



**CARACTERIZACIÓN CELULAR Y MOLECULAR DE LA
SIALILTRANSFERASA ST3GAL-II. ROL DEL DISIALOGLIÓSIDO
GD1a EN LA UNIÓN Y ENDOCITOSIS DE ANTICUERPOS ASOCIADOS
A NEUROPATOLOGÍAS EXPERIMENTALES**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
POR

BIOQ. FERNANDO MIGUEL RUGGIERO

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA
CIQUIBIC (UNC-CONICET)
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

MARZO 20, 2017

CÓRDOBA, ARGENTINA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ L. DANIOTTI

COMISIÓN DE TESIS:

DRA. CECILIA I. ÁLVAREZ

DR. FERNANDO J. IRAZOQUI

DR. GABRIEL R. CUADRA

EVALUADORA EXTERNA:

DRA. CECILIA D'ALESSIO

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a realizar este trabajo de tesis:

- A mis padres Carlos y Raquel, que me educaron en el camino del trabajo, el sacrificio y la honestidad. Nada hubiera logrado sin ustedes, Gracias viejos!!
- A mi hermano Julián. Además de ser mi mejor amigo es un ejemplo de vida, de lucha y de esfuerzo.
- A mi compañera de vida Carina, que estuvo siempre a mi lado brindándome su apoyo incondicional y contagiándome día a día su entusiasmo y perseverancia.
- Al Dr. José Luis Daniotti, por brindarme su confianza y permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. Por su constante incentivo y pasión por la ciencia.
- Al Dr. Gerardo Fidelio por guiar mis primeros pasos en la vida universitaria.
- Al Dr. Gustavo Chiabrando y la Dra. Cecilia Sánchez que me abrieron las puertas de su laboratorio para realizar mis primeros pasos en el maravilloso mundo de la ciencia, así como también a los miembros de su laboratorio Javier, Pablo, Darío y Vale.
- A las autoridades del CIQUIBIC y del Departamento de Química Biológica.
- A la Dra. Cecilia Álvarez, Dr. Fernando Irazoqui y Dr. Gabriel Cuadra, miembros de mi Comisión de Tesis por sus constantes aportes al trabajo realizado, desde cada reunión anual hasta las instancias finales.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por el apoyo económico brindado a través de sus programas de becas.
- A mis compañeros de laboratorio: Ale, Pili, Maca y Vani.
- Al Dr. Carlos Mas, Dra. Cecilia Sampedro, Susana Deza y Gabriela Schachner por la excelente asistencia técnica brindada.
- A los miembros del CIQUIBIC por su ayuda y colaboración desinteresada.
- A mis amigos, los hermanos que la vida te regala, muchas gracias por estar siempre.

“Pienso que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico, es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”.

Marie Curie.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	4
ÍNDICE GENERAL	7
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ABREVIATURAS	12
RESUMEN	15
SUMMARY	18
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	22
GANGLIÓSIDOS: GENERALIDADES	23
Estructura	23
Nomenclatura	24
Localización y metabolismo	25
Regulación de la expresión y actividad de glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de gangliósidos.....	29
ROL DE LOS GANGLIÓSIDOS EN PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS	32
Evidencias por su distribución diferencial en tejidos	32
Evidencias de experimentos <i>in vitro</i>	33
Descubrimientos en animales modificados genéticamente y en humanos con enfermedades relacionadas a la síntesis de gangliósidos	34
Rol de los gangliósidos en transformación oncogénica, sobrevida tumoral y evasión del sistema inmune	36
Anticuerpos anti-glicoesfingolípidos en terapia antitumoral	38
Anticuerpos anti-glicoesfingolípidos en neuropatías periféricas	40
OBJETIVOS	43
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN SUBCELULAR, ESTADO DE N-GLICOSILACIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> DE LA SIALILTRANSFERASA HUMANA ST3GAL-II	45
INTRODUCCIÓN	46
RESULTADOS	50
Expresión de ST3Gal-II en células CHO-K1	50

Localización subcelular y sub-Golgi de ST3Gal-II en células CHO-K1	51
Localización subcelular de ST3Gal-II en respuesta al tratamiento con brefeldina A	52
Localización subcelular y expresión de ST3Gal-II en respuesta al tratamiento con tunicamicina y castanospermina.....	53
El estado de N-glicosilación de ST3Gal-II afecta su localización subcelular	56
Análisis del estado de N-glicosilación de ST3Gal-II mediante la digestión <i>in vitro</i> con PNGasa F	57
Estado de procesamiento del N-glicano. Digestión <i>in vitro</i> con endoglicosidasa H	58
El estado de N-glicosilación de ST3Gal-II influencia su actividad enzimática <i>in vitro</i>	59
La región N-terminal, no glicosilada, de ST3Gal-II dirige su localización hacia el complejo de Golgi	60
Rol del residuo cisteína del dominio citoplasmático en la dimerización y transporte intracelular de ST3Gal-II.....	62
DISCUSIÓN	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69
Plásmidos y mutagénesis sitio dirigida.....	69
Anticuerpos	69
Cultivo celular y transfección	69
Microscopía confocal.....	70
Inhibición de la N-glicosilación y del remodelado del oligosacárido	70
Digestiones con Endo H y PNGasa F	70
Ensayos de actividad enzimática	71
Western blot	71
Análisis estadístico.....	72
CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN Y DESTINO CELULAR DE ANTICUERPOS QUE RECONOCEN LOS GANGLIÓSIDOS GD1A Y GM1	74
INTRODUCCIÓN	75
RESULTADOS	76
El anticuerpo Ab1-GD1a se une específicamente a GD1a localizado en la membrana plasmática de células CHO-K1 y una fracción minoritaria es internalizada	76
La fracción de Ab1-GD1a internalizada colocaliza con marcadores de endosomas de reciclado pero no con una proteína residente del complejo de Golgi	78

La endocitosis de Ab1-GD1a es un proceso dinamina 2 independiente y Arf6 dependiente	79
Ab1-GD1a permanece asociado a la membrana plasmática a 16°C	83
Caracterización de la unión y el destino intracelular de dos anticuerpos que reconocen GD1a en células CHO-K1	87
Caracterización de la unión a membrana y el destino celular de Ab2-GD1a en células derivadas de neuroblastoma	90
Un anticuerpo monoclonal que reconoce el gangliósido GM1 muestra un comportamiento diferente al de los anticuerpos que unen GD1a en células epiteliales y neuronales	91
DISCUSIÓN	93
MATERIALES Y MÉTODOS	98
Anticuerpos y plásmidos.....	98
Cultivo celular y transfección	98
Marcación celular y ensayos de internalización	99
Microscopía confocal.....	99
Microscopía confocal <i>in vivo</i> (time-lapse).....	99
Ensayos fluorimétricos	100
Otros procedimientos experimentales	100
Análisis estadístico.....	100
REFERENCIAS	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1. Estructura y composición de los gangliósidos de la serie a, b y c.....	24
Figura I-2 Topología y dominios comunes de las glicosiltransferasas de gangliósidos.....	28
Figura I-3 Esquema de biosíntesis de los gangliósidos	29
Figura II-1. N-glicosilación, plegamiento de glicoproteínas y control de calidad en el RE...	47
Figura II-2. Análisis de los sitios de N-glicosilación en ST3Gal-II.....	49
Figura II-3. Expresión de ST3Gal-II humana en células CHO-K1	50
Figura II-4. Expresión y colocalización de ST3Gal-II con marcadores del complejo de Golgi	51
Figura II-5. Efecto de brefeldina A (BFA) en la localización subcelular de ST3Gal-II.....	53
Figura II-6. Efecto de tunicamicina y castanospermina en la localización subcelular, N-glicosilación y homoasociación de ST3Gal-II	55
Figura II-7. Efecto de tunicamicina y castanospermina en la distribución subcelular de GM130	56
Figura II-8. Expresión y localización subcelular de ST3Gal-II salvaje y sus mutantes de N-glicosilación	57
Figura II-9. Digestión de ST3Gal-II con PNGasa F.....	58
Figura II-10. Digestión de ST3Gal-II con Endoglicosidasa H (Endo H)	59
Figura II-11. Efecto de la N-glicosilación en la actividad enzimática de ST3Gal-II in vitro	60
Figura II-12. El dominio N-terminal (amino ácidos 1–51) de ST3Gal-II dirige la localización en el complejo de Golgi de una proteína fluorescente	61
Figura II-13. Expresión de WT-ST3Gal-II- ¹⁻⁵¹ -mCherry en células CHO-K1	62
Figura II-14. Sustitución de cisteína por alanina en el dominio citoplasmático (MKCSLR) de ST3Gal-II- ¹⁻⁵¹ -mCherry no afecta su localización subcelular pero previene su dimerización	63
Figura II-15. ST3Gal-II- ¹⁻⁵¹ -mCherry rescata parcialmente a ST3Gal-II-N92Q,N211Q del retículo endoplásmico	64

Figura III-1. Unión a la superficie de células CHO-K1 ^{GD1a/GM1+} y endocitosis de Ab1-GD1a, un anticuerpo monoclonal que reconoce los gangliósidos GD1a y GT1a α	77
Figura III-2. Localización subcelular de la fracción endocitada de Ab1-GD1a en células CHO-K1 ^{GD1a/GM1+}	78
Figura III-3. La endocitosis de Ab1-GD1a es independiente de dinamina 2.....	80
Figura III-4. La endocitosis de Ab1-GD1a es dependiente de Arf6.....	82
Figura III-5. Unión a membrana plasmática y destino celular diferencial de Ab1-GD1a y transferrina en células CHO-K1 ^{GD1a/GM1+} a 16°C.....	84
Figura III-6. Control de permeabilización.....	85
Figura III-7. Endocitosis y destino celular de Ab1-GD1a a diferentes temperaturas evaluado mediante microscopía confocal in vivo (time-lapse).....	86
Figura III-8. Ab1-GD1a es recuperado en el medio de cultivo a 37°C pero no a 16°C.....	87
Figura III-9. Unión a la superficie celular y destino de un anticuerpo monoclonal contra los gangliósidos GD1a/GT1b/GT1a α (Ab2-GD1a) en células CHO-K1 ^(GD1a/GM1+)	88
Figura III-10. Ab2-GD1a es acumulado en células CHO-K1 que expresan Arf6 Q67L y su endocitosis disminuye en células que expresan Arf6 T27N.....	89
Figura III-11. Unión a la superficie celular y destino de un anticuerpo monoclonal contra los gangliósidos GD1a/GT1b/GT1a α (Ab2-GD1a) en células Neuro-2a.....	90
Figura III-12. Unión a superficie celular y destino de un anticuerpo monoclonal contra el gangliósido GM1 (Ab2-GM1) en células CHO-K1 ^{GD1a/GM1+} y células Neuro-2a	92
Figura III-13. Representación esquemática del destino y procesamiento celular de diferentes anticuerpos anti-gangliósidos en células CHO-K1	94

ABREVIATURAS

- ⁴⁸⁸**Anti-IgG**: anti IgG de ratón/conejo producido en cabra y conjugado a Alexa Fluor⁴⁸⁸
- ⁵⁴⁶**Anti-IgG**: anti IgG de ratón/conejo producido en cabra y conjugado a Alexa Fluor⁵⁴⁶
- Ab1-GD1a**: anticuerpo que reconoce los gangliósidos GD1a y GT1b de isotipo IgG1
- ⁵⁶⁸**Ab1-GD1a**: Ab1-GD1a unido covalentemente a la molécula fluorescente Alexa Fluor 568
- Ab2- GD1a**: anticuerpo que reconoce los gangliósidos GD1a, GT1b y GT1α de isotipo IgG2b
- Ab2-GM1**: anticuerpo que reconoce el gangliósido GM1 de isotipo IgG2b
- ADCC**: citotoxicidad celular mediada por anticuerpo
- AGAb**: anticuerpo anti-gangliósido
- AMAN**: neuropatía axonal motora aguda
- ARF6**: factor de ribosilación de ADP 6
- BFA**: brefeldina A
- BSA**: albúmina sérica bovina
- CDC**: citotoxicidad dependiente de complemento
- Cer**: ceramida
- CERT**: proteína transferidora de ceramida
- CFP**: proteína fluorescente cian
- DMEM**: medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
- EEM**: error estándar de la media
- FAPP2**: proteína adaptadora de cuatro fosfatos transportadora de lípidos
- Gal**: galactosa
- GalNAc**: N-Acetil galactosamina
- GFP**: proteína fluorescente verde
- Glc**: glucosa
- GlcCer**: glucosilceramida
- GlcNAc**: N-Acetil glucosamina
- GM130**: proteína de la matriz de cis-Golgi de 130 kDa
- GM-CSF**: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
- GSLs**: glicosfingolípidos
- Iip33**: cadena invariante del complejo mayor de histocompatibilidad II
- LacCer**: lactosilceramida
- M6PR**: receptor de manosa 6-fosfato

Man: manosa

mCherry: proteína fluorescente cherry

NeuAc: ácido N-Acetilneuramínico

NeuGc: ácido N-Glicolilneuramínico

NtD: dominio N-terminal

PBS: buffer fosfato salino

PIP2: fosfatidil inositol (4,5) bifosfato

MPT: modificación postraducciona

RE: retículo endoplásmico

SFB: suero fetal bovino

SGB: síndrome de Guillain-Barré

ST3Gal-II: CMP-NeuAc:GA1/GM1/GD1b/GT1c sialiltransferasa (GM1b/GD1a/GT1b/GQ1b sintasa)

ST3Gal-V: CMP-NeuAc:lactosilceramida sialiltransferasa (GM3 sintasa)

ST8Sia-I: CMP-NeuAc:GM3 sialiltransferasa y CMP-NeuAc:GD3 sialiltransferasa (GD3/GT3 sintasa)

ST8Sia-V: CMP-NeuAc:GM1b/GD1a/GT1b/GQ1c sialiltransferasa y CMP-NeuAc:GD3 sialiltransferasa (GT3/GD1c/GT1a/GQ1b/GP1c sintasa)

TGN: red del trans-Golgi

UGCG: UDP-Glc:ceramida glucosiltransferasa (GlcCer sintasa)

UGGT: UDP-Glc:glicoprotein glucosiltransferasa

YFP: proteína fluorescente amarilla

β3GalT-IV: UDP-Gal: GA2/GM2/GD2/GT2 galactosiltransferasa (GA1/GM1/GD1b/GT1c sintasa)

β4GalNAcT-I: UDP-GalNAc:lactosilceramida/GM3/GD3/GT3 N-acetilgalactosaminiltransferasa (GA2/GM2/GD2/GT2 sintasa)

β4GalT-VI: UDP-Gal:glucosilceramida galactosiltransferasa (LacCer sintasa)

βME: 2-mercaptoetanol

RESUMEN

Los gangliósidos, una gran familia de glicosfingolípidos ácidos, se componen de un segmento hidrofóbico, la ceramida, y un oligosacárido mono o polisialilado de longitud y composición variable. En las células, los gangliósidos se encuentran principalmente en la hemicapa externa de la membrana plasmática a la cual se insertan a través del residuo ceramida exponiendo el oligosacárido hacia el medioambiente extracelular. Estos glicolípidos han sido implicados en numerosos procesos fisiológicos que incluyen, crecimiento, diferenciación, migración y apoptosis entre otros, a través de la modulación de la actividad de receptores de membrana y de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Además de su rol fisiológico, los gangliósidos también han sido asociados a un amplio espectro de procesos patológicos siendo receptores de virus, toxinas, lectinas y anticuerpos.

Durante el presente trabajo de tesis se abordó el estudio de la unión y comportamiento endocítico de diferentes anticuerpos anti-glicolípidos (AGAb), particularmente de inmunoglobulinas que reconocen a los gangliósidos GD1a y GM1 en varias líneas celulares en cultivo. En primera instancia se caracterizó la unión, endocitosis y destino intracelular de diferentes anticuerpos monoclonales de isotipo IgG que unen con alta afinidad al gangliósido GD1a en células epiteliales derivadas de ovario de hámster chino (CHO-K1) y en células derivadas de neuroblastoma murino (Neuro-2a). Luego de unirse a membrana plasmática, una fracción minoritaria de un anticuerpo anti-GD1a (Ab1-GD1a) fue rápidamente endocitada a 37°C en células epiteliales mediante un mecanismo independiente de dinamina-2 y dependiente de Arf-6 colocalizando en una región yuxtannuclear principalmente con marcadores de endosomas de reciclado. Mientras que la cantidad asociada a la fracción celular fue mínima (20-25%) una fracción mayoritaria del anticuerpo inicialmente unida a membrana plasmática, fue recuperada en el medio de cultivo. Este anticuerpo permaneció principalmente localizado en la superficie celular en experimentos de endocitosis a 16°C, contrastando con la eficiente endocitosis de la proteína transferrina y de otro complejo gangliósido-anticuerpo (GD3-R24) a esta temperatura. Esta evidencia experimental sugiere la presencia de mecanismos selectivos de internalización celular de complejos gangliósidos-anticuerpos.

Para determinar si la unión a membrana, endocitosis y destino intracelular es una característica compartida por los anticuerpos anti-GD1a, se incluyó en el estudio otro anticuerpo monoclonal anti-GD1a de diferente isotipo (Ab2-GD1a). Los resultados obtenidos muestran una mínima endocitosis de este anticuerpo en células epiteliales que involucra un mecanismo

dependiente de Arf-6, junto con una drástica y rápida reducción de los niveles totales de Ab2-GD1a y localización del anticuerpo endocitado en una región yuxtannuclear. Esto indica un comportamiento comparable de ambos anticuerpos que reconocen GD1a sugiriendo que comparten procesos similares de unión y endocitosis en células epiteliales.

Ab2-GD1a se une eficientemente a la superficie de células derivadas de neuroblastoma y se registra un moderado descenso de los niveles totales del anticuerpo comparado con la drástica reducción observada en las células epiteliales. Esto sugiere que el procesamiento endocítico de los anticuerpos anti-GD1a analizados también depende del tipo celular. Los estudios de unión y endocitosis fueron también investigados para un anticuerpo monoclonal contra el gangliósido GM1 (Ab2-GM1). Este anticuerpo se unió eficientemente a la membrana plasmática de células CHO-K1 y una fracción mayoritaria (60-70%) fue rápidamente endocitada a 37°C y acumulada en un compartimiento yuxtannuclear contrastando con la mínima endocitosis descrita para los anticuerpos que reconocen GD1a. Además, los niveles de Ab2-GM1 permanecieron inalterados y principalmente asociados a la membrana plasmática cuando los experimentos de endocitosis se realizaron a 37°C en células Neuro-2a, contrastando con lo observado para los anticuerpos anti-GD1a en esta línea celular. Por lo tanto, se observó que bajo idénticas condiciones experimentales, el tiempo de residencia en membrana plasmática y la fracción endocitada de anticuerpos anti-GD1a y anti-GM1 fueron notoriamente diferentes.

En su conjunto, los datos experimentales sugieren que el comportamiento endocítico y procesamiento celular de cada anticuerpo anti-gangliósido puede variar en función del tipo de anticuerpo y del tipo celular, lo cual representa un aspecto clave a considerar en el estudio de sus roles patogénicos en neuropatías así como también en su uso como herramientas terapéuticas.

Los gangliósidos son sintetizados por un conjunto de enzimas glicosiltransferasas y sialiltransferasas residentes de retículo endoplásmico (RE) y del complejo de Golgi. Estas enzimas, en muchos casos organizadas como complejos multienzimáticos, utilizan como sustrato de partida ceramida (Cer) e incorporan monosacáridos de forma secuencial de manera que el producto de una enzima es sustrato de la siguiente en la vía biosintética (Fig. I-1). Como parte de este trabajo de tesis se caracterizó por primera vez la expresión, localización subcelular y modificaciones postraduccionales de la sialiltransferasa humana ST3Gal-II. Ésta es la principal enzima responsable de la biosíntesis *in vivo* del gangliósido GD1a a partir de GM1, ambos gangliósidos blanco de los anticuerpos anti-glicolípidos estudiados en la segunda parte de esta tesis.

ST3Gal-II es una proteína transmembrana tipo-II con un corto segmento citoplasmático N-terminal, un fragmento transmembrana y un gran dominio C-terminal orientado hacia el lumen del complejo de Golgi que contiene el sitio catalítico. La secuencia primaria de aminoácidos revela dos sitios potenciales de N-glicosilación, asparagina 92 y asparagina 211 (Asn92 y Asn211). Mediante ensayos bioquímicos, farmacológicos, de microscopía confocal y mutagénesis sitio dirigida se caracterizó la expresión, localización subcelular, ocupación y relevancia de los sitios de N-glicosilación en la localización y actividad *in vitro* de la enzima. ST3Gal-II se localiza en el complejo de Golgi de células CHO-K1 con predominio en compartimientos proximales y se expresa en similar proporción de monómero y dímero sensible al tratamiento con agentes reductores. La enzima se encuentra N-glicosilada principalmente en Asn211 y el glicano no es del tipo complejo, sino que contiene una alta proporción de residuos de manosa. La presencia del N-glicano en dicha posición es necesaria para la salida de la enzima del RE y su transporte y localización en el complejo de Golgi. La carencia del N-glicano en posición 211 influencia de manera negativa la actividad sialiltransferasa *in vitro* utilizando como aceptor un gangliósido (GM1) o una glicoproteína (asialofetaina), mientras que la falta del mismo en la posición 92 no afecta la actividad hacia la glicoproteína e influencia de manera positiva la actividad hacia el gangliósido.

Una versión quimérica conteniendo el dominio N-terminal (NtD) de ST3Gal-II (aminoácidos 1-51) fusionada a la proteína fluorescente mCherry (ST3Gal-II-1-51-mCherry) se expresa en células CHO-K1 y se localiza en el complejo de Golgi. Esto sugiere que el NtD es necesario para el transporte desde el RE y retención de ST3Gal-II en el complejo de Golgi. Además, indicaría que el dominio C-terminal de ST3Gal-II depende de la N-glicosilación para alcanzar un estado conformacional óptimo de plegamiento que le permita salir del RE para localizarse adecuadamente en el aparato de Golgi, probablemente como un requerimiento del control de calidad de plegamiento de proteínas en RE, pero no sería un requerimiento excluyente para la retención de la enzima en el complejo de Golgi. Asimismo, el residuo cisteína presente en el NtD de ST3Gal-II tendría un rol en la formación y estabilización de la forma dimérica.

SUMMARY

Gangliosides are composed of a hydrophobic moiety, the ceramide, and a mono or polysialylated oligosaccharide of variable length and composition. Gangliosides are mainly found in the outer leaflet of the plasma membrane of cells, to which they are embedded through the ceramide residue exposing the oligosaccharide to the extracellular environment. These glycolipids have been implicated in many physiological processes including, growth, differentiation, migration and apoptosis among others, through the modulation of the activity of membrane receptors and cell-cell and extracellular matrix-cell interactions. In addition to their physiological role, gangliosides have also been associated with a wide spectrum of pathological processes being receptors for viruses, toxins, lectins and antibodies.

During the present thesis, the binding and endocytic behavior of different anti-glycolipid antibodies (AGAb), particularly immunoglobulins that recognize gangliosides GD1a and GM1 in several cell lines in culture, were studied. First, the binding, endocytosis and intracellular fate of different IgG isotype monoclonal antibodies that bind with high affinity to GD1a ganglioside in Chinese hamster ovary (CHO-K1) derived epithelial cells and cells derived from murine neuroblastoma (Neuro -2a) were characterized. After binding to plasma membrane, a minor fraction of an anti-GD1a antibody (Ab1-GD1a) was rapidly endocytosed at 37°C in epithelial cells by a dynamin 2 independent and Arf-6 dependent mechanism, colocalizing in a juxtannuclear region with recycling endosome markers. While the amount of antibody associated with the cell fraction was minimal (20-25%) a major fraction of the initially bound antibody was recovered in the culture medium. On the other hand, this antibody remained located on the plasma membrane in experiments performed at 16°C, contrasting with the efficient endocytosis of transferrin and other ganglioside-antibody complex (GD3-R24) at this temperature. This experimental evidence suggests the presence of selective mechanisms of cellular internalization of ganglioside-antibody complexes.

To determine if membrane binding, endocytosis and intracellular fate is a common feature shared by anti-GD1a antibodies, another anti-GD1a monoclonal antibody of different isotype (Ab2-GD1a) was included in the study. Results show a minimal endocytosis of this antibody in epithelial cells involving an Arf-6-dependent mechanism with a drastic and rapid reduction of total levels of Ab2-GD1a and localization of the endocytosed antibody in a juxtannuclear region. These results indicate a comparable behavior of both anti-GD1a antibodies

suggesting they share similar processes of binding and endocytosis and cellular fate in epithelial cells.

Ab2-GD1a binds efficiently to neuroblastoma-derived cells surface and there is a moderate decrease in total antibody levels compared to the drastic reduction observed in epithelial cells. This suggests that the endocytic processing of the anti-GD1a antibodies analyzed also depends on the cell type. Binding and endocytosis studies were also investigated for a monoclonal antibody to ganglioside GM1 (Ab2-GM1). This antibody efficiently bound to the plasma membrane of CHO-K1 cells and a major fraction (60-70%) was rapidly endocytosed at 37°C and accumulated in a juxtannuclear compartment, contrasting with the minimal endocytosis described for antibodies recognizing GD1a ganglioside. In addition, Ab2-GM1 levels remained unchanged and mainly associated with the plasma membrane when endocytosis experiments were performed at the same temperature on Neuro-2a cells. Therefore, it was observed that under identical experimental conditions, the plasma membrane residence time and the endocytosed fraction of anti-GD1a and anti-GM1 antibodies were notoriously different.

Together, the experimental data suggest that the endocytic behavior and cellular processing of each anti-ganglioside antibody may vary depending on the antibody and the cell type, which is a key aspect to consider in the study of their pathogenic roles in neuropathies as well as in their use as therapeutic tools.

Gangliosides are synthesized by endoplasmic reticulum (ER) and Golgi complex resident glycosyltransferases and sialyltransferases. These enzymes, in many cases organized as multienzymatic complexes, use ceramide (Cer) as the initial substrate and catalyze the sequential addition of monosaccharides so that the product of one enzyme is the substrate of the following one in the biosynthetic pathway (Fig. I-1). As part of this thesis, the expression, subcellular localization and posttranslational modifications of human sialyltransferase ST3Gal-II was characterized for the first time. This is the main enzyme responsible for the *in vivo* biosynthesis of ganglioside GD1a from GM1; both gangliosides are molecular targets of the anti-glycolipid antibodies studied in the second part of this thesis.

ST3Gal-II is a type-II transmembrane protein with a short N-terminal cytoplasmic tail, a transmembrane region and a large lumenally oriented C-terminal domain that contains the catalytic site. The primary amino acid sequence reveals two potential N-glycosylation sites, asparagine 92 and asparagine 211 (Asn92 and Asn211). By means of biochemical, pharmacological, confocal microscopy and site-directed mutagenesis assays we characterized the expression, subcellular localization, occupancy and relevance of these N-glycosylation sites

on the *in vitro* localization and activity of the enzyme. ST3Gal-II was localized at the Golgi complex of CHO-K1 cells with predominance in proximal compartments and was expressed in a similar proportion of monomer and dimer sensitive to treatment with reducing agents. The enzyme is mainly N-glycosylated at Asn211 and the glycan is not of the complex type, but contains a high proportion of mannose residues. The presence of the N-glycan at Asn211 is required for the enzyme to leave the ER and its trafficking and localization at the Golgi complex. *In vitro* sialyltransferase activity was negatively influenced by the absence of glycosylation at Asn211 when a ganglioside (GM1) or a glycoprotein (asialofetuin) was used as acceptor substrates. On the other hand, the lack of N-glycan at Asn92 did not affect the sialyltransferase activity towards the glycoprotein but influenced the activity towards the ganglioside in a positive way.

A chimeric version containing the N-terminal domain (NtD) of ST3Gal-II (amino acids 1-51) fused to the fluorescent protein mCherry (ST3Gal-II-1-51-mCherry) was expressed in CHO-K1 cells and was located at the Golgi complex. This suggests that the NtD is required for the transport of ST3Gal-II from the ER and its retention at the Golgi complex. It would also indicate that the C-terminal domain of ST3Gal-II depends on N-glycosylation to achieve an optimal folding state that allows it to exit the ER and to be properly located at the Golgi apparatus. This probably is a requirement of the quality control of protein folding in the ER but would not be an exclusive requirement for retention of the enzyme at the Golgi complex. Finally, the cysteine residue present at the cytoplasmic tail of ST3Gal-II would have a role in the formation and stabilization of the dimeric form.

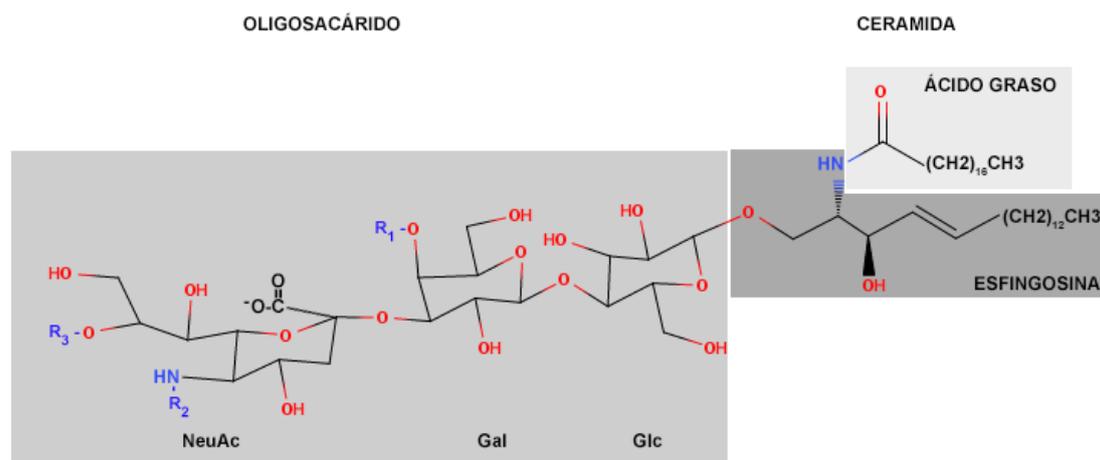
**CAPÍTULO I:
INTRODUCCIÓN**

GANGLIÓSIDOS: GENERALIDADES

Estructura

Junto con los glicosaminoglicanos y las glicoproteínas, los glicoesfingolípidos (GSLs) son parte del glicocálix que cubre la superficie de casi todas las células eucariotas. Algunos GSLs de mamíferos derivan de galactosilceramida (GalCer) y constituyen la serie-gala de GSLs. Sin embargo, la mayoría de los GSLs derivan de glucosilceramida (GlcCer) y constituyen tres series mayoritarias: ganglio, lacto y neolacto y globo e isoglobo (Yu et al. 2007). Los gangliósidos constituyen una gran familia de GSLs ácidos y consisten de una porción lipídica, la ceramida, unida a un oligosacárido de longitud y composición variable con presencia de una o más unidades de ácido siálico (Kolter 2012). La lactosilceramida (Gal(β 1,4)Glc(β 1-1')Cer) es el precursor común de todos los gangliósidos. A esta estructura central se pueden unir otros monosacáridos como N-Acetilgalactosamina (GalNAc), galactosa (Gal) y ácido siálico en un orden y tipo de unión definido dando lugar a un gran repertorio de gangliósidos (Fig. I-1). Los gangliósidos se caracterizan por poseer carga neta negativa a pH fisiológico otorgado por una o más moléculas de ácido siálico en su estructura. El ácido siálico es un monosacárido de nueve átomos de carbono y se dispone típicamente en las porciones terminales de los oligosacáridos de glicoproteínas y glicolípidos. Se han descrito cerca de 50 tipos diferentes de ácido siálico (Angata and Varki 2002; Schauer 2004). Sin embargo, el ácido N-Acetilneuramínico (NeuAc) es el que más frecuentemente se encuentra formando parte de los gangliósidos en humanos.

La heterogeneidad que presentan estos glicolípidos no se halla restringida al oligosacárido, sino que también está presente en el residuo ceramida. En los animales superiores, la ceramida se compone principalmente de esfingosina (un amino alcohol de 18-20 átomos de carbono) unido mediante enlace amida a un ácido graso que generalmente se halla en su forma saturada y posee un largo de cadena de 16 (palmítico) o 18 (esteárico) átomos de carbono. Esta diversidad en el componente lipídico de los gangliósidos puede tener consecuencias funcionales. Por ejemplo, el transporte retrogrado de toxina colérica desde membrana plasmática hacia la red del trans-Golgi (TGN) y el retículo endoplásmico (RE) (eventos necesarios para que la toxina acceda al citoplasma celular y medie sus efectos citotóxicos) ocurre solo luego de unir en membrana plasmática moléculas del gangliósido GM1 que posean cadenas de ácido graso insaturadas en su porción ceramida (Chinnapen et al. 2012).



Serie	Gangliosido	R1	R2	R3
a	GM3	H	COCH ₃	H
	GM2	GalNAc(β1-4)	COCH ₃	H
	GM1	Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)	COCH ₃	H
	GD1a	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)	COCH ₃	H
	GT1a	NeuAc(α2-8)NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)	COCH ₃	H
b	GD3	H	COCH ₃	NeuAc(α2-8)
	GD2	GalNAc(β1-4)	COCH ₃	NeuAc(α2-8)
	GD1b	Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)	COCH ₃	NeuAc(α2-8)
	GT1b	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)	COCH ₃	NeuAc(α2-8)
	GQ1b	NeuAc(α2-8)NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)	COCH ₃	NeuAc(α2-8)
c	GT3	H	COCH ₃	NeuAc(α2-8)NeuAc(α2-8)
	GT2	GalNAc(β1-4)	COCH ₃	NeuAc(α2-8)NeuAc(α2-8)
	GT1c	Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)	COCH ₃	NeuAc(α2-8)NeuAc(α2-8)
	GQ1c	NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)	COCH ₃	NeuAc(α2-8)NeuAc(α2-8)
	GP1c	NeuAc(α2-8)NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc(β1-4)	COCH ₃	NeuAc(α2-8)NeuAc(α2-8)
	N-glicolil-GM3	H	COCH ₂ OH	H

Figura I-1. Estructura y composición de los gangliosidos de la serie a, b y c

Glc: glucosa; Gal: galactosa; GalNAc: N-Acetilgalactosamina; NeuAc: Ácido N-Acetilneuramínico

Nomenclatura

La nomenclatura más frecuentemente utilizada para referirse a los gangliosidos y que especifica la composición del oligosacárido presente en estos glicolípidos fue propuesta por Svennerholm basada inicialmente en el orden en el que migraban los principales gangliosidos de cerebro humano en una cromatografía (Svennerholm 1963) y posteriormente fue expandida a otras estructuras (Svennerholm 1980; Svennerholm 1994). Una nomenclatura que utiliza el sistema IUPAC (Chester 1997) es menos frecuentemente utilizada. De acuerdo a la nomenclatura de Svennerholm, los nombres contienen información de la serie (“G” = gangliosido), el número de ácidos siálico (“M” = 1, “D” = 2, “T” = 3, “Q” = 4, “P” = 5) e

indirectamente el número de carbohidratos neutros, el cual es siempre menor a 5. De esta manera el nombre “GD3” indica que es un gangliósido que contiene 2 ácidos siálico y (5 – “3” = 2) azúcares neutros. Además los gangliósidos se caracterizan por contener una, dos o varias moléculas de ácido siálico unidas en enlace α 2,3 al residuo galactosa “interno” o “externo” y en enlace α 2,8 a otros ácidos siálico, razón por la cual se los agrupa en series “a, b y c” según posean 1, 2 o 3 moléculas de ácido siálico unidas a la galactosa interna respectivamente. Esto permite distinguir entre diferentes estructuras que poseen la misma cantidad de siálico en su composición como los gangliósidos GT1a, GT1b y GT1c. (Fig. I-1).

Localización y metabolismo

Los gangliósidos se encuentran principalmente enriquecidos en el sistema nervioso donde constituyen entre un 10-12% del contenido lipídico total. A nivel subcelular, la mayor parte de los gangliósidos residen en la hemicapa externa de la membrana plasmática donde contribuyen entre un 20-25% de los lípidos en esta localización (Tettamanti 2004). También se pueden encontrar gangliósidos en membranas de organelas como el núcleo, donde tienen un rol en el balance celular de Ca^{2+} (Ledeen and Wu 2006; Ledeen and Wu 2011) y en mitocondrias donde regularían el proceso apoptótico (Garofalo et al. 2007). También se expresan, aunque en cantidades inferiores, en tejidos extraneurales (uno a dos órdenes de magnitud menor que en el sistema nervioso) y son transportados en suero unidos a lipoproteínas (Senn et al. 1989). Los niveles y patrones de expresión de gangliósidos dependen del estadio del desarrollo (Dreyfus et al. 1975; Panzetta et al. 1983; Yu et al. 1988; Yu 1994) y principalmente de la actividad de glicosiltransferasas que regulan su síntesis y que varían a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo (Panzetta et al. 1980; Cortassa et al. 1984; Maccioni et al. 1984a; Maccioni et al. 1984b; Daniotti et al. 1991). Un ejemplo lo constituye el cambio en el patrón de expresión de gangliósidos simples como GM3 y GD3 a gangliósidos más complejos como GM1, GD1a y GT1b durante el desarrollo del SNC (Dreyfus et al. 1980; Irwin et al. 1980; Panzetta et al. 1980; Rosner 1982; Cortassa et al. 1984; Maccioni et al. 1984b; Panzetta et al. 1987; Yu et al. 2009)

La síntesis *de novo* de gangliósidos comienza con la producción de ceramida en la hemicapa citoplasmática del RE por acción de la enzima ceramida sintasa que cataliza la formación de un enlace amida entre esfingosina y un ácido graso. La ceramida es luego transferida en parte hacia TGN por transporte no vesicular mediado por la proteína transferidora de ceramida (CERT) (Hanada et al. 2003), una proteína que posee un dominio con capacidad de unir fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) en TGN y un dominio que media su unión a la proteína VAP

de RE (D'Angelo et al. 2008). Sin embargo, este transporte mediado por CERT tendría un aporte mínimo en la síntesis de GlcCer, por lo tanto de gangliósidos, y contribuiría principalmente en la síntesis de esfingomielina en el lumen de la organela (Fukasawa et al. 1999; Funakoshi et al. 2000; Hanada et al. 2003). Esta evidencia se contrapone con la reportada en otro trabajo más reciente donde señalan que CERT también podría transportar ceramida a TGN para ser utilizada en la síntesis de GlcCer (Halter et al. 2007). Lo que sí está claro es que en la hemicapa citoplasmática de RE y complejo de Golgi se localiza la enzima UDP-Glc:ceramida glucosiltransferasa (UGCG) la cual cataliza la transferencia de glucosa desde UDP-Glc hacia ceramida para producir GlcCer, el primer intermediario glicosilado en la vía de síntesis de glicoesfingolípidos. Esta enzima presenta una topología diferente al resto de las glucosiltransferasas de gangliósidos ya que es una proteína de membrana tipo III y su dominio C-terminal, que contiene el sitio catalítico, está orientado hacia el citoplasma. De esta manera la síntesis de GlcCer es llevada a cabo en la hemicapa citosólica de estas membranas (Coste et al. 1986; Futerman and Pagano 1991; Marks et al. 1999; Kohyama-Koganeya et al. 2004; Crespo et al. 2008). Las demás glucosiltransferasas de gangliósidos de vertebrados son proteínas de membrana tipo II que se caracterizan por poseer dominios estructurales comunes: una región N-terminal citoplasmática corta (6-30 aminoácidos) crítica para la salida de las mismas del RE y su concentración en el complejo de Golgi (Giraud and Maccioni 2003), un dominio señal de anclaje de entre 16-22 aminoácidos que actúa como un péptido señal no escindible y como una región transmembrana que determina su localización en el complejo de Golgi (Quiroga et al. 2013) y que orienta la región espaciadora y el gran dominio C-terminal (que alberga el sitio catalítico y los sitios de unión a los sustratos donador y aceptor (Taniguchi et al. 2002)) hacia el lumen del complejo de Golgi (Paulson and Colley 1989) (Fig. I-2). Por lo tanto, luego de su síntesis, GlcCer debe ser trastocada hacia el lumen del complejo de Golgi para ser utilizada como sustrato en la síntesis de gangliósidos, proceso mediado por actividad flipasa (Chalat et al. 2012). Los sitios exactos de translocación y la dirección en la que GlcCer es transportada en la célula son controversiales. Inicialmente se propuso que un mecanismo de transporte no vesicular mediado por FAPP2 (proteína adaptadora de cuatro fosfatos transportadora de lípidos, que posee un dominio de unión a GlcCer y otro de unión a PI4P y Arf1 (Godi et al. 2004)) transporta de manera retrógrada GlcCer sintetizada en Golgi hacia el RE donde es translocada al lumen y luego transportada nuevamente al Golgi donde podrá ser glicosilada (Halter et al. 2007). Por otro lado, evidencia experimental reciente sugiere que dos mecanismos de transporte diferentes intervienen en el destino subcelular de GlcCer (D'Angelo et al. 2013). Un mecanismo de transporte no vesicular mediado por la proteína FAPP2 dirige GlcCer desde cis-Golgi hacia TGN donde trasloca y contribuye principalmente a la síntesis de globósidos, mientras que un transporte vesicular de GlcCer desde RE a compartimientos tempranos de Golgi alimenta la

síntesis de gangliósidos (D'Angelo et al. 2013). Independientemente del sitio de translocación, GlcCer en el lumen del complejo Golgi, constituye el sustrato de partida para la síntesis de gangliósidos. Dicha síntesis se realiza por un conjunto de glicosiltransferasas integrales de membrana y localizadas en el complejo de Golgi que transfieren monosacáridos desde un sustrato donador activado, usualmente un nucleótido azúcar, a una cadena de oligosacáridos creciente (Fig. I-3). Así, GlcCer es sustrato de la enzima β 4GalT-VI (UDP-Gal:glucosilceramida galactosiltransferasa o LacCer sintasa) (Takizawa et al. 1999) la cual transfiere un residuo galactosa desde UDP-Gal a GlcCer sintetizando lactosilceramida (LacCer). La subsiguiente transferencia de siálico por ST3Gal-V (CMP-NeuAc:lactosilceramida sialiltransferasa o GM3 sintasa) a LacCer desde CMP-siálico produce GM3, el primer gangliósido de la vía y un punto de ramificación clave en la síntesis de estos GSLs. GM3 puede ser modificado por β 4GalNAcT-I (UDP-GalNAc:lactosilceramida/GM3/GD3/GT3 N-acetilgalactosaminiltransferasa o GA2/GM2/GD2/GT2 sintasa) que transfiere GalNAc a GM3 para sintetizar GM2. Alternativamente, ST8Sia-I (CMP-NeuAc:GM3 sialiltransferasa y CMP-NeuAc:GD3 sialiltransferasa o GD3/GT3 sintasa) puede adicionar de manera secuencial uno o dos ácidos siálico a GM3 produciendo GD3 y GT3, los primeros gangliósidos de las vías b y c respectivamente. La incorporación de GalNAc impide cualquier adición posterior de siálico a la galactosa interna, de modo que la producción de GM2, GD2 y GT2 confina la síntesis de gangliósidos más complejos a las vías a, b o c respectivamente (Fig. I-3). Luego de su síntesis, los gangliósidos son rápidamente transferidos a la superficie celular mediante transporte vesicular (Young et al. 1992; Crespo et al. 2004; Crespo et al. 2008) donde se organizan en microdominios de membrana (Harder 2003) que se cree funcionan como plataformas de señalización intracelular por su capacidad de interactuar con proteínas señalizadoras (Simons and Toomre 2000; Hakomori Si 2002). Una vez en la membrana plasmática pueden también ser metabolizados por diferentes glicosiltransferasas y glicosidasas (Daniotti et al. 2015a). Luego, los gangliósidos son internalizados, alcanzan el compartimiento endosomal y pueden tener diferentes destinos celulares. Pueden ser reciclados hacia la membrana plasmática (Iglesias-Bartolome et al. 2006; Iglesias-Bartolome et al. 2009) o ser transportados hacia el complejo de Golgi donde pueden ser sustrato de nuevos procesos de glicosilación que conducen a la formación de gangliósidos más complejos (Tettamanti 2004). Finalmente, los gangliósidos son degradados en lisosomas donde glicosidasas apropiadas (Ito 2007) escinden de manera secuencial las unidades de monosacáridos desde el extremo no reductor de la cadena de oligosacárido. Además se requiere de un pH adecuado y en algunos casos (gangliósidos con cuatro o menos residuos de carbohidratos) se necesitan de proteínas activadoras (proteína activadora de GM2 o una de las cuatro saposinas A, B, C y D) las cuales extraen los glicolípidos de las membranas y se los presentan a las hidrolasas ácidas (Kolter 2012; Daniotti et al. 2015a).

Los productos catabólicos resultantes pueden escapar de los lisosomas y ser usados como precursores de síntesis de nuevas moléculas o siguen una vía degradativa (Sandhoff and Kolter 2003; Tettamanti 2004; Kolter and Sandhoff 2010).

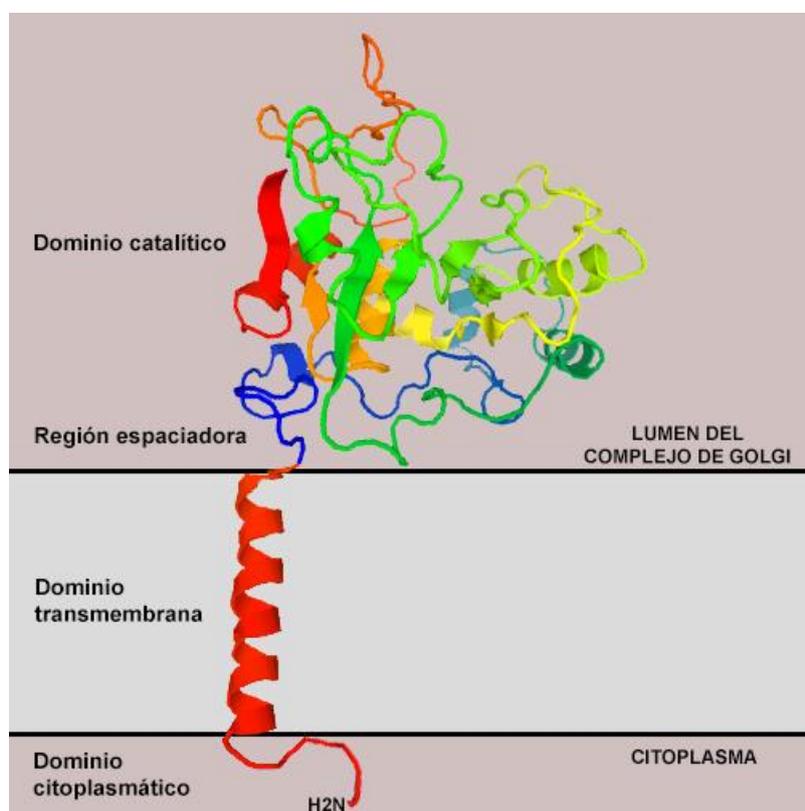


Figura I-2 Topología y dominios comunes de las glicosiltransferasas de gangliósidos

Las glicosiltransferasas de gangliósidos presentan una topología característica en el complejo de Golgi que consiste de un dominio N-terminal corto orientado hacia el citoplasma, un dominio señal de anclaje que atraviesa la membrana y un dominio C-terminal orientado hacia el lumen de la organela que alberga el sitio catalítico.

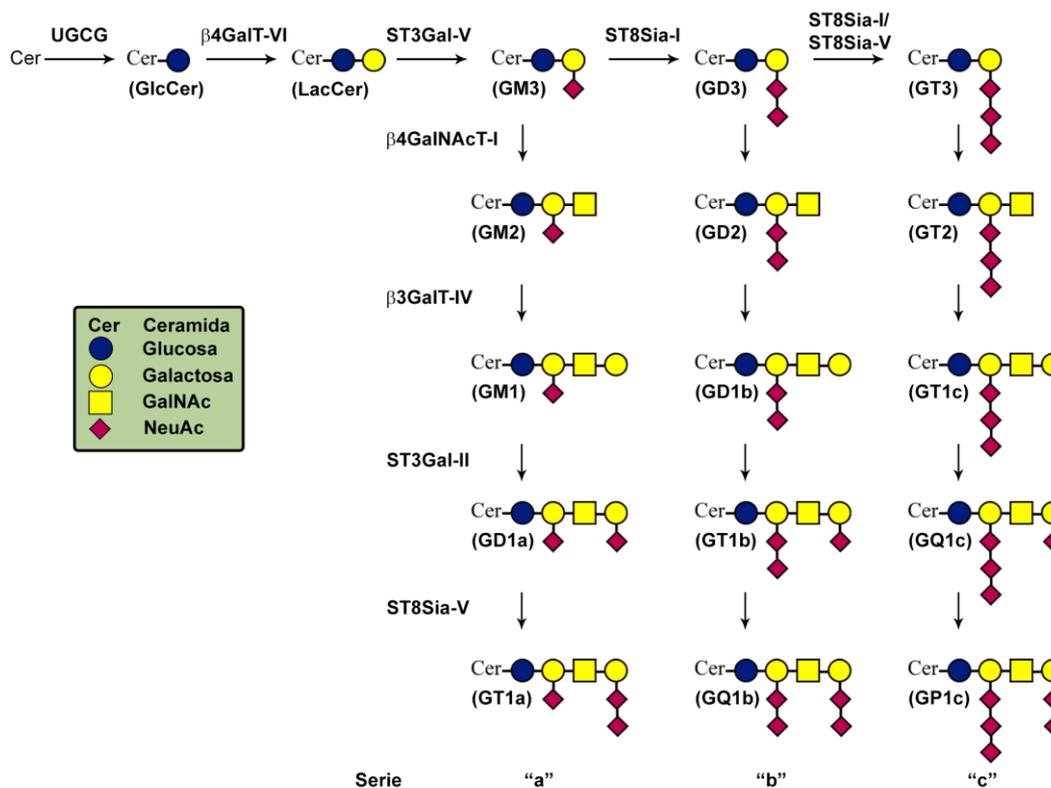


Figura I-3 Esquema de biosíntesis de los gangliósidos

Síntesis de los gangliósidos de las series a, b y c. UGCG, UDP-Glc:ceramida glucosiltransferasa; β4GalT-VI, UDP-Gal:glucosilceramida galactosiltransferasa; ST3Gal-V, CMP-NeuAc:lactosilceramida sialiltransferasa; ST8Sia-I, CMP-NeuAc:GM3 sialiltransferasa y CMP-NeuAc:GD3 sialiltransferasa; β4GalNAcT-I, UDP-GalNAc:lactosilceramida/GM3/GD3/GT3 N-acetilgalactosaminiltransferasa; β3GalT-IV, UDP-Gal: GA2/GM2/GD2/GT2 galactosiltransferasa; ST3Gal-II, CMP-NeuAc:GA1/GM1/GD1b/GT1c sialiltransferasa; ST8Sia-V, CMP-NeuAc:GM1b/GD1a/GT1b/GQ1c sialiltransferasa y CMP-NeuAc:GD3 sialiltransferasa. Los gangliósidos son nombrados de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Svennerholm (Svennerholm 1980).

Regulación de la expresión y actividad de glicosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de gangliósidos

Como se mencionó anteriormente, el patrón de expresión de gangliósidos no solamente se encuentra regulado a lo largo del desarrollo, sino que también depende del tipo celular y el estadio de diferenciación. Es decir, el perfil de glicolípidos que una célula expresa se halla finamente regulado y si bien algunos mecanismos de regulación han sido caracterizados, no está del todo claro cómo se controla la expresión relativa de los diferentes glicolípidos.

El clonado de los genes de las glicosiltransferasas de gangliósidos ha permitido estudiar la regulación de su expresión a nivel transcripcional (Daniotti et al. 1997a; Daniotti et al. 1997b; Daniotti et al. 1999; Yu et al. 2004; Zeng and Yu 2008). Al analizar varios de sus promotores (Furukawa et al. 1996; Zeng et al. 1998; Takashima et al. 2000; Tencomnao et al. 2001; Kim et

al. 2002; Furukawa et al. 2003; Xia et al. 2003; Zeng et al. 2003; Raimondi et al. 2004) se observó que comparten algunas características con promotores de genes constitutivos (genes que se expresan permanentemente con poca regulación y en cuyos promotores hay ausencia de secuencias TATA y presencia de secuencias con alto contenido en GC). Sin embargo, la expresión de gangliósidos está sujeta a una compleja regulación durante el desarrollo y de manera tejida específica por lo cual deben existir mecanismos que regulen la expresión génica. Al respecto, se describió que un conjunto de factores de transcripción (que incluyen Sp1, AP2 y CREB) se unen a promotores de glicosiltransferasas y que existen algunas secuencias regulatorias negativas aguas arriba de los mismos (Zeng and Yu 2008). Además de la regulación génica, algunas observaciones sugieren mecanismos de control epigenéticos. En particular, durante el desarrollo neuronal se regularía el reclutamiento de factores de transcripción a los promotores de β 4GalNAcT-I y ST8Sia-I (Tsai and Yu 2014) en función del estado de acetilación de histonas (Suzuki et al. 2011). Por otro lado, en etapas específicas del desarrollo neuronal, los gangliósidos podrían modular de manera epigenética la expresión de algunos genes de glicosiltransferasas contribuyendo de esta manera a cambios en el perfil de expresión de glicolípidos descritos durante el desarrollo neuronal (Itokazu et al. 2016). Por lo tanto, la regulación de estos genes es un proceso complejo y se requieren nuevos estudios que permitan comprender más ampliamente los mecanismos que modulan la expresión de los mismos.

Las glicosiltransferasas, al igual que un gran número de proteínas, adquieren diversas modificaciones postraduccionales (MPT) (Khoury et al. 2011) que impactan finalmente en la capacidad de biosíntesis de gangliósidos constituyendo así otro mecanismo que regula la expresión de estos glicolípidos. Una de las modificaciones más frecuentemente hallada en proteínas es la N-glicosilación. Esta modificación involucra la transferencia en bloque de un oligosacárido preformado (compuesto por 14 monosacáridos: $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glu}_3$) a un residuo asparagina de la proteína que está siendo sintetizada y trasladada a través de la membrana del RE y el subsiguiente remodelado enzimático del glicano en el RE y el complejo de Golgi (Stanley 2009). Con excepción de UGCG, todas las glicosiltransferasas mencionadas en la Fig. I-3 poseen secuencias consenso de N-glicosilación (NXS/T, donde $X \neq P$) las cuales son necesarias pero no suficientes para que esta modificación ocurra. Estos oligosacáridos confieren características estructurales y funcionales difíciles de predecir (Varki 1993) y que deben ser determinadas experimentalmente. Casi todas las glicosiltransferasas de gangliósidos se hallan N-glicosiladas y diversos estudios demuestran que prevenir la incorporación del N-glicano o su posterior remodelado, conduce generalmente a cambios en su estabilidad (Jeanneau et al. 2004), vida media (Bieberich et al. 2000), localización/transporte subcelular y actividad enzimática

(Haraguchi et al. 1995; Martina et al. 1998; Daniotti et al. 2000; Martina et al. 2000; Uemura et al. 2006; Ruggiero et al. 2015).

La MPT más frecuentemente encontrada en proteínas es la fosforilación (Khoury et al. 2011). A diferencia de la N-glicosilación, la fosforilación es un proceso reversible y constituye así un mecanismo de regulación rápido en respuesta a diversas demandas celulares (Krebs and Beavo 1979; Edelman et al. 1987). En la actualidad no existen evidencias que demuestren una regulación de la actividad de glicosiltransferasas de gangliósidos mediante eventos de fosforilación/defosforilación de las mismas, sólo existen algunas observaciones indirectas. Inicialmente se encontró que la composición de gangliósidos era modificada al incubar células con efectores de proteínas quinasas como el mitógeno PMA (Huberman et al. 1979; Srinivas and Colburn 1982; Burczak et al. 1983; Grunberger et al. 1984). Luego, se reportó que la fosforilación/defosforilación modula la actividad *in vitro* de ST3Gal-II, ST3Gal-V y ST8Sia-I (Gu et al. 1995) y que el tratamiento de células en cultivo con inhibidores de fosfatasa o activadores de quinasas modificaría el estado de fosforilación de β 4GalNAcT-I y ST3Gal-II pudiendo regular sus actividades y por lo tanto los niveles de GM1 y GD1a (Bieberich et al. 1998). Estos experimentos preliminares llevaron a algunos autores a proponer que la regulación de las glicosiltransferasas mediante fosforilación/defosforilación sería un mecanismo regulatorio importante para la biosíntesis de gangliósidos (Yu and Bieberich 2001). Sin embargo, este tipo de regulación de la expresión de glicolípidos aún debe ser demostrado *in vivo*.

Otros factores como la disponibilidad de nucleótidos azúcares (Sprong et al. 2003; Hadley et al. 2014), de los sustratos aceptores, factores cinéticos de las glicosiltransferasas, inhibición por producto final (Nores and Caputto 1984; Yusuf et al. 1987) y la formación de complejos multienzimáticos (Giraud et al. 2001; Bieberich et al. 2002; Giraud and Maccioni 2003; Spessott et al. 2012) también pueden influenciar el nivel y repertorio de gangliósidos expresados. La formación de un complejo físico y funcional entre β 4GalNAcT-I y β 3GalT-IV (Giraud et al. 2001), determina una eficiente conversión de GM3 a GM1. Esto podría explicar por ejemplo, porque el cerebro contiene altas cantidades de GM1 y GD1a y muy poco GM2.

Recientemente, se ha demostrado un tipo adicional de regulación de la expresión de glicolípidos que ocurre a nivel de la membrana plasmática, debido a ectoglicosidasas y glicosiltransferasas asociadas a la membrana plasmática (Crespo et al. 2010; Sonnino et al. 2010; Vilcaes et al. 2011; Daniotti et al. 2015a) que son responsables del remodelado local del patrón de gangliósidos en membrana plasmática.

ROL DE LOS GANGLIÓSIDOS EN PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS

Evidencias por su distribución diferencial en tejidos

Como se mencionó anteriormente, la expresión de glicolípidos y en particular de gangliósidos está finamente regulada durante el desarrollo y de manera tejido específica. Esta expresión diferencial no solamente se limita a diferencias en la composición de gangliósidos entre tejidos u órganos (Thierfelder et al. 1992; Kwak et al. 2011), sino que también se han descrito composiciones diferenciales de gangliósidos en distintas regiones de un mismo tejido (Serb et al. 2009; Kwak et al. 2011). Un nivel de complejidad aún mayor es evidente al observar que diferentes estructuras de un órgano como el cerebro, expresan distintas especies de un mismo gangliósido (GM1) y que sólo difieren en el número de átomos de carbono que componen la cadena de esfingosina. Esta expresión diferencial no solo se observa entre las distintas estructuras como la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo y la amígdala, sino también en diferentes zonas de una misma estructura (Weishaupt et al. 2015). La composición de gangliósidos puede también diferir entre células que tienen un origen común y que a lo largo del desarrollo se diferencian en tejidos relacionados (Daniotti et al. 1994). Esta distribución diferencial es fuertemente indicativa de un rol funcional importante y específico de los gangliósidos en dichos tejidos. Sin embargo, resulta difícil asignar una función a un determinado glicolípidos sólo con estos hallazgos descriptivos. El concepto general que emerge de estos y otros estudios es que los gangliósidos intervienen en numerosos procesos mediante el reconocimiento célula-célula y célula-matriz extracelular ya sea a través de interacciones con proteínas tipo lectina (Ideo et al. 2003; Chakrabandhu et al. 2008; Schnaar and Lopez 2009; Russo et al. 2016) o mediante interacciones con carbohidratos o dominios de unión de glicolípidos presentes en glicoproteínas, muchas de las cuales son receptores de factores de crecimiento localizadas en la membrana plasmática (Regina Todeschini and Hakomori 2008; Lopez and Schnaar 2009), modulando la actividad de los mismos (Kawashima et al. 2009; Coskun et al. 2011; Singh et al. 2012). De esta manera, los gangliósidos serían fundamentales en diversas funciones fisiológicas como crecimiento, diferenciación, adhesión, apoptosis y migración. Por otro lado, la desregulación del metabolismo de gangliósidos (principalmente de su catabolismo), está implicada en diversas condiciones patológicas tal como ocurre en las gangliosidosis o enfermedades de acumulación de glicolípidos (Kolter and Sandhoff 2006; Sandhoff and Harzer 2013; Platt 2014). Además, los gangliósidos pueden actuar como receptores de diversos virus (Taube et al. 2010; Matrosovich et al. 2015), toxinas (Holmgren et al. 1973; Basu and Mukhopadhyay 2014; Aureli et al. 2016) y anticuerpos (Bourque et al. 2015;

Goodfellow and Willison 2016; Uncini 2016), siendo más susceptibles aquellos tejidos en los que estos agentes etiológicos tengan un mayor acceso a los gangliósidos blanco. En el presente trabajo de tesis se abordó el estudio de la unión, endocitosis y destino de inmunoglobulinas asociadas a neuropatías periféricas que reconocen a los gangliósidos GD1a y GM1 en varias líneas celulares en cultivo, con el objetivo de lograr una mayor comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen estos fenómenos (Capítulo II).

Evidencias de experimentos *in vitro*

Muchos experimentos fueron realizados para tratar de dilucidar la función de los gangliósidos en diferentes procesos celulares. Estas aproximaciones suelen realizarse en células en cultivo y determinando el efecto de la adición de gangliósidos exógenos, bloqueando la síntesis de gangliósidos con inhibidores específicos, incorporando el ADNc de diferentes glicosiltransferasas o empleando células que carecen de un determinado glicoesfingolípido. Varias observaciones y experimentos iniciales sugirieron que los gangliósidos participan en diversos procesos celulares. En general se observó una disminución del crecimiento y proliferación celular ante el agregado de gangliósidos exógenos (Keenan et al. 1975; Bremer et al. 1984; Hefti et al. 1985; Bremer et al. 1986; Sobue et al. 1988) y en células con bloqueo reversible de la síntesis de gangliósidos (Weis and Davis 1990). También influyen la diferenciación neuronal (Schengrund 1990; Rosenberg et al. 1992; Kojima et al. 1994) y de algunas células linfoides (Nojiri et al. 1986; Zeng et al. 1995). Además, tendrían un rol en la adhesión y migración de algunos tipos celulares (Alessandri et al. 1986; Stallcup et al. 1989; Greis and Rosner 1990; Lang et al. 2001) y regulación de actividades enzimáticas (Caputto et al. 1977; Leon et al. 1981). Estas funciones serían mediadas a través de una modulación de la actividad de receptores de superficie por parte de los gangliósidos (Miljan and Bremer 2002). Sin embargo, la interpretación de muchos de estos resultados es complicada, principalmente la de aquellos experimentos en los que se adicionaron gangliósidos de manera exógena ya que, por ejemplo, las células pueden convertir los gangliósidos que incorporan de manera exógena en especies más simples o más complejas (Furukawa et al. 1989). De esta manera no resulta sencillo asignar como responsable del efecto al gangliósido añadido. Otra complicación de estos experimentos son las altas concentraciones de gangliósidos empleadas, muy alejadas de las concentraciones fisiológicas de los mismos. Estos problemas pudieron ser superados gracias al clonado de las diferentes glicosiltransferasas y a las intervenciones a nivel genético que permitieron modificar los patrones de expresión endógena de gangliósidos en células en cultivo (Giraud et al. 1999; Daniotti et al. 2000). En nuestro laboratorio se logró de esta manera

generar líneas celulares que expresan determinadas glicosiltransferasas de la vía de síntesis de los gangliósidos y una de estas líneas celulares (doble transfectante estable de $\beta 4\text{GalNAcT-I}$ y $\beta 3\text{GalT-IV}$ en células CHO-K1, de ahora en adelante, células CHO-K1^{GD1a/GM1+}) fue ampliamente utilizada durante este trabajo de tesis (Capítulo II).

Descubrimientos en animales modificados genéticamente y en humanos con enfermedades relacionadas a la síntesis de gangliósidos

Los experimentos *in vitro* si bien son válidos a nivel celular, no permiten entender el rol de los gangliósidos en sistemas más complejos como tejidos u organismos. El empleo de la tecnología de ADN recombinante en ratones permitió generar animales que carecen de un determinado grupo de glicoesfingolípidos y así estudiar las funciones de los mismos a nivel organismo. El primer paso de la síntesis de glicoesfingolípidos es realizado por la enzima UGCG produciendo GlcCer (Fig. I-3). Los animales *ugcg*^{-/-} mueren en un estadio embrionario temprano debido a un proceso apoptótico masivo en la capa del ectodermo (Yamashita et al. 1999). Por otro lado, células madre embrionarias derivadas de estos animales *ugcg*^{-/-} son capaces de formar teratomas cuando son inoculadas de manera subcutánea, sin embargo carecen de tejidos diferenciados. Estos resultados indican que la síntesis de glicolípidos es necesaria para el desarrollo embrionario y la diferenciación celular.

ST3Gal-V es la enzima que cataliza la formación del gangliósido más simple, GM3. Animales ST3Gal-V^{-/-} no expresan GM3, son viables y sin mayores complicaciones neurológicas, posiblemente debido a la síntesis de gangliósidos complejos de la “serie – 0” (gangliósidos que carecen de NeuAc en el residuo galactosa interno) y sólo manifiestan una incrementada sensibilidad a la insulina (Yamashita et al. 2003).

La síntesis de los gangliósidos complejos requiere de la enzima $\beta 4\text{GalNAcT-I}$ (Fig. I-3). Los ratones $\beta 4\text{GalNAcT-I}$ ^{-/-} son viables aunque carecen de gangliósidos complejos y en su lugar expresan grandes cantidades de GM3 y GD3, presentan alteraciones neuronales progresivas posiblemente debidas a la carencia de interacciones axón-glía en la que están involucrados gangliósidos complejos (Takamiya et al. 1996; Sheikh et al. 1999; Chiavegatto et al. 2000; Wu et al. 2001) y alteraciones en tejidos extraneurales como respuesta reducida a interleuquina-2 en células T (Zhao et al. 1999) e infertilidad en machos (Takamiya et al. 1998; Liu et al. 1999). Estos resultados demostraron que, contrario a lo que se pensaba, el sistema

nervioso de mamíferos puede formarse sin la mayoría de los gangliósidos complejos pero que la ausencia de los mismos resulta en anomalías neurológicas.

La síntesis de gangliósidos de la vía b es controlada por la actividad de la enzima responsable de la biosíntesis de GD3, ST8Sia-I (Fig. I-3). Los ratones ST8Sia-I^{-/-} son viables, fértiles y neurológicamente normales (Okada et al. 2002) y posiblemente la falta de gangliósidos complejos de la “serie – b” sea compensada por gangliósidos complejos de la “serie – a” como GM1 y GD1a. La cruce de los ratones β 4GalNAcT-I^{-/-} y ST8Sia-I^{-/-} generó el doble mutante β 4GalNAcT-I^{-/-}, ST8Sia-I^{-/-} que sólo expresa el gangliósido GM3 en cerebro, manifiesta daños en la piel (Inoue et al. 2002), son muy sensibles a ruidos y desarrollan convulsiones letales y también muerte espontánea (Kawai et al. 2001). Por otro lado, los animales doble mutantes β 4GalNAcT-I^{-/-}, ST3Gal-V^{-/-} son viables pero no expresan glicolípidos de la serie ganglio, acumulan LacCer y LacCer-sulfato y desarrollan una condición neurodegenerativa severa que culmina con la muerte (Yamashita et al. 2005).

En su conjunto, estos estudios realizados en animales carentes de una o más enzimas de la vía de síntesis de gangliósidos permitieron conocer en mayor detalle la función de los gangliósidos a nivel organismo. Los fenotipos severos de los animales doble mutantes demuestran la gran importancia de los gangliósidos en la función del sistema nervioso, mientras que los fenotipos no tan severos de los ratones simple mutantes sugieren que algunos gangliósidos tendrían funciones redundantes. Así, estos glicolípidos parecen no ser absolutamente necesarios en el desarrollo del sistema nervioso pero si para su mantenimiento y funcionamiento. Esto ha sido demostrado en pacientes que presentan severas alteraciones neurológicas que se manifiestan poco después del nacimiento. Mutaciones en el gen que codifica ST3Gal-V han sido descritas en pacientes con una forma de epilepsia asociada a alteraciones neurológicas (Simpson et al. 2004). Los individuos afectados expresan una versión trunca de ST3Gal-V que carece de actividad enzimática y por lo tanto no ocurre síntesis de GM3 ni de gangliósidos más complejos, pero se observa acumulación de LacCer y de derivados de LacCer. El desarrollo intrauterino fue normal y el nacimiento a término, presentando los síntomas entre la semana 2 y 12 de vida. (Simpson et al. 2004). Por otro lado, una mutación puntual en el gen de ST3Gal-V que involucra la sustitución de glutamato en posición 332 por lisina (E332K) y que ocasionaría una disminución en la estabilidad de la enzima con pérdida de su función, ha sido descrita en pacientes con el síndrome de “sal y pimienta”, un severo trastorno caracterizado por déficits neurológicos y cambios en la pigmentación cutánea (Boccutto et al. 2014). Se evidencia una ausencia total de expresión de GM3 en fibroblastos de individuos afectados, con acumulación de los globósidos Gb3 y Gb4 pero sin aumento de

LacCer. Esta alteración del perfil de GSLs es acompañada por cambios en la sialilación de glicoproteínas, tanto en fibroblastos de estos pacientes como en peces deficientes de ST3Gal-V. Estos cambios se correlacionan con un incremento de la apoptosis neuronal en los peces de experimentación, sugiriendo un posible mecanismo para la ocurrencia de los déficits neurológicos en los pacientes afectados. En contraste, los cambios de pigmentación cutánea son asintomáticos y no se asocian con la severidad neurológica observada. Se comienzan a detectar durante los primeros años de vida y aumentan con la edad. Por lo tanto, estos cambios distintivos de pigmentación asociados a alteraciones neurológicas pueden ser útiles en la identificación de pacientes con éste desorden de la síntesis de gangliósidos (Wang et al. 2013). Recientemente, un segundo tipo de trastorno asociado a la síntesis de gangliósidos y que involucra mutaciones en la glicosiltransferasa β 4GalNAcT-I ha sido descrito (Boukhris et al. 2013; Harlalka et al. 2013). Las principales manifestaciones clínicas incluyen una pérdida parcial y progresiva de los movimientos de las extremidades inferiores (paraparesis) y dificultad variable en el aprendizaje, con un progreso lento de la enfermedad. En estos pacientes se han identificado varios tipos de mutaciones puntuales e inclusive una inserción en el último exón del gen que codifica esta glicosiltransferasa y que causa pérdida de la actividad GM2 sintasa, con la consecuente ausencia de GM2 y acumulación de su gangliósido precursor (GM3). Estos hallazgos van en favor de la idea de que los gangliósidos serían principalmente necesarios para el adecuado funcionamiento del sistema nervioso. Si bien existen numerosas enfermedades asociadas al metabolismo de glicoesfingolípidos, la totalidad de ellas había sido asociada al catabolismo de los mismos, siendo estos los primeros reportes en los cuales se asocia una patología con la falta de síntesis de gangliósidos.

Rol de los gangliósidos en transformación oncogénica, sobrevida tumoral y evasión del sistema inmune

La expresión de gangliósidos varía no solo en diferentes estadios fisiológicos, sino que también lo hace durante la transformación oncogénica (Daniotti et al. 2013; Daniotti et al. 2015b). Las células tumorales expresan un patrón aberrante de glicosilación como consecuencia de cambios genéticos y epigenéticos que resultan en la síntesis alterada de glicanos (sobrexpresión, producción de glicanos truncados), neosíntesis de antígenos onco-fetales, cambios en la densidad de superficie o de cripticidad de los antígenos (Hakomori 1984; Dabelsteen and Clausen 1987), o expresión de variantes de glicosilación que no son propias de la especie (Daniotti et al. 2013) (ver más adelante). El patrón de glicosilación neoplásica no es aleatorio, sino que evoluciona a través de la presión ejercida por el sistema inmune sobre el

tumor. De esta manera, se seleccionan células tumorales que poseen un repertorio de glicanos pobremente reconocidos por el sistema inmune (Fuster and Esko 2005; Kim et al. 2007). El estudio y caracterización del perfil de glicosilación aberrante en diferentes tipos de neoplasias permitió el diseño de terapias dirigidas contra estos antígenos (ver más adelante). La hipersialilación es uno de los principales tipos de glicosilación aberrante en el cáncer y es lograda principalmente por el aumento en la expresión de sialiltransferasas ante diferentes condiciones del microambiente tumoral como hipoxia (Kannagi et al. 2010; Bull et al. 2014). Además, el aumento de la disponibilidad de sustrato, como consecuencia de la sobreexpresión de genes involucrados en la biosíntesis o transporte de siálico (Kannagi et al. 2010; Almaraz et al. 2012) y la disminución de la expresión de sialidasas (Miyagi et al. 2012) pueden llevar a la hipersialilación de células neoplásicas. Otro tipo de glicosilación aberrante ocurre por la expresión de variantes que no son propias de la especie, tal como ocurre con el ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc) en humanos. NeuGc es abundante en muchas otras especies de mamíferos pero no en humanos debido a una deleción en el gen de la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa responsable de sintetizar CMP-NeuGc al catalizar la incorporación de un grupo –OH al grupo –CH₃ de CMP-NeuAc (Shaw and Schauer 1988; Muchmore et al. 1989; Irie et al. 1998; Malykh et al. 2001) (Fig. I-1). A pesar de la incapacidad de las células humanas de sintetizar NeuGc, éste se encuentra formando parte de glicoproteínas y especialmente de gangliósidos en células de tumores humanos de colon (Higashi et al. 1985), mama (Marquina et al. 1996), melanoma (Zhong et al. 2012) y retinoblastoma (Higashi et al. 1988). La casi total ausencia de expresión de NeuGc en células normales indica que éste tipo de ácido siálico debe provenir de una fuente externa como la dieta (Kawai et al. 1991; Tangvoranuntakul et al. 2003; Bardor et al. 2005; Banda et al. 2012) y que es principalmente asimilado por las células tumorales. Esto se asocia con la aumentada tasa metabólica de las células neoplásicas por sobre las normales (Hedlund et al. 2007) y por el estado de hipoxia en el tumor (Yin et al. 2010). Ha sido demostrado que la hipoxia induce la expresión de un transportador de siálico que media la incorporación de este azúcar desde el exterior celular (Yin et al. 2006). Estos cambios cualitativos y cuantitativos en glicolípidos y glicoproteínas (glicosilación aberrante) se relacionan con el fenotipo tumoral maligno modulando varias características neoplásicas como crecimiento, transformación oncogénica, potencial metastásico, invasividad, motilidad, adhesión y evasión del sistema inmune (Alessandri et al. 1987; Hamamura et al. 2008; Ohkawa et al. 2008; Cazet et al. 2009; Cazet et al. 2010; Furukawa et al. 2012; Li et al. 2013; Furukawa et al. 2014; Liu et al. 2014; Samraj et al. 2014; Wondimu et al. 2014; Blanco et al. 2015; Boligan et al. 2015; Hakomori and Handa 2015; Ohkawa et al. 2015; Daniotti et al. 2015b; Kundu et al. 2016).

Anticuerpos anti-glicoesfingolípidos en terapia antitumoral

Tumores como el melanoma, el cáncer de células pequeñas de pulmón, sarcoma y neuroblastoma, expresan los gangliósidos GD3, GD2 y GM2 en niveles superiores comparados con los tejidos normales (Cheresh et al. 1986; Nores et al. 1987; Morton and Barth 1996; Zhang et al. 1997; Lo et al. 2010). Además, algunos tumores también expresan los derivados N-glicolil-GM3 (NeuGcGM3) y GM1-fucosilado (que no se expresan en tejidos humanos normales) (Zhang et al. 1997; Tangvoranuntakul et al. 2003; Nguyen et al. 2005; Tokuda et al. 2006). Esto impulsó el desarrollo de investigaciones que derivaron en prometedoras inmunoterapias dirigidas contra los gangliósidos aberrantemente expresados en el cáncer.

El disialogangliósido GD3 se encuentra altamente expresado durante la etapa de proliferación activa de neuronas durante el desarrollo del SNC. En etapas posteriores del desarrollo, el contenido de GD3 disminuye (Daniotti et al. 1997b) expresándose en muy bajos niveles en SNC, células pigmentadas de la retina y en melanocitos. Sin embargo, GD3 se encuentra sobreexpresado en células tumorales, notoriamente en más del 80% de los melanomas. El principal gangliósido aislado de melanocitos humanos es GM3 (86-91% del contenido total de ácido siálico), siendo el gangliósido GD3 un componente minoritario en estas células (2-6% del total de siálico). Por otro lado en melanomas humanos, GD3 es el gangliósido predominante (48-63% del total de siálico) (Carubia et al. 1984), indicando que la síntesis de gangliósidos cambia de la “serie – a” a la “serie – b” en este tipo de tumores. El análisis del contenido de GM3 y GD3, más precisamente la relación GM3/GD3, es un criterio bioquímico que puede ser útil en el pronóstico y manejo terapéutico del melanoma (Ravindranath et al. 1991). Por estos motivos, GD3 ha sido propuesta como una molécula blanco importante contra la cuál dirigir inmunoterapias anti-tumorales pasivas (Nasi et al. 1997) y activas (Ravindranath and Morton 1991), las cuales han producido modestos resultados (Slovin et al. 2005). Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas y herramientas ha permitido abordar nuevas estrategias como redirigir la especificidad de células T del paciente hacia GD3 expresado en la superficie de células tumorales (“Chimeric Antigen Receptor T cells”, linfocitos T que poseen un receptor quimérico específico contra el antígeno blanco) (Lo et al. 2010). Otra estrategia explota la rápida internalización y acumulación de R24 (un anticuerpo murino monoclonal contra GD3) en estructuras endosomales, luego de unir GD3 en la superficie celular (Iglesias-Bartolome et al. 2006), para entregar de manera selectiva un agente citotóxico al interior de las células que sobreexpresan este glicolípido (Torres Demichelis et al. 2013; Higgins et al. 2015). Estos últimos estudios se encuentran aún en fase pre-clínica.

El disialogangliósido GD2 se encuentra altamente expresado en neuroblastoma, glioma y melanoma. Recientemente (10 de marzo de 2015) la Administración de Drogas y Alimentos de EE.UU. (FDA) aprobó el uso de Dinutuximab (un anticuerpo monoclonal contra el gangliósido GD2) en combinación con el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina-2 y ácido 13-cis retinoico para el tratamiento de pacientes pediátricos con neuroblastoma de alto riesgo que tuvieron al menos una respuesta parcial a terapias de primera línea (Dhillon 2015; Horta et al. 2016; Ploessl et al. 2016). Dinutuximab se une a la superficie de las células que expresan el gangliósido GD2 e induce su lisis mediante citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Mujoo et al. 1987; Barker and Reisfeld 1993; Chasick et al. 2015). Ésta no sólo es la primera terapia específica contra neuroblastoma aprobada, sino que es el primer anticuerpo reactivo contra tumor y dirigido contra un glicolípido en ser aprobado para su uso en humanos. Futuras investigaciones determinarán si Dinutuximab puede ser usado más tempranamente en la terapia, en pacientes que no respondan a los tratamientos iniciales, en combinación con quimioterapia o en otros tipos de tumores que expresen el gangliósido GD2.

Otro anticuerpo anti-glicolípido de importancia en el tratamiento de neoplasias es Racotumomab (Vazquez et al. 1998), un anticuerpo monoclonal anti-idiotipo que imita al gangliósido NeuGcGM3 sobreexpresado en la superficie de diversos tipos tumorales (Alfonso et al. 2002; Hernandez et al. 2008; van Crujisen et al. 2009; Lahera et al. 2014; Cacciavillano et al. 2015; Torbidoni et al. 2015; Blanco 2016) y que es capaz de inducir la producción de anticuerpos contra gangliósidos que posean NeuGc en su estructura al ser administrado en estos pacientes. Los anticuerpos producidos tras la administración de Racotumomab, reconocen y median la muerte de células que expresan el antígeno blanco mediante un mecanismo de necrosis oncótica independiente de complemento (hinchazón celular y aparición de lesiones en la membrana plasmática que llevan a la pérdida de la integridad de membrana y de componentes citoplasmáticos) (Hernandez et al. 2011). Este anticuerpo fue aprobado en 2013 para su uso en Argentina y Cuba para el tratamiento de pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas avanzado (Gajdosik 2014; Gabri et al. 2016). Los pacientes que recibieron Racotumomab y que desarrollaron anticuerpos contra NeuGcGM3 mostraron una mejoría significativa en la supervivencia (Hernandez and Vazquez 2015).

Como se mencionó anteriormente, estas terapias pueden involucrar el acoplamiento de toxinas o drogas citotóxicas a anticuerpos monoclonales con el objetivo de direccionarlas específicamente al interior de las células tumorales o anticuerpos monoclonales con eficacia para inducir ADCC y CDC, los cuales requieren de presencia sostenida del anticuerpo en la

superficie celular. Por lo tanto, diferentes modos de acción son posibles dependiendo de la función deseada del anticuerpo.

Anticuerpos anti-glicoesfingolípidos en neuropatías periféricas

El síndrome de Guillain-Barré (SGB) es actualmente la principal causa de parálisis flácida aguda a nivel mundial con una incidencia cercana a 1 – 2 nuevos casos por año cada 100000 personas (Alter 1990). Se caracteriza por presentar inicialmente debilidad muscular bilateral de los miembros inferiores, que puede luego extenderse hacia el tronco de manera progresiva e involucrar debilidad de miembros superiores (Ropper 1992). En la mayoría de los casos hay pérdida de reflejos (arreflexia) que pueden estar o no acompañadas por manifestaciones sensoriales (Capasso et al. 2011). Estos síntomas pueden incrementar su intensidad de manera progresiva hasta dejar totalmente paralizado al paciente (tetraplegia) o hasta causar una severa disfunción del sistema nervioso autónomo comprometiendo la respiración, el ritmo cardíaco y la presión arterial entre otras funciones autonómicas. En estos casos, la enfermedad amenaza la vida y es considerada una urgencia médica. Si bien la mayoría de los pacientes se recuperan de manera completa, un 20% permanece con severas discapacidades (Hughes et al. 2007) y resulta fatal en promedio entre un 5-10% de los casos (The Italian Guillain-Barre Study Group 1996; Dhar et al. 2008). Anticuerpos anti-gangliósidos (AGAb), en particular, anti-GD1a y anti-GM1, se han asociado con una amplia gama de síndromes neuropatológicos agudos y crónicos clínicamente identificables (Willison and Yuki 2002; Sheikh et al. 2004). En particular, los anticuerpos contra GM1 y GD1a están asociados con la disfunción e injuria selectiva de axones motores en la neuropatía axonal motora aguda (AMAN), un subtipo del SGB que se caracteriza por afectar de manera exclusiva a nervios motores periféricos. Si bien algunos factores genéticos podrían predisponer a padecer esta condición (van der Pol et al. 2000; Myhr et al. 2003; Pandey and Vedeler 2003), la misma no se declara hasta que algún factor ambiental gatille la producción de AGAbs (Israeli et al. 2012). En la literatura, se han reportado numerosos factores que potencialmente provocan esta respuesta autoinmune. Los gangliósidos tienen un rol en la regeneración nerviosa, razón por la cual se empleaban en pruebas clínicas para el tratamiento de afecciones neurológicas como la neuropatía diabética. Durante estas pruebas se comenzaron a reportar casos de SGB en pacientes que recibieron gangliósidos exógenos (Yuki et al. 1991; Figueras et al. 1992; Landi et al. 1993). También se reportaron casos del SGB luego de vacunaciones estacionales contra la gripe (Asbury 1990; Dodd et al. 2013) o infecciones virales (Lebrun et al. 2009; Carod-Artal et al. 2013; Dalton et al. 2016; Kamar et al. 2016; Uncini et al. 2016). Un agente infeccioso

bacteriano, *Campilobacter jejuni*, ha sido relacionado frecuentemente con SGB post-infeccioso, siendo así, el agente etiológico más frecuentemente relacionado con el inicio del síndrome (1 de cada 3 casos). Luego de muchos años de investigación, hoy en día se comprende más claramente el mecanismo fisiopatológico y molecular involucrado en el desarrollo del SGB posterior a la infección por *C. jejuni*. Luego de una infección con una cepa de *C. jejuni* cuyo lipooligosacárido de membrana comparte determinantes antigénicos con los gangliósidos GM1 o GD1a (Yuki et al. 1993; Koga et al. 2005), se producen anticuerpos anti-GM1 o anti-GD1a (mimetismo molecular) (Yuki et al. 2004; Caporale et al. 2006). Estos anticuerpos se unen a sus gangliósidos blanco presentes en el axolema de nervios periféricos a nivel del nodo de Ranvier, donde inducen activación del complemento y formación del complejo de ataque a membrana (Susuki et al. 2007). Este ataque provoca la disrupción de los canales de sodio presentes en el nodo, lo cual conduce a la debilidad muscular que se observa durante la fase temprana de la enfermedad. Cambios posteriores que ocurren en el paranodo y juxtapanodo están involucrados en la degeneración axonal.

Los gangliósidos GM1 y GD1a, además de estar altamente enriquecidos y expuestos al medioambiente extracelular en los nodos de Ranvier, también se encuentran en el terminal nervioso a nivel de la unión neuromuscular. Recientemente, se demostró que los auto-anticuerpos anti-GM1 y anti-GD1a presentes en estas neuropatías agudas autoinmunes median daño a través de la fijación de complemento en regiones donde la endocitosis es mínima (Nodo de Ranvier) (Fewou et al. 2012; Susuki et al. 2012). En contraste, se observó que la rápida internalización de estos anticuerpos en el terminal nervioso motor atenúa en gran medida la lesión mediada por el complemento (Fewou et al. 2012; Fewou et al. 2014). Estos resultados indican que el procesamiento endocítico diferencial de los AGAbs representa un factor modulador crítico de la lesión sitio específica en el SGB y neuropatías relacionadas. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la internalización de estos anticuerpos no son del todo comprendidos. Por otro lado, los niveles de expresión de gangliósidos (Goodfellow et al. 2005), así como también la composición local de glicolípidos en los tejidos blanco del SGB (Greenshields et al. 2009) influyen fuertemente el potencial neuropatológico de los anticuerpos anti-GD1a y anti-GM1. El gangliósido GD1a es sintetizado principalmente por la enzima ST3Gal-II *in vivo* (Sturgill et al. 2012) catalizando la adición de una molécula de ácido siálico a la galactosa externa del gangliósido GM1, regulando así de manera directa los niveles de ambos glicolípidos. Esta enzima posee dos sitios potenciales de N-glicosilación que pueden ser críticos, no sólo para la adecuada localización de ST3Gal-II en el complejo de Golgi, sino también para su correcta actividad enzimática. Sin embargo, aún no se conoce el estado de

N-glicosilación de esta enzima ni como esta modificación afecta su localización subcelular y actividad enzimática.

Por lo tanto, comprender aspectos relacionados a la biosíntesis de los gangliósidos GM1 y GD1a junto con los mecanismos moleculares que intervienen en la unión a la superficie celular y el destino de los AGAbs, no solo permitirá una mejor comprensión de las características clínicas de las neuropatías mediadas por AGAbs, sino que también podría aportar conocimiento útil en el mejoramiento de las actuales inmunoterapias contra el cáncer y en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

OBJETIVOS

La información que se dispone sobre los mecanismos involucrados en transporte intracelular de AGAbs es escasa. La mayor parte de los estudios analizan principalmente aspectos relacionados a la afinidad, especificidad y efecto de diferentes AGAbs en neuropatías y en tratamientos antineoplásicos, habiendo escasas evidencias experimentales de los mecanismos moleculares que operan luego de la unión de AGAbs al gangliósido blanco. El conocimiento de los mecanismos básicos involucrados en el metabolismo de los gangliósidos blanco de AGAbs y del transporte intracelular de los complejos gangliósidos-AGAbs es de gran utilidad para una mejor comprensión de su rol patogénico en neuropatías así como también en el mejoramiento de su uso como herramientas terapéuticas.

En este contexto, el **objetivo general** de este trabajo de Tesis fue **caracterizar algunos aspectos moleculares de ST3Gal-II, la principal sialiltransferasa responsable de la biosíntesis del gangliósido GD1a a partir de GM1. Ambos glicolípidos son blanco de AGAbs en neuropatías periféricas, por lo tanto también se propuso indagar sobre los mecanismos que participan en el transporte intracelular de anticuerpos anti-glicolípidos que reconocen los gangliósidos GD1a y GM1.**

Como **objetivos particulares** se propuso:

1- Analizar la expresión, localización subcelular y modificaciones postraduccionales de la sialiltransferasa ST3Gal-II humana y como estas modificaciones influyen en su localización y actividad *in vitro*, utilizando como modelo células CHO-K1 que expresan de manera transiente o estable diferentes versiones de la enzima (Capítulo II)

2- Analizar el destino y rutas de transporte endocítico de los anticuerpos monoclonales Ab1-GD1a (IgG1), Ab2-GD1a (IgG2b) y Ab1-GM1 (IgG2b) luego de su unión a membrana plasmática de células epiteliales CHO-K1 modificadas genéticamente para expresar los gangliósidos GM1 y GD1a y células Neuro-2a que expresan de manera endógena ambos glicolípidos (Capítulo III).

CAPÍTULO II:

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN,
LOCALIZACIÓN SUBCELULAR, ESTADO DE
N-GLICOSILACIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA
IN VITRO DE LA SIALILTRANSFERASA
HUMANA ST3GAL-II**

INTRODUCCIÓN

La N-glicosilación es una de las modificaciones más frecuentes en proteínas después de la fosforilación (Khoury et al. 2011), con más de la mitad de las proteínas eucariotas predichas de estar N-glicosiladas (Apweiler et al. 1999). La N-glicosilación es iniciada por un proceso cotraduccional en el lumen del RE donde el complejo oligosacariltransferasa cataliza la transferencia de un oligosacárido preformado ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$) (Fig. II-1A) al grupo amida de ciertos residuos asparagina que se encuentren en el contexto: Asn-Xaa-(Ser/Thr) del polipéptido nascente, siendo Xaa cualquier aminoácido excepto prolina (Parodi and Leloir 1979; Helenius et al. 1997; Aebi 2013). Inmediatamente después de la reacción de transferencia, comienza el remodelado del N-glicano en el RE con la remoción secuencial de los dos residuos más externos de glucosa por las enzimas glucosidasa I y glucosidasa II respectivamente (Fig. II-1B). El intermediario monoglucosilado puede ahora ser unido por dos lectinas chaperonas homólogas, calnexina y calreticulina (Hammond et al. 1994; Ware et al. 1995; Helenius et al. 1997; Paquet et al. 2005). Estas lectinas intervienen en el plegamiento de las glicoproteínas junto con otras chaperonas (Fig. II-1B) que asisten a la formación de enlaces disulfuro (PDIs: Proteína disulfuro isomerasas) y a la isomerización de los enlaces prolina (PPIs: Peptidil proil isomerasas) (Ellgaard and Helenius 2003). Luego, glucosidasa II remueve el único residuo de glucosa remanente en el oligosacárido lo cual libera la glicoproteína de las chaperonas. A este nivel, las glicoproteínas que alcanzaron un correcto plegamiento podrán proceder hacia su destino final. Por el contrario, las especies deglucosiladas y mal plegadas o con oligómeros inapropiadamente ensamblados, serán reconocidos por la enzima UDP-Glc:glicoprotein glucosiltransferasa (UGGT), el único componente del sistema de control de calidad del RE que puede distinguir entre las formas nativas y no nativas de las glicoproteínas deglucosiladas (Trombetta and Helenius 2000; Trombetta and Parodi 2005) detectando la exposición de parches hidrofóbicos en intermediarios tardíos de plegamiento (Caramelo et al. 2003). UGGT adiciona un residuo glucosa a las especies con una conformación no nativa (Fig. II-1B) y de esta manera, la glicoproteína reglucosilada podrá asociarse nuevamente con las chaperonas para una nueva ronda de plegamiento (D'Alessio et al. 2010). Este ciclo de deglucosilación y reglucosilación llevado a cabo por glucosidasa II y UGGT puede ocurrir repetidamente durante la biosíntesis de una glicoproteína (Suh et al. 1989), siendo este, un proceso clave del sistema de control de calidad en el lumen del RE. El ciclo continua hasta que la glicoproteína adquiera una conformación nativa lo cual resulta en la remoción final del residuo de glucosa por glucosidasa II y transporte al sitio de residencia final, o alternativamente, hasta que la glicoproteína que no

alcance un estado adecuado de plegamiento, sea eliminada a través del sistema de degradación asociado al RE (ERAD) (Romisch 2005). Este proceso se inicia cuando una manosidasa de RE remueve un residuo manosa de la rama B del oligosacárido de glicoproteínas que han permanecido asociado a chaperonas en el RE por prolongados períodos de tiempo (Herscovics 2001). La remoción de este residuo manosa convierte al N-glicano en un peor sustrato para la reglicosilación y resulta en la salida de la glicoproteína del ciclo de unión a chaperonas (Molinari et al. 2003) y direccionamiento de la misma a degradación (Fig. II-1B).

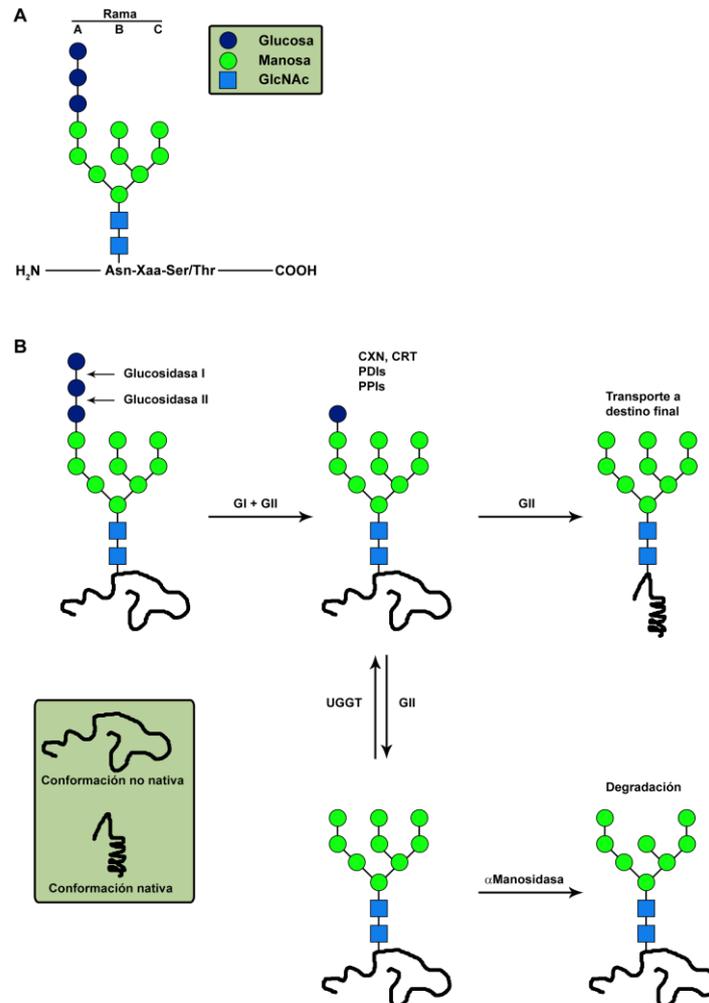


Figura II-1. N-glicosilación, plegamiento de glicoproteínas y control de calidad en el RE

A. Representación esquemática del oligosacárido preformado que es incorporado a glicoproteínas de manera cotraduccional en el lumen del RE. **B.** Representación del modelo propuesto para el sistema de control de calidad de plegamiento de glicoproteínas en el RE. Las glucosidasas I y II (GI y GII) remueven de manera secuencial los dos residuos glucosa más externos del oligosacárido. El intermediario monoglucosilado es unido por las chaperonas de RE calnexina (CXN) y calreticulina (CRT), las cuales junto a otras chaperonas de las familias PDIs (Proteína disulfuro isomerasas) y PPIs (Peptidil prolil isomerasas) asisten al plegamiento de la proteína. La remoción del último residuo glucosa por GII genera un intermediario deglucosilado que no es unido por las chaperonas. UGGT reglicosila intermediarios deglucosilados que posean una conformación no nativa de la porción proteica. Una α -manosidasa remueve un residuo manosa de la rama B iniciando el proceso de degradación de intermediarios terminalmente mal plegados.

Las glicoproteínas que trafican la vía exocítica/secretoria pueden sufrir un remodelado posterior de los N-glicanos al transitar el complejo de Golgi. La N-glicosilación de proteínas tiene múltiples efectos, desde distribución intracelular a regulación de la vida media y actividad (Varki 1993; Dennis et al. 1999; Fares 2006). Sin embargo, muchas proteínas que son normalmente glicosiladas no pierden su actividad cuando la glicosilación es impedida (Chen and Colley 2000; Jeanneau et al. 2004; Uemura et al. 2006).

Las sialiltransferasas son un grupo de glicosiltransferasas que usan CMP-NeuAc como sustrato donador para catalizar la transferencia de ácido siálico a oligosacáridos de glicolípidos y glicoproteínas. Se clasifican en cuatro familias: ST3Gal, ST6Gal, ST6GalNAc y ST8Sia, en base al tipo de unión mediante la cual el ácido siálico es transferido y al sustrato aceptor (Audry et al. 2011). Las sialiltransferasas de vertebrados son proteínas integrales de membrana tipo II con un dominio N-terminal que consiste en un segmento citoplasmático relativamente corto, un segmento transmembrana y un dominio C-terminal luminal que alberga los sitios catalíticos y de unión a los nucleótidos azúcares (Fig. I-2).

Los genomas humanos y de ratón codifican seis miembros de la familia ST3Gal (α 2,3-sialiltransferasas) (ST3Gal-I a ST3Gal-VI). Catalizan la formación de un enlace α 2,3 entre el ácido siálico y los residuos de galactosa terminal en glicoproteínas y glicolípidos. En particular ST3Gal-I y ST3Gal-II catalizan la adición *in vitro* de ácido siálico a la galactosa terminal de glicolípidos que contienen el residuo terminal Gal(β 1-3)GalNAc, los cuales son comparativamente preferidos por ST3Gal-II (Lee et al. 1993; Kono et al. 1997). Recientemente se demostró mediante experimentos en ratones, que ST3Gal-II es la principal sialiltransferasa de mamíferos responsable de la biosíntesis de los gangliósidos GD1a y GT1b en cerebro *in vivo* (Sturgill et al. 2012). Además, también se describió actividad sialiltransferasa de ST3Gal-II hacia glicoproteínas (Giordanengo et al. 1997; Sturgill et al. 2012).

Al igual que otras glicosiltransferasas de mamíferos, la secuencia primaria de amino ácidos de ST3Gal-II revela un sitio potencial de N-glicosilación (Asn211) el cual se encuentra altamente conservado en mamíferos, peces y aves. Sin embargo, otro sitio potencial de N-glicosilación (Asn92) solo se encuentra conservado en mamíferos (Fig. II-2A y Fig. II-2B).

En el siguiente capítulo se detalla el estudio de la ocupación de estos sitios potenciales de N-glicosilación y la influencia del oligosacárido en la actividad, tráfico intracelular y distribución subcelular de ST3Gal-II humana en células CHO-K1. Primero se examinó la localización sub-Golgi precisa de la enzima y la ocupación de los sitios de N-glicosilación.

Además se describió el efecto de inhibir la glicosilación y el remodelado del glicano en la actividad y la distribución subcelular de la misma.

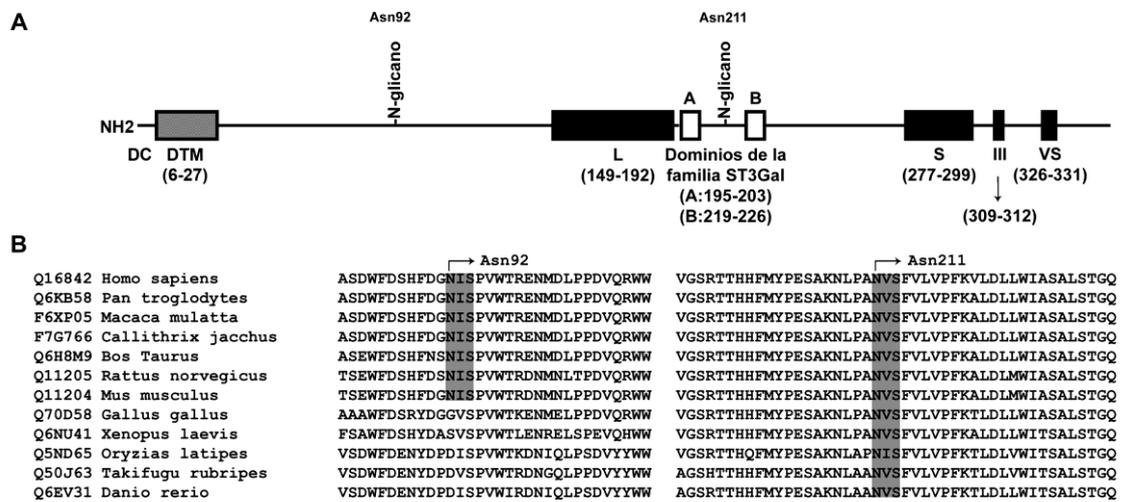


Figura II-2. Análisis de los sitios de N-glicosilación en ST3Gal-II

A. Representación esquemática de la secuencia de amino ácidos de ST3Gal-II humana mostrando los N-glicanos en sitios potenciales de N-glicosilación Asn92 y Asn211. Los sialilmotivos conservados de la superfamilia de las sialiltransferasas L (large, grande), S (small, pequeño), VS (very small, muy pequeño) y III son representados por rectángulos negros. Los motivos conservados de la familia ST3Gal son representados por rectángulos blancos. DC, dominio citoplasmático; DTM, dominio transmembrana. Debajo de cada dominio se indica la posición inicial y final del mismo. **B.** Alineamiento de las secuencias reportadas de amino ácidos de ST3Gal-II denotando la conservación de las secuencias de N-glicosilación (rectángulos grises).

RESULTADOS

Expresión de ST3Gal-II en células CHO-K1

Para investigar la localización subcelular de la enzima ST3Gal-II humana se generó un plásmido capaz de dirigir la expresión de los 350 aminoácidos propios de la sialiltransferasa junto con los 9 aminoácidos del epítipo hemaglutinina (HA: YPYDVPDYA) en su región C-terminal (pCEFL2-hST3Gal-II-HA). Se transfectaron células CHO-K1 con el plásmido y extractos totales de las mismas se analizaron por western blot. En presencia del agente reductor β -mercaptoetanol, ST3Gal-II fue detectada principalmente como un polipéptido de 43 kDa (81% del total de la marca). También se observaron bandas minoritarias de 41 kDa (14%) y 45 kDa (2%) (Fig. II-3).

Teniendo en cuenta que el peso molecular calculado a partir de la secuencia primaria de aminoácidos es de 40.2 kDa, éste experimento sugiere que la proteína estaría glicosilada y que éstas bandas podrían corresponderse al polipéptido más dos (45 kDa), uno (43 kDa) o ningún (41 kDa) glicano N-unido. En geles corridos en ausencia de β -mercaptoetanol, una banda mayoritaria de 81 kDa fue detectada, la cual da cuenta del 50% de la expresión total de la enzima. Por otro lado, bajo condiciones reductoras, esta banda de 81 kDa desaparece prácticamente por completo con la aparición concomitante de las formas de 43 y 41 kDa. Este resultado fuertemente sugiere que la fracción de 81 kDa probablemente se genera por la asociación, a través de enlaces disulfuro, de las formas monoméricas. No se detectó marcación alguna en experimentos de western blot utilizando extractos de células CHO-K1 transfectadas con el plásmido que no contiene la secuencia codificante de ST3Gal-II (pCEFL2-HA) (Fig. II-3).

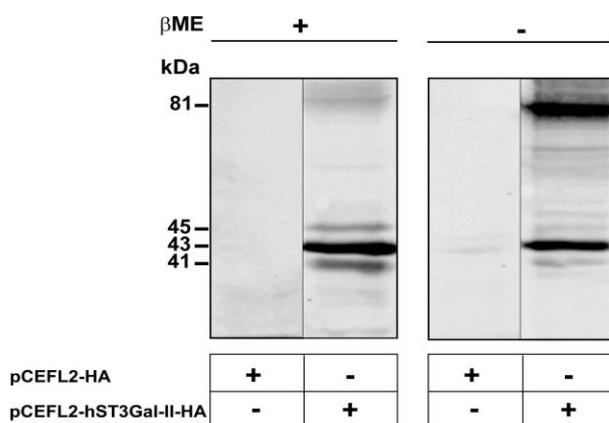


Figura II-3. Expresión de ST3Gal-II humana en células CHO-K1

Homogenatos totales de células CHO-K1 (40 mg) transfectadas transientemente con el vector de expresión vacío (pCEFL2-HA) o con el vector que codifica para ST3Gal-II humana (pCEFL2-hST3Gal-II-HA) fueron separados en geles de SDS/poliacrilamida al 12% con (+) o sin (-) 5% de 2-mercaptoetanol (β ME) en el buffer de siembra. El anticuerpo monoclonal anti-HA (clon HA-7, Sigma-Aldrich) fue utilizado para la detección de ST3Gal-II-HA. Los pesos moleculares expresados en kilo Daltons (kDa) se muestran en el lado izquierdo.

Localización subcelular y sub-Golgi de ST3Gal-II en células CHO-K1

A continuación se caracterizó la localización subcelular de ST3Gal-II, particularmente su localización sub-Golgi. Para ello se realizaron estudios de colocalización en células CHO-K1 que expresan de manera estable la versión de ST3Gal-II que lleva el epítipo c-myc (EQKLISEEDL) en su extremo C-terminal (pCi-hST3Gal-II-myc) con varios marcadores de Golgi. ST3Gal-II fue principalmente detectada en una región yuxtannuclear colocalizando ampliamente con dos marcadores de Golgi proximal, GM130 (una proteína de la matriz de cis-Golgi de 130 kDa expresada de manera endógena) y con la sialiltransferasa ST8Sia-I expresada de manera transiente. También se observó colocalización parcial con TGN38 (una proteína transmembrana residente de TGN) y con un marcador también endógeno de TGN y endosomas tardíos, el receptor de manosa 6 fosfato (M6PR) (Fig. II-4). Estos resultados inicialmente sugieren una amplia distribución de ST3Gal-II en el complejo de Golgi.

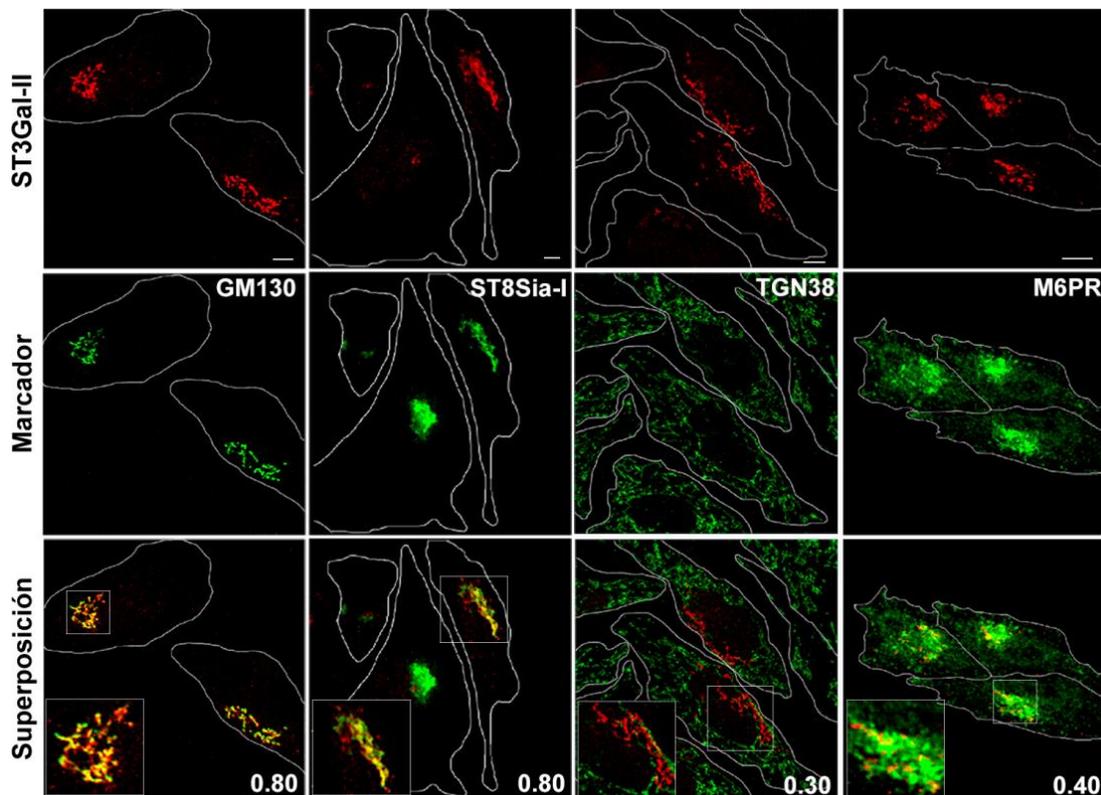


Figura II-4. Expresión y colocalización de ST3Gal-II con marcadores del complejo de Golgi
Células CHO-K1 que expresan de manera estable ST3Gal-II-myc fueron incubadas con anticuerpos específicos que reconocen proteínas endógenas localizadas en diferentes regiones del aparato de Golgi: GM130 (marcador de cis-Golgi), TGN38 (marcador de la red de trans-Golgi, TGN) o M6PR (marcador de TGN y endosomas tardíos). En otro experimento, estas células fueron transfectadas para expresar de manera transiente la sialiltransferasa ST8Sia-I-YFP (marcador de cis/medial-Golgi). Se muestra el contorno de las células (líneas blancas). Recuadros mostrando detalles con mayor magnificación y los coeficientes de colocalización de Manders se muestran en los paneles de superposición. Escala: 5 μ m.

Localización subcelular de ST3Gal-II en respuesta al tratamiento con brefeldina A

Para estudiar con mayor detalle la localización sub-Golgi de esta sialiltransferasa se realizaron ensayos de colocalización en células tratadas con brefeldina A (BFA), un metabolito fúngico que bloquea de manera reversible el transporte vesicular Golgi-RE e intra-Golgi causando redistribución de las membranas de Golgi proximal (cis, medial y trans), pero no de membranas de TGN hacia el RE (Lippincott-Schwartz et al. 1991; Klausner et al. 1992; Donaldson and Klausner 1994; Sciaky et al. 1997; Mossessova et al. 2003; Lippincott-Schwartz and Liu 2006). El tratamiento con BFA causó una dispersión de la mayor parte de la marca de ST3Gal-II a lo largo del RE incrementando su colocalización con Iip33 (una proteína residente del RE) (Fig. II-5, primera y segunda columna). En otro experimento, se trataron células que coexpresan ST3Gal-II y ST8Sia-I. Estas sialiltransferasas que colocalizan en el complejo de Golgi proximal (Fig. II-5, tercera columna), redistribuyeron hacia el RE luego del tratamiento con BFA (Fig. II-5, cuarta columna). Podría argumentarse que la presencia de ST3Gal-II en el compartimiento proximal de Golgi se debe a la sobreexpresión de la proteína en células transfectadas transientemente, como se demostró para la GM2 sintasa, β 4GalNAcT-I (Giraud et al. 1999). Sin embargo, la localización sub-Golgi y el mismo comportamiento en respuesta a BFA fue observado en células CHO-K1 que expresan de manera estable ST3Gal-II-myc (Fig. II-5, primera y segunda columna). Por lo tanto, estos experimentos refuerzan la noción de que ST3Gal-II se distribuye a lo largo del complejo de Golgi encontrándose principalmente en compartimientos proximales.

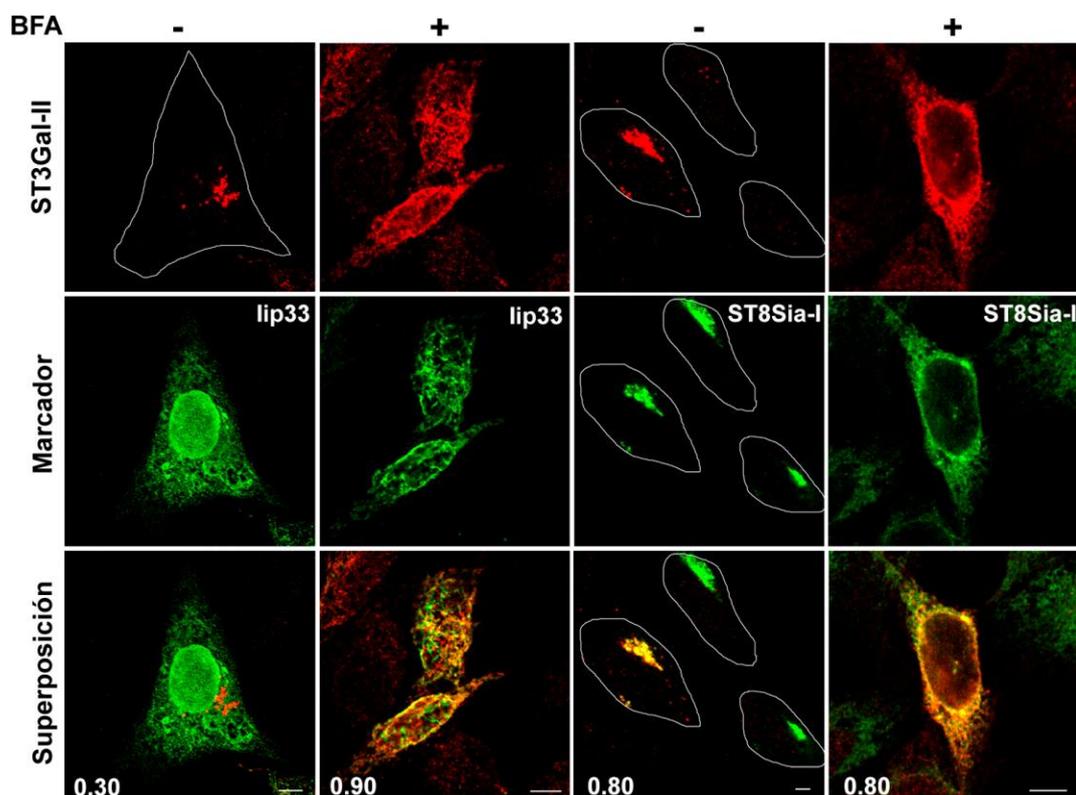


Figura II-5. Efecto de brefeldina A (BFA) en la localización subcelular de ST3Gal-II

Células CHO-K1 que expresan de manera estable ST3Gal-II-myc fueron transfectadas para expresar Iip33-YFP (una proteína de membrana tipo-II residente de RE) y tratadas (+) o no (-) con BFA (2 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C por 30 minutos. Por otro lado, células CHO-K1 que expresan de manera estable ST8Sia-I-YFP fueron transfectadas para expresar ST3Gal-II-myc y tratadas (+) o no (-) con BFA como se indica más arriba. Un anticuerpo policlonal anti-c-myc producido en conejo fue usado para la detección de ST3Gal-II-myc. La expresión de ST8Sia-I y de Iip33 fue detectada por la fluorescencia intrínseca de YFP. En algunos casos se muestra el contorno de las células (líneas blancas). Los coeficientes de colocalización de Manders se muestran en el panel de superposición. Escala: 5 μm .

Localización subcelular y expresión de ST3Gal-II en respuesta al tratamiento con tunicamicina y castanospermina

La predicción de los sitios de N-glicosilación en ST3Gal-II fue hecha usando el servidor de predicción NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Análisis de la secuencia primaria de aminoácidos mostró dos sitios potenciales de N-glicosilación (Asn92 y Asn211) (Fig. II-2) y la asparagina que obtuvo un puntaje predictivo de N-glicosilación por el algoritmo fue la Asn211, mientras que la predicción para la Asn92 estuvo por debajo del valor umbral. Adicionalmente, debe mencionarse que la presencia de un residuo prolina (Pro95) en la posición +3 con respecto a la Asn92 es indicativo de una fuerte, aunque no absoluta, inhibición de la N-glicosilación (Ben-Dor et al. 2004). Inicialmente se observó que la expresión de ST3Gal-II en presencia del inhibidor general de la N-glicosilación tunicamicina, afectó

drásticamente la salida de la sialiltransferasa del RE, lo cual sugiere que la enzima estaría N-glicosilada y que esta modificación cotraduccional sería necesaria para un plegamiento adecuado de la proteína y posterior transporte hacia el complejo de Golgi (Fig. II-6A). Además, el polipéptido sintetizado en presencia de tunicamicina tuvo el peso molecular esperado para el calculado desde la secuencia primaria de aminoácidos de ST3Gal-II (41 kDa) (Fig. II-6B) sugiriendo que por lo menos uno de los sitios potenciales de N-glicosilación en ST3Gal-II estarían ocupados por un oligosacárido (2-3 kDa por cada N-glicano). A continuación, se exploró si perturbar el procesado del N-glicano que ocurre en el RE, impacta sobre el tráfico intracelular de la proteína. Para ello, la transfección y posterior expresión de ST3Gal-II se realizó en presencia de castanospermina, un inhibidor de las glucosidasas I y II de RE. Como se muestra en la Fig. II-6A, este inhibidor también afectó la localización de la sialiltransferasa en el complejo de Golgi con retención de la misma en el RE, pero no modificó significativamente su masa molecular (Fig. II-6B). Como se mencionó anteriormente, ST3Gal-II se expresó principalmente como un producto de 81 kDa, cuya formación probablemente involucra enlaces disulfuro entre las formas monoméricas y que puede ser evidenciado en condiciones no reductoras (Fig. II-3). La formación de este homocomplejo persistió cuando la salida de la proteína del RE fue impedida mediante el tratamiento con castanospermina, indicando que la formación de este homodímero ocurre principalmente en el RE (Fig. II-6C). Por otra parte, los homocomplejos también son evidenciados en células tratadas con tunicamicina (Fig. II-6D). En experimentos control, se observó que el tratamiento de células con tunicamicina o castanospermina no modificó significativamente la morfología ni distribución de GM130, una proteína de la matriz de cis-Golgi (Fig. II-7). Así, estos estudios farmacológicos fuertemente sugieren que ST3Gal-II estaría N-glicosilada y que ésta modificación sería necesaria para el tráfico y localización subcelular de la enzima pero no sería necesaria para la formación de homocomplejos.

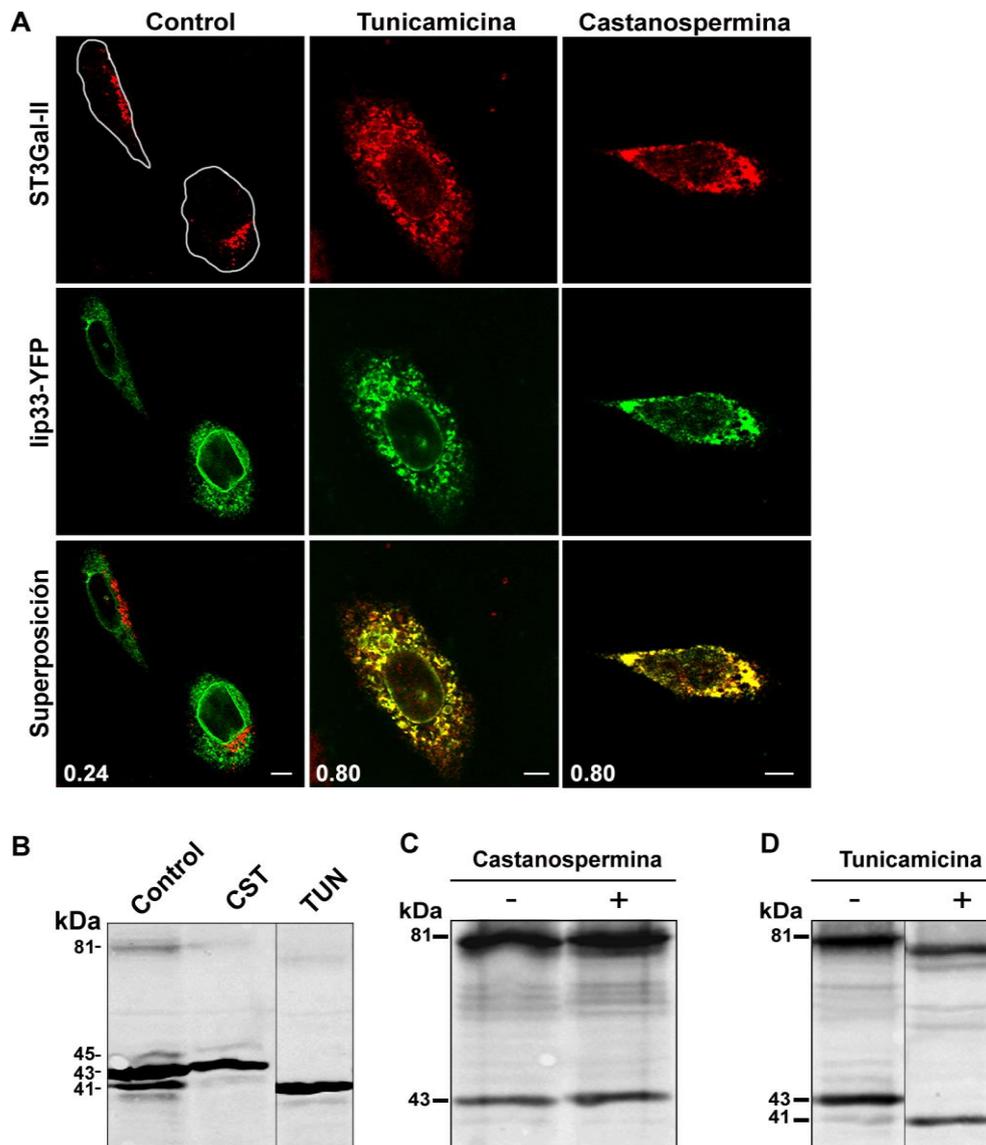


Figura II-6. Efecto de tunicamicina y castanospermina en la localización subcelular, N-glicosilación y homoasociación de ST3Gal-II

(A) Células CHO-K1 transfectadas transientemente para expresar ST3Gal-II-HA e Iip33-YFP fueron tratadas o no con 10 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina o 75 $\mu\text{g/ml}$ de castanospermina por 15 h post-transfección. Un anticuerpo monoclonal que une HA fue empleado para la detección de ST3Gal-II-HA. El anticuerpo primario fue detectado usando anticuerpos específicos conjugados a Alexa Flúor. En el panel de superposición se muestran los coeficientes de colocalización de Manders. Escala: 5 μm . (B) Homogenatos de células que expresan ST3Gal-II-HA en presencia o ausencia (Control) de castanospermina (CST) o tunicamicina (TUN) fueron separados en geles de SDS/poliacrilamida con 5% de βME en el buffer de siembra y revelados con anti-HA. Los pesos moleculares expresados en kDa se muestran en el lado izquierdo. Homogenatos de células que expresan ST3Gal-II-HA en presencia (+) o ausencia (-) de castanospermina (C) o tunicamicina (D) fueron separados en geles de SDS/poliacrilamida en ausencia de βME en el buffer de siembra y revelados con anti-HA. Los pesos moleculares expresados kDa se muestran en el lado izquierdo.

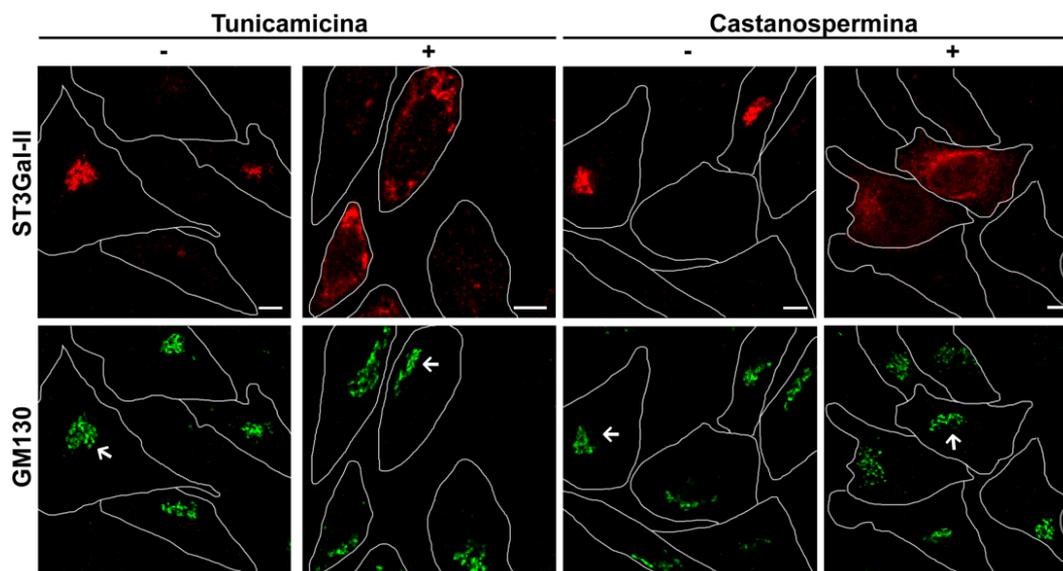


Figura II-7. Efecto de tunicamicina y castanospermina en la distribución subcelular de GM130

Células CHO-K1 transfectadas transientemente para expresar ST3Gal-II-HA fueron tratadas o no con 10 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina o 75 $\mu\text{g/ml}$ de castanospermina por 15 h post-transfección e inmunomarcadas para detectar ST3Gal-II-HA y GM130. Se muestra el contorno de las células (líneas blancas). Las flechas señalan la localización del marcador de Golgi GM130. Escala: 5 μm .

El estado de N-glicosilación de ST3Gal-II afecta su localización subcelular

Para demostrar que ST3Gal-II se encuentra N-glicosilada y determinar el impacto de ésta modificación en el transporte intracelular de la proteína, los residuos de asparagina Asn92 y/o Asn211 fueron reemplazados por residuos glutamina mediante mutagénesis sitio dirigida usando como templado el plásmido que codifica la versión de ST3Gal-II-HA. Como se muestra en la Fig. II-8A, la mutación del sitio de N-glicosilación en la posición Asn211 (N211Q) resultó en una casi total retención de ST3Gal-II en el RE. Un resultado similar fue hallado para la proteína que posee los dos sitios de N-glicosilación mutados (N92Q,N211Q). La mutación en el sitio Asn92 (N92Q) no alteró la localización de ST3Gal-II en Golgi y no cambió significativamente el peso molecular del polipéptido analizado por Western blot (Fig. II-8B). Por el contrario, la mutación en Asn211 principalmente resultó en la producción de un polipéptido con un peso molecular esperado para la forma no glicosilada (41 kDa) y una banda minoritaria (cercano al 2% de la expresión total) la cual probablemente corresponde a ST3Gal-II ligeramente glicosilada en Asn92 (43 kDa). La doble mutante resultó en un polipéptido con una masa molecular de 41 kDa (Fig. II-8B). Estos resultados indican que ST3Gal-II se halla principalmente N-glicosilada en Asn211 y que esta modificación cotraduccional es crítica para su salida de RE y apropiada localización en el complejo de Golgi.

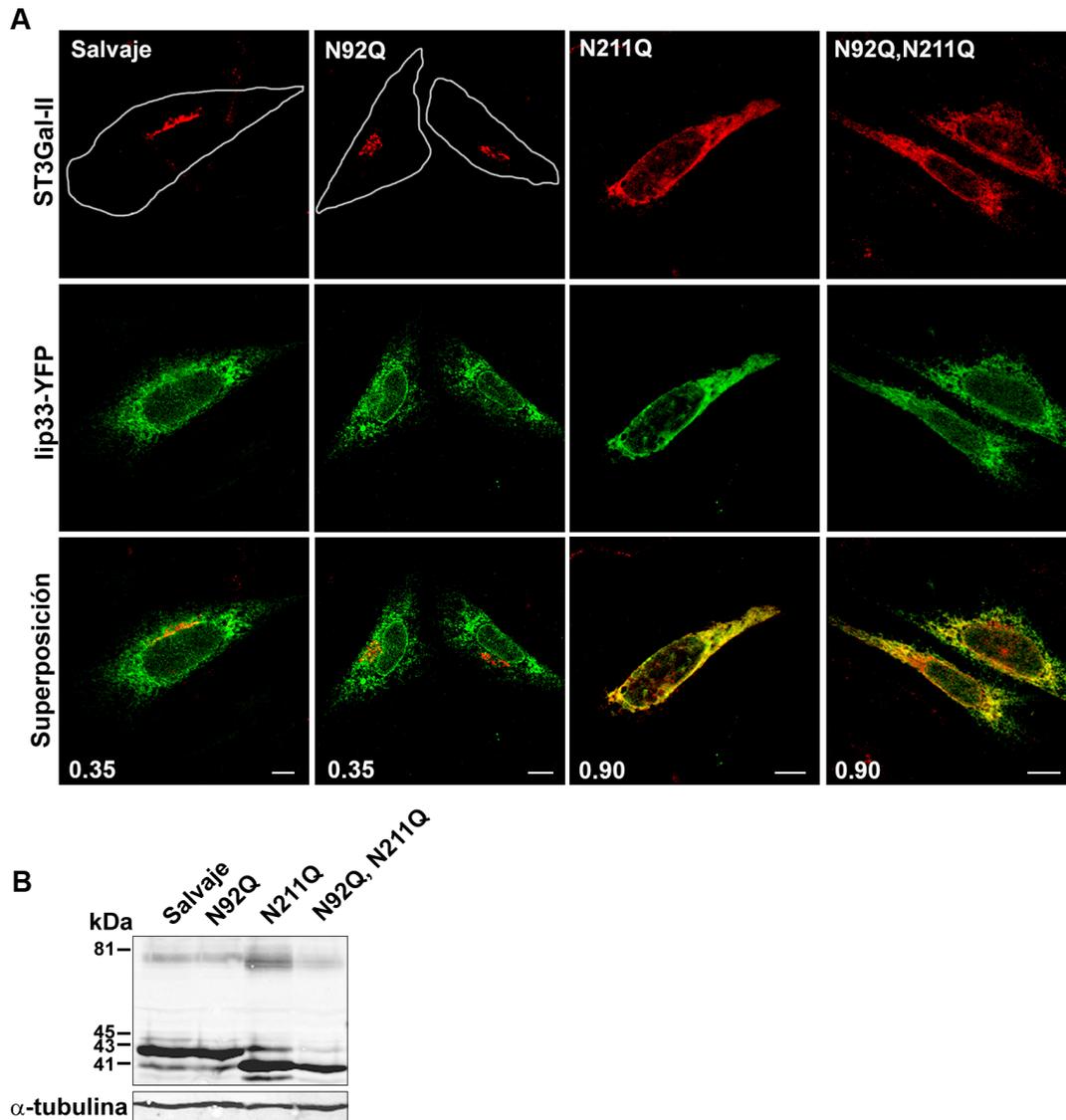


Figura II-8. Expresión y localización subcelular de ST3Gal-II salvaje y sus mutantes de N-glicosilación

(A) Células CHO-K1 fueron cotransfectadas para expresar Iip33 y ST3Gal-II (salvaje o alguna de sus versiones mutantes de N-glicosilación: N92Q, N211Q o N92Q,N211Q), luego fijadas, permeabilizadas e inmunomarcadas para la detección de ST3Gal-II-HA. En el panel de superposición se muestran los coeficientes de colocalización de Manders. Escala: 5 μ m. (B) Homogenatos totales de células transfectadas como se menciona en A, fueron separados en geles de SDS/poliacrilamida con 5% de β ME en el buffer de siembra. Los pesos moleculares expresados en kDa se muestran en el lado izquierdo.

Análisis del estado de N-glicosilación de ST3Gal-II mediante la digestión *in vitro* con PNGasa F

La presencia del N-glicano fue también analizada mediante digestión *in vitro* con PNGasa F, enzima que libera oligosacáridos de su unión a glicoproteínas mediante el clivaje del enlace entre GlcNAc y asparagina (GlcNAc β 1-Asn), independientemente de la complejidad del

oligosacárido. Una excepción la constituyen los N-glicanos que poseen α 1-3 fucosa unida a GlcNAc β 1-Asn (Fuc α 1-3-GlcNAc β 1-Asn), característica de varias N-glicoproteínas de plantas pero no de mamíferos donde sólo se encontró fucosa α 1-6-GlcNAc y donde si es activa (Tretter et al. 1991). Otra excepción se da cuando el oligosacárido se encuentra asociado a una asparagina en el extremo C o N terminal de un polipéptido (Tarentino et al. 1985). Como se muestra en la Fig. II-9, el tratamiento con PNGasa F causó una reducción del peso molecular desde 43 kDa a 41 kDa, comparable al peso molecular de la doble mutante (N92Q,N211Q), lo cual indica la presencia de un N-glicano sensible a PNGasa F unido a ST3Gal-II.

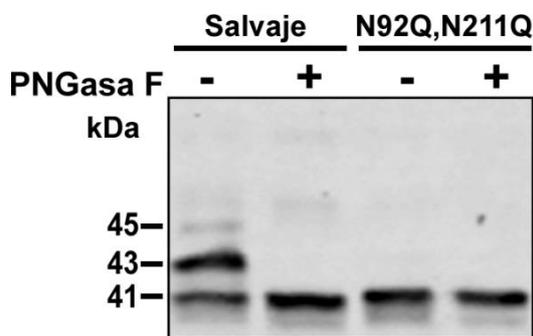


Figura II-9. Digestión de ST3Gal-II con PNGasa F
Homogenatos de células CHO-K1 que expresan ST3Gal-II salvaje o su versión doble mutante (N92Q,N211Q) fueron tratadas con 1500 unidades de PNGasa F por 4 h a 37°C y luego fueron separados en geles de SDS/poliacrilamida.

Estado de procesamiento del N-glicano. Digestión *in vitro* con endoglicosidasa H

Como un abordaje complementario para investigar la localización sub-Golgi de ST3Gal-II, se examinó el estado de procesamiento del N-glicano en la posición Asn211. Es bien conocido que las glicoproteínas que transitan a lo largo de la vía secretoria y que progresan más allá de del compartimiento medio del complejo de Golgi, sufren la acción sucesiva de las enzimas N-acetilglucosaminiltransferasa I/manosidasa II, adquiriendo Endo H resistencia y glicosilación terminal de sus N-glicanos. El tratamiento con Endo H causó una reducción del peso molecular de ST3Gal-II desde 43 kDa a 41 kDa similar al observado para el polipéptido sintetizado en presencia de tunicamicina y para la doble mutante de N-glicosilación (N92Q,N211Q) (Fig. II-10). Este resultado indica que el oligosacárido presente en ST3Gal-II contiene una alta proporción de residuos manosa, lo cual sugiere que la mayor parte de ST3Gal-II no progresa más allá del compartimiento medio del complejo de Golgi y apoya la localización sub-Golgi de la sialiltransferasa demostrada por microscopia confocal y análisis farmacológicos.

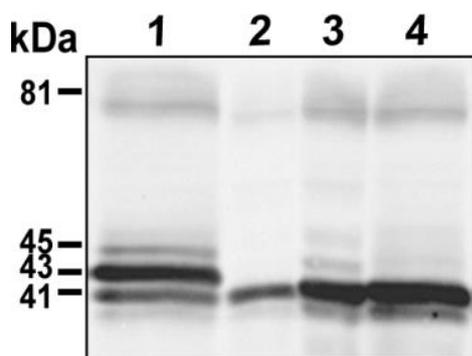


Figura II-10. Digestión de ST3Gal-II con Endoglicosidasa H (Endo H)

Homogenatos de células CHO-K1 que expresan ST3Gal-II fueron tratadas con 1.5 mU de Endo H por 18 h a 37°C y luego, 40 µg de proteínas totales fueron sometidos a electroforesis en geles de SDS / poliacrilamida (4). Como control, extractos de células que expresan ST3Gal-II salvaje (1) o la doble mutante de N-glicosilación de ST3Gal-II (N92Q,N211Q) (2) o ST3Gal-II salvaje sintetizada en presencia de tunicamicina (3) fueron procesadas simultáneamente.

El estado de N-glicosilación de ST3Gal-II influencia su actividad enzimática *in vitro*

La actividad enzimática de ST3Gal-II salvaje fue comparada con la de las mutantes de N-glicosilación. Usando un gangliósido como sustrato aceptor (GM1), ST3Gal-II (N211Q) retuvo un 47% de la actividad enzimática, mientras que la doble mutante (N92Q,N211Q) sólo exhibió un 24% de actividad (Fig. II-11A). Por otro lado, la simple mutante en Asn92 no modificó de manera significativa la actividad enzimática. Además observamos que el estado de N-glicosilación de ST3Gal-II también afectó la actividad enzimática hacia una glicoproteína (Fig. II-11B). Usando asialofetuina como sustrato aceptor, ST3Gal-II (N211Q) conserva el 29% de la actividad mientras que la doble mutante (N92Q,N211Q) mostró un 24% de actividad. Por lo tanto el glicano en la posición Asn211 parece influenciar el reconocimiento de sustrato o, eventualmente, eventos conformacionales que son necesarios para una apropiada actividad enzimática.

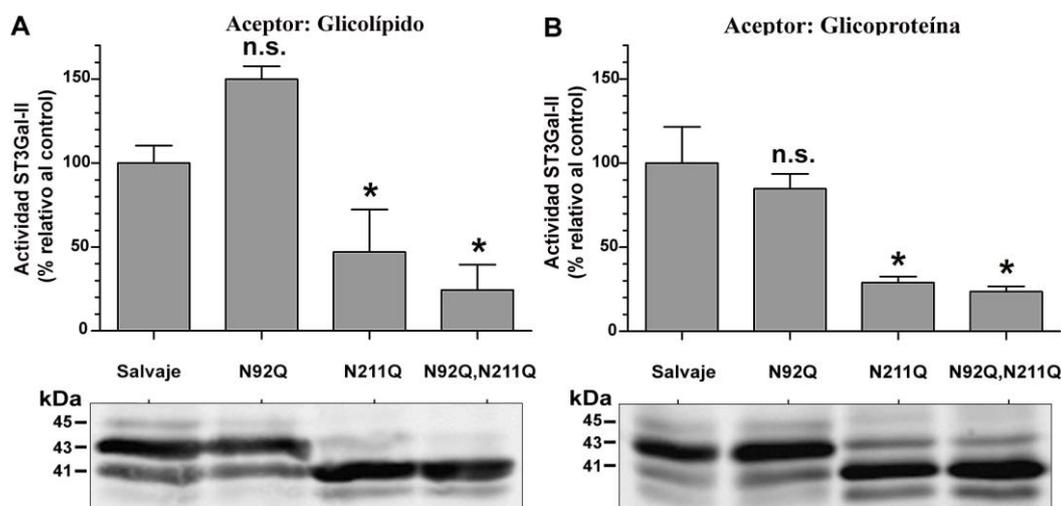


Figura II-11. Efecto de la N-glicosilación en la actividad enzimática de ST3Gal-II *in vitro*

(A) Homogenatos de células CHO-K1 que expresan ST3Gal-II salvaje o sus variantes de N-glicosilación fueron procesados para la determinación de la actividad enzimática de ST3Gal-II usando GM1 y CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc como sustrato aceptor y donador respectivamente. El producto fluorescente fue extraído y resuelto mediante HPTLC. La intensidad de fluorescencia obtenida en cada condición fue normalizada a los niveles de expresión de la enzima analizados por Western blot. Un gel representativo se muestra debajo del histograma con los pesos moleculares indicados en kDa. La actividad enzimática fue expresada relativa a la condición correspondiente a ST3Gal-II salvaje. (B) La actividad sialiltransferasa hacia una glicoproteína fue explorada mediante el empleo de asialofetuina y CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc como sustrato aceptor y donador respectivamente. Las proteínas totales fueron precipitadas y la intensidad de fluorescencia obtenida en cada condición fue normalizada a los niveles de expresión de ST3Gal-II analizados por Western blot. Un gel representativo se muestra debajo del histograma con los pesos moleculares indicados en kDa. La actividad enzimática fue expresada relativa a la condición correspondiente a ST3Gal-II salvaje. Los resultados son la media \pm EEM de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas de actividad enzimática entre la versión salvaje y las versiones mutantes de la enzima se evaluaron mediante la prueba de ANOVA seguido de prueba de Dunnett y se indican con * ($p < 0,01$). Las diferencias no significativas se indican como: n.s.

La región N-terminal, no glicosilada, de ST3Gal-II dirige su localización hacia el complejo de Golgi

Muchos estudios indican que determinantes que residen en el dominio N-terminal (NtD) de proteínas transmembrana tipo II están involucrados en su localización en el complejo de Golgi. Específicamente, fue demostrado para las glicosiltransferasas de gangliósidos que el principal mecanismo de retención en Golgi involucra su dominio transmembrana y que la N-glicosilación no constituye un requerimiento absoluto para la localización en el complejo de Golgi (Maccioni et al. 1999; Daniotti and Iglesias-Bartolome 2011; Maccioni et al. 2011). Para examinar el rol del NtD de ST3Gal-II en su transporte y localización subcelular, se construyó una proteína quimérica que contiene la región citosólica, transmembrana y región espaciadora de la sialiltransferasa (aminoácidos 1-51) fusionada a la proteína fluorescente mCherry (WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry), reemplazando de esta manera el extremo C-terminal que contiene los

sitios de N-glicosilación (Fig. II-12A). Los resultados mostrados en la Fig. II-12B indican que el NtD de ST3Gal-II fue capaz de conducir a la proteína fluorescente (no glicosilada) fuera del RE y de retenerla en el complejo de Golgi, contrastando con la retención en RE de la doble mutante de N-glicosilación (N92Q,N211Q) (Fig. II-8A). Este resultado también sugiere que el dominio C-terminal de ST3Gal-II depende de la N-glicosilación para alcanzar una conformación óptima que le permita salir del RE y ser transportada hacia el complejo de Golgi.

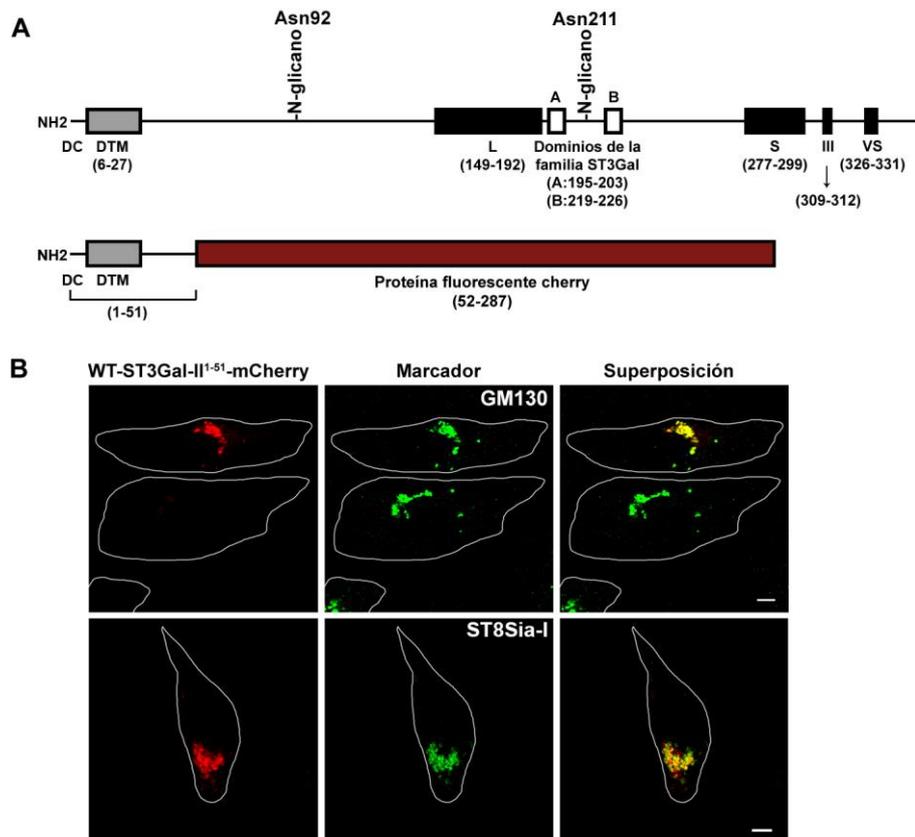


Figura II-12. El dominio N-terminal (amino ácidos 1–51) de ST3Gal-II dirige la localización en el complejo de Golgi de una proteína fluorescente

(A) Representación esquemática de la secuencia primaria de amino ácidos de ST3Gal-II salvaje y WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry, una proteína quimérica que contiene el dominio N-terminal (regiones, citoplasmática, transmembrana y espaciadora; aminoácidos 1 al 51) de ST3Gal-II fusionada a la proteína fluorescente mCherry. Los dominios conservados de la superfamilia de las sialiltransferasas sialilmotivos L, S, VS y III se representan con rectángulos negros. Los dominios conservados de la familia de las ST3Gal se representan con rectángulos blancos. DC: dominio citoplasmático, DTM: Dominio transmembrana. Debajo de cada dominio se indica la posición inicial y final del mismo. (B) Células CHO-K1 fueron transfectadas transientemente para expresar WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry e incubadas con anticuerpos específicos anti GM130 o cotransfectadas para expresar WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry y ST8Sia-I, una glicosiltransferasa residente de Golgi proximal. Las imágenes de superposición se muestran en la columna de la derecha. Escala: 5 μ m.

Rol del residuo cisteína del dominio citoplasmático en la dimerización y transporte intracelular de ST3Gal-II

Además de localizarse en el complejo de Golgi, WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry, al igual que la versión completa de ST3Gal-II, puede formar dímeros sensibles a β ME (Fig. II-13), razón por la cual se realizaron experimentos para determinar si el único residuo cisteína en WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry localizado en el corto dominio citoplasmático (MKCSLR), podría estar involucrado en la asociación de los monómeros y como esto puede impactar en el tráfico subcelular de la proteína. Para ello se produjo una versión de la proteína fluorescente en la cual esta cisteína fue reemplazada por alanina mediante mutagénesis sitio dirigida para generar una proteína con la secuencia MKASLR en su dominio citoplasmático (C3A-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry) (Fig. II-14A). Como se muestra en la Fig. II-14B, ésta mutación no alteró la localización subcelular de la proteína, pero si modificó la capacidad de formar dímeros sensibles a β ME.

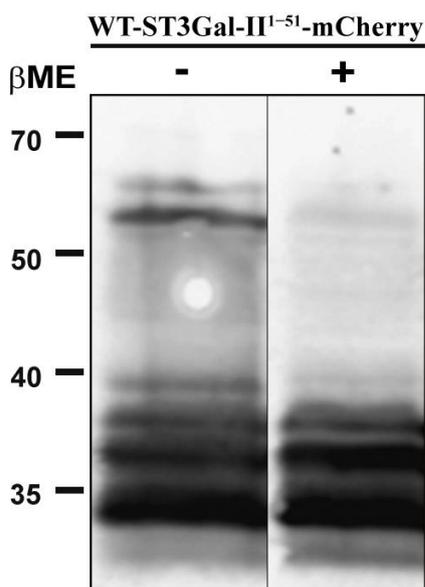


Figura II-13. Expresión de WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry en células CHO-K1

Homogenatos totales de células CHO-K1 (40 μ g) transfectadas transientemente con el vector que codifica la expresión de WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry fueron separados en geles de SDS/poliacrilamida al 12% con (+) o sin (-) 5% de β ME en el buffer de siembra. Los pesos moleculares expresados kDa se muestran en el lado izquierdo.

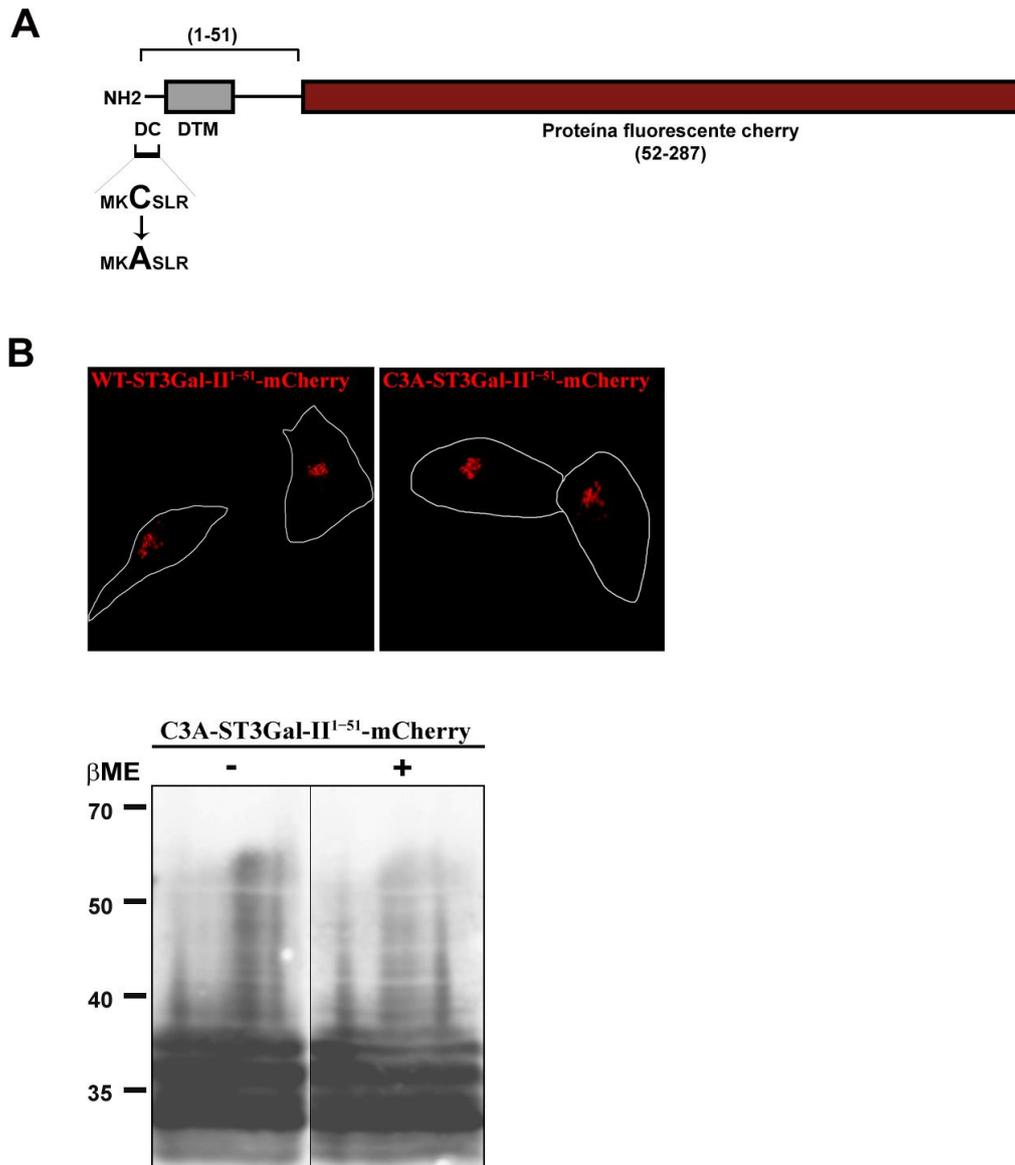


Figura II-14. Sustitución de cisteína por alanina en el dominio citoplasmático (MKCSLR) de ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry no afecta su localización subcelular pero previene su dimerización

(A) Representación esquemática de la sustitución de cisteína por alanina en WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry para generar la versión C3A-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry. Se indica la posición inicial y final de cada dominio entre paréntesis. (B) Células CHO-K1 que expresan C3A-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry fueron fijadas para explorar la localización subcelular de la proteína (panel derecho). En paralelo se procesaron células que expresan de manera transiente la versión WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry que posee el residuo cisteína en su dominio citoplasmático (panel izquierdo). Un homogenato total de éstas células fue separado en geles de SDS/poliacrilamida al 12% con (+) o sin (-) 5% de β ME en el buffer de siembra. Los pesos moleculares expresados en kDa se muestran en el lado izquierdo.

Como se describió anteriormente, la doble mutante de N-glicosilación de ST3Gal-II (N92Q,N211Q) se localiza principalmente en el RE (Fig. II-8). En experimentos de coexpresión de N92Q,N211Q con las variantes fluorescentes (WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry o C3A-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry) se observó que ST3Gal-II-N92Q,N211Q es más frecuentemente encontrada en

el complejo de Golgi cuando se coexpresa con WT-ST3Gal-II-¹⁻⁵¹-mCherry que cuando la coexpresión es con C3A-ST3Gal-II-¹⁻⁵¹-mCherry (Fig. II-15). Por lo tanto, este resultado sugiere un rol para este residuo cisteína en el transporte subcelular a través de la formación y/o estabilización de homocomplejos en el RE como se ha descrito previamente para otras glicosiltransferasas de gangliósidos (Ferrari et al. 2012).

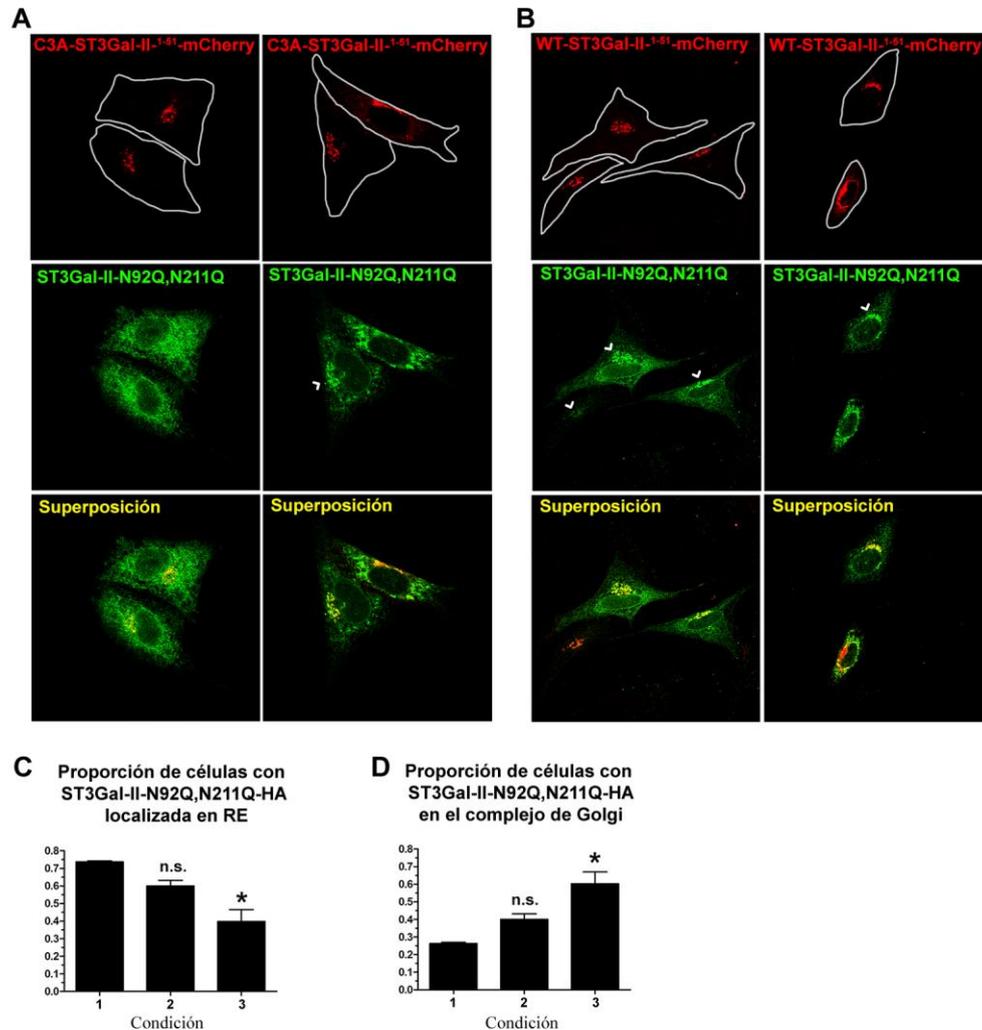


Figura II-15. ST3Gal-II-¹⁻⁵¹-mCherry rescata parcialmente a ST3Gal-II-N92Q,N211Q del retículo endoplásmico

Células CHO-K1 fueron cotransfectadas para expresar ST3Gal-II-N92Q,N211Q-HA y la versión fluorescente de ST3Gal-II (ST3Gal-II-¹⁻⁵¹-FT) en su versión mutante (C3A-ST3Gal-II-¹⁻⁵¹-mCherry (**A**), primera y segunda columna) o su versión salvaje (WT-ST3Gal-II-¹⁻⁵¹-mCherry (**B**), tercera y cuarta columna). Las flechas indican la localización de ST3Gal-II-N92Q,N211Q-HA en el complejo de Golgi. Se muestra la proporción de células con ST3Gal-II-N92Q,N211Q-HA localizada en el RE (**C**) o en el complejo de Golgi (**D**). En cada condición la suma de la proporción de ST3Gal-II-N92Q,N211Q-HA en Golgi y RE es igual a 1. Las condiciones en los gráficos son (1) ST3Gal-II-N92Q,N211Q-HA simple transfección, (2) ST3Gal-II-N92Q,N211Q-HA cotransfectada con C3A-ST3Gal-II-¹⁻⁵¹-mCherry (3) ST3Gal-II-N92Q,N211Q-HA cotransfectada con WT-ST3Gal-II-¹⁻⁵¹-mCherry. Las diferencias en las proporciones se evaluaron mediante la prueba de ANOVA seguido de prueba de Dunnett. Las diferencias significativas se indican con * ($p < 0,01$) y las diferencias no significativas se indican como: n.s.

DISCUSIÓN

Las glicosiltransferasas de gangliósidos se caracterizan por presentar N-glicanos que son esenciales para su correcta localización subcelular y función. Por ejemplo, en β 3GalT-IV (Martina et al. 2000), β 4GalNAcT-I (Haraguchi et al. 1995) y ST8Sia-I (Martina et al. 1998; Daniotti et al. 2000), se encontró que la N-glicosilación es necesaria para la actividad y localización subcelular, probablemente reflejando mecanismos de control de calidad de la conformación de la proteína mediado por el oligosacárido en el RE (D'Alessio et al. 2010; Maccioni et al. 2011). Además, también fue demostrado que la N-glicosilación ocurre en glicosiltransferasas de glicoproteínas. En particular, se conoce el rol crítico que tienen los N-glicanos en las propiedades enzimáticas de α 1,3/4-fucosiltransferasa III, -V y -VI (Christensen et al. 2000), β -1,6-N-acetilglucosaminiltransferasa (Toki et al. 1997) y en el tráfico intracelular y distribución subcelular de ST6Gal-I (Chen and Colley 2000) y N-acetilglucosaminiltransferasa III (Nagai et al. 1997). En el presente capítulo, mediante microscopía confocal, experimentos farmacológicos y bioquímicos y mutagénesis sitio dirigida, se demostró que ST3Gal-II se encuentra ampliamente distribuida en las cisternas del complejo de Golgi, principalmente en compartimientos proximales y que está N-glicosilada en la asparagina 211. Los resultados muestran que la mutante de ST3Gal-II que carece de N-glicosilación tiene una disminuida salida del RE y localización apropiada en el complejo de Golgi, lo cual probablemente sea debido a cambios conformacionales en la proteína. Además, también sugiere que ST3Gal-II requiere un correcto procesamiento de sus N-glicanos para una adecuada localización en el complejo de Golgi ya que la inhibición de las glucosidasas I y II residentes de RE afectó severamente su salida de esta organela. El tratamiento con Endo H mostró que la mayor parte del N-glicano de ST3Gal-II es sensible a la endoglicosidasa lo cual indica que el oligosacárido no es del tipo complejo y que contiene una alta proporción de residuos manosa. Además, este resultado también indica que la mayor parte de ST3Gal-II no progresa más allá del compartimiento medio de Golgi y apoya la localización sub-Golgi de la sialiltransferasa demostrada por microscopía confocal y análisis farmacológicos.

Todas las sialiltransferasas eucariotas contienen ciertas secuencias conservadas referidas como sialilmotivos L (large, grande), S (small, pequeño) y VS (very small, muy pequeño) (Datta and Paulson 1997; Geremia et al. 1997) (Fig. II-12A). Más adelante, un motivo adicional, denominado motivo III, se encontró localizado entre los sialilmotivos S y VS y conservado en todas las sialiltransferasas (Jeanneau et al. 2004). Más recientemente, se han identificado y

descripto diversos motivos que son únicos de cada una de las familias de las sialiltransferasas (Patel and Balaji 2006). Particularmente, la familia ST3Gal contiene dos motivos específicos de unión localizados entre los motivos L y S (Fig. II-12A). Se cree que estos motivos son importantes para la especificidad de unión y para el reconocimiento del residuo de oligosacárido aceptor de ácido siálico (Patel and Balaji 2006). En este sentido, debe ser remarcado que la asparagina N-glicosilada en ST3Gal-II (Asn211) está localizada entre los dos motivos identificados de la familia ST3Gal, lo cual sugiere fuertemente que esta modificación cotraduccional podría eventualmente influenciar las propiedades enzimáticas de la sialiltransferasa, como se observó usando un glicolípido y una glicoproteína como sustratos aceptores (Fig. II-11).

Ha sido previamente demostrado para otras glicosiltransferasas de gangliósidos que el principal mecanismo de retención en el complejo de Golgi involucra sus dominios transmembrana y que la N-glicosilación no es un requisito absoluto para la localización en Golgi (Maccioni et al. 1999; Daniotti and Iglesias-Bartolome 2011; Maccioni et al. 2011). De acuerdo con los resultados mostrados en la Fig. II-12, ST3Gal-II no parece ser la excepción. Se observó que el dominio N-terminal de ST3Gal-II fue capaz de conducir una proteína reportera fluorescente (ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry) fuera del RE y de retenerla en el complejo de Golgi, apoyando la noción de que determinantes moleculares que residen en la región N-terminal dirigen la localización de las glicosiltransferasas en Golgi. Además, los resultados que se muestran en la Fig. II-13 y Fig. II-14 indican que la región N-terminal de ST3Gal-II, estaría involucrada en la formación de homocomplejos que serían estabilizados a través de enlaces disulfuro, ya que en condiciones reductoras (Fig. II-13) y ante la ausencia del residuo cisteína en su dominio citoplasmático (Fig. II-14B), no se evidencian las bandas compatibles con homodímeros. Es bien conocido que la formación de puentes disulfuro ocurre en el medioambiente oxidativo del RE (Bulleid 2012; Oka and Bulleid 2013). A pesar que el ambiente reductor del citosol debería ser prohibitivo para la formación de enlaces disulfuro (Hwang et al. 1992; Lopez-Mirabal and Winther 2008), la ocurrencia de este tipo de unión en proteínas citoplasmáticas susceptibles a la oxidación ha sido descrita (Cumming et al. 2004; Ostergaard et al. 2004) particularmente bajo condiciones de estrés oxidativo (Aslund and Beckwith 1999). No está claro si este es el caso de ST3Gal-II. Lo que sí está claro es que el residuo cisteína citoplasmático tiene un rol en la formación y/o estabilización de homocomplejos. Al respecto, ST3Gal-II se expresó principalmente como un producto de 81 kDa, cuya formación persistió cuando la salida de la proteína del RE fue impedida mediante la inhibición de las glucosidasas I y II con castanospermina (Fig. II-6C), indicando que la formación de este homodímero a través de puentes disulfuro ocurre principalmente en el RE. En

este sentido, homodímeros unidos por puentes disulfuro de β 4GalNAcT-I formados en el RE (Jaskiewicz et al. 1996) han sido descritos. Además, experimentos usando la mutante N92Q,N211Q de ST3Gal-II o expresando ST3Gal-II en presencia de tunicamicina indicaron que la versión monomérica no glicosilada de ST3Gal-II también es capaz de formar dímeros (Fig. II-6D). El experimento mostrado en la Fig. II-15 sugiere que la formación de homocomplejos de ST3Gal-II tiene un rol en el transporte intracelular de la proteína ya que la versión mutante de N-glicosilación (ST3Gal-II-N92Q,N211Q), que es retenida en RE, fue rescatada parcialmente y localizó en el complejo de Golgi al coexpresar ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry. Este fenotipo fue más evidente cuando la versión de ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry coexpresada era la que presentaba el residuo cisteína en su dominio citoplasmático (Fig. II-15), nuevamente sugiriendo que este residuo en dicha localización tiene una función en la formación y/o estabilización de homocomplejos de ST3Gal-II. Al respecto, fue demostrado por experimentos de microscopía empleando la técnica de FRET que los dominios N-terminal de β 4GalNAcT-I, una glicosiltransferasa involucrada en la síntesis de los gangliósidos GM2, GD2 y GT2, son capaces de formar homocomplejos (Ferrari et al. 2012). Además, se encontró que glicosiltransferasas de glicoproteínas también forman homómeros y heterómeros durante su tránsito a través de los compartimientos secretorios tempranos (Hassinen et al. 2010; Hassinen and Kellokumpu 2014). Por otra parte, el residuo cisteína en el dominio citoplasmático de ST3Gal-II es susceptible de sufrir otra MPT denominada S-acilación. Esta modificación involucra la incorporación de un ácido graso, generalmente ácido palmítico, razón por la cual también se la conoce como “palmitoilación”. Esta es la única MPT por lipidación con carácter reversible y puede tener diferentes consecuencias en las proteínas que van desde su unión a membranas, segregación en dominios, transporte intracelular, función y estabilidad (Chamberlain and Shipston 2015). Actualmente se están llevando a cabo experimentos en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Javier Valdez Taubas (CIQUIBIC-CONICET, Departamento de Química Biológica, Fac. de Cs. Químicas, UNC) acerca del rol que esta MPT tiene en las glicosiltransferasas de gangliósidos. Resultados obtenidos recientemente y presentados en la “LII Reunión Anual de SAIB 2016” demuestran que el residuo cisteína de ST3Gal-II se encuentra S-acilado y que prevenir la acilación mediante el empleo del inhibidor 2-bromopalmitato resulta en un incremento en la fracción dimérica de ST3Gal-II. Debido a que tanto la formación de enlaces disulfuro, como la S-acilación son procesos reversibles, la fina regulación de estas MPTs podría ser utilizada por las células como un potencial mecanismo de regulación aun no caracterizado en estas glicosiltransferasas. A pesar que estos aspectos deben ser investigados más a fondo, se sugirió que la formación de complejos de glicosiltransferasas podría ser considerado como un mecanismo potencial de regulación de la actividad enzimática,

a través de la regulación de las composiciones y relación estequiométrica entre las enzimas involucradas en un proceso de glicosilación particular (Maccioni et al. 2011).

En conclusión, en este capítulo se demostró que ST3Gal-II se encuentra N-glicosilada en secuencias de glicosilación consenso y se reveló el rol que esta modificación tiene para su tráfico hacia el complejo de Golgi proximal y actividad enzimática. Vale destacar que el gangliósido GD1a, el producto de esta sialiltransferasa, es un glicolípido blanco de los auto anticuerpos asociados con un amplio rango de síndromes neuropatológicos agudos y crónicos, incluyendo el síndrome de Guillain-Barré y el síndrome de Miller-Fisher (Willison and Yuki 2002; Lardone et al. 2010; Fewou et al. 2012), que se estudian en el próximo capítulo de esta tesis.

Parte de los resultados presentados en este capítulo forman parte del trabajo:

Ruggiero FM, Vilcaes AA, Iglesias-Bartolomé R, Daniotti JL. "Critical role of evolutionarily conserved glycosylation at Asn211 in the intracellular trafficking and activity of sialyltransferase ST3Gal-II". *Biochem J.* 2015 Jul 1;469(1):83-95. Epub 2015 Apr 28. doi: 10.1042/BJ20150072.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos y mutagénesis sitio dirigida

El plásmido que codifica ST3Gal-II humana (hST3Gal-II) con el epítoto c-myc en su extremo C-terminal (pCi-hST3Gal-II-myc) fue sintetizado por Genescript (Piscataway, NJ, EEUU). Para generar pCEFL2-hST3Gal-II-HA, la secuencia de ST3Gal-II fue subclonada en el vector pCEFL2-HA, un pCEFL2 modificado que codifica el epítoto HA (hemaglutinina, YPYDVPDYA). Sustituciones de un único amino ácido (asparagina (N) por glutamina (Q)) en ST3Gal-II (N92Q, N211Q y N92Q,N211Q) fueron realizadas usando pCEFL2-hST3Gal-II-HA como templado y el kit de mutagénesis sitio dirigida QuickChange® (Stratagene). Para generar pCEFL2-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry, el cuál dirige la expresión de los primeros 51 aminoácidos de hST3Gal-II fusionada a la proteína fluorescente mCherry, el fragmento correspondiente de ADNc de ST3Gal-II fue subclonado en el plásmido pCherry (Clontech). La sustitución de un único amino ácido (cisteína (C) por alanina (A)) en ST3Gal-II fue realizada usando WT-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry como templado y el kit de mutagénesis sitio dirigida QuickChange® (Stratagene) para generar C3A-ST3Gal-II¹⁻⁵¹-mCherry. La identidad de cada constructo fue confirmada mediante secuenciación de ADN. La cadena invariante del complejo mayor de histocompatibilidad II (Iip33) fusionada a la proteína fluorescente amarilla (YFP) fue recibida de H.J.F. Maccioni (CIQUIBIC, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

Anticuerpos

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados en experimentos de inmunofluorescencia indirecta: anti-GM130 (proteína de la matriz de cis-Golgi de 130 kDa) y anti-TGN38 (red de trans-Golgi 38) ambos monoclonales producidos en ratón y adquiridos de BD Biosciences (San Jose, CA, EEUU). Anti-c-myc policlonal producido en conejo y anti-HA producido en ratón de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU). Los anticuerpos secundarios ⁴⁸⁸Anti-IgG y ⁵⁴⁶Anti-IgG de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EEUU).

Cultivo celular y transfección

Células de ovario de hámster chino (CHO-K1) (A.T.C.C., Manassas, VA, EEUU) fueron mantenidas a 37°C y 5% CO₂ en DMEM suplementado con SFB 10% v/v y antibióticos (penicilina 100 µg/ml y estreptomycin 100 µg/ml). Las células fueron transfectadas con 0,5-1,0 µg del plásmido indicado/cápsula de 35 mm de diámetro usando polietilenimina (PEI) lineal de 25 kDa (2µg PEI:1µg ADN) (Sigma-Aldrich). Adicionalmente, algunos experimentos fueron también realizados en un clon de células CHO-K1 transfectadas de manera estable con un plásmido que codifica la expresión del dominio N-terminal de ST8Sia-I (amino ácidos 1-57 conteniendo las regiones citosólica y transmembrana de la

proteína) fusionada a YFP (Crespo et al. 2010; Spessott et al. 2012). Para generar un clon de células CHO-K1 que expresan de manera estable ST3Gal-II, pCi-hST3Gal-II-myc fue transfectado en CHO-K1 usando polietilenimina como se indica más arriba. Luego de 48 h de expresión, las células fueron cultivadas en DMEM conteniendo 10% v/v SFB y 1 mg/ml de geneticina (G418). Las colonias de células transfectantes estables fueron aisladas y analizadas mediante inmunofluorescencia y Western blot para detectar la expresión de ST3Gal-II.

Microscopía confocal

Las células fueron crecidas en cubreobjetos y fueron lavadas dos veces con DMEM, fijadas en 1% (p/v) de paraformaldehído en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente, permeabilizadas con 0,1% tritón X-100/200 mM glicina en PBS por 2 minutos a temperatura ambiente y bloqueadas con 3% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS por 60 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células fueron expuestas durante 12 h a anticuerpo anti-c-myc diluido 1:3000 o anti-HA diluido 1:2500 en PBS-BSA 3% (p/v) a 4°C. Los anticuerpos secundarios empleados fueron ⁴⁸⁸Anti-IgG y ⁵⁴⁶Anti-IgG, ambos diluidos 1:1000. Después de lavar con PBS, las células fueron montadas con FluorSave (Calbiochem/EMD Biosciences, San Diego, CA, USA). Las imágenes confocales fueron tomadas usando el microscopio de escaneo confocal Olympus Fluoview FV-1000 equipado con un láser de argón/helio/neón y un objetivo de inmersión en aceite de 63x y 1,4 de apertura numérica. Secciones confocales de 0,8 μm fueron tomadas paralelas al cubreobjetos (secciones xy). Las imágenes fueron adquiridas y procesadas con el software del microscopio, FV10 y con el software ImageJ. Las imágenes finales fueron compiladas con Adobe Photoshop CS6. Las micrografías confocales de fluorescencia mostradas son representativas de al menos tres experimentos independientes.

Inhibición de la N-glicosilación y del remodelado del oligosacárido

Se transfectaron células CHO-K1 de manera transiente con 0,7 μg de pCi (vector vacío) o pCi-hST3Gal-II-myc en presencia de tunicamicina (10 μg/ml) (Enzo) o castanospermina (75 μg/ml) (Enzo) y luego se cultivaron durante 15 h en presencia de las drogas para permitir la expresión de ST3Gal-II-myc. Finalmente, las células fueron procesadas como se indica en el apartado microscopía confocal.

Digestiones con Endo H y PNGasa F

Para la digestión con Endo H (endoglicosidasa H), 30 μg de homogenatos de células CHO-K1 que expresan ST3Gal-II fue hervido durante 10 minutos y luego incubado por 18 h a 37°C en presencia o ausencia de 1,5 mU de Endo H en 25 μl de una solución que contiene 0,1 M de buffer citrato (pH 5,5), 0,5% SDS y 0,1 M βME. Para la digestión con PNGasa F (péptido N-glicosidasa F), 30 μg de homogenatos de células CHO-K1 que expresan ST3Gal-II en su versión salvaje o sus variantes mutantes de N-glicosilación fueron incubados en presencia o ausencia de 1500 unidades de PNGasa F por 4 h a 37°C en un volumen final de 60 μl. Las digestiones fueron detenidas con buffer de siembra y los productos fueron analizados por Western blot como se indica más abajo.

Ensayos de actividad enzimática

Células CHO-K1 que expresan de manera transiente ST3Gal-II-HA salvaje o las versiones simple o doble mutantes de N-glicosilación (N92Q, N211Q o N92Q,N211Q) fueron resuspendidas en 50 μ l de una solución que contiene 250 mM sucrosa en 10 mM Tris/HCl (pH 7.2). El sistema de incubación para determinar la actividad enzimática empleando un glicolípido como sustrato aceptor tenía un volumen final de 30 μ l y contenía 150 μ g de proteínas totales del extracto de células, 400 μ M GM1 (sustrato aceptor), 17,6 μ M CMP-9-fluoresceinil-NeuAc (sustrato donador, Glyco Medical Research), 20 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂, 75 μ g de Tritón CF54/Tween 80 (2:1 p/p) y 100 μ M de buffer cacodilato de sodio/HCl (pH 6.5). Las incubaciones fueron hechas a 37°C por 150 min. Las reacciones fueron detenidas con 500 μ l de cloroformo/metanol (2:1, v/v) y las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos para extraer lípidos. Los extractos lipídicos fueron suplementados con cantidades apropiadas de gangliósidos estándar y cromatografiados en placas de HPTLC (Merck) usando cloroformo/metanol y 0.25% CaCl₂ (60:36:8, vol.) como solvente. Los gangliósidos estándar fueron visualizados mediante exposición de la placa a vapores de yodo. Las imágenes fueron tomadas usando EC3 Bioimaging System (UVP) y analizadas usando ImageJ.

Un ensayo fluorimétrico fue realizado usando como sustrato aceptor una glicoproteína (Gross 1992; Giordanengo et al. 1997). El sistema de incubación contenía, en 30 μ l de volumen final, 50 μ g de proteínas totales del extracto celular, 20 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂, 100 μ M de buffer cacodilato de sodio/HCl buffer (pH 6.5), 100 μ M galactosa y 25 μ g Tritón CF54/Tween 80 (2:1, p/p). Adicionalmente, 6,3 μ M CMP-9-fluoresceinil-NeuAc más 53,7 μ M CMP-NeuAc (sustrato donador) y/o 60 μ g de asialofetaina (Sigma–Aldrich) fueron agregados al sistema de incubación. Las reacciones se realizaron a 37°C por 120 minutos y fueron detenidas con 37.5 μ l de cloroformo/metanol (1:4, v/v). Las proteínas precipitadas fueron lavadas dos veces con 30 μ l de metanol y luego resuspendidas en 300 μ l de PBS conteniendo 10 % buffer de siembra (4% SDS, 50 mM Tris/HCl y 5 mM EDTA). La fluorescencia total fue medida usando un espectrofluorómetro FluoroMax-P Horiba Jobin Yvon.

Western blot

Proteínas totales fueron precipitadas con cloroformo/metanol (1:4, v/v) y cuantificadas por el método de Bradford. Luego, 40 μ g de proteínas totales por condición fueron separadas en geles de poliacrilamida/SDS y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Luego de incubación con 5% (p/v) de leche descremada en polvo en TBS (50 mM Tris/HCl, pH 7,4 y 200 mM NaCl) por 60 minutos, las membranas fueron lavadas una vez con TBS e incubadas con anticuerpo monoclonal anti-HA (clone HA-7, Sigma–Aldrich) diluido 1:1000 en TTBS (TBS que contiene 0,5% Tween 20) a 4°C por 12 h. Las membranas fueron lavadas tres veces con TTBS en incubadas con una dilución 1:10000 de un anticuerpo policlonal anti IgG de ratón producido en cabra (IRDye800CW, LI-COR) por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron lavadas tres veces con TTBS y visualizadas usando el sistema infrarrojo de LI-COR según los protocolos del fabricante.

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron evaluados mediante análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de Dunnett para la comparación de múltiples grupos con un grupo control. El nivel de significancia fue establecido en 1% ($p < 0,01$). Los resultados se expresan como la media \pm EEM.

CAPÍTULO III:
CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN Y DESTINO
CELULAR DE ANTICUERPOS QUE
RECONOCEN LOS GANGLIÓSIDOS GD1a Y
GM1

INTRODUCCIÓN

Como se describió en el capítulo I (Introducción y Objetivos), los AGAbs, se han asociado con una amplia gama de síndromes neuropatológicos agudos y crónicos. En particular, los anticuerpos que reconocen GM1 y GD1a se relacionan con disfunción e injuria de axones motores en la neuropatía axonal motora aguda (AMAN), una variante del síndrome de Guillain-Barré que se caracteriza por afectar de manera exclusiva a nervios motores. Los AGAbs reconocen a los gangliósidos blanco presentes en la membrana axonal expuestos al medioambiente extracelular en o cerca de los nodos de Ranvier y en el terminal nervioso a nivel de la unión neuromuscular. En los nodos de Ranvier, la endocitosis de los complejos gangliósidos-AGAbs es mínima, mediando injuria selectiva de esta región por fijación de complemento. Por otro lado, en el terminal nervioso, la rápida endocitosis de los AGAbs atenúa en gran medida la lesión mediada por el complemento. De esta manera, los resultados sugieren que el procesamiento endocítico diferencial de AGAbs representa un factor modulador crítico de la lesión sitio específica en el SGB y neuropatías relacionadas. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la internalización de los AGAb no son del todo comprendidos.

En este capítulo se describe el destino celular de anticuerpos que unen los gangliósidos GD1a y GM1 los cuales se hallan asociados a neuropatías periféricas. Los anticuerpos de alta afinidad anti-GD1a empleados fueron obtenidos a partir de ratones genéticamente modificados y que carecen de gangliósidos complejos (Lunn et al. 2000; Schnaar et al. 2002) y uno de ellos es capaz de inducir neuropatía axonal en ratones (Sheikh et al. 2004) y ratas (Susuki et al. 2012). Los anticuerpos de alta afinidad y especificidad que reconocen GM1 usados, bloquean los potenciales de acción muscular en co-cultivos de músculo/médula espinal y marcan nodos de Ranvier y células de Schwann paranodales en raíces espinales humanas (Yuki et al. 2004).

Mediante técnicas bioquímicas, inmunofluorescencia y microscopia confocal *in vivo*, se realizó un estudio comparativo y detallado de la unión a membrana plasmática y de los requerimientos moleculares para la internalización o residencia en membrana de anticuerpos que unen los gangliósidos GD1a y GM1 en células epiteliales y derivadas de tejido neural.

RESULTADOS

El anticuerpo Ab1-GD1a se une específicamente a GD1a localizado en la membrana plasmática de células CHO-K1 y una fracción minoritaria es internalizada

La especificidad de unión del anticuerpo Ab1-GD1a *in vitro* fue analizada en un trabajo anterior (Schnaar et al. 2002). Brevemente, se describió que en experimentos de ELISA, la unión de Ab1-GD1a a GD1a es detectable a menos de 20 pmol del gangliósido por pocillo, mientras que no se detecta unión a GM1, GT1b ni GD1b (los principales gangliósidos de sistema nervioso central junto a GD1a) a concentraciones de hasta 100 pmol/pocillo. También se analizó la especificidad de unión de Ab1-GD1a hacia un panel de 14 gangliósidos (GA1, GM1b, GM3, GM2, GM1, GD3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b, GM1 α , GD1 α , GT1 α y GQ1 α). Ab1-GD1a no se unió significativamente a ninguno de los gangliósidos mencionados excepto a GD1a y GT1 α . Por otro lado, ensayos de inmunocromatografía en capa delgada revelaron que Ab1-GD1a no muestra reactividad cruzada contra ninguno de los principales gangliósidos de sistema nervioso central empleados (GM1, GD1b, GT1b) (Schnaar et al. 2002). Conociendo la especificidad *in vitro*, nos propusimos analizar la unión del anticuerpo monoclonal Ab1-GD1a conjugado con Alexa Fluor 568 (568 Ab1-GD1a) a la superficie de un clon de células CHO-K1 que expresa el gangliósido GD1a (CHO-K1^{GD1a/GM1+}) por transfección estable de β 4GalNAcT-I y β 3GalT-IV (Crespo et al. 2002). Como se mencionó anteriormente, este anticuerpo además reconoce GT1 α (Lunn et al. 2000; Schnaar et al. 2002), sin embargo, las células CHO-K1^{GD1a/GM1+} expresan los gangliósidos GM3, GM2, GM1 y GD1a (Fig. III-1A, línea 2). Para ello, células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron incubadas por 15 minutos a 4°C para inhibir el transporte intracelular y luego con 568 Ab1-GD1a por 45 minutos a 4°C para permitir la unión del anticuerpo al gangliósido GD1a expresado en la superficie celular. Posteriormente, las células fueron lavadas con medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) frío para remover el anticuerpo no unido y fijadas o transferidas a DMEM precalentado a 37°C por diferentes tiempos para restaurar el transporte y permitir la endocitosis. El análisis por microscopía confocal reveló que 568 Ab1-GD1a se une a las células CHO-K1^{GD1a/GM1+} a 4°C con un patrón de distribución punteado en membrana plasmática (Fig. III-1B). No se detectó unión en células CHO-K1 salvajes (CHO-K1^{GD1a/GM1-}) (Fig. III-1B) las cuáles expresan predominantemente el gangliósido GM3 (Fig. III-1A, línea 1). Solo 5 minutos después de cambiar la temperatura a 37°C para inducir la endocitosis, la fluorescencia total asociada al anticuerpo fue drásticamente reducida a un valor cercano al 25% (relativizado a la condición de

4°C) y comenzó a mostrar una distribución citoplasmática y yuxtannuclear (Fig. III-1C, flechas). Luego de 15 minutos a 37°C y a períodos de tiempo más largos (30 y 45 minutos), ⁵⁶⁸Ab1-GD1a

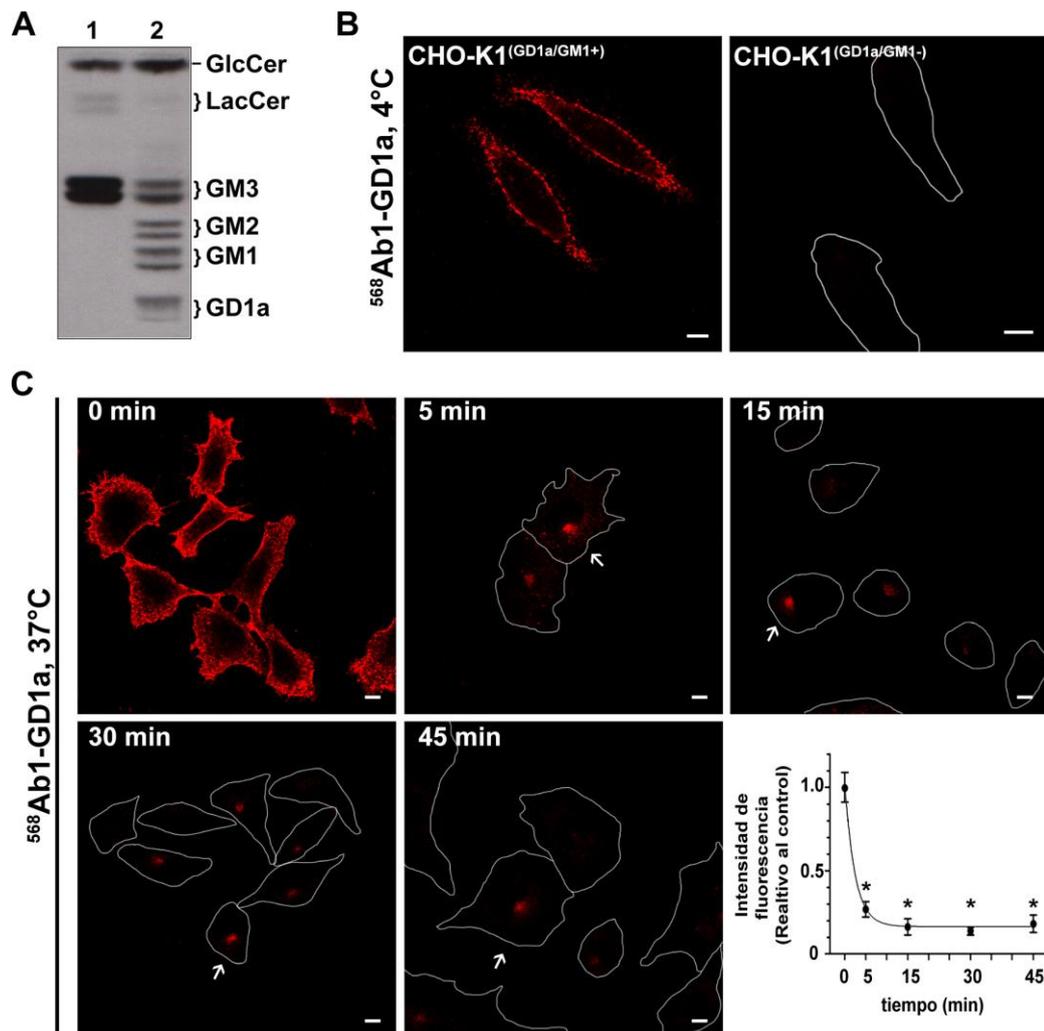


Figura III-1. Unión a la superficie de células CHO-K1^{GD1a/GM1+} y endocitosis de Ab1-GD1a, un anticuerpo monoclonal que reconoce los gangliósidos GD1a y GT1a α .

A. Cromatografía en capa delgada que muestra el patrón de expresión de gangliósidos de las células CHO-K1 salvajes (CHO-K1^{GD1a/GM1-}, línea 1) y de células CHO-K1 genéticamente modificadas para expresar los gangliósidos de la “serie – a” (CHO-K1^{GD1a/GM1+}, línea 2). Los gangliósidos fueron marcados metabólicamente con [³H] galactosa, purificados, separados por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) y visualizados mediante placa radiográfica. La posición de gangliósidos estándares se indica con corchetes. **B.** Células CHO-K1 genéticamente modificadas para expresar la “serie – a” de gangliósidos (CHO-K1^{GD1a/GM1+}, panel izquierdo) y células CHO-K1 salvajes (CHO-K1^{GD1a/GM1-}, panel derecho) fueron incubadas 15 minutos a 4°C seguidos de 45 minutos de incubación con ⁵⁶⁸Ab1-GD1a a 4°C. Luego, las células fueron lavadas y fijadas. Se muestran los bordes de las células CHO-K1^{GD1a/GM1-} (líneas blancas). Escala: 5 μ m. **C.** Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron marcadas como se indica en **B** y luego fijadas (0 min) o transferidas a DMEM precalentado a 37°C por diferentes tiempos. Se muestran imágenes confocales de 0,8 μ m tomadas paralelas al cubreobjetos representativas de al menos 3 experimentos independientes. En todos los tiempos de endocitosis se muestran los bordes de las células (líneas blancas). Las flechas señalan endocitosis. Escala: 5 μ m. En el gráfico se muestra la cuantificación de la señal total de inmunofluorescencia (media +/- EEM) que permanece asociada a la fracción celular a cada tiempo ensayado. Los valores fueron relativizados a la intensidad de fluorescencia obtenida para la condición de unión inicial (0 min). Las diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia entre el grupo control (0 min) y los grupos tratados (incubación a 37°C por diferentes períodos de tiempo) se indican con * (p<0,01). ANOVA seguido de prueba de Dunnett. EEM: error estándar de la media.

fue principalmente detectado en la región yuxtannuclear (Fig. III-1C, flechas). Estos resultados indican que $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ es parcialmente internalizado después de unir al gangliósido GD1a en membrana plasmática.

La fracción de Ab1-GD1a internalizada colocaliza con marcadores de endosomas de reciclado pero no con una proteína residente del complejo de Golgi

Como se describió anteriormente, la fracción de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ internalizada se localizó principalmente en una región yuxtannuclear. En células CHO-K1, ésta localización intracelular se asemeja a la típica distribución pericentriolar del complejo de Golgi o de los endosomas de reciclado (Gomez and Daniotti 2005; Iglesias-Bartolome et al. 2006). Para identificar este com-

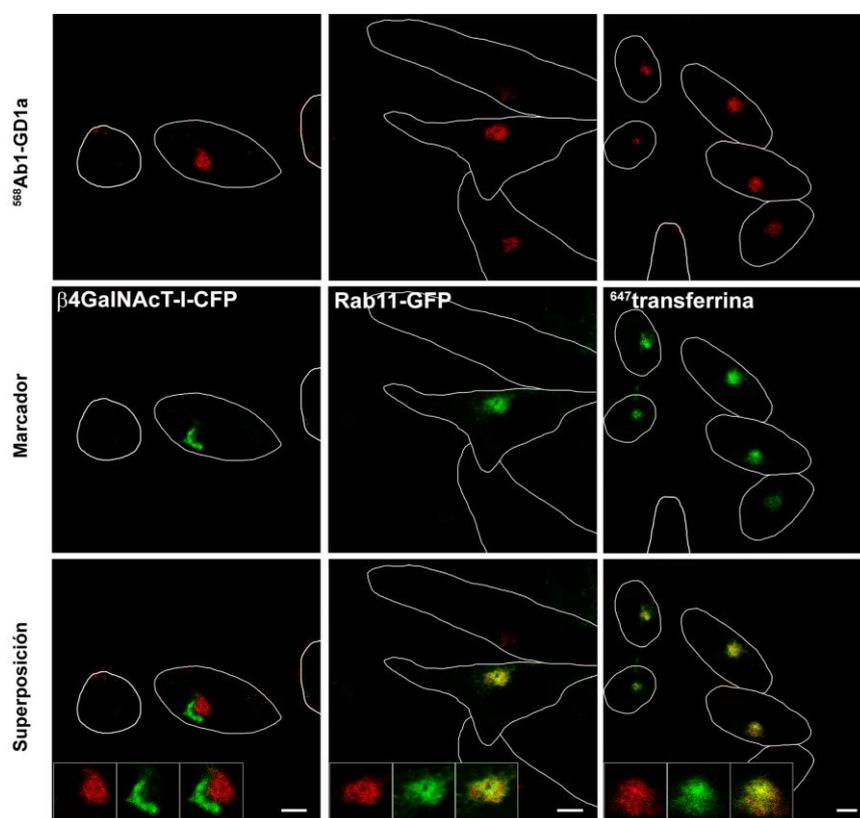


Figura III-2. Localización subcelular de la fracción endocitada de Ab1-GD1a en células CHO-K1^{GD1a/GM1+}

Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} transfectadas transientemente para expresar $\beta 4\text{GalNAcT-I-CFP}$ ($\beta 4\text{GalNAcT-I}$ fusionada a la proteína fluorescente cian (CFP), pseudo-coloreado verde, primera columna) o Rab11-GFP (Rab11 fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP), segunda columna) o no transfectadas (tercera columna) fueron incubadas por 15 minutos a 4°C y luego con $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ (y 10 $\mu\text{g/mL}$ $^{647}\text{transferrina}$, tercera columna solamente) por 45 minutos a 4°C. Luego las células fueron lavadas y transferidas a DMEM precalentado a 37°C (o DMEM precalentado a 37°C suplementado con 5 $\mu\text{g/mL}$ de $^{647}\text{transferrina}$, tercera columna solamente) por 30 minutos. Finalmente, las células fueron fijadas. Se muestran imágenes confocales de 0,8 μm tomadas paralelas al cubreobjetos representativas de al menos 3 experimentos independientes. Los recuadros en el panel de superposición muestran detalles a mayor magnificación. Se muestran los bordes de las células (líneas blancas). Escala: 5 μm .

partimiento yuxtanclear, se realizó un análisis de colocalización con marcadores de endosomas de reciclado y del complejo de Golgi (Fig. III-2). Luego de 30 minutos de internalización, no se observó colocalización entre $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ y $\beta 4\text{GalNAcT-I-CFP}$, una glicosiltransferasa del complejo de Golgi. Por otro lado, se observó una amplia colocalización entre $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ y la GTPasa Rab11, un marcador de endosomas de reciclado (Gomez and Daniotti 2005). Además, se encontró una importante colocalización de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ con transferrina co-endocitada (647 transferrina) en un compartimiento yuxtanclear, demostrando que la fracción mayoritaria de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ endocitada se encuentra presente en endosomas de reciclado de células CHO-K1.

La endocitosis de Ab1-GD1a es un proceso dinamina 2 independiente y Arf6 dependiente

Varias son las vías endocíticas involucradas en el acceso de diferentes moléculas al interior celular. Estas rutas de entrada pueden ser clasificadas como dinamina dependiente o dinamina independiente en función del requerimiento de la actividad de dinamina 2 para la escisión de las vesículas endocíticas (Fig. III-3A). Además, la endocitosis dependiente de dinamina 2 involucra las proteínas clatrina o caveolina, mientras que las GTPasas Arf6 o Cdc42 regulan la endocitosis independiente de dinamina 2 (Fig. III-3A). Por lo tanto, para explorar la vía endocítica que participa en la internalización de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$, primero se indagó si el proceso depende de dinamina 2. Para ello, se transfectaron de manera transiente células CHO-K1^{GD1a/GM1+} con una variante de dinamina 2 fusionada a GFP (dinamina 2 salvaje (WT) o dinamina 2-K44A (K44A), una mutante deficiente en unión e hidrólisis de GTP la cual es incapaz de promover endocitosis mediada por receptor de vesículas recubiertas de clatrina (van der Blik et al. 1993)). Luego de 30 minutos de endocitosis a 37°C, se evidenció una fracción de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ presente en endosomas de reciclado de células transfectadas con dinamina 2 K44A y WT (Fig. III-3B, flechas en primera y segunda columna respectivamente y Fig. III-3C). Como control, se investigó la endocitosis de 647 transferrina y se observó que no fue perturbada cuando se sobreexpresó la variante dinamina 2 WT contrastando con una potente inhibición de la endocitosis en células transfectadas con la variante mutante (K44A), como fue previamente demostrado (van der Blik et al. 1993) (Fig. III-3B, flechas en tercera y cuarta columna y Fig. III-3C). Dado que la internalización de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ no requiere dinamina 2, es probable que la endocitosis de este anticuerpo anti-gangliósido en células CHO-K1 ocurra por algún mecanismo independiente de clatrina y de caveolina 1.

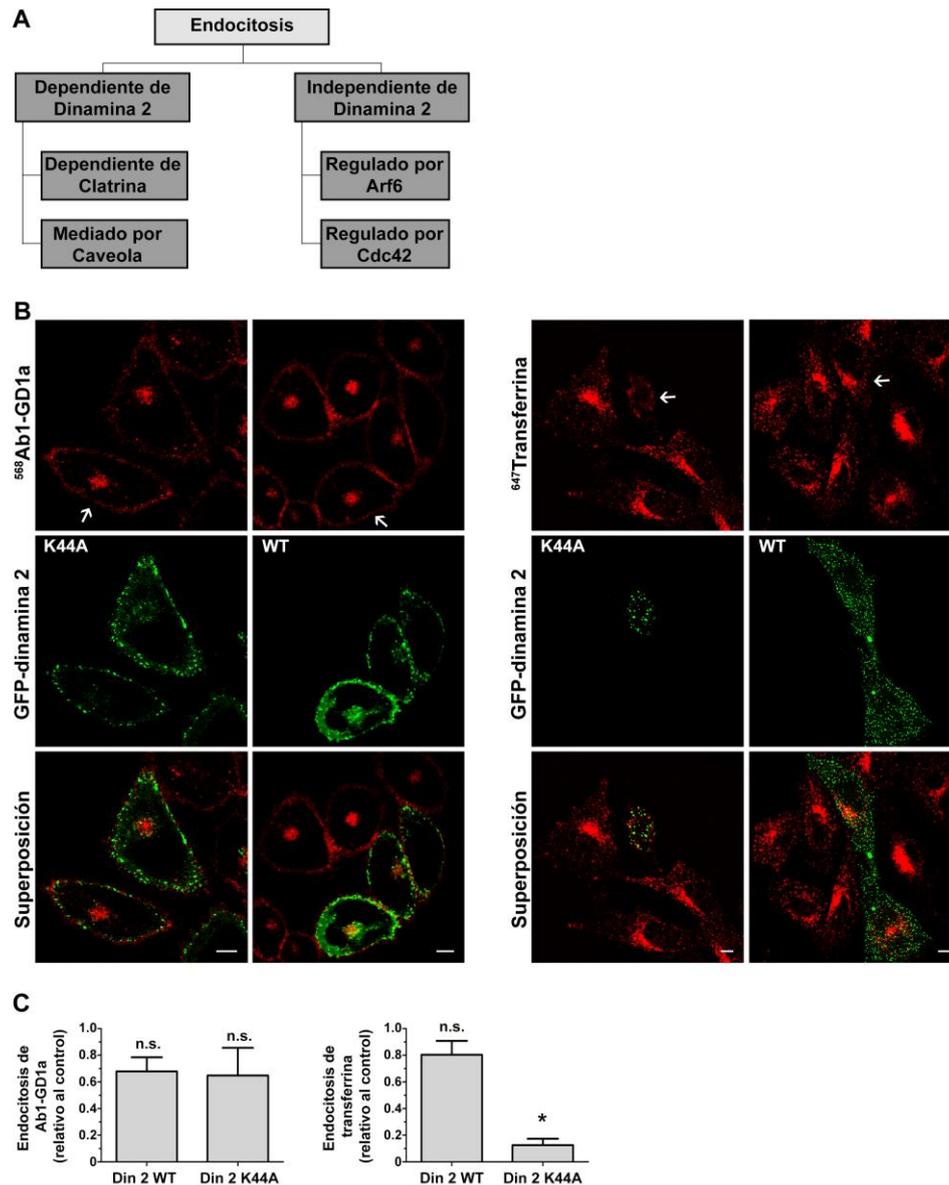


Figura III-3. La endocitosis de Ab1-GD1a es independiente de dinamina 2

A. Representación esquemática de las principales vías de endocitosis y su dependencia de la actividad de la GTPasa dinamina 2. **B.** Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} transfectadas para expresar de manera transiente la dominante negativa GFP-dinamina 2-K44A (K44A, primera columna) o GFP-dinamina 2 salvaje (WT, segunda columna) fueron incubadas 15 minutos a 4°C y luego marcadas por 45 minutos con ⁵⁶⁸Ab1-GD1a en DMEM frío. Las células fueron finalmente lavadas con DMEM frío e incubadas a 37°C en DMEM durante 30 minutos. En otro experimento, células CHO-K1^{GD1a/GM1+} transfectadas para expresar de manera transiente la dominante negativa GFP-dinamina 2-K44A (K44A, tercera columna) o GFP-dinamina 2 salvaje (WT, cuarta columna) fueron primero incubadas por 90 minutos en DMEM sin SFB y luego 45 minutos a 4°C en DMEM que contenía 10 µg/mL de ⁶⁴⁷transferrina y ⁵⁶⁸Ab1-GD1a. Finalmente las células fueron lavadas y el medio fue reemplazado por DMEM pre calentado a 37°C sin SFB suplementado con 5 µg/mL de ⁶⁴⁷transferrina e incubado a dicha temperatura durante 30 minutos. Las flechas señalan ⁵⁶⁸Ab1-GD1a o ⁶⁴⁷transferrina endocitados en células que expresan dinamina 2. Escala: 5 µm. **C.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (media +/- EEM) correspondiente a la fracción de ⁵⁶⁸Ab1GD1a o ⁶⁴⁷transferrina presente en el compartimiento endosomal de reciclado. Los valores fueron relativizados a la intensidad de fluorescencia obtenida para las células no transfectadas (arbitrariamente 1). Las diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia endocitada entre el grupo control (células no transfectadas) y los grupos tratados (transfección con dinamina 2 WT o K44A) se indican con * (p<0,01). Las diferencias no significativas se indican como: n.s. Prueba ANOVA seguido de prueba de Dunnett.

Tomando en cuenta estos resultados, se indagó si la pequeña GTPasa Arf6 tiene un rol en este proceso ya que la endocitosis asociada a Arf6 parece ser un evento dinámico independiente y estos endosomas pueden comunicarse y parcialmente superponerse con compartimientos positivos para transferrina (Naslavsky et al. 2003). La GTPasa Arf6 en su estado activo (unido a GTP) regula indirectamente los niveles del fosfoinosítido PI(4,5)P₂ (PIP₂) en membrana plasmática a través de la activación de fosfatidilinositol 4-fosfato 5-kinasa (PI(4)P5K) (Honda et al. 1999). Bajo estas condiciones, algunas proteínas de membrana plasmática que carecen de las secuencias citoplasmáticas que son reconocidas por clatrina/AP₂, son internalizadas en endosomas que contienen Arf6-GTP/PIP₂ (Naslavsky et al. 2003; Porat-Shliom et al. 2008). La subsiguiente inactivación de Arf6 y la pérdida o modificación de PIP₂ le permite a estas vesículas endocíticas entregar su carga en parte, de regreso a la membrana plasmática mientras que otra fracción puede fusionarse con el compartimiento endosomal temprano clásico (EEA1, Rab5 positivos) y transitar hacia los endosomas de reciclado o endosomas tardíos/lisomas para ser degradados (Naslavsky et al. 2003). Por el contrario, cuando el ciclo GTP-GDP de Arf6 es bloqueado por medio de la sobreexpresión de Arf6 Q67L (una mutante incapaz de hidrolizar GTP), las células acumulan numerosas estructuras vacuolares enriquecidas en PIP₂ y recubiertas de actina secuestrando las moléculas que normalmente transitan a través de la vía endosomal de reciclado de Arf6 y luego sufren una extensa fusión homotípica resultando en vesículas más grandes (Brown et al. 2001) (Fig. III-4A). Para investigar si esta vía está involucrada en la internalización de ⁵⁶⁸Ab1GD1a, se cotransfectaron células para que expresen de manera transiente el dominio homólogo a pleckstrina de la fosfolipasa Cδ1 fusionado a GFP (PH-PLCδ-GFP), un sensor de PIP₂, (Garcia et al. 1995; Varnai and Balla 1998; Lemmon 2003) y la versión salvaje de Arf6 o su variante mutante Arf6 Q67L. Los resultados muestran claramente que ⁵⁶⁸Ab1GD1a es internalizado y acumulado en vesículas decoradas de PIP₂ en células que expresan Arf6 Q67L (Fig. III-4B), sugiriendo un rol para Arf6 en la endocitosis de este anticuerpo anti-gangliósido.

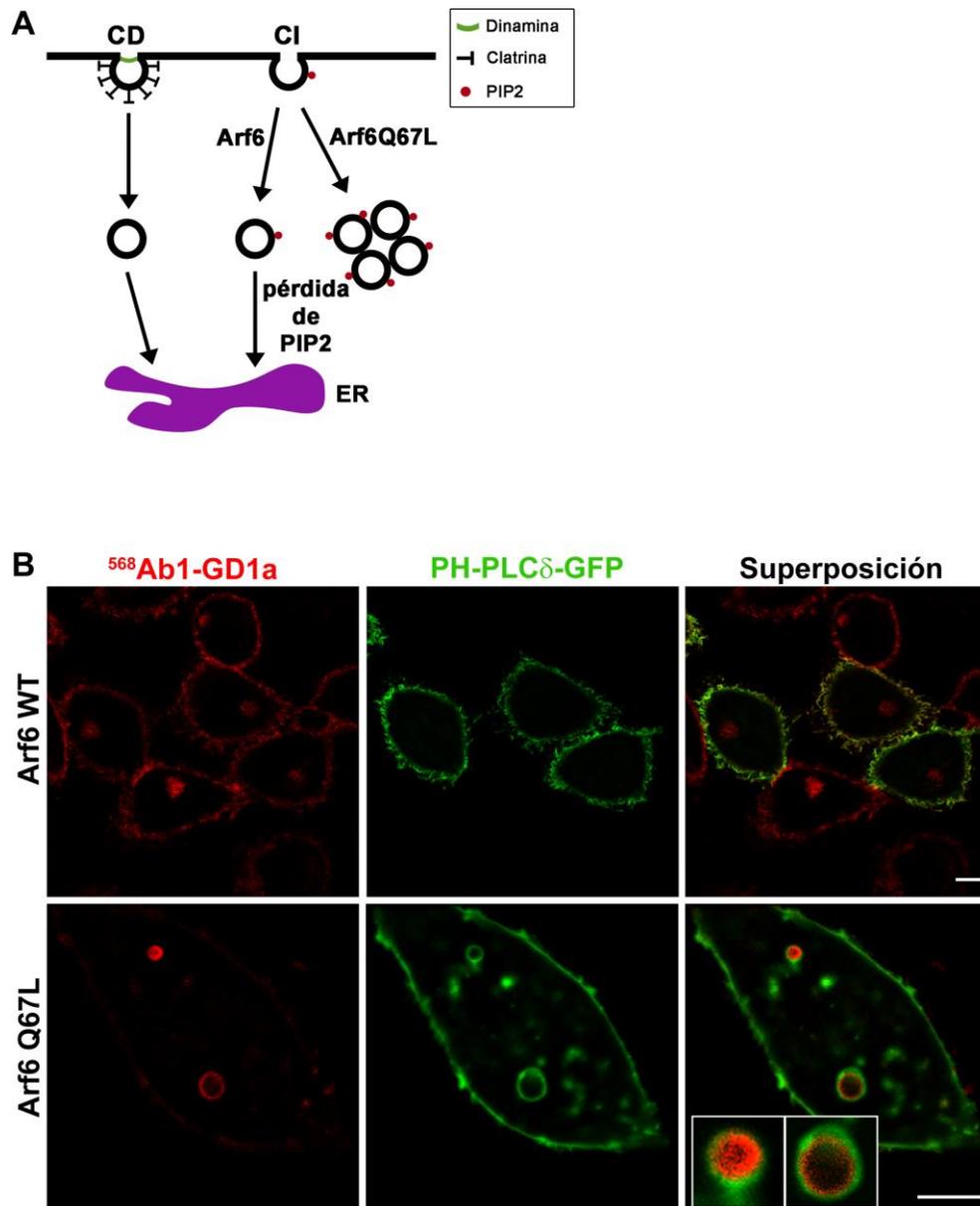


Figura III-4. La endocitosis de Ab1-GD1a es dependiente de Arf6

A. Después de un evento endocítico a través de la vía independiente de clatrina (CI) y que depende de la actividad de la GTPasa Arf6, la pérdida de PIP2 en estos endosomas permite, en parte, la fusión de estas vesículas endocíticas con el compartimiento endosomal temprano que es positivo para los marcadores Rab5/EEA1. De esta manera, el material endocitado por la vía Arf6 se fusiona con el material endocitado a través de la vía dependiente de clatrina (CD) en el endosoma de reciclado. Cuando la mutante de Arf6 que es deficiente en hidrólisis de GTP es sobreexpresada, el material endocitado a través de esta vía es secuestrado y acumulado en estructuras vacuolares que luego sufren una extensiva fusión homotípica. **B.** Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron cotransfectadas para expresar el dominio homólogo a pleckstrina de la fosfolipasa Cδ1 fusionada a GFP (PH-PLCδ1-GFP) y la versión salvaje de Arf6 (Arf6 WT, fila superior) o la mutante deficiente en hidrólisis de GTP (Arf6 Q67L, fila inferior) e incubadas durante 15 minutos a 4°C y luego marcadas con ⁵⁶⁸Ab1-GD1a durante 30 minutos en DMEM. Luego, se reemplazó el medio por DMEM precalentado a 37°C y se mantuvo dicha temperatura por 30 minutos para permitir la endocitosis del anticuerpo. Se muestran imágenes confocales de 0,8 μm tomadas paralelas al cubreobjetos. Los recuadros en el panel de superposición muestran detalles a mayor magnificación. Escala: 5 μm.

Ab1-GD1a permanece asociado a la membrana plasmática a 16°C

Para caracterizar los eventos iniciales involucrados en la endocitosis de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$, se realizaron experimentos de endocitosis a 16°C, una técnica ampliamente empleada para acumular el material endocitado en el compartimiento endosomal temprano (Punnonen et al. 1998; Ellinger et al. 2002; Iglesias-Bartolome et al. 2009). Para ello, células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron incubadas a 4°C con $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ y luego fijadas (0 min) o transferidas a DMEM precalentado a 16°C para permitir la endocitosis por 10 y 20 minutos. Finalmente, las células fueron fijadas e incubadas con anti IgG de ratón producido en cabra y conjugado a Alexa Fluor⁴⁸⁸ ($^{488}\text{anti-IgG}$) para evaluar la colocalización con cualquier remanente de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ en la superficie celular. Se observó que una fracción mayoritaria de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ permaneció asociada a la membrana plasmática a 16°C (Fig. III-5A) y no se evidenciaron estructuras endocíticas, contrastando con hallazgos previos que mostraron que un anticuerpo monoclonal que reconoce el gangliósido GD3 (R24) (Iglesias-Bartolome et al. 2006) y un anticuerpo policlonal que reconoce el gangliósido GM1 (Ab1-GM1) (Iglesias-Bartolome et al. 2009) fueron internalizados a esta temperatura y acumulados en endosomas tempranos. La señal de inmunofluorescencia total asociada a la fracción celular a cada tiempo de endocitosis no mostró cambios (Fig. III-5B). Un experimento control, donde células previamente tratadas con $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ para marcar el total de GD1a seguido de incubación con $^{488}\text{anti-IgG}$, mostró que el anticuerpo secundario accede a compartimientos intracelulares solo luego de permeabilizar (Fig. III-6). Esto descarta la posibilidad de que la permeabilización haya ocurrido por el procedimiento de fijado. Además, para probar que los mecanismos endocíticos se encuentran activos a 16°C, $^{647}\text{transferrina}$ se añadió al medio de cultivo (Fig. III-5C) ya que se conoce que transferrina es endocitada y acumulada en el compartimiento endosomal temprano a esta temperatura. Como se esperaba, transferrina fue internalizada y acumulada en estructuras vesiculares dispersadas en el citoplasma, mientras que la endocitosis de $^{568}\text{Ab1-GD1a}$ fue completamente bloqueada manteniendo una alta colocalización en membrana plasmática con el anticuerpo secundario aún luego de 60 minutos de incubación a 16°C (Fig. III-5C).

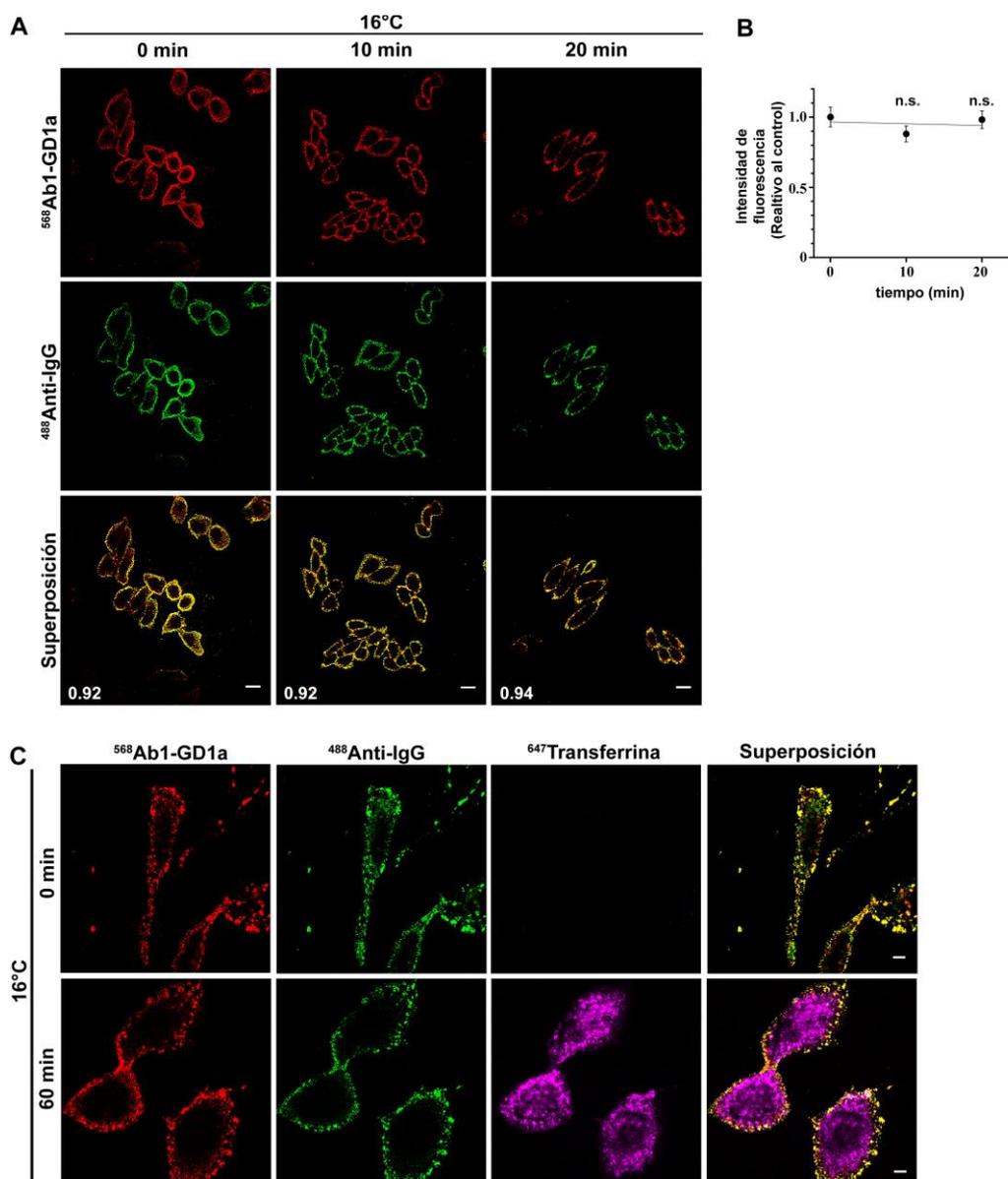


Figura III-5. Unión a membrana plasmática y destino celular diferencial de Ab1-GD1a y transferrina en células CHO-K1^{GD1a/GM1+} a 16°C

A. Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} se incubaron por 15 minutos a 4°C seguido de 45 minutos de incubación con ⁵⁶⁸Ab1-GD1a a 4°C. Luego se lavaron tres veces con DMEM frío y se fijaron o fueron transferidas a DMEM precalentado a 16°C por 10 o 20 minutos. Después de cada período de tiempo, las células se fijaron e incubaron con anti IgG de ratón producido en cabra y conjugado a Alexa Fluor⁴⁸⁸ (⁴⁸⁸anti-IgG). Se muestran imágenes confocales de 0,8 μm tomadas paralelas al cubreobjetos. El coeficiente de colocalización de Manders se muestra en los paneles de superposición. Escala: 15 μm. **B.** Cuantificación de la señal de inmunofluorescencia total (media +/- EEM) que permaneció asociada a la fracción celular a cada tiempo endocítico. Los valores fueron relativizados a la intensidad de fluorescencia obtenida para la condición inicial de unión (0 min). Las diferencias en intensidades de fluorescencia entre grupos experimentales se evaluaron mediante prueba ANOVA seguido de prueba de Dunnett. No se encontró diferencias significativas (n.s.) entre el grupo control (0 min) y los grupos tratados (incubación a 16°C durante 10 y 20 min). **C.** Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron primero incubadas por 90 minutos en DMEM sin SFB y luego 45 minutos a 4°C en DMEM que contenía 10 μg/mL ⁶⁴⁷transferrina y una dilución apropiada de ⁵⁶⁸Ab1-GD1a. Finalmente las células fueron lavadas y fijadas (0 min) o transferidas a DMEM precalentado a 16°C sin SFB suplementado con 5 μg/mL ⁶⁴⁷transferrina e incubado a dicha temperatura durante 60 minutos. Finalmente, las células fueron fijadas en incubadas con ⁴⁸⁸anti-IgG. Escala: 5 μm.

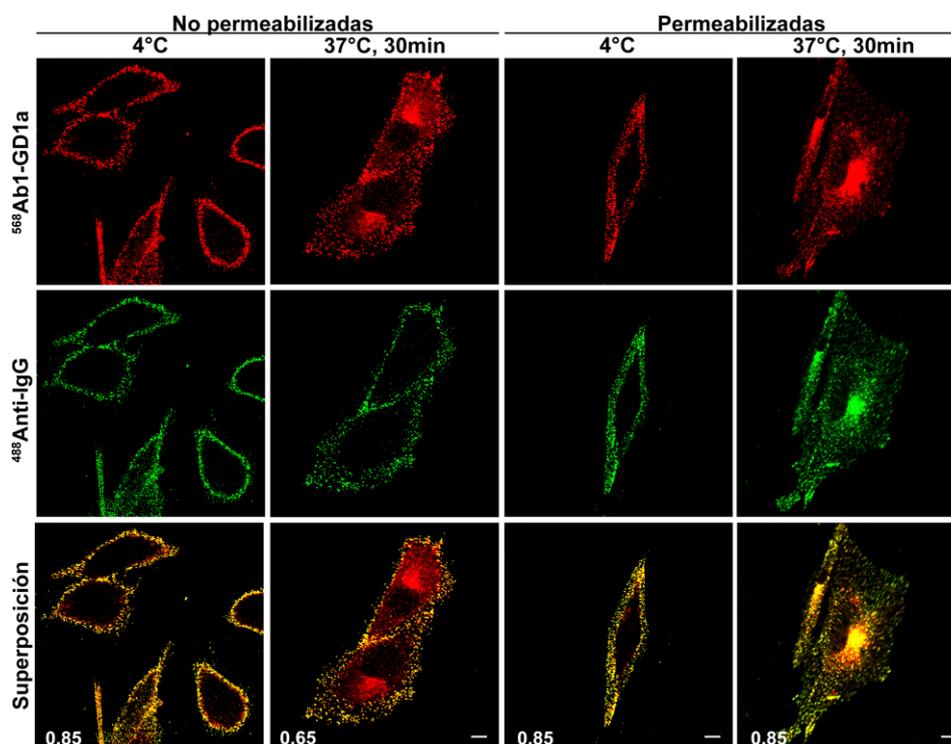


Figura III-6. Control de permeabilización

Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron incubadas por 15 minutos a 4°C y luego marcadas con ⁵⁶⁸Ab1-GD1a por 45 minutos a 4°C. Luego fueron lavadas con DMEM frío y fijadas (4°C) o transferidas a DMEM precalentado a 37°C suplementado con ⁵⁶⁸Ab1-GD1a por 30 minutos para marcar GD1a total. Finalmente fueron fijadas, permeabilizadas (tercera y cuarta columna solamente) e incubadas con ⁴⁸⁸anti-IgG. Se muestran imágenes confocales de 0,8 μm tomadas paralelas al cubreobjetos. El coeficiente de colocalización de Manders se muestra en los paneles de superposición. La colocalización en compartimientos intracelulares sólo es evidenciada luego de permeabilizar. Escala: 5 μm.

El bloqueo selectivo de la endocitosis de ⁵⁶⁸Ab1-GD1a a 16°C y la rápida reducción de la señal de fluorescencia a 37°C fueron confirmados por microscopía confocal *in vivo* (time-lapse) y ensayos fluorimétricos. Los experimentos de microscopía confocal *in vivo* mostraron que ⁵⁶⁸Ab1-GD1a permaneció asociado a la fracción celular cuando la temperatura de incubación fue de 16°C (Fig. III-7A, panel superior y Fig. III-7B, 16°C). Inmediatamente después de cambiar la temperatura a 37°C, se observó una drástica reducción de la intensidad de fluorescencia asociada a la fracción celular (Fig. III-7A, panel inferior y Fig. III-7B, 37°C). Además, mediante ensayos de fluorimetría, se evidenció que una fracción cercana al 40% de ⁵⁶⁸Ab1-GD1a inicialmente unido a células CHO-K1^{GD1a/GM1+} en cultivo, es recuperada en el sobrenadante cuando las células fueron incubadas a 37°C, mientras que a 16°C la fracción liberada al medio de cultivo es mínima (Fig. III-8). En su conjunto los resultados presentados sugieren la presencia de mecanismos selectivos de internalización de complejos anticuerpos anti-gangliósidos, los cuales fueron aquí evidenciados por una endocitosis diferencial a 16°C.

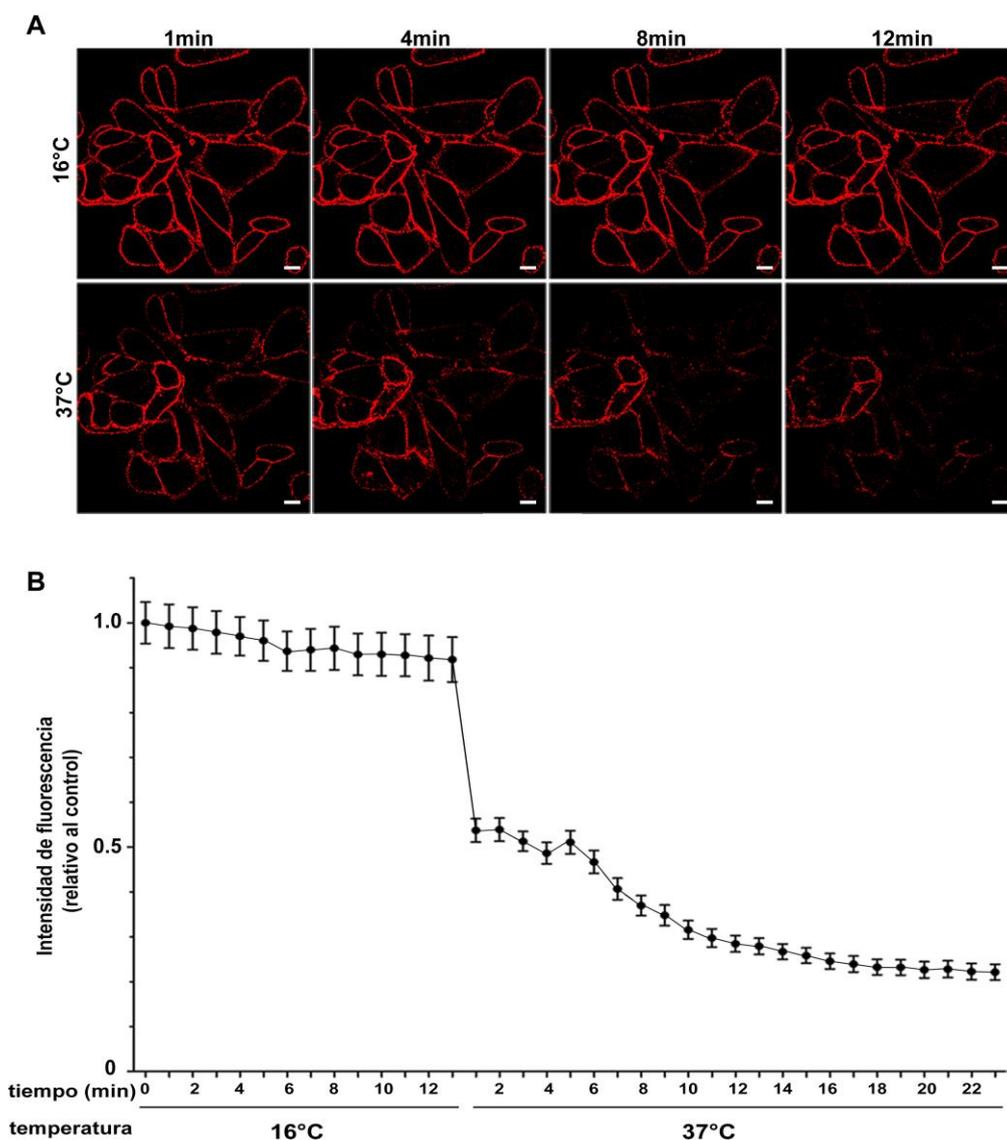


Figura III-7. Endocitosis y destino celular de Ab1-GD1a a diferentes temperaturas evaluado mediante microscopía confocal *in vivo* (time-lapse)

A. Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron marcadas por 15 minutos a 4°C seguido de 45 minutos de incubación a 4°C con ⁵⁶⁸Ab1-GD1a. Luego se lavaron con DMEM frío y fueron transferidas a DMEM precalentado a 16°C por 13 minutos. Inmediatamente después, la temperatura fue cambiada a 37°C y mantenida hasta el final del experimento. Se tomaron imágenes cada 1 minuto. Se muestran imágenes confocales de 0,8 μm tomadas a tiempos iniciales, intermedios y finales a cada temperatura. Escala: 10 μm. **B.** Se muestra la cuantificación de la señal de inmunofluorescencia total (media +/- EEM) que permaneció asociada a la fracción celular a cada tiempo endocítico. Los valores fueron relativizados a la intensidad de fluorescencia obtenida para la condición inicial de unión (16°C, 0 min).

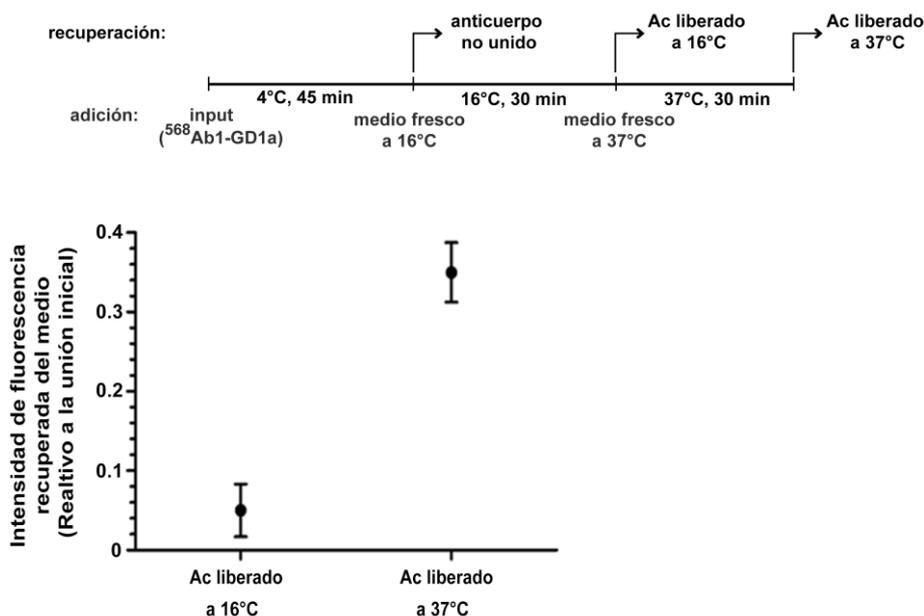


Figura III-8. Ab1-GD1a es recuperado en el medio de cultivo a 37°C pero no a 16°C

Se cultivaron células CHO-K1^{GD1a/GM1+} en placas de 96 pocillos por 24 h. Medio precalentado fue agregado (adición) o recolectado (recuperación) a diferentes tiempos durante el experimento. Primero, las células fueron marcadas con ⁵⁶⁸Ab1-GD1a durante 30 minutos en DMEM libre de rojo fenol. Luego, se recuperó el medio (anticuerpo no unido); las células fueron lavadas a 4°C, se agregó DMEM libre de rojo fenol precalentado a 16°C y se incubó por 30 minutos. A continuación el medio que contiene anticuerpo liberado a 16°C durante este período de incubación de 30 minutos fue recuperado (Ac liberado a 16°C) y se agregó DMEM libre de rojo fenol precalentado a 37°C por 30 minutos. Finalmente, el medio que contiene el anticuerpo liberado durante este período de incubación a 37°C fue recuperado (Ac liberado a 37°C). La fluorescencia en cada fracción recuperada fue medida usando un espectrofluorómetro FluoroMax-P. Los valores mostrados son media +/- EEM relativizados a la unión inicial del anticuerpo (arbitrariamente 1 y calculado sustrayendo a la señal inicial (input) el valor de intensidad de fluorescencia para la fracción de anticuerpo no unido); Dos experimentos independientes; n=3 para cada condición de tiempo.

Caracterización de la unión y el destino intracelular de dos anticuerpos que reconocen GD1a en células CHO-K1

Para determinar si el comportamiento de ⁵⁶⁸Ab1-GD1a con respecto a la unión a membrana, internalización y destino intracelular es compartido con otro anticuerpo monoclonal que reconoce GD1a, se incluyó en el análisis el anticuerpo Ab2-GD1a, una inmunoglobulina de isotipo IgG2b que reconoce los gangliósidos GD1a, GT1b y GT1aα (Lunn et al. 2000). Se incubaron células CHO-K1^{GD1a/GM1+} por 15 minutos a 4°C para inhibir el transporte intracelular y luego con Ab2-GD1a por 45 minutos a 4°C. Después de esto, las células se lavaron con medio de cultivo frío para remover el anticuerpo no unido y se fijaron o transfirieron a medio precalentado a 37°C por diferentes períodos de tiempo para restaurar el transporte y permitir la endocitosis. Finalmente, se procedió a fijar, permeabilizar e inmunomarcas las células (Fig.

III.9A). El análisis por microscopía confocal reveló que Ab2-GD1a, al igual que Ab1-GD1a, se unió a las células a 4°C con un patrón de distribución punteado en membrana plasmática (Fig. III-9A, 0 min). Luego de cambiar la temperatura a 37°C, comenzó a evidenciarse una distribución yuxtancuclear y el nivel total de señal se redujo drásticamente (Fig. III-9A). Al igual que Ab1-GD1a, no se detectó unión de Ab2-GD1a a la superficie de células CHO-K1^{GD1a/GM1-} (Fig. III-9B). Por otro lado, cuando estas células se trataron en cultivo con GD1a purificado, se evidenció marcación de Ab2-GD1a en la membrana plasmática, indicando especificidad de unión al gangliósido GD1a (Fig. III-9B).

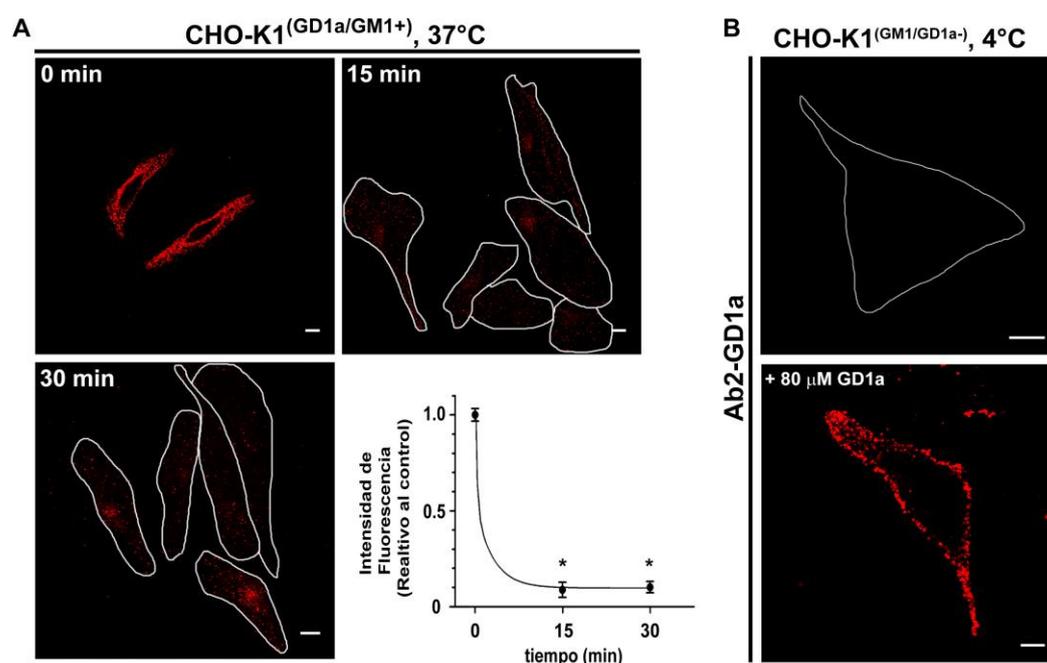


Figura III-9. Unión a la superficie celular y destino de un anticuerpo monoclonal que reconoce los gangliósidos GD1a, GT1b y GT1a α (Ab2-GD1a) en células CHO-K1^(GD1a/GM1+)

A. Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron incubadas por 15 min a 4°C y luego con Ab2-GD1a por 45 min a 4°C. Luego, las células fueron lavadas con DMEM frío y fijadas a 4°C (0 min) o transferidas a medio precalentado a 37°C por diferentes períodos de tiempo. Finalmente, las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con ⁵⁴⁶anti-IgG. Se muestran imágenes confocales de 0,8 μ m de cada tiempo tomadas paralelas al cubreobjetos. Escala: 5 μ m. Se muestra la cuantificación de la señal total de inmunofluorescencia (media \pm EEM) a cada tiempo ensayado que permanece asociada a la fracción celular. Los valores fueron relativizados a los valores de intensidad de fluorescencia inicial (0 min), arbitrariamente 1. Las diferencias significativas de intensidad de fluorescencia entre el grupo control (0 min) y los grupos tratados (incubación a 37°C por diferentes períodos de tiempo) se indican con * ($p < 0,01$). ANOVA seguido de prueba de Dunnett. EEM: error estándar de la media. **B.** Células CHO-K1^{GD1a/GM1-} fueron incubadas por 30 min a 37°C y 5% CO₂ con 80 μ M de GD1a en DMEM. Luego las células fueron lavadas para remover el exceso de GD1a, transferidas a DMEM a 4°C e inmunomarcadas con Ab2-GD1a. Finalmente se incubó con ⁵⁴⁶anti-IgG para detectar Ab2-GD1a en la superficie celular. Escala: 5 μ m.

Como fue anteriormente demostrado para Ab1-GD1a, Ab2-GD1a también fue acumulado en vesículas decoradas de PIP2 en células que expresan Arf6 Q67L y su

endocitosis fue reducida significativamente en células que sobreexpresan una variante dominante negativa de Arf6 (Arf6 T27N) (Fig. 10-III A y Fig. 10-III B respectivamente). Estos resultados en su conjunto sugieren que ambos anticuerpos que reconocen GD1a (Ab1-GD1a y Ab2-GD1a) comparten un proceso similar de unión, endocitosis y destino celular.

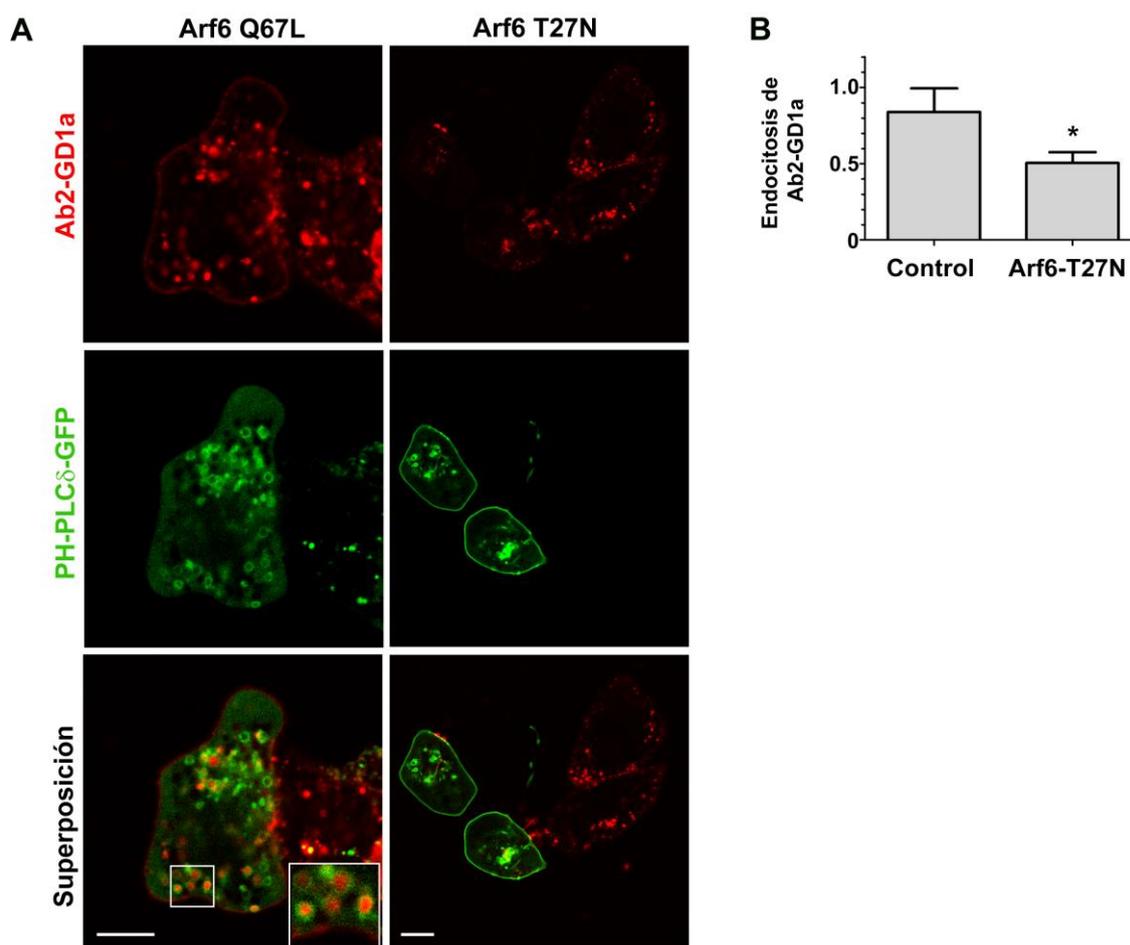


Figura III-10. Ab2-GD1a es acumulado en células CHO-K1 que expresan Arf6 Q67L y su endocitosis disminuye en células que expresan Arf6 T27N

A. Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron cotransfectadas para expresar PH-PLCδ1-GFP y la variante dominante positiva de Arf6 (Arf6 Q67L, columna izquierda) o la variante dominante negativa de la GTPasa (Arf6 T27N, columna derecha). Después de 24 horas de transfección, las células fueron marcadas a 4°C con Ab2-GD1a, lavadas y transferidas a 37°C para permitir la endocitosis durante 30 minutos. Para detectar Ab2-GD1a se incubó con ⁵⁴⁶anti-IgG. El recuadro en el panel de superposición muestra detalles a mayor magnificación. Escala: 5 μm. **B.** Cuantificación de la señal de inmunofluorescencia de Ab2-GD1a endocitada en células transfectadas con Arf6 T27N (media +/- EEM) relativizada a la intensidad de fluorescencia obtenida para células no transfectadas (Control). Las diferencias significativas en la endocitosis de Ab2-GD1a entre el grupo control y el grupo de células transfectadas con Arf6 T27N se evaluó mediante una prueba de t-Student y se indica con * (p<0,01).

Caracterización de la unión a membrana y el destino celular de Ab2-GD1a en células derivadas de neuroblastoma

Antecedentes previos indican que un anticuerpo policlonal que une el gangliósido GM1 (Ab1-GM1), tiene un comportamiento de internalización y destino intracelular diferencial en función del tipo celular (Iglesias-Bartolome et al. 2009). Ab1-GM1 fue eficientemente endocitado en células epiteliales CHO-K1 pero fue solo ligeramente internalizado en células Neuro-2a, una línea celular derivada de neuroblastoma, la cual expresa principalmente los gangliósidos GM1 y GD1a (Wu et al. 1995; Hitoshi et al. 1996). Con estos antecedentes se decidió explorar si este comportamiento se extiende a otros anticuerpos anti gangliósidos, particularmente para el anticuerpo Ab2-GD1a. Este anti-GD1a se unió eficientemente a la membrana plasmática de células Neuro-2a a 4°C (Fig. III-11A, 0 min). Cuando la temperatura se cambió a 37°C, la intensidad de fluorescencia inicial para Ab2-GD1a se redujo moderadamente (Fig. III-11A y Fig. III-11B) comparado con la drástica reducción reportada en células CHO-K1^{GD1a/GM1+} (Fig. III-9). Por lo tanto, estos resultados sugieren que los anticuerpos anti- gangliósidos pueden tener diferente comportamiento o procesamiento celular, lo cual puede representar un aspecto crítico a ser considerado en el análisis de su rol patogénico y sus usos terapéuticos.

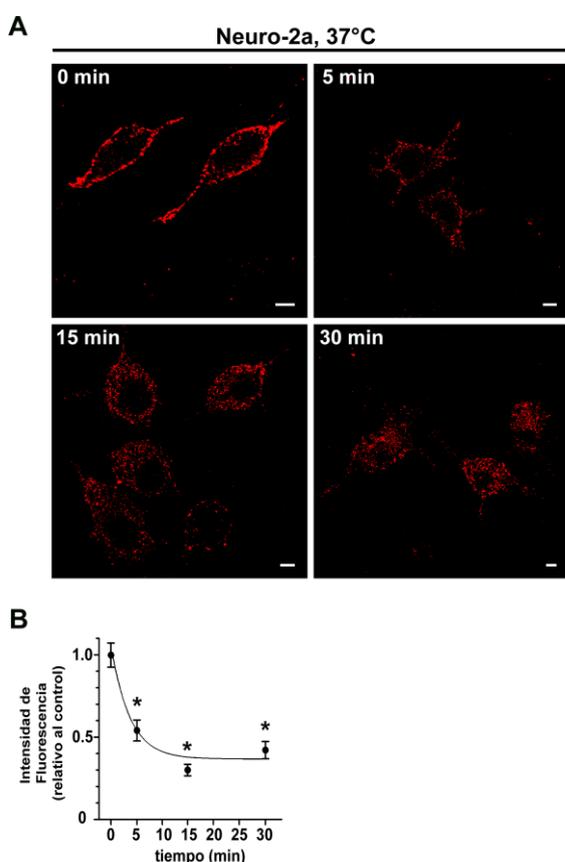


Figura III-11. Unión a la superficie celular y destino de un anticuerpo monoclonal que reconoce los gangliósidos GD1a, GT1b y GT1a α (Ab2-GD1a) en células Neuro-2a

A. Células Neuro-2a fueron incubadas por 15 min a 4°C y luego con Ab2-GD1a por 45 min a 4°C. Luego, las células fueron lavadas con DMEM frío y fijadas a 4°C (0 min) o transferidas a medio precalentado a 37°C por diferentes períodos de tiempo. Finalmente, las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con ⁵⁴⁶anti-IgG. Se muestran imágenes confocales de 0,8 μ m de cada tiempo tomadas paralelas al cubreobjetos. Escala: 5 μ m. **B.** Se muestra la cuantificación de la señal total de inmunofluorescencia (media \pm EEM) a cada tiempo ensayado que permanece asociada a la fracción celular. Los valores fueron relativizados a los valores de intensidad de fluorescencia inicial (0 min), arbitrariamente 1. Las diferencias en la intensidad de fluorescencia entre el grupo control y el grupo de células tratadas (incubadas a 37°C por diferentes períodos de tiempo) se evaluó mediante la prueba de ANOVA seguido de prueba de Dunnett y se indica con * ($p < 0,01$).

Un anticuerpo monoclonal que reconoce el gangliósido GM1 muestra un comportamiento diferente al de los anticuerpos que unen GD1a en células epiteliales y neuronales

Finalmente se exploró si los parámetros cinéticos de unión a membrana y endocitosis de los anticuerpos que se asocian a GD1a son específicos de este complejo anticuerpo/gangliósido o, si en cambio, son un fenómeno más general observable para otros anticuerpos anti-gangliósidos de la “serie – a”. Para ello analizamos la unión a membrana y destino subcelular de Ab2-GM1, un anticuerpo monoclonal de isotipo IgG2_{bκ} que reacciona fuertemente con el gangliósido GM1 (Yuki et al. 2004; Koga et al. 2005; Susuki et al. 2007), en células CHO-K1 y Neuro-2a. El anticuerpo Ab2-GM1 prolonga los intervalos del potencial de acción muscular en la unión neuromuscular y marca nodos de Ranvier y células de Schwann paranodales en raíces espinales humanas (Yuki et al. 2004). Células CHO-K1^{GM1/GD1a+} fueron incubadas por 15 minutos a 4°C para inhibir el transporte celular y luego con Ab2-GM1 por 45 minutos a 4°C. Después de lavar para remover el anticuerpo no unido, las células fueron fijadas (0 min) o transferidas a DMEM precalentado a 37°C (Fig. III-12A) o DMEM precalentado a 16°C (Fig. III-12E) por diferentes tiempos para restaurar la endocitosis. Análisis de microscopía confocal reveló que el anticuerpo Ab2-GM1 se une a células CHO-K1^{GM1/GD1a+} con una distribución punteada en membrana plasmática a 4°C. Inmediatamente después de cambiar la temperatura a 37°C para inducir la endocitosis (5 min), se evidenció la presencia del anticuerpo en una región yuxtannuclear con una reducción moderada de la señal de inmunofluorescencia total (conservando un 70% del valor inicial de fluorescencia, 0 min) permaneciendo cercano a este valor a períodos de tiempo más largos (15 min y 30 min) (Fig. III-12A y Fig. III-12C). Esto contrasta con lo observado para los anticuerpos que unen GD1a (Ab1-GD1a, Fig. III-1C y Ab2-GD1a, Fig. III-9) donde la intensidad de fluorescencia se reduce drásticamente dentro de los primeros minutos de incubación a 37°C. Por otro lado, cuando la temperatura se establece en 16°C, la intensidad de fluorescencia total permanece prácticamente constante y asociada a membrana plasmática (Fig. III-12E y Fig. III-12F), como también fue observado para un anticuerpo anti-GD1a (Ab1-GD1a, Fig. III-5 y Fig. III-7). También se observó en células Neuro-2a que luego de la unión y cambio de temperatura a 37°C, el anticuerpo Ab2-GM1 permaneció principalmente asociado a la superficie celular (Fig. III-12B) y la señal de inmunofluorescencia total no se modificó (Fig. III-12D), contrastando con lo observado para el anticuerpo anti-GD1a (Ab2-GD1a, Fig. III-11). Por lo tanto, observamos que bajo idénticas condiciones experimentales, el tiempo de residencia en la superficie celular y la fracción endocitada de los anticuerpos que unen GD1a y GM1 fueron notoriamente diferentes, sugiriendo un procesamiento diferencial que podría depender no solo del anticuerpo anti-

gangliósido, sino también del tipo celular. Estos hallazgos pueden ayudar a comprender mejor no solamente el rol y los efectos patogénicos diferenciales de los anticuerpos anti-gangliósidos en neuropatías, sino también podrían permitir incrementar su eficacia como agentes terapéuticos antitumorales.

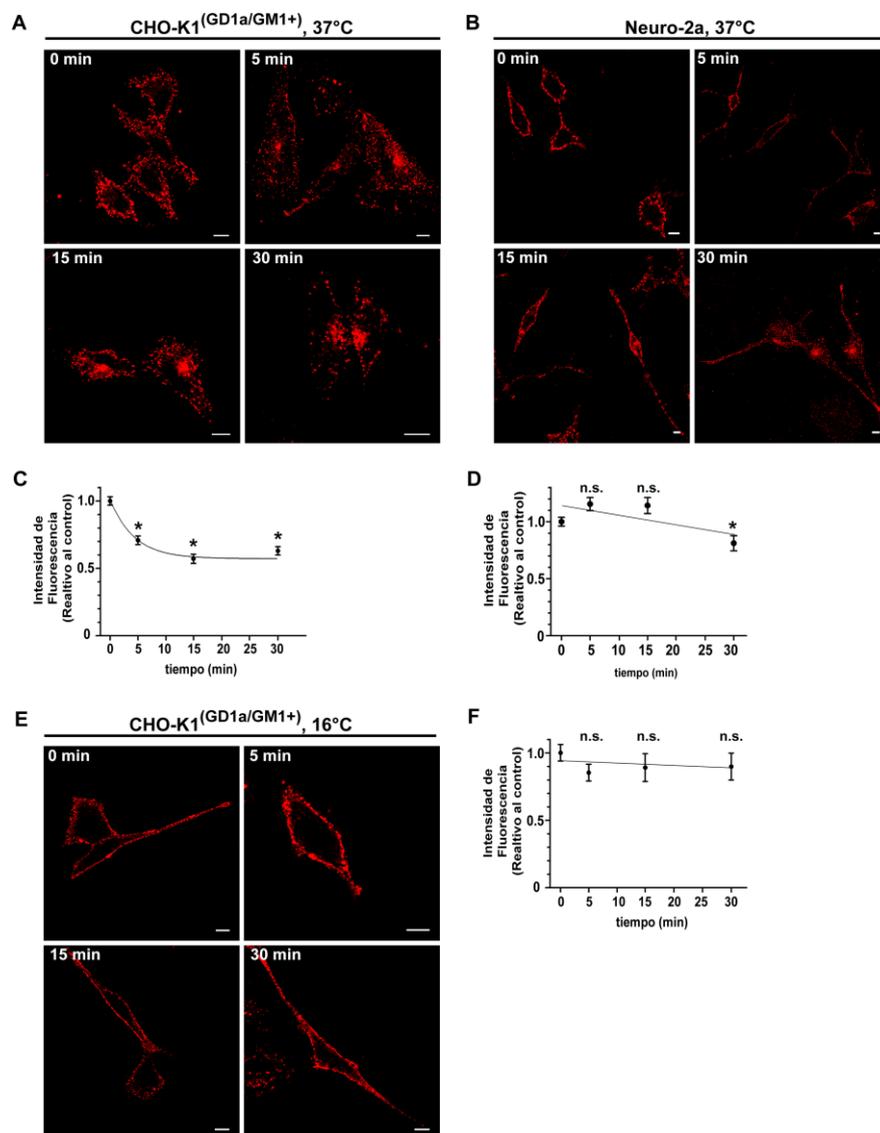


Figura III-12. Unión a superficie celular y destino de un anticuerpo monoclonal que reconoce el gangliósido GM1 (Ab2-GM1) en células CHO-K1^{GD1a/GM1+} y células Neuro-2a

Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} (A) y células Neuro-2a (B) fueron incubadas a 4°C por 15 minutos y luego incubadas con una dilución apropiada de un anticuerpo anti-GM1 (Ab2-GM1) por 45 minutos a 4°C. Después de esto, las células fueron permeabilizadas e incubadas con ⁵⁴⁶anti-IgG. Escala: 5µm. La señal total de inmunofluorescencia para Ab2-GM1 asociada a células CHO-K1 (C) y células Neuro-2a (D) fue cuantificada. Experimentos de endocitosis a 16°C fueron realizados en células CHO-K1^{GD1a/GM1+} (E) y la señal de inmunofluorescencia total asociada a la fracción celular a cada tiempo endocítico fue cuantificada (F). En todos los casos, los valores de intensidad de fluorescencia fueron referidos a la señal obtenida para la condición de unión inicial (0 min, arbitrariamente 1). Las diferencias en la intensidad de fluorescencia entre el grupo control y el grupo de células tratadas (incubadas a 37°C o 16°C por diferentes períodos de tiempo) se evaluaron mediante la prueba de ANOVA seguido de prueba de Dunnett. Las diferencias significativas se indican con * (p<0,01) y las diferencias no significativas con n.s.

DISCUSIÓN

Los AGAbs, en particular aquellos que unen GM1, GD1a y GQ1b, han sido asociados con un amplio rango de neuropatías, incluyendo el síndrome de Guillain-Barré y el síndrome de Miller Fisher (Willison and Yuki 2002). Además, dado el patrón de glicosilación aberrante de glicolípidos expresados en la superficie de la mayoría de las células cancerígenas, un número sustancial de inmunoterapias pasivas y activas contra estos lípidos han sido desarrolladas, las cuáles han mostrado resultados promisorios en pruebas clínicas (Daniotti et al. 2013; Daniotti et al. 2015b). Más recientemente, los AGAbs han emergido como una herramienta atractiva para la entrega de agentes citotóxicos en procesos neoplásicos (Daniotti et al. 2015b). En este contexto, resulta necesario comprender los mecanismos por los cuáles los AGAbs, principalmente aquellos que se unen a los gangliósidos, reconocen sus epítopes, el destino celular y las consecuencias fisiopatológicas. Esta información tiene importantes implicancias traslacionales para el entendimiento de las características clínicas de las neuropatías mediadas por AGAbs y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

De acuerdo a la información obtenida en este trabajo de tesis y en trabajos anteriores, los AGAbs difieren en características como unión a membrana, endocitosis y respuesta inmune (Fig. III-13). Más bien, se comportan de una manera dependiente del epítope que unen y del tipo celular. Se ha demostrado anteriormente que un anticuerpo monoclonal que reconoce el gangliósido GD3 (R24) fue específicamente endocitado unido al gangliósido, transportado a endosomas tempranos y endosomas de reciclado y transportado hacia la membrana plasmática en vesículas recubiertas de clatrina, en células CHO-K1 y células de melanoma humano SK-Mel 28 (Iglesias-Bartolome et al. 2006). Por otro lado, un anticuerpo que une GM1 (Ab1-GM1) fue rápidamente y específicamente endocitado en células CHO-K1 mientras que mostró una internalización reducida en células COS-7 y en las líneas celulares derivadas de neuroblastoma SH-SY5Y y Neuro-2a (Iglesias-Bartolome et al. 2009) (Fig. III-13).

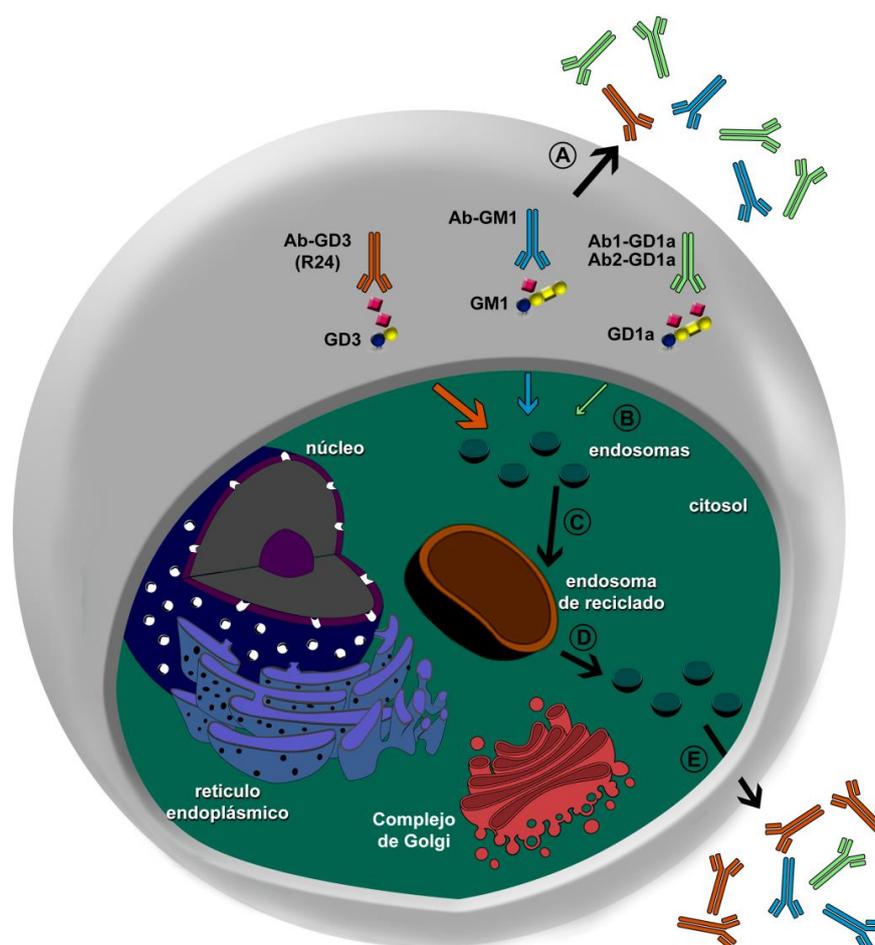


Figura III-13. Representación esquemática del destino y procesamiento celular de diferentes anticuerpos anti-gangliósidos en células CHO-K1

El destino de tres anticuerpos anti-gangliósidos diferentes en células CHO-K1 es representado. La flecha A representa la disociación desde la membrana plasmática hacia el medio extracelular, el principal destino de los anticuerpos que reconocen el gangliósido GD1a. El grosor de las flechas desde membrana plasmática hacia los endosomas (B) representa la cantidad endocitada del complejo gangliósido-anticuerpo. Las flechas C, D y E muestran el principal camino intracelular seguido por estos anticuerpos luego de ser internalizados.

Esta información es considerada de significancia biológica e inmunológica ya que provee por primera vez, evidencias acerca de la internalización, destino intracelular y vías endocíticas de un anticuerpo anti-GM1 obtenido de un modelo experimental de SGB en conejos. Más tarde, se describió que la rápida internalización de los anticuerpos anti-gangliósidos en el terminal nervioso motor atenúa la injuria mediada por complemento, contrastando con el extensivo daño observado en los nodos de Ranvier, donde la endocitosis es mínima (Fewou et al. 2012; Susuki et al. 2012). Además, se demostró recientemente en ratones que una gran proporción de anticuerpos anti-gangliósidos circulantes en plasma son principalmente removidos de circulación a través de la unión a gangliósidos en membranas neuronales en los

terminales nerviosos motores de las uniones neuromusculares (Cunningham et al. 2016). Esta endocitosis neuronal representa una vía mayoritaria a través de la cual anticuerpos anti-gangliósidos patogénicos y potencialmente otras proteínas que unen gangliósidos, son retiradas de la circulación sistémica y transportados hacia el sistema nervioso central.

En este trabajo de tesis, se extendió el análisis de los AGAbs, investigando la unión, endocitosis y destino celular de anticuerpos que unen el disialogangliósido GD1a. Hallamos que, en células CHO-K1 modificadas genéticamente para expresar los gangliósidos GM2, GM1 y GD1a (células CHO-K1^{GD1a/GM1+}), los anticuerpos que reconocen GD1a (⁵⁶⁸Ab1-GD1a y Ab2-GD1a) se unen específicamente a la membrana plasmática de las células a 4°C mostrando un patrón con distribución punteada. Luego de la unión en membrana y tras cambiar la temperatura a 37°C para inducir la endocitosis, una fracción minoritaria del anticuerpo fue inicialmente detectada en vesículas distribuidas a lo largo del citoplasma celular y luego acumulada en un compartimiento pericentriolar caracterizado como endosoma de reciclado (ER). Por otro lado, una fracción mayoritaria del anticuerpo inicialmente asociado a membrana plasmática, fue recuperada en el medio de cultivo. Es posible que, luego de unir GD1a en la superficie de células CHO-K1, este anticuerpo esté siendo principalmente liberado desde la membrana plasmática sin ser endocitado. Al respecto, ha sido ampliamente documentado que una fracción considerable de los gangliósidos producidos por una célula puede ser liberada al medio extracelular y potencialmente transferida a la membrana plasmática de otras células (Saqr et al. 1993; Olshefski and Ladisch 1996; Ziulkoski et al. 2006). Además, ha sido demostrado que los gangliósidos pueden ser transferidos espontáneamente entre membranas a elevadas temperaturas (Masserini and Freire 1987) y el ritmo de transferencia es dependiente de la temperatura y el estado físico de las membranas donoras y receptoras (Palestini et al. 1995), lo cual está de acuerdo con los experimentos realizados a 16°C donde el anticuerpo que reconoce GD1a permaneció mayoritariamente localizado en la membrana plasmática (Fig. III-5y Fig. III-7) y en contraposición a la liberación significativa observada a 37°C. Por otro lado, es poco probable que esta fracción mayoritaria del anticuerpo unido al gangliósido, sea rápidamente endocitada, reciclada hacia la membrana plasmática de estas células y liberada al medio extracelular sin transitar por el ER, como ha sido descrito para un análogo fluorescente de esfingomielina (Hao and Maxfield 2000) ya que el anticuerpo no se acumula en endosomas tempranos en ensayos realizados a 16°C. Por lo tanto, solo una fracción minoritaria que es endocitada y acumulada en el ER es detectada a nivel intracelular a los distintos tiempos de endocitosis ensayados.

Los experimentos mostrados en la Fig. III-3 indican que la endocitosis del anticuerpo que une GD1a en células CHO-K1 no requiere dinamina 2, sugiriendo un mecanismo

independiente de clatrina y de caveolina-1. Tomando estos resultados en cuenta y considerando que la internalización de muchas proteínas ancladas por GPI y proteínas aciladas (ambos tipos de moléculas unidas a la membrana celular mediante lípidos) ocurre por una vía independiente de clatrina y regulada por la GTPasa Arf6 (Naslavsky et al. 2003; Porat-Shliom et al. 2008), se investigó si esta GTPasa participa en la internalización del anticuerpo que une GD1a. Para ello, se examinó el efecto de la expresión de la mutante constitutivamente activa (incapaz de hidrolizar GTP) de Arf6 en la internalización del anticuerpo anti-GD1a, encontrando al anticuerpo principalmente asociado con estructuras vesiculares que contenían PIP2. Por otro lado, la sobreexpresión de una versión dominante negativa de la GTPasa Arf6 resultó en una reducción en la internalización del anticuerpo anti-GD1a. Por lo tanto, estos resultados sugieren fuertemente que el complejo gangliósido-anticuerpo está siendo internalizado a través de una vía asociada a Arf6. Endocitosis rápida mediada por Arf6 ha sido demostrada en conos de crecimiento de neuronas en desarrollo (Torii et al. 2012) y la participación de Arf6 en el tráfico retrógrado y anterógrado ha sido reportada en axones y conos de crecimiento de neuronas adultas (Onishi et al. 2013). Arf6 además tiene un rol en el reclutamiento de proteínas de cubierta de clatrina a membranas donde ocurre el reciclado de vesículas sinápticas al menos en parte incrementando los niveles de PIP2 (Krauss et al. 2003). Tomando en consideración estos y otros antecedentes, Arf6 podría estar involucrado en la rápida endocitosis de los anticuerpos anti-gangliósidos en la membrana del terminal nervioso motor, atenuando la injuria mediada por complemento (Fewou et al. 2012; Susuki et al. 2012). Por el contrario, hay poca información acerca del transporte exocítico y endocítico en los nodos de Ranvier y, particularmente, no hay información en la literatura acerca de la participación de Arf6 en esta región neuronal especializada. Por lo tanto, la examinación de la vía de endocitosis/reciclado mediada por Arf6 en estos sitios neuronales resulta de interés ya que la mínima endocitosis de los anticuerpos anti-gangliósidos observada en los nodos de Ranvier puede eventualmente estar asociada con la ausencia de endocitosis de membrana mediada por Arf6, lo cual aún debe ser investigado.

Como se mencionó, los gangliósidos neosintetizados en procesos oncogénicos muestran especificidad de antígeno y por lo tanto constituyen candidatos atractivos para el diseño de inmunoterapias contra el cáncer. En este sentido, la información reportada en este estudio y en otros trabajos del laboratorio (Iglesias-Bartolome et al. 2006; Iglesias-Bartolome et al. 2009; Torres Demichelis et al. 2013), tiene importantes implicancias conceptuales y traslacionales para el desarrollo de nuevas terapias específicas (Hazin et al. 2015). Así, mientras los anticuerpos anti-gangliósidos son específicos en su unión, diferentes modos de acción son posibles dependiendo de la función deseada del anticuerpo (es decir, internalización subcelular

para la entrega de drogas versus presencia sostenida en la superficie celular para un efecto mediado por células del sistema inmune).

Los resultados presentados en este capítulo forman parte del trabajo:

Ruggiero FM, Vilcaes AA, Yuki N, Daniotti JL. "Membrane binding, endocytic trafficking and intracellular fate of high-affinity antibodies to gangliosides GD1a and GM1". Biochim Biophys Acta 1859(1) (2017): 80-93. Epub 2016 Oct 30. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.10.020.

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos y plásmidos

Dos anticuerpos monoclonales que reconocen el gangliósido GD1a y un anticuerpo monoclonal que une el gangliósido GM1 fueron generados en ratones knock-out que carecen del gen que codifica para la enzima UDP-GalNAc:LacCer/GM3/GD3N-acetilgalactosaminiltransferasa (β 4GalNAcT-I): i) anti-GD1a/GT1b isotipo IgG1 (Ab1-GD1a) (Lunn et al. 2000), ii) anti-GD1a/GT1b/GT1a α isotipo IgG2b (Ab2- GD1a) (Schnaar et al. 2002) y iii) anti-GM1 isotipo IgG2b (Ab2-GM1) (Yuki et al. 2004). Los anticuerpos fueron purificados mediante cromatografía de afinidad empleando columnas de proteína G o columnas con anti IgG de ratón inmovilizado. El kit de marcación de anticuerpos con Alexa Flúor 568 de Invitrogen fue usado para marcar Ab1-GD1a siguiendo las instrucciones del fabricante para generar Alexa568-Ab1-GD1a (568 Ab1-GD1a).

Los constructos hemaglutinina (HA)-Arf6-Q67L y (HA)-Arf6-T27N fueron recibidos de J. Donaldson (NHLBI, NIH, Bethesda, MD, EEUU) y pGFP-Rab11a de M. Colombo (Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina). Los plásmidos que codifican para GFP-dinamina 2-salvaje (WT) y GFP-dinamina 2-K44A fueron provistos por J. Bonifacino (NICHD, NIH, Bethesda, MD, EEUU). El constructo que codifica para el dominio N-terminal (región citosólica, dominio transmembrana y algunos aminoácidos de la región espaciadora) de β 4GalNAcT-I fusionada al N-terminal de CFP (β 4GalNAcT-I-CFP) fue obtenida subclonando el correspondiente fragmento de ADNc en el plásmido pECFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA, EEUU) (Giraud and Maccioni 2003). El plásmido que codifica para PH-PLC δ 1-GFP (una proteína quimérica que contiene el dominio homólogo a pleckstrina de la fosfolipasa C δ 1 fusionado a GFP (PH-PLC δ -GFP) fue recibido de M. Lemmon (University of Pennsylvania School of Medicine, Filadelfia, EEUU).

Cultivo celular y transfección

Células CHO-K1 (ATCC, Manassas, VA, USA) genéticamente modificadas para expresar los gangliósidos GM1 y GD1a (CHO-K1^{GD1a/GM1+}) (Crespo et al. 2002) y la línea celular derivada de neuroblastoma Neuro-2a (ATCC, Manassas, VA, USA) que expresan de manera endógena los gangliósidos GD1a and GM1, fueron mantenidas a 37°C, 5% CO₂ en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 μ g/mL penicilina y 100 μ g/mL estreptomycin). Las células fueron transfectadas con 0,5-1,0 μ g/ placa de 35 mm del plásmido indicado usando polietilenimina lineal (Sigma-Aldrich, MO, EEUU).

Marcación celular y ensayos de internalización

Células transientemente transfectadas con los plásmidos indicados más arriba o células no transfectadas fueron incubadas a 4°C por 15 minutos para inhibir el transporte intracelular y luego incubadas a 4°C por 45 minutos con diluciones apropiadas de ⁵⁶⁸Ab1-GD1a o Ab2-GD1a para marcar el gangliósido GD1a o Ab2-GM1 para marcar el gangliósido GM1 expresados en la superficie celular. Después, las células fueron lavadas tres veces con DMEM frío para remover el anticuerpo no unido, fijadas en paraformaldehído al 1% en buffer fosfato salino (PBS) por 10 minutos a 4°C o transferidas a DMEM pre calentado a 16°C o 37°C para permitir la endocitosis del anticuerpo durante diferentes períodos de tiempo y finalmente fijadas. Para la internalización de transferrina, las células fueron primero incubadas por 90 minutos a 37°C en DMEM sin SFB. Luego, se lavaron y se incubaron a 4°C por 15 minutos seguido de 45 minutos en DMEM frío conteniendo 10 µg/mL de Alexa647-transferrina (⁶⁴⁷transferrina) (Molecular Probes, Eugene, OR, EEUU) y ⁵⁶⁸Ab1-GD1a. Finalmente, las células fueron transferidas a DMEM precalentado a 37°C o 16°C sin SFB suplementado con 5 µg/mL de ⁶⁴⁷transferrina y fijadas a diferentes tiempos. Anti IgG de ratón producido en cabra y conjugado a Alexa Flúor 488 (⁴⁸⁸Anti-IgG) fue utilizado para ensayos de colocalización en experimentos realizados a 16°C. Anti IgG de ratón producido en cabra y conjugado a Alexa Flúor 546 (⁵⁴⁶Anti-IgG) fue empleado para detectar Ab2-GD1a y Ab2-GM1.

Microscopía confocal

Las células fueron crecidas en cubreobjetos, lavadas dos veces con DMEM y fijadas en paraformaldehído al 1% en PBS por 10 minutos a 4°C. Cuando se indica, las células fueron permeabilizadas con 0.1% Tritón X-100/200 mM glicina en PBS por 2 minutos a temperatura ambiente y los anticuerpos secundarios ⁴⁸⁸Anti-IgG y ⁵⁴⁶Anti-IgG, ambos diluidos 1:1000, fueron usados para detección de los anticuerpos primarios. Luego de lavados finales, las células fueron montadas en FluorSave (Calbiochem, EMD Biosciences, La Jolla, CA, EEUU). La expresión de β 4GalNAcT-I fue detectada por la fluorescencia intrínseca de CFP. Dinamina 2-K44A y dinamina 2-salvaje fueron detectadas por la fluorescencia intrínseca de GFP. Las imágenes confocales fueron tomadas con un microscopio Olympus FluoViewTMFV1000 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con un láser argón/helio/neón y un objetivo de inmersión en aceite de 63x y una apertura numérica de 1.42. Secciones confocales de 0,8 µm fueron tomadas paralelas al cubreobjetos (secciones xy). Las imágenes fueron adquiridas y procesadas con el software del microscopio y con ImageJ. Las imágenes finales fueron compiladas con Adobe Photoshop CS6.

Microscopía confocal *in vivo* (time-lapse)

Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} crecidas por 24 h en LabTeks fueron inicialmente incubadas a 4°C en DMEM libre de rojo fenol por 15 minutos y luego con una dilución apropiada de ⁵⁶⁸Ab1-GD1a a 4°C durante 45 minutos. Luego de lavar para remover el anticuerpo no unido, se adicionó medio precalentado

a 16°C y la temperatura fue mantenida durante 13 minutos. Luego de este período de tiempo, el medio fue removido y reemplazado por medio precalentado a 37°C y la temperatura fue mantenida hasta el final del experimento.

Ensayos fluorimétricos

Células CHO-K1^{GD1a/GM1+} fueron crecidas en placas de 96 pocillos durante 24 h y luego incubadas a 4°C en DMEM sin rojo fenol durante 15 minutos y luego con una dilución apropiada de ⁵⁶⁸Ab1-GD1a durante 45 minutos a 4°C (input). Luego de este período de tiempo, la fracción de anticuerpo no unido fue recuperada, las células fueron lavadas y se adicionó medio precalentado a 16°C e incubó durante 30 minutos. El medio conteniendo el anticuerpo liberado durante este período de tiempo a 16°C fue recuperado y se adicionó medio precalentado a 37°C e incubó durante otros 30 minutos. Finalmente, el medio conteniendo el anticuerpo liberado durante este período de tiempo a 30°C fue recuperado y la fluorescencia en cada fracción fue determinada usando el espectrofluorómetro FluoroMax-P (HORIBA Jobin Yvon SAS, Longjumeau Cedex, Francia). La unión inicial del anticuerpo fue estimada restando a la señal inicial de fluorescencia (input) la señal obtenida para la fracción de anticuerpo no unido.

Otros procedimientos experimentales

El marcado metabólico de gangliósidos, extracción de lípidos y la cromatografía fueron realizados esencialmente como se describió anteriormente (Rodríguez-Walker et al. 2015).

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron evaluados mediante análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de Dunnett para la comparación de múltiples grupos con un grupo control. En los experimentos donde se comparan dos medias experimentales, se utilizó una prueba de t-Student. El nivel de significancia fue establecido en 1% ($p < 0,01$). Los resultados se expresan como la media +/- EEM.

REFERENCIAS

- Aebi, M. (2013). "N-linked protein glycosylation in the ER." *Biochim Biophys Acta* **1833**(11): 2430-2437.
- Alessandri, G., Filippeschi, S., Sinibaldi, P., Mornet, F., Passera, P., Spreafico, F., Cappa, P. M. and Gullino, P. M. (1987). "Influence of gangliosides on primary and metastatic neoplastic growth in human and murine cells." *Cancer Res* **47**(16): 4243-4247.
- Alessandri, G., Raju, K. S. and Gullino, P. M. (1986). "Interaction of gangliosides with fibronectin in the mobilization of capillary endothelium. Possible influence on the growth of metastasis." *Invasion Metastasis* **6**(3): 145-165.
- Alfonso, M., Diaz, A., Hernandez, A. M., Perez, A., Rodriguez, E., Bitton, R., Perez, R. and Vazquez, A. M. (2002). "An anti-idiotypic vaccine elicits a specific response to N-glycolyl sialic acid residues of glycoconjugates in melanoma patients." *J Immunol* **168**(5): 2523-2529.
- Almaraz, R. T., Tian, Y., Bhattarcharya, R., Tan, E., Chen, S. H., Dallas, M. R., Chen, L., Zhang, Z., Zhang, H., Konstantopoulos, K. and Yarema, K. J. (2012). "Metabolic flux increases glycoprotein sialylation: implications for cell adhesion and cancer metastasis." *Mol Cell Proteomics* **11**(7): M112 017558.
- Alter, M. (1990). "The epidemiology of Guillain-Barre syndrome." *Ann Neurol* **27 Suppl**: S7-12.
- Angata, T. and Varki, A. (2002). "Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective." *Chem Rev* **102**(2): 439-469.
- Apweiler, R., Hermjakob, H. and Sharon, N. (1999). "On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database." *Biochim Biophys Acta* **1473**(1): 4-8.
- Asbury, A. K. (1990). "Guillain-Barre syndrome: historical aspects." *Ann Neurol* **27 Suppl**: S2-6.
- Aslund, F. and Beckwith, J. (1999). "Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation." *Cell* **96**(6): 751-753.
- Audry, M., Jeanneau, C., Imberty, A., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P. and Breton, C. (2011). "Current trends in the structure-activity relationships of sialyltransferases." *Glycobiology* **21**(6): 716-726.
- Aureli, M., Mauri, L., Ciampa, M. G., Prinetti, A., Toffano, G., Secchieri, C. and Sonnino, S. (2016). "GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential." *Mol Neurobiol* **53**(3): 1824-1842.
- Banda, K., Gregg, C. J., Chow, R., Varki, N. M. and Varki, A. (2012). "Metabolism of vertebrate amino sugars with N-glycolyl groups: mechanisms underlying gastrointestinal incorporation of the non-human sialic acid xeno-autoantigen N-glycolylneuraminic acid." *J Biol Chem* **287**(34): 28852-28864.
- Bardor, M., Nguyen, D. H., Diaz, S. and Varki, A. (2005). "Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid into human cells." *J Biol Chem* **280**(6): 4228-4237.
- Barker, E. and Reisfeld, R. A. (1993). "A mechanism for neutrophil-mediated lysis of human neuroblastoma cells." *Cancer Res* **53**(2): 362-367.

- Basu, I. and Mukhopadhyay, C. (2014). "Insights into binding of cholera toxin to GM1 containing membrane." Langmuir **30**(50): 15244-15252.
- Ben-Dor, S., Esterman, N., Rubin, E. and Sharon, N. (2004). "Biases and complex patterns in the residues flanking protein N-glycosylation sites." Glycobiology **14**(2): 95-101.
- Bieberich, E., Freischutz, B., Liour, S. S. and Yu, R. K. (1998). "Regulation of ganglioside metabolism by phosphorylation and dephosphorylation." J Neurochem **71**(3): 972-979.
- Bieberich, E., MacKinnon, S., Silva, J., Li, D. D., Tencomnao, T., Irwin, L., Kapitonov, D. and Yu, R. K. (2002). "Regulation of ganglioside biosynthesis by enzyme complex formation of glycosyltransferases." Biochemistry **41**(38): 11479-11487.
- Bieberich, E., Tencomnao, T., Kapitonov, D. and Yu, R. K. (2000). "Effect of N-glycosylation on turnover and subcellular distribution of N-acetylgalactosaminyltransferase I and sialyltransferase II in neuroblastoma cells." J Neurochem **74**(6): 2359-2364.
- Blanco, R. (2016). "N-Glycolyl GM3 Ganglioside as a Relevant Tumor Antigen in Humans." Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis.
- Blanco, R., Dominguez, E., Morales, O., Blanco, D., Martinez, D., Rengifo, C. E., Viada, C., Cedeno, M., Rengifo, E. and Carr, A. (2015). "Prognostic Significance of N-Glycolyl GM3 Ganglioside Expression in Non-Small Cell Lung Carcinoma Patients: New Evidences." Patholog Res Int **2015**: 132326.
- Boccuti, L., Aoki, K., Flanagan-Steet, H., Chen, C. F., Fan, X., Bartel, F., Petukh, M., Pittman, A., Saul, R., Chaubey, A., Alexov, E., Tiemeyer, M., Steet, R. and Schwartz, C. E. (2014). "A mutation in a ganglioside biosynthetic enzyme, ST3GAL5, results in salt & pepper syndrome, a neurocutaneous disorder with altered glycolipid and glycoprotein glycosylation." Hum Mol Genet **23**(2): 418-433.
- Boligan, K. F., Mesa, C., Fernandez, L. E. and von Gunten, S. (2015). "Cancer intelligence acquired (CIA): tumor glycosylation and sialylation codes dismantling antitumor defense." Cell Mol Life Sci **72**(7): 1231-1248.
- Boukhris, A., Schule, R., Loureiro, J. L., Lourenco, C. M., Mundwiller, E., Gonzalez, M. A., Charles, P., Gauthier, J., Reik, I., Acosta Lebrigio, R. F., Gaussen, M., Speziani, F., Ferbert, A., Feki, I., Caballero-Oteyza, A., Dionne-Laporte, A., Amri, M., Noreau, A., Forlani, S., Cruz, V. T., Mochel, F., Coutinho, P., Dion, P., Mhiri, C., Schols, L., Pouget, J., Darios, F., Rouleau, G. A., Marques, W., Jr., Brice, A., Durr, A., Zuchner, S. and Stevanin, G. (2013). "Alteration of ganglioside biosynthesis responsible for complex hereditary spastic paraplegia." Am J Hum Genet **93**(1): 118-123.
- Bourque, P. R., Chardon, J. W. and Massie, R. (2015). "Autoimmune peripheral neuropathies." Clin Chim Acta **449**: 37-42.
- Bremer, E. G., Hakomori, S., Bowen-Pope, D. F., Raines, E. and Ross, R. (1984). "Ganglioside-mediated modulation of cell growth, growth factor binding, and receptor phosphorylation." J Biol Chem **259**(11): 6818-6825.
- Bremer, E. G., Schlessinger, J. and Hakomori, S. (1986). "Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem **261**(5): 2434-2440.
- Brown, F. D., Rozelle, A. L., Yin, H. L., Balla, T. and Donaldson, J. G. (2001). "Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic." J Cell Biol **154**(5): 1007-1017.

- Bull, C., Stoel, M. A., den Brok, M. H. and Adema, G. J. (2014). "Sialic acids sweeten a tumor's life." Cancer Res **74**(12): 3199-3204.
- Bulleid, N. J. (2012). "Disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(11).
- Burczak, J. D., Moskal, J. R., Trosko, J. E., Fairley, J. L. and Sweeley, C. C. (1983). "Phorbol ester-associated changes in ganglioside metabolism." Exp Cell Res **147**(2): 281-286.
- Cacciavillano, W., Sampor, C., Venier, C., Gabri, M. R., de Davila, M. T., Galluzzo, M. L., Guthmann, M. D., Fainboim, L., Alonso, D. F. and Chantada, G. L. (2015). "A Phase I Study of the Anti-Idiotypic Vaccine Racotumomab in Neuroblastoma and Other Pediatric Refractory Malignancies." Pediatr Blood Cancer **62**(12): 2120-2124.
- Capasso, M., Notturmo, F., Manzoli, C. and Uncini, A. (2011). "Involvement of sensory fibres in axonal subtypes of Guillain-Barre syndrome." J Neurol Neurosurg Psychiatry **82**(6): 664-670.
- Caporale, C. M., Capasso, M., Luciani, M., Prencipe, V., Creati, B., Gandolfi, P., De Angelis, M. V., Di Muzio, A., Caporale, V. and Uncini, A. (2006). "Experimental axonopathy induced by immunization with Campylobacter jejuni lipopolysaccharide from a patient with Guillain-Barre syndrome." J Neuroimmunol **174**(1-2): 12-20.
- Caputto, R., Maccioni, A. H. and Caputto, B. L. (1977). "Activation of deoxycholate solubilized adenosine triphosphatase by ganglioside and asialoganglioside preparations." Biochem Biophys Res Commun **74**(3): 1046-1052.
- Caramelo, J. J., Castro, O. A., Alonso, L. G., De Prat-Gay, G. and Parodi, A. J. (2003). "UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 86-91.
- Carod-Artal, F. J., Wichmann, O., Farrar, J. and Gascon, J. (2013). "Neurological complications of dengue virus infection." Lancet Neurol **12**(9): 906-919.
- Carubia, J. M., Yu, R. K., Macala, L. J., Kirkwood, J. M. and Varga, J. M. (1984). "Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes." Biochem Biophys Res Commun **120**(2): 500-504.
- Cazet, A., Groux-Degroote, S., Teylaert, B., Kwon, K. M., Lehoux, S., Slomianny, C., Kim, C. H., Le Bourhis, X. and Delannoy, P. (2009). "GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells." Biol Chem **390**(7): 601-609.
- Cazet, A., Lefebvre, J., Adriaenssens, E., Julien, S., Bobowski, M., Grigoriadis, A., Tutt, A., Tulasne, D., Le Bourhis, X. and Delannoy, P. (2010). "GD(3) synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation." Mol Cancer Res **8**(11): 1526-1535.
- Chakrabandhu, K., Huault, S., Garmy, N., Fantini, J., Stebe, E., Mailfert, S., Marguet, D. and Hueber, A. O. (2008). "The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand." Cell Death Differ **15**(12): 1824-1837.
- Chalat, M., Menon, I., Turan, Z. and Menon, A. K. (2012). "Reconstitution of glucosylceramide flip-flop across endoplasmic reticulum: implications for mechanism of glycosphingolipid biosynthesis." J Biol Chem **287**(19): 15523-15532.

- Chamberlain, L. H. and Shipston, M. J. (2015). "The physiology of protein S-acylation." *Physiol Rev* **95**(2): 341-376.
- Chasick, A., Solimando, D. A., Jr. and Waddell, J. A. (2015). "Dinutuximab and Panobinostat." *Hosp Pharm* **50**(9): 767-772.
- Chen, C. and Colley, K. J. (2000). "Minimal structural and glycosylation requirements for ST6Gal I activity and trafficking." *Glycobiology* **10**(5): 531-583.
- Cheresh, D. A., Rosenberg, J., Mujoo, K., Hirschowitz, L. and Reisfeld, R. A. (1986). "Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity." *Cancer Res* **46**(10): 5112-5118.
- Chester, M. A. (1997). "Nomenclature of glycolipids." *Pure and Applied Chemistry* **69**: 2475-2487.
- Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R. J. and Schnaar, R. L. (2000). "A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice." *Exp Neurol* **166**(2): 227-234.
- Chinnapen, D. J., Hsieh, W. T., te Welscher, Y. M., Saslowsky, D. E., Kaoutzani, L., Brandsma, E., D'Auria, L., Park, H., Wagner, J. S., Drake, K. R., Kang, M., Benjamin, T., Ullman, M. D., Costello, C. E., Kenworthy, A. K., Baumgart, T., Massol, R. H. and Lencer, W. I. (2012). "Lipid sorting by ceramide structure from plasma membrane to ER for the cholera toxin receptor ganglioside GM1." *Dev Cell* **23**(3): 573-586.
- Christensen, L. L., Jensen, U. B., Bross, P. and Orntoft, T. F. (2000). "The C-terminal N-glycosylation sites of the human alpha1,3/4-fucosyltransferase III, -V, and -VI (hFucTIII, -V, and -VI) are necessary for the expression of full enzyme activity." *Glycobiology* **10**(9): 931-939.
- Cortassa, S., Panzetta, P. and Maccioni, H. J. (1984). "Biosynthesis of gangliosides in the developing chick embryo retina." *J Neurosci Res* **12**(2-3): 257-267.
- Coskun, U., Grzybek, M., Drechsel, D. and Simons, K. (2011). "Regulation of human EGF receptor by lipids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(22): 9044-9048.
- Coste, H., Martel, M. B. and Got, R. (1986). "Topology of glucosylceramide synthesis in Golgi membranes from porcine submaxillary glands." *Biochim Biophys Acta* **858**(1): 6-12.
- Crespo, P. M., Demichelis, V. T. and Daniotti, J. L. (2010). "Neobiosynthesis of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycosyltransferases." *J Biol Chem* **285**(38): 29179-29190.
- Crespo, P. M., Iglesias-Bartolome, R. and Daniotti, J. L. (2004). "Ganglioside GD3 traffics from the trans-Golgi network to plasma membrane by a Rab11-independent and brefeldin A-insensitive exocytic pathway." *J Biol Chem* **279**(46): 47610-47618.
- Crespo, P. M., Silvestre, D. C., Gil, G. A., Maccioni, H. J., Daniotti, J. L. and Caputto, B. L. (2008). "c-Fos activates glucosylceramide synthase and glycolipid synthesis in PC12 cells." *J Biol Chem* **283**(45): 31163-31171.
- Crespo, P. M., von Muhlinen, N., Iglesias-Bartolome, R. and Daniotti, J. L. (2008). "Complex gangliosides are apically sorted in polarized MDCK cells and internalized by clathrin-independent endocytosis." *FEBS J* **275**(23): 6043-6056.

- Crespo, P. M., Zurita, A. R. and Daniotti, J. L. (2002). "Effect of gangliosides on the distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in plasma membrane from Chinese hamster ovary-K1 cells." *J Biol Chem* **277**(47): 44731-44739.
- Cumming, R. C., Andon, N. L., Haynes, P. A., Park, M., Fischer, W. H. and Schubert, D. (2004). "Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress." *J Biol Chem* **279**(21): 21749-21758.
- Cunningham, M. E., McGonigal, R., Meehan, G. R., Barrie, J. A., Yao, D., Halstead, S. K. and Willison, H. J. (2016). "Anti-ganglioside antibodies are removed from circulation in mice by neuronal endocytosis." *Brain* **139**(Pt 6): 1657-1665.
- D'Alessio, C., Caramelo, J. J. and Parodi, A. J. (2010). "UDP-Glc:glycoprotein glycosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control." *Semin Cell Dev Biol* **21**(5): 491-499.
- D'Angelo, G., Uemura, T., Chuang, C. C., Polishchuk, E., Santoro, M., Ohvo-Rekila, H., Sato, T., Di Tullio, G., Varriale, A., D'Auria, S., Daniele, T., Capuani, F., Johannes, L., Mattjus, P., Monti, M., Pucci, P., Williams, R. L., Burke, J. E., Platt, F. M., Harada, A. and De Matteis, M. A. (2013). "Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi." *Nature* **501**(7465): 116-120.
- D'Angelo, G., Vicinanza, M., Di Campli, A. and De Matteis, M. A. (2008). "The multiple roles of PtdIns(4)P -- not just the precursor of PtdIns(4,5)P₂." *J Cell Sci* **121**(Pt 12): 1955-1963.
- Dabelsteen, E. and Clausen, H. (1987). "Tumor-associated carbohydrate antigens." *J Oral Pathol* **16**(4): 196-198.
- Dalton, H. R., Kamar, N., van Eijk, J. J., McLean, B. N., Cintas, P., Bendall, R. P. and Jacobs, B. C. (2016). "Hepatitis E virus and neurological injury." *Nat Rev Neurol* **12**(2): 77-85.
- Daniotti, Lardone, R. D. and Vilcaes, A. A. (2015b). "Dysregulated Expression of Glycolipids in Tumor Cells: From Negative Modulator of Anti-tumor Immunity to Promising Targets for Developing Therapeutic Agents." *Front Oncol* **5**: 300.
- Daniotti, Vilcaes, Rodriguez-Walker and Ruggiero (2015a). *Metabolism of Glycolipids at the Cell Surface Sphingolipids: Biology, Synthesis and Functions*. A. Catalá, Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-63483-708-8.
- Daniotti, J. L. and Iglesias-Bartolome, R. (2011). "Metabolic pathways and intracellular trafficking of gangliosides." *IUBMB Life* **63**(7): 513-520.
- Daniotti, J. L., Landa, C. A. and Maccioni, H. J. (1994). "Regulation of ganglioside composition and synthesis is different in developing chick retinal pigment epithelium and neural retina." *J Neurochem* **62**(3): 1131-1136.
- Daniotti, J. L., Landa, C. A., Rosner, H. and Maccioni, H. J. (1991). "GD3 prevalence in adult rat retina correlates with the maintenance of a high GD3-/GM2-synthase activity ratio throughout development." *J Neurochem* **57**(6): 2054-2058.
- Daniotti, J. L., Martina, J. A., Giraudo, C. G., Zurita, A. R. and Maccioni, H. J. (2000). "GM3 alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase): protein characterization and sub-golgi location in CHO-K1 cells." *J Neurochem* **74**(4): 1711-1720.

- Daniotti, J. L., Martina, J. A., Zurita, A. R. and Maccioni, H. J. (1999). "Mouse beta 1,3-galactosyltransferase (GA1/GM1/GD1b synthase): protein characterization, tissue expression, and developmental regulation in neural retina." J Neurosci Res **58**(2): 318-327.
- Daniotti, J. L., Rosales Fritz, V., Kunda, P., Nishi, T. and Maccioni, H. J. (1997b). "Cloning, characterization and developmental expression of alpha2,8 sialyltransferase (GD3 synthase, ST8Sia I) gene in chick brain and retina." Int J Dev Neurosci **15**(6): 767-776.
- Daniotti, J. L., Rosales Fritz, V. M., Martina, J. A., Furukawa, K. and Maccioni, H. J. (1997a). "Expression of beta 1-4 N-acetylgalactosaminyltransferase gene in the developing rat brain and retina: mRNA, protein immunoreactivity and enzyme activity." Neurochem Int **31**(1): 11-19.
- Daniotti, J. L., Vilcaes, A. A., Torres Demichelis, V., Ruggiero, F. M. and Rodriguez-Walker, M. (2013). "Glycosylation of glycolipids in cancer: basis for development of novel therapeutic approaches." Front Oncol **3**: 306.
- Datta, A. K. and Paulson, J. C. (1997). "Sialylmotifs of sialyltransferases." Indian J Biochem Biophys **34**(1-2): 157-165.
- Dennis, J. W., Granovsky, M. and Warren, C. E. (1999). "Glycoprotein glycosylation and cancer progression." Biochim Biophys Acta **1473**(1): 21-34.
- Dhar, R., Stitt, L. and Hahn, A. F. (2008). "The morbidity and outcome of patients with Guillain-Barre syndrome admitted to the intensive care unit." J Neurol Sci **264**(1-2): 121-128.
- Dhillon, S. (2015). "Dinutuximab: first global approval." Drugs **75**(8): 923-927.
- Dodd, C. N., Romio, S. A., Black, S., Vellozzi, C., Andrews, N., Sturkenboom, M., Zuber, P., Hua, W., Bonhoeffer, J., Buttery, J., Crawford, N., Deceuninck, G., de Vries, C., De Wals, P., Gutierrez-Gimeno, M. V., Heijbel, H., Hughes, H., Hur, K., Hviid, A., Kelman, J., Kilpi, T., Chuang, S. K., Macartney, K., Rett, M., Lopez-Callada, V. R., Salmon, D., Gimenez-Sanchez, F., Sanz, N., Silverman, B., Storsaeter, J., Thirugnanam, U., van der Maas, N., Yih, K., Zhang, T. and Izurieta, H. (2013). "International collaboration to assess the risk of Guillain Barre Syndrome following Influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccines." Vaccine **31**(40): 4448-4458.
- Donaldson, J. G. and Klausner, R. D. (1994). "ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure." Curr Opin Cell Biol **6**(4): 527-532.
- Dreyfus, H., Louis, J. C., Harth, S. and Mandel, P. (1980). "Gangliosides in cultured neurons." Neuroscience **5**(9): 1647-1655.
- Dreyfus, H., Urban, P. F., Edel-Harth, S. and Mandel, P. (1975). "Developmental patterns of gangliosides and of phospholipids in chick retina and brain." J Neurochem **25**(3): 245-250.
- Edelman, A. M., Blumenthal, D. K. and Krebs, E. G. (1987). "Protein serine/threonine kinases." Annu Rev Biochem **56**: 567-613.
- Ellgaard, L. and Helenius, A. (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 181-191.
- Ellinger, I., Klapper, H., Courtoy, P. J., Vaerman, J. P. and Fuchs, R. (2002). "Different temperature sensitivity of endosomes involved in transport to lysosomes and transcytosis in rat hepatocytes: analysis by free-flow electrophoresis." Electrophoresis **23**(13): 2117-2129.

- Fares, F. (2006). "The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists." *Biochim Biophys Acta* **1760**(4): 560-567.
- Ferrari, M. L., Gomez, G. A. and Maccioni, H. J. (2012). "Spatial organization and stoichiometry of N-terminal domain-mediated glycosyltransferase complexes in Golgi membranes determined by fret microscopy." *Neurochem Res* **37**(6): 1325-1334.
- Fewou, S. N., Plomp, J. J. and Willison, H. J. (2014). "The pre-synaptic motor nerve terminal as a site for antibody-mediated neurotoxicity in autoimmune neuropathies and synaptopathies." *J Anat* **224**(1): 36-44.
- Fewou, S. N., Rupp, A., Nickolay, L. E., Carrick, K., Greenshields, K. N., Pediani, J., Plomp, J. J. and Willison, H. J. (2012). "Anti-ganglioside antibody internalization attenuates motor nerve terminal injury in a mouse model of acute motor axonal neuropathy." *J Clin Invest* **122**(3): 1037-1051.
- Figueras, A., Morales-Olivas, F. J., Capella, D., Palop, V. and Laporte, J. R. (1992). "Bovine gangliosides and acute motor polyneuropathy." *BMJ* **305**(6865): 1330-1331.
- Fukasawa, M., Nishijima, M. and Hanada, K. (1999). "Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells." *J Cell Biol* **144**(4): 673-685.
- Funakoshi, T., Yasuda, S., Fukasawa, M., Nishijima, M. and Hanada, K. (2000). "Reconstitution of ATP- and cytosol-dependent transport of de novo synthesized ceramide to the site of sphingomyelin synthesis in semi-intact cells." *J Biol Chem* **275**(39): 29938-29945.
- Furukawa, K., Hamamura, K., Ohkawa, Y. and Ohmi, Y. (2012). "Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities." *Glycoconj J* **29**(8-9): 579-584.
- Furukawa, K., Horie, M., Okutomi, K. and Sugano, S. (2003). "Isolation and functional analysis of the melanoma specific promoter region of human GD3 synthase gene." *Biochim Biophys Acta* **1627**(2-3): 71-78.
- Furukawa, K., Kambe, M., Miyata, M., Ohkawa, Y. and Tajima, O. (2014). "Ganglioside GD3 induces convergence and synergism of adhesion and hepatocyte growth factor/Met signals in melanomas." *Cancer Sci* **105**(1): 52-63.
- Furukawa, K., Soejima, H., Niikawa, N. and Shiku, H. (1996). "Genomic organization and chromosomal assignment of the human beta1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase gene. Identification of multiple transcription units." *J Biol Chem* **271**(34): 20836-20844.
- Furukawa, K., Thampoe, I. J., Yamaguchi, H. and Lloyd, K. O. (1989). "The addition of exogenous gangliosides to cultured human cells results in the cell type-specific expression of novel surface antigens by a biosynthetic process." *J Immunol* **142**(3): 848-854.
- Fuster, M. M. and Esko, J. D. (2005). "The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets." *Nat Rev Cancer* **5**(7): 526-542.
- Futerman, A. H. and Pagano, R. E. (1991). "Determination of the intracellular sites and topology of glucosylceramide synthesis in rat liver." *Biochem J* **280** (Pt 2): 295-302.

- Gabri, M. R., Cacciavillano, W., Chantada, G. L. and Alonso, D. F. (2016). "Racotumomab for treating lung cancer and pediatric refractory malignancies." Expert Opin Biol Ther **16**(4): 573-578.
- Gajdosik, Z. (2014). "Racotumomab - a novel anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine for the treatment of cancer." Drugs Today (Barc) **50**(4): 301-307.
- Garcia, P., Gupta, R., Shah, S., Morris, A. J., Rudge, S. A., Scarlata, S., Petrova, V., McLaughlin, S. and Rebecchi, M. J. (1995). "The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes." Biochemistry **34**(49): 16228-16234.
- Garofalo, T., Tinari, A., Matarrese, P., Giammarioli, A. M., Manganelli, V., Ciarlo, L., Misasi, R., Sorice, M. and Malorni, W. (2007). "Do mitochondria act as "cargo boats" in the journey of GD3 to the nucleus during apoptosis?" FEBS Lett **581**(21): 3899-3903.
- Geremia, R. A., Harduin-Lepers, A. and Delannoy, P. (1997). "Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action." Glycobiology **7**(2): v-vii.
- Giordanengo, V., Bannwarth, S., Laffont, C., Van Miegem, V., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P. and Lefebvre, J. C. (1997). "Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line." Eur J Biochem **247**(2): 558-566.
- Giraud, C. G., Daniotti, J. L. and Maccioni, H. J. (2001). "Physical and functional association of glycolipid N-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1625-1630.
- Giraud, C. G. and Maccioni, H. J. (2003). "Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1." Mol Biol Cell **14**(9): 3753-3766.
- Giraud, C. G. and Maccioni, H. J. (2003). "Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells." J Biol Chem **278**(41): 40262-40271.
- Giraud, C. G., Rosales Fritz, V. M. and Maccioni, H. J. (1999). "GA2/GM2/GD2 synthase localizes to the trans-golgi network of CHO-K1 cells." Biochem J **342 Pt 3**: 633-640.
- Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D. R., Kular, G. S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J. M. and De Matteis, M. A. (2004). "FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P." Nat Cell Biol **6**(5): 393-404.
- Gomez, G. A. and Daniotti, J. L. (2005). "H-Ras dynamically interacts with recycling endosomes in CHO-K1 cells: involvement of Rab5 and Rab11 in the trafficking of H-Ras to this pericentriolar endocytic compartment." J Biol Chem **280**(41): 34997-35010.
- Goodfellow, J. A., Bowes, T., Sheikh, K., Odaka, M., Halstead, S. K., Humphreys, P. D., Wagner, E. R., Yuki, N., Furukawa, K., Plomp, J. J. and Willison, H. J. (2005). "Overexpression of GD1a ganglioside sensitizes motor nerve terminals to anti-GD1a antibody-mediated injury in a model of acute motor axonal neuropathy." J Neurosci **25**(7): 1620-1628.
- Goodfellow, J. A. and Willison, H. J. (2016). "Guillain-Barre syndrome: a century of progress." Nat Rev Neurol **12**(12): 723-731.

- Greenshields, K. N., Halstead, S. K., Zitman, F. M., Rinaldi, S., Brennan, K. M., O'Leary, C., Chamberlain, L. H., Easton, A., Roxburgh, J., Pediani, J., Furukawa, K., Goodyear, C. S., Plomp, J. J. and Willison, H. J. (2009). "The neuropathic potential of anti-GM1 autoantibodies is regulated by the local glycolipid environment in mice." J Clin Invest **119**(3): 595-610.
- Greis, C. and Rosner, H. (1990). "Migration and aggregation of embryonic chicken neurons in vitro: possible functional implication of polysialogangliosides." Brain Res Dev Brain Res **57**(2): 223-234.
- Gross, H. J. (1992). "Fluorescent CMP-sialic acids as a tool to study the specificity of the CMP-sialic acid carrier and the glycoconjugate sialylation in permeabilized cells." Eur J Biochem **203**(1-2): 269-275.
- Grunberger, G., Zick, Y., Taylor, S. I. and Gordon, P. (1984). "Tumor-promoting phorbol ester stimulates tyrosine phosphorylation in U-937 monocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(9): 2762-2766.
- Gu, X., Preuss, U., Gu, T. and Yu, R. K. (1995). "Regulation of sialyltransferase activities by phosphorylation and dephosphorylation." J Neurochem **64**(5): 2295-2302.
- Hadley, B., Maggioni, A., Ashikov, A., Day, C. J., Haselhorst, T. and Tiralongo, J. (2014). "Structure and function of nucleotide sugar transporters: Current progress." Comput Struct Biotechnol J **10**(16): 23-32.
- Hakomori, S. (1984). "Tumor-associated carbohydrate antigens." Annu Rev Immunol **2**: 103-126.
- Hakomori, S. I. and Handa, K. (2015). "GM3 and cancer." Glycoconj J **32**(1-2): 1-8.
- Hakomori Si, S. I. (2002). "The glycosynapse." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 225-232.
- Halter, D., Neumann, S., van Dijk, S. M., Wolthoorn, J., de Maziere, A. M., Vieira, O. V., Mattjus, P., Klumperman, J., van Meer, G. and Sprong, H. (2007). "Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis." J Cell Biol **179**(1): 101-115.
- Hamamura, K., Tsuji, M., Ohkawa, Y., Nakashima, H., Miyazaki, S., Urano, T., Yamamoto, N., Ueda, M. and Furukawa, K. (2008). "Focal adhesion kinase as well as p130Cas and paxillin is crucially involved in the enhanced malignant properties under expression of ganglioside GD3 in melanoma cells." Biochim Biophys Acta **1780**(3): 513-519.
- Hammond, C., Braakman, I. and Helenius, A. (1994). "Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 913-917.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M. and Nishijima, M. (2003). "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide." Nature **426**(6968): 803-809.
- Hao, M. and Maxfield, F. R. (2000). "Characterization of rapid membrane internalization and recycling." J Biol Chem **275**(20): 15279-15286.
- Haraguchi, M., Yamashiro, S., Furukawa, K., Takamiya, K. and Shiku, H. (1995). "The effects of the site-directed removal of N-glycosylation sites from beta-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase on its function." Biochem J **312** (Pt 1): 273-280.
- Harder, T. (2003). "Formation of functional cell membrane domains: the interplay of lipid- and protein-mediated interactions." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1433): 863-868.

- Harlalka, G. V., Lehman, A., Chioza, B., Baple, E. L., Maroofian, R., Cross, H., Sreekantan-Nair, A., Priestman, D. A., Al-Turki, S., McEntagart, M. E., Proukakis, C., Royle, L., Kozak, R. P., Bastaki, L., Patton, M., Wagner, K., Coblenz, R., Price, J., Mezei, M., Schlade-Bartusiak, K., Platt, F. M., Hurles, M. E. and Crosby, A. H. (2013). "Mutations in B4GALNT1 (GM2 synthase) underlie a new disorder of ganglioside biosynthesis." *Brain* **136**(Pt 12): 3618-3624.
- Hassinen, A. and Kellokumpu, S. (2014). "Organizational interplay of Golgi N-glycosyltransferases involves organelle microenvironment-dependent transitions between enzyme homo- and heteromers." *J Biol Chem* **289**(39): 26937-26948.
- Hassinen, A., Rivinoja, A., Kauppila, A. and Kellokumpu, S. (2010). "Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells." *J Biol Chem* **285**(23): 17771-17777.
- Hazin, J., Moldenhauer, G., Altevogt, P. and Brady, N. R. (2015). "A novel method for measuring cellular antibody uptake using imaging flow cytometry reveals distinct uptake rates for two different monoclonal antibodies targeting L1." *J Immunol Methods* **423**: 70-77.
- Hedlund, M., Tangvoranuntakul, P., Takematsu, H., Long, J. M., Housley, G. D., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Wynshaw-Boris, A., Ryan, A. F., Gallo, R. L., Varki, N. and Varki, A. (2007). "N-glycolylneuraminic acid deficiency in mice: implications for human biology and evolution." *Mol Cell Biol* **27**(12): 4340-4346.
- Hefti, F., Hartikka, J. and Frick, W. (1985). "Gangliosides alter morphology and growth of astrocytes and increase the activity of choline acetyltransferase in cultures of dissociated septal cells." *J Neurosci* **5**(8): 2086-2094.
- Helenius, A., Trombetta, E. S., Hebert, D. N. and Simons, J. F. (1997). "Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins." *Trends Cell Biol* **7**(5): 193-200.
- Hernandez, A. M., Rodriguez, N., Gonzalez, J. E., Reyes, E., Rondon, T., Grinan, T., Macias, A., Alfonso, S., Vazquez, A. M. and Perez, R. (2011). "Anti-NeuGcGM3 antibodies, actively elicited by idiotype vaccination in non-small cell lung cancer patients, induce tumor cell death by an oncosis-like mechanism." *J Immunol* **186**(6): 3735-3744.
- Hernandez, A. M., Toledo, D., Martinez, D., Grinan, T., Brito, V., Macias, A., Alfonso, S., Rondon, T., Suarez, E., Vazquez, A. M. and Perez, R. (2008). "Characterization of the antibody response against NeuGcGM3 ganglioside elicited in non-small cell lung cancer patients immunized with an anti-idiotypic antibody." *J Immunol* **181**(9): 6625-6634.
- Hernandez, A. M. and Vazquez, A. M. (2015). "Racotumomab-alum vaccine for the treatment of non-small-cell lung cancer." *Expert Rev Vaccines* **14**(1): 9-20.
- Herscovics, A. (2001). "Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control." *Biochimie* **83**(8): 757-762.
- Higashi, H., Hirabayashi, Y., Fukui, Y., Naiki, M., Matsumoto, M., Ueda, S. and Kato, S. (1985). "Characterization of N-glycolylneuraminic acid-containing gangliosides as tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human colon cancer." *Cancer Res* **45**(8): 3796-3802.
- Higashi, H., Sasabe, T., Fukui, Y., Maru, M. and Kato, S. (1988). "Detection of gangliosides as N-glycolylneuraminic acid-specific tumor-associated Hanganutziu-Deicher antigen in human retinoblastoma cells." *Jpn J Cancer Res* **79**(8): 952-956.

- Higgins, S. C., Fillmore, H. L., Ashkan, K., Butt, A. M. and Pilkington, G. J. (2015). "Dual targeting NG2 and GD3A using Mab-Zap immunotoxin results in reduced glioma cell viability in vitro." Anticancer Res **35**(1): 77-84.
- Hitoshi, S., Koijima, N., Kusunoki, S., Inokuchi, J., Kanazawa, I. and Tsuji, S. (1996). "Expression of the beta-galactoside alpha 1,2-fucosyltransferase gene suppresses axonal outgrowth of neuro2a neuroblastoma cells." J Neurochem **66**(4): 1633-1640.
- Holmgren, J., Lonroth, I. and Svennerholm, L. (1973). "Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure from studies with GM1 ganglioside and related glycolipids." Infect Immun **8**(2): 208-214.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A. J., Frohman, M. A. and Kanaho, Y. (1999). "Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation." Cell **99**(5): 521-532.
- Horta, Z. P., Goldberg, J. L. and Sondel, P. M. (2016). "Anti-GD2 mAbs and next-generation mAb-based agents for cancer therapy." Immunotherapy **8**(9): 1097-1117.
- Huberman, E., Heckman, C. and Langenbach, R. (1979). "Stimulation of differentiated functions in human melanoma cells by tumor-promoting agents and dimethyl sulfoxide." Cancer Res **39**(7 Pt 1): 2618-2624.
- Hughes, R. A., Swan, A. V., Raphael, J. C., Annane, D., van Koningsveld, R. and van Doorn, P. A. (2007). "Immunotherapy for Guillain-Barre syndrome: a systematic review." Brain **130**(Pt 9): 2245-2257.
- Hwang, C., Sinskey, A. J. and Lodish, H. F. (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." Science **257**(5076): 1496-1502.
- Ideo, H., Seko, A., Ishizuka, I. and Yamashita, K. (2003). "The N-terminal carbohydrate recognition domain of galectin-8 recognizes specific glycosphingolipids with high affinity." Glycobiology **13**(10): 713-723.
- Iglesias-Bartolome, R., Crespo, P. M., Gomez, G. A. and Daniotti, J. L. (2006). "The antibody to GD3 ganglioside, R24, is rapidly endocytosed and recycled to the plasma membrane via the endocytic recycling compartment. Inhibitory effect of brefeldin A and monensin." FEBS J **273**(8): 1744-1758.
- Iglesias-Bartolome, R., Trenchi, A., Comin, R., Moyano, A. L., Nores, G. A. and Daniotti, J. L. (2009). "Differential endocytic trafficking of neuropathy-associated antibodies to GM1 ganglioside and cholera toxin in epithelial and neural cells." Biochim Biophys Acta **1788**(12): 2526-2540.
- Inoue, M., Fujii, Y., Furukawa, K., Okada, M., Okumura, K., Hayakawa, T. and Sugiura, Y. (2002). "Refractory skin injury in complex knock-out mice expressing only the GM3 ganglioside." J Biol Chem **277**(33): 29881-29888.
- Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Suzuki, A. (1998). "The molecular basis for the absence of N-glycolylneuraminic acid in humans." J Biol Chem **273**(25): 15866-15871.
- Irwin, L. N., Michael, D. B. and Irwin, C. C. (1980). "Ganglioside patterns of fetal rat and mouse brain." J Neurochem **34**(6): 1527-1530.

- Israeli, E., Agmon-Levin, N., Blank, M., Chapman, J. and Shoenfeld, Y. (2012). "Guillain-Barre syndrome--a classical autoimmune disease triggered by infection or vaccination." *Clin Rev Allergy Immunol* **42**(2): 121-130.
- Ito, M. (2007). "Degradation of Glycolipids", in *Comprehensive Glycoscience: from Chemistry to Systems Biology* Oxford, UK., Elsevier Science Ltd. **3**: 193-203.
- Itokazu, Y., Tsai, Y. T. and Yu, R. K. (2016). "Epigenetic regulation of ganglioside expression in neural stem cells and neuronal cells." *Glycoconj J*.
- Jaskiewicz, E., Zhu, G., Taatjes, D. J., Darling, D. S., Zwanzig, G. E., Jr. and Young, W. W., Jr. (1996). "Cloned beta 1,4N-acetylgalactosaminyltransferase: subcellular localization and formation of disulfide bonded species." *Glycoconj J* **13**(2): 213-223.
- Jeanneau, C., Chazalet, V., Auge, C., Soumpasis, D. M., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., Imberty, A. and Breton, C. (2004). "Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I: role of n-glycosylation and a novel conserved sialylmotif." *J Biol Chem* **279**(14): 13461-13468.
- Kamar, N., Marion, O., Abravanel, F., Izopet, J. and Dalton, H. R. (2016). "Extrahepatic manifestations of hepatitis E virus." *Liver Int* **36**(4): 467-472.
- Kannagi, R., Sakuma, K., Miyazaki, K., Lim, K. T., Yusa, A., Yin, J. and Izawa, M. (2010). "Altered expression of glycan genes in cancers induced by epigenetic silencing and tumor hypoxia: clues in the ongoing search for new tumor markers." *Cancer Sci* **101**(3): 586-593.
- Kawai, H., Allende, M. L., Wada, R., Kono, M., Sango, K., Deng, C., Miyakawa, T., Crawley, J. N., Werth, N., Bierfreund, U., Sandhoff, K. and Proia, R. L. (2001). "Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures." *J Biol Chem* **276**(10): 6885-6888.
- Kawai, T., Kato, A., Higashi, H., Kato, S. and Naiki, M. (1991). "Quantitative determination of N-glycolylneuraminic acid expression in human cancerous tissues and avian lymphoma cell lines as a tumor-associated sialic acid by gas chromatography-mass spectrometry." *Cancer Res* **51**(4): 1242-1246.
- Kawashima, N., Yoon, S. J., Itoh, K. and Nakayama, K. (2009). "Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor is regulated by GM3 binding through carbohydrate to carbohydrate interactions." *J Biol Chem* **284**(10): 6147-6155.
- Keenan, T. W., Schmid, E., Franke, W. W. and Wiegandt, H. (1975). "Exogenous glycosphingolipids suppress growth rate of transformed and untransformed 3T3 mouse cells." *Exp Cell Res* **92**(2): 259-270.
- Khoury, G. A., Baliban, R. C. and Floudas, C. A. (2011). "Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database." *Sci Rep* **1**.
- Kim, R., Emi, M. and Tanabe, K. (2007). "Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape." *Immunology* **121**(1): 1-14.
- Kim, S. W., Lee, S. H., Kim, K. S., Kim, C. H., Choo, Y. K. and Lee, Y. C. (2002). "Isolation and characterization of the promoter region of the human GM3 synthase gene." *Biochim Biophys Acta* **1578**(1-3): 84-89.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J. (1992). "Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure." *J Cell Biol* **116**(5): 1071-1080.

- Koga, M., Gilbert, M., Li, J., Koike, S., Takahashi, M., Furukawa, K., Hirata, K. and Yuki, N. (2005). "Antecedent infections in Fisher syndrome: a common pathogenesis of molecular mimicry." Neurology **64**(9): 1605-1611.
- Kohyama-Koganeya, A., Sasamura, T., Oshima, E., Suzuki, E., Nishihara, S., Ueda, R. and Hirabayashi, Y. (2004). "Drosophila glucosylceramide synthase: a negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors." J Biol Chem **279**(34): 35995-36002.
- Kojima, N., Kurosawa, N., Nishi, T., Hanai, N. and Tsuji, S. (1994). "Induction of cholinergic differentiation with neurite sprouting by de novo biosynthesis and expression of GD3 and b-series gangliosides in Neuro2a cells." J Biol Chem **269**(48): 30451-30456.
- Kolter, T. (2012). "Ganglioside biochemistry." ISRN Biochem **2012**: 506160.
- Kolter, T. and Sandhoff, K. (2006). "Sphingolipid metabolism diseases." Biochim Biophys Acta **1758**(12): 2057-2079.
- Kolter, T. and Sandhoff, K. (2010). "Lysosomal degradation of membrane lipids." FEBS Lett **584**(9): 1700-1712.
- Kono, M., Ohyama, Y., Lee, Y. C., Hamamoto, T., Kojima, N. and Tsuji, S. (1997). "Mouse beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases: comparison of in vitro substrate specificities and tissue specific expression." Glycobiology **7**(4): 469-479.
- Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M. R., De Camilli, P., Takei, K. and Haucke, V. (2003). "ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma." J Cell Biol **162**(1): 113-124.
- Krebs, E. G. and Beavo, J. A. (1979). "Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes." Annu Rev Biochem **48**: 923-959.
- Kundu, M., Mahata, B., Banerjee, A., Chakraborty, S., Debnath, S., Ray, S. S., Ghosh, Z. and Biswas, K. (2016). "Ganglioside GM2 mediates migration of tumor cells by interacting with integrin and modulating the downstream signaling pathway." Biochim Biophys Acta **1863**(7 Pt A): 1472-1489.
- Kwak, D. H., Seo, B. B., Chang, K. T. and Choo, Y. K. (2011). "Roles of gangliosides in mouse embryogenesis and embryonic stem cell differentiation." Exp Mol Med **43**(7): 379-388.
- Lahera, T., Calvo, A., Torres, G., Rengifo, C. E., Quintero, S., Arango Mdel, C., Danta, D., Vazquez, J. M., Escobar, X. and Carr, A. (2014). "Prognostic Role of 14F7 Mab Immunoreactivity against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in Colon Cancer." J Oncol **2014**: 482301.
- Landi, G., D'Alessandro, R., Dossi, B. C., Ricci, S., Simone, I. L. and Ciccone, A. (1993). "Guillain-Barre syndrome after exogenous gangliosides in Italy." BMJ **307**(6917): 1463-1464.
- Lang, Z., Guerrero, M., Li, R. and Ladisch, S. (2001). "Ganglioside GD1a enhances VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration." Biochem Biophys Res Commun **282**(4): 1031-1037.
- Lardone, R. D., Yuki, N., Odaka, M., Daniotti, J. L., Irazoqui, F. J. and Nores, G. A. (2010). "Anti-GM1 IgG antibodies in Guillain-Barre syndrome: fine specificity is associated with disease severity." J Neurol Neurosurg Psychiatry **81**(6): 629-633.

- Lebrun, G., Chadda, K., Reboux, A. H., Martinet, O. and Gauzere, B. A. (2009). "Guillain-Barre syndrome after chikungunya infection." Emerg Infect Dis **15**(3): 495-496.
- Ledeen, R. and Wu, G. (2011). "New findings on nuclear gangliosides: overview on metabolism and function." J Neurochem **116**(5): 714-720.
- Ledeen, R. W. and Wu, G. (2006). "Gangliosides of the nuclear membrane: a crucial locus of cytoprotective modulation." J Cell Biochem **97**(5): 893-903.
- Lee, Y. C., Kurosawa, N., Hamamoto, T., Nakaoka, T. and Tsuji, S. (1993). "Molecular cloning and expression of Gal beta 1,3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase from mouse brain." Eur J Biochem **216**(2): 377-385.
- Lemmon, M. A. (2003). "Phosphoinositide recognition domains." Traffic **4**(4): 201-213.
- Leon, A., Facci, L., Toffano, G., Sonnino, S. and Tettamanti, G. (1981). "Activation of (Na⁺, K⁺)-ATPase by nanomolar concentrations of GM1 ganglioside." J Neurochem **37**(2): 350-357.
- Li, Y., Huang, X., Zhong, W., Zhang, J. and Ma, K. (2013). "Ganglioside GM3 promotes HGF-stimulated motility of murine hepatoma cell through enhanced phosphorylation of cMet at specific tyrosine sites and PI3K/Akt-mediated migration signaling." Mol Cell Biochem **382**(1-2): 83-92.
- Lippincott-Schwartz, J. and Liu, W. (2006). "Insights into COPI coat assembly and function in living cells." Trends Cell Biol **16**(10): e1-4.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L. and Klausner, R. D. (1991). "Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic." Cell **67**(3): 601-616.
- Liu, Y., Wada, R., Kawai, H., Sango, K., Deng, C., Tai, T., McDonald, M. P., Araujo, K., Crawley, J. N., Bierfreund, U., Sandhoff, K., Suzuki, K. and Proia, R. L. (1999). "A genetic model of substrate deprivation therapy for a glycosphingolipid storage disorder." J Clin Invest **103**(4): 497-505.
- Liu, Y., Wondimu, A., Yan, S., Bobb, D. and Ladisch, S. (2014). "Tumor gangliosides accelerate murine tumor angiogenesis." Angiogenesis **17**(3): 563-571.
- Lo, A. S., Ma, Q., Liu, D. L. and Junghans, R. P. (2010). "Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors." Clin Cancer Res **16**(10): 2769-2780.
- Lopez-Mirabal, H. R. and Winther, J. R. (2008). "Redox characteristics of the eukaryotic cytosol." Biochim Biophys Acta **1783**(4): 629-640.
- Lopez, P. H. and Schnaar, R. L. (2009). "Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation." Curr Opin Struct Biol **19**(5): 549-557.
- Lunn, M. P., Johnson, L. A., Fromholt, S. E., Itonori, S., Huang, J., Vyas, A. A., Hildreth, J. E., Griffin, J. W., Schnaar, R. L. and Sheikh, K. A. (2000). "High-affinity anti-ganglioside IgG antibodies raised in complex ganglioside knockout mice: reexamination of GD1a immunolocalization." J Neurochem **75**(1): 404-412.
- Maccioni, H. J., Daniotti, J. L. and Martina, J. A. (1999). "Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus." Biochim Biophys Acta **1437**(2): 101-118.

- Maccioni, H. J., Panzetta, P. and Arrieta, D. (1984a). "Some properties of uridine-5'-diphospho-N-acetylgalactosamine:Hematoside N-acetylgalactosaminyltransferase at early and late stages of embryonic development of chicken retina." Int J Dev Neurosci **2**(3): 259-265.
- Maccioni, H. J., Panzetta, P., Arrieta, D. and Caputto, R. (1984b). "Ganglioside glycosyltransferase activities in the cerebral hemispheres from developing rat embryos." Int J Dev Neurosci **2**(1): 13-19.
- Maccioni, H. J., Quiroga, R. and Ferrari, M. L. (2011). "Cellular and molecular biology of glycosphingolipid glycosylation." J Neurochem **117**(4): 589-602.
- Malykh, Y. N., Schauer, R. and Shaw, L. (2001). "N-Glycolylneuraminic acid in human tumours." Biochimie **83**(7): 623-634.
- Marks, D. L., K., W., P., P., Y., K., R., W. and R., P. (1999). "Oligomerization and Topology of the Golgi Membrane Protein Glucosylceramide Synthase." The Journal of Biological Chemistry **274**(1).
- Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L. E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R. and Ando, S. (1996). "Gangliosides expressed in human breast cancer." Cancer Res **56**(22): 5165-5171.
- Martina, J. A., Daniotti, J. L. and Maccioni, H. J. (1998). "Influence of N-glycosylation and N-glycan trimming on the activity and intracellular traffic of GD3 synthase." J Biol Chem **273**(6): 3725-3731.
- Martina, J. A., Daniotti, J. L. and Maccioni, H. J. (2000). "GM1 synthase depends on N-glycosylation for enzyme activity and trafficking to the Golgi complex." Neurochem Res **25**(5): 725-731.
- Masserini, M. and Freire, E. (1987). "Kinetics of ganglioside transfer between liposomal and synaptosomal membranes." Biochemistry **26**(1): 237-242.
- Matrosovich, M., Herrler, G. and Klenk, H. D. (2015). "Sialic Acid Receptors of Viruses." Top Curr Chem **367**: 1-28.
- Miljan, E. A. and Bremer, E. G. (2002). "Regulation of growth factor receptors by gangliosides." Sci STKE **2002**(160): re15.
- Miyagi, T., Takahashi, K., Hata, K., Shiozaki, K. and Yamaguchi, K. (2012). "Sialidase significance for cancer progression." Glycoconj J **29**(8-9): 567-577.
- Molinari, M., Calanca, V., Galli, C., Lucca, P. and Paganetti, P. (2003). "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle." Science **299**(5611): 1397-1400.
- Morton, D. L. and Barth, A. (1996). "Vaccine therapy for malignant melanoma." CA Cancer J Clin **46**(4): 225-244.
- Mossessova, E., Corpina, R. A. and Goldberg, J. (2003). "Crystal structure of ARF1*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism." Mol Cell **12**(6): 1403-1411.
- Muchmore, E. A., Milewski, M., Varki, A. and Diaz, S. (1989). "Biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid. The primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool." J Biol Chem **264**(34): 20216-20223.

- Mujoo, K., Cheresch, D. A., Yang, H. M. and Reisfeld, R. A. (1987). "Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth." Cancer Res **47**(4): 1098-1104.
- Myhr, K. M., Vagnes, K. S., Maroy, T. H., Aarseth, J. H., Nyland, H. I. and Vedeler, C. A. (2003). "Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with Guillain-Barre syndrome." J Neuroimmunol **139**(1-2): 81-83.
- Nagai, K., Ihara, Y., Wada, Y. and Taniguchi, N. (1997). "N-glycosylation is requisite for the enzyme activity and Golgi retention of N-acetylglucosaminyltransferase III." Glycobiology **7**(6): 769-776.
- Nasi, M. L., Meyers, M., Livingston, P. O., Houghton, A. N. and Chapman, P. B. (1997). "Anti-melanoma effects of R24, a monoclonal antibody against GD3 ganglioside." Melanoma Res **7 Suppl 2**: S155-162.
- Naslavsky, N., Weigert, R. and Donaldson, J. G. (2003). "Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides." Mol Biol Cell **14**(2): 417-431.
- Nguyen, D. H., Tangvoranuntakul, P. and Varki, A. (2005). "Effects of natural human antibodies against a nonhuman sialic acid that metabolically incorporates into activated and malignant immune cells." J Immunol **175**(1): 228-236.
- Nojiri, H., Takaku, F., Terui, Y., Miura, Y. and Saito, M. (1986). "Ganglioside GM3: an acidic membrane component that increases during macrophage-like cell differentiation can induce monocytic differentiation of human myeloid and monocytoid leukemic cell lines HL-60 and U937." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(3): 782-786.
- Nores, G. A. and Caputto, R. (1984). "Inhibition of the UDP-N-acetylgalactosamine: GM3, N-acetylgalactosaminyl transferase by gangliosides." J Neurochem **42**(5): 1205-1211.
- Nores, G. A., Dohi, T., Taniguchi, M. and Hakomori, S. (1987). "Density-dependent recognition of cell surface GM3 by a certain anti-melanoma antibody, and GM3 lactone as a possible immunogen: requirements for tumor-associated antigen and immunogen." J Immunol **139**(9): 3171-3176.
- Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Miyata, M., Hamamura, K. and Furukawa, K. (2008). "Essential roles of integrin-mediated signaling for the enhancement of malignant properties of melanomas based on the expression of GD3." Biochem Biophys Res Commun **373**(1): 14-19.
- Ohkawa, Y., Momota, H., Kato, A., Hashimoto, N., Tsuda, Y., Kotani, N., Honke, K., Suzumura, A., Furukawa, K., Ohmi, Y., Natsume, A. and Wakabayashi, T. (2015). "Ganglioside GD3 Enhances Invasiveness of Gliomas by Forming a Complex with Platelet-derived Growth Factor Receptor alpha and Yes Kinase." J Biol Chem **290**(26): 16043-16058.
- Oka, O. B. and Bulleid, N. J. (2013). "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum." Biochim Biophys Acta **1833**(11): 2425-2429.
- Okada, M., Itoh, M., Haraguchi, M., Okajima, T., Inoue, M., Oishi, H., Matsuda, Y., Iwamoto, T., Kawano, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Furukawa, K. and Aizawa, S. (2002). "b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve." J Biol Chem **277**(3): 1633-1636.
- Olshefski, R. and Ladisch, S. (1996). "Intercellular transfer of shed tumor cell gangliosides." FEBS Lett **386**(1): 11-14.

- Onishi, K., Shafer, B., Lo, C., Tissir, F., Goffinet, A. M. and Zou, Y. (2013). "Antagonistic functions of Dishevelleds regulate Frizzled3 endocytosis via filopodia tips in Wnt-mediated growth cone guidance." J Neurosci **33**(49): 19071-19085.
- Ostergaard, H., Tachibana, C. and Winther, J. R. (2004). "Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol." J Cell Biol **166**(3): 337-345.
- Palestini, P., Pitto, M., Sonnino, S., Omodeo-Sale, M. F. and Masserini, M. (1995). "Spontaneous transfer of GM3 ganglioside between vesicles." Chem Phys Lipids **77**(2): 253-260.
- Pandey, J. P. and Vedeler, C. A. (2003). "Immunoglobulin KM genes in Guillain-Barre syndrome." Neurogenetics **4**(3): 147-149.
- Panzetta, P., Chiarenza, A. P. and Maccioni, H. J. (1983). "Axonal transport of gangliosides in the visual system of the developing chick embryo." Int J Dev Neurosci **1**(2): 149-153.
- Panzetta, P., Gravotta, D. and Maccioni, H. J. (1987). "Biosynthesis and expression of gangliosides during differentiation of chick embryo retina cells in vitro." J Neurochem **49**(6): 1763-1771.
- Panzetta, P., Maccioni, H. J. and Caputto, R. (1980). "Synthesis of retinal gangliosides during chick embryonic development." J Neurochem **35**(1): 100-108.
- Paquet, M. E., Leach, M. R. and Williams, D. B. (2005). "In vitro and in vivo assays to assess the functions of calnexin and calreticulin in ER protein folding and quality control." Methods **35**(4): 338-347.
- Parodi, A. J. and Leloir, L. F. (1979). "The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eucaryotic cell." Biochim Biophys Acta **559**(1): 1-37.
- Patel, R. Y. and Balaji, P. V. (2006). "Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases." Glycobiology **16**(2): 108-116.
- Paulson, J. C. and Colley, K. J. (1989). "Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation." J Biol Chem **264**(30): 17615-17618.
- Platt, F. M. (2014). "Sphingolipid lysosomal storage disorders." Nature **510**(7503): 68-75.
- Ploessl, C., Pan, A., Maples, K. T. and Lowe, D. K. (2016). "Dinutuximab: An Anti-GD2 Monoclonal Antibody for High-Risk Neuroblastoma." Ann Pharmacother **50**(5): 416-422.
- Porat-Shliom, N., Kloog, Y. and Donaldson, J. G. (2008). "A unique platform for H-Ras signaling involving clathrin-independent endocytosis." Mol Biol Cell **19**(3): 765-775.
- Punnonen, E. L., Ryhanen, K. and Marjomaki, V. S. (1998). "At reduced temperature, endocytic membrane traffic is blocked in multivesicular carrier endosomes in rat cardiac myocytes." Eur J Cell Biol **75**(4): 344-352.
- Quiroga, R., Trenchi, A., Gonzalez Montoro, A., Valdez Taubas, J. and Maccioni, H. J. (2013). "Short transmembrane domains with high-volume exoplasmic halves determine retention of Type II membrane proteins in the Golgi complex." J Cell Sci **126**(Pt 23): 5344-5349.
- Raimondi, L. P., Daniotti, J. L. and Maccioni, H. J. (2004). "ETS-1 transcription factor activates the expression of mouse UDP-Gal:GA2/GM2/GD2/GT2 galactosyltransferase gene." FEBS Lett **576**(3): 487-491.

- Ravindranath, M. H. and Morton, D. L. (1991). "Role of gangliosides in active immunotherapy with melanoma vaccine." Int Rev Immunol **7**(4): 303-329.
- Ravindranath, M. H., Tsuchida, T., Morton, D. L. and Irie, R. F. (1991). "Ganglioside GM3:GD3 ratio as an index for the management of melanoma." Cancer **67**(12): 3029-3035.
- Regina Todeschini, A. and Hakomori, S. I. (2008). "Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains." Biochim Biophys Acta **1780**(3): 421-433.
- Rodriguez-Walker, M., Vilcaes, A. A., Garbarino-Pico, E. and Daniotti, J. L. (2015). "Role of plasma-membrane-bound sialidase NEU3 in clathrin-mediated endocytosis." Biochem J **470**(1): 131-144.
- Romisch, K. (2005). "Endoplasmic reticulum-associated degradation." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 435-456.
- Ropper, A. H. (1992). "The Guillain-Barre syndrome." N Engl J Med **326**(17): 1130-1136.
- Rosenberg, A., Sauer, A., Noble, E. P., Gross, H. J., Chang, R. and Brossmer, R. (1992). "Developmental patterns of ganglioside sialosylation coincident with neuritogenesis in cultured embryonic chick brain neurons." J Biol Chem **267**(15): 10607-10612.
- Rosner, H. (1982). "Ganglioside changes in the chicken optic lobes as biochemical indicators of brain development and maturation." Brain Res **236**(1): 49-61.
- Ruggiero, F. M., Vilcaes, A. A., Iglesias-Bartolome, R. and Daniotti, J. L. (2015). "Critical role of evolutionarily conserved glycosylation at Asn211 in the intracellular trafficking and activity of sialyltransferase ST3Gal-II." Biochem J **469**(1): 83-95.
- Russo, D., Parashuraman, S. and D'Angelo, G. (2016). "Glycosphingolipid-Protein Interaction in Signal Transduction." Int J Mol Sci **17**(10).
- Samraj, A. N., Laubli, H., Varki, N. and Varki, A. (2014). "Involvement of a non-human sialic Acid in human cancer." Front Oncol **4**: 33.
- Sandhoff, K. and Harzer, K. (2013). "Gangliosides and gangliosidoses: principles of molecular and metabolic pathogenesis." J Neurosci **33**(25): 10195-10208.
- Sandhoff, K. and Kolter, T. (2003). "Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1433): 847-861.
- Saqr, H. E., Pearl, D. K. and Yates, A. J. (1993). "A review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes." J Neurochem **61**(2): 395-411.
- Schauer, R. (2004). "Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man." Zoology (Jena) **107**(1): 49-64.
- Schengrund, C. L. (1990). "The role(s) of gangliosides in neural differentiation and repair: a perspective." Brain Res Bull **24**(1): 131-141.
- Schnaar, R. L., Fromholt, S. E., Gong, Y., Vyas, A. A., Laroy, W., Wayman, D. M., Heffer-Lauc, M., Ito, H., Ishida, H., Kiso, M., Griffin, J. W. and Shiekh, K. A. (2002). "Immunoglobulin G-class mouse monoclonal antibodies to major brain gangliosides." Anal Biochem **302**(2): 276-284.

- Schnaar, R. L. and Lopez, P. H. (2009). "Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors." J Neurosci Res **87**(15): 3267-3276.
- Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K. J., Cole, N., Moreira, J. E., Terasaki, M., Siggia, E. and Lippincott-Schwartz, J. (1997). "Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells." J Cell Biol **139**(5): 1137-1155.
- Senn, H. J., Orth, M., Fitzke, E., Wieland, H. and Gerok, W. (1989). "Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins." Eur J Biochem **181**(3): 657-662.
- Serb, A., Schiopu, C., Flangea, C., Vukelic, Z., Sisu, E., Zagrean, L. and Zamfir, A. D. (2009). "High-throughput analysis of gangliosides in defined regions of fetal brain by fully automated chip-based nanoelectrospray ionization multi-stage mass spectrometry." Eur J Mass Spectrom (Chichester) **15**(4): 541-553.
- Shaw, L. and Schauer, R. (1988). "The biosynthesis of N-glycolylneuraminic acid occurs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid." Biol Chem Hoppe Seyler **369**(6): 477-486.
- Sheikh, K. A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T. O., Proia, R. L., Griffin, J. W. and Schnaar, R. L. (1999). "Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7532-7537.
- Sheikh, K. A., Zhang, G., Gong, Y., Schnaar, R. L. and Griffin, J. W. (2004). "An anti-ganglioside antibody-secreting hybridoma induces neuropathy in mice." Ann Neurol **56**(2): 228-239.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000). "Lipid rafts and signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 31-39.
- Simpson, M. A., Cross, H., Proukakis, C., Priestman, D. A., Neville, D. C., Reinkensmeier, G., Wang, H., Wiznitzer, M., Gurtz, K., Verganelaki, A., Pryde, A., Patton, M. A., Dwek, R. A., Butters, T. D., Platt, F. M. and Crosby, A. H. (2004). "Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase." Nat Genet **36**(11): 1225-1229.
- Singh, P., Paila, Y. D. and Chattopadhyay, A. (2012). "Role of glycosphingolipids in the function of human serotonin(1)A receptors." J Neurochem **123**(5): 716-724.
- Slovin, S. F., Keding, S. J. and Ragupathi, G. (2005). "Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer." Immunol Cell Biol **83**(4): 418-428.
- Sobue, G., Taki, T., Yasuda, T. and Mitsuma, T. (1988). "Gangliosides modulate Schwann cell proliferation and morphology." Brain Res **474**(2): 287-295.
- Sonnino, S., Aureli, M., Loberto, N., Chigorno, V. and Prinetti, A. (2010). "Fine tuning of cell functions through remodeling of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycohydrolases." FEBS Lett **584**(9): 1914-1922.
- Spessott, W., Crespo, P. M., Daniotti, J. L. and Maccioni, H. J. (2012). "Glycosyltransferase complexes improve glycolipid synthesis." FEBS Lett **586**(16): 2346-2350.
- Sprong, H., Degroote, S., Nilsson, T., Kawakita, M., Ishida, N., van der Sluijs, P. and van Meer, G. (2003). "Association of the Golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell **14**(8): 3482-3493.

- Srinivas, L. and Colburn, N. H. (1982). "Ganglioside changes induced by tumor promoters in promotable JB6 mouse epidermal cells: antagonism by an antipromoter." *J Natl Cancer Inst* **68**(3): 469-473.
- Stallcup, W. B., Pytela, R. and Ruoslahti, E. (1989). "A neuroectoderm-associated ganglioside participates in fibronectin receptor-mediated adhesion of germinal cells to fibronectin." *Dev Biol* **132**(1): 212-229.
- Stanley, P. S., H. Taniguchi, N. (2009). N-Glycans. *Essentials of Glycobiology*. C. R. Varki A, Esko JD, et al., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sturgill, E. R., Aoki, K., Lopez, P. H., Colacurcio, D., Vajn, K., Lorenzini, I., Majic, S., Yang, W. H., Heffer, M., Tiemeyer, M., Marth, J. D. and Schnaar, R. L. (2012). "Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b." *Glycobiology* **22**(10): 1289-1301.
- Suh, K., Bergmann, J. E. and Gabel, C. A. (1989). "Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins." *J Cell Biol* **108**(3): 811-819.
- Susuki, K., Rasband, M. N., Tohyama, K., Koibuchi, K., Okamoto, S., Funakoshi, K., Hirata, K., Baba, H. and Yuki, N. (2007). "Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers." *J Neurosci* **27**(15): 3956-3967.
- Susuki, K., Yuki, N., Schafer, D. P., Hirata, K., Zhang, G., Funakoshi, K. and Rasband, M. N. (2012). "Dysfunction of nodes of Ranvier: a mechanism for anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies." *Exp Neurol* **233**(1): 534-542.
- Suzuki, Y., Yanagisawa, M., Ariga, T. and Yu, R. K. (2011). "Histone acetylation-mediated glycosyltransferase gene regulation in mouse brain during development." *J Neurochem* **116**(5): 874-880.
- Svennerholm, L. (1963). "Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides." *J Neurochem* **10**: 613-623.
- Svennerholm, L. (1980). "Ganglioside designation." *Adv Exp Med Biol* **125**: 11.
- Svennerholm, L. (1994). "Designation and schematic structure of gangliosides and allied glycosphingolipids." *Prog Brain Res* **101**: XI-XIV.
- Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H. and Aizawa, S. (1996). "Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10662-10667.
- Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Zhao, J., Fukumoto, S., Yamashiro, S., Okada, M., Haraguchi, M., Shin, M., Kishikawa, M., Shiku, H. and Aizawa, S. (1998). "Complex gangliosides are essential in spermatogenesis of mice: possible roles in the transport of testosterone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12147-12152.
- Takashima, S., Kono, M., Kurosawa, N., Yoshida, Y., Tachida, Y., Inoue, M., Kanematsu, T. and Tsuji, S. (2000). "Genomic organization and transcriptional regulation of the mouse GD3 synthase gene (ST8Sia I): comparison of genomic organization of the mouse sialyltransferase genes." *J Biochem* **128**(6): 1033-1043.
- Takizawa, M., Nomura, T., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Hattori, M. and Matsuo, N. (1999). "cDNA cloning and expression of human lactosylceramide synthase." *Biochim Biophys Acta* **1438**(2): 301-304.

- Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A. and Muchmore, E. (2003). "Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid." Proc Natl Acad Sci USA **100**(21): 12045-12050.
- Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M. (2002). Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes. Japan, Springer. ISBN: 978-4-431-67996-7.
- Tarentino, A. L., Gomez, C. M. and Plummer, T. H., Jr. (1985). "Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F." Biochemistry **24**(17): 4665-4671.
- Taube, S., Jiang, M. and Wobus, C. E. (2010). "Glycosphingolipids as receptors for non-enveloped viruses." Viruses **2**(4): 1011-1049.
- Tencomnao, T., Yu, R. K. and Kapitonov, D. (2001). "Characterization of the human UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase gene promoter." Biochim Biophys Acta **1517**(3): 416-423.
- Tettamanti, G. (2004). "Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts." Glycoconj J **20**(5): 301-317.
- The Italian Guillain-Barre Study Group (1996). "The prognosis and main prognostic indicators of Guillain-Barre syndrome. A multicentre prospective study of 297 patients. The Italian Guillain-Barre Study Group." Brain **119 (Pt 6)**: 2053-2061.
- Thierfelder, S., Pini, S., Harrison, F. and Wiegandt, H. (1992). "Immunohistochemical localisation of monoclonal antibody R 24-recognized ganglioside Glac2 in early chick embryos." Differentiation **49**(1): 7-15.
- Toki, D., Sarkar, M., Yip, B., Reck, F., Joziase, D., Fukuda, M., Schachter, H. and Brockhausen, I. (1997). "Expression of stable human O-glycan core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase in Sf9 insect cells." Biochem J **325 (Pt 1)**: 63-69.
- Tokuda, N., Zhang, Q., Yoshida, S., Kusunoki, S., Urano, T. and Furukawa, K. (2006). "Genetic mechanisms for the synthesis of fucosyl GM1 in small cell lung cancer cell lines." Glycobiology **16**(10): 916-925.
- Torbidoni, A. V., Scursoni, A., Camarero, S., Segatori, V., Gabri, M., Alonso, D., Chantada, G. and Davila, M. T. (2015). "Immunoreactivity of the 14F7 Mab raised against N-Glycolyl GM3 Ganglioside in retinoblastoma tumours." Acta Ophthalmol **93**(4): e294-300.
- Torii, T., Miyamoto, Y., Nakamura, K., Maeda, M., Yamauchi, J. and Tanoue, A. (2012). "Arf6 guanine-nucleotide exchange factor, cytohesin-2, interacts with actinin-1 to regulate neurite extension." Cell Signal **24**(9): 1872-1882.
- Torres Demichelis, V., Vilcaes, A. A., Iglesias-Bartolome, R., Ruggiero, F. M. and Daniotti, J. L. (2013). "Targeted delivery of immunotoxin by antibody to ganglioside GD3: a novel drug delivery route for tumor cells." PLoS One **8**(1): e55304.
- Tretter, V., Altmann, F. and Marz, L. (1991). "Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1----3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue." Eur J Biochem **199**(3): 647-652.
- Trombetta, E. S. and Helenius, A. (2000). "Conformational requirements for glycoprotein reglucosylation in the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **148**(6): 1123-1129.

- Trombetta, E. S. and Parodi, A. J. (2005). "Glycoprotein reglucosylation." *Methods* **35**(4): 328-337.
- Tsai, Y. T. and Yu, R. K. (2014). "Epigenetic activation of mouse ganglioside synthase genes: implications for neurogenesis." *J Neurochem* **128**(1): 101-110.
- Uemura, S., Kurose, T., Suzuki, T., Yoshida, S., Ito, M., Saito, M., Horiuchi, M., Inagaki, F., Igarashi, Y. and Inokuchi, J. (2006). "Substitution of the N-glycan function in glycosyltransferases by specific amino acids: ST3Gal-V as a model enzyme." *Glycobiology* **16**(3): 258-270.
- Uncini, A. (2016). "Guillain-Barre syndrome: What have we learnt during one century? A personal historical perspective." *Rev Neurol (Paris)* **172**(10): 632-644.
- Uncini, A., Shahrizaila, N. and Kuwabara, S. (2016). "Zika virus infection and Guillain-Barre syndrome: a review focused on clinical and electrophysiological subtypes." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- van Cruijssen, H., Ruiz, M. G., van der Valk, P., de Gruijl, T. D. and Giaccone, G. (2009). "Tissue micro array analysis of ganglioside N-glycolyl GM3 expression and signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 activation in relation to dendritic cell infiltration and microvessel density in non-small cell lung cancer." *BMC Cancer* **9**: 180.
- van der Blik, A. M., Redelmeier, T. E., Damke, H., Tisdale, E. J., Meyerowitz, E. M. and Schmid, S. L. (1993). "Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation." *J Cell Biol* **122**(3): 553-563.
- van der Pol, W. L., van den Berg, L. H., Scheepers, R. H., van der Bom, J. G., van Doorn, P. A., van Koningsveld, R., van den Broek, M. C., Wokke, J. H. and van de Winkel, J. G. (2000). "IgG receptor IIa alleles determine susceptibility and severity of Guillain-Barre syndrome." *Neurology* **54**(8): 1661-1665.
- Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." *Glycobiology* **3**(2): 97-130.
- Varnai, P. and Balla, T. (1998). "Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3H]inositol-labeled phosphoinositide pools." *J Cell Biol* **143**(2): 501-510.
- Vazquez, A. M., Perez, A., Hernandez, A. M., Macias, A., Alfonso, M., Bombino, G. and Perez, R. (1998). "Syngeneic anti-idiotypic monoclonal antibodies to an anti-NeuGc-containing ganglioside monoclonal antibody." *Hybridoma* **17**(6): 527-534.
- Vilcaes, A. A., Demichelis, V. T. and Daniotti, J. L. (2011). "Trans-activity of plasma membrane-associated ganglioside sialyltransferase in mammalian cells." *J Biol Chem* **286**(36): 31437-31446.
- Wang, H., Bright, A., Xin, B., Bockoven, J. R. and Paller, A. S. (2013). "Cutaneous dyspigmentation in patients with ganglioside GM3 synthase deficiency." *Am J Med Genet A* **161A**(4): 875-879.
- Ware, F. E., Vassilakos, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R., Lehrman, M. A. and Williams, D. B. (1995). "The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins." *J Biol Chem* **270**(9): 4697-4704.
- Weis, F. M. and Davis, R. J. (1990). "Regulation of epidermal growth factor receptor signal transduction. Role of gangliosides." *J Biol Chem* **265**(20): 12059-12066.

- Weishaupt, N., Caughlin, S., Yeung, K. K. and Whitehead, S. N. (2015). "Differential Anatomical Expression of Ganglioside GM1 Species Containing d18:1 or d20:1 Sphingosine Detected by MALDI Imaging Mass Spectrometry in Mature Rat Brain." Front Neuroanat **9**: 155.
- Willison, H. J. and Yuki, N. (2002). "Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies." Brain **125**(Pt 12): 2591-2625.
- Wondimu, A., Liu, Y., Su, Y., Bobb, D., Ma, J. S., Chakrabarti, L., Radoja, S. and Ladisch, S. (2014). "Gangliosides drive the tumor infiltration and function of myeloid-derived suppressor cells." Cancer Res **74**(19): 5449-5457.
- Wu, G., Lu, Z. H. and Ledeen, R. W. (1995). "Induced and spontaneous neuritogenesis are associated with enhanced expression of ganglioside GM1 in the nuclear membrane." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 3739-3746.
- Wu, G., Xie, X., Lu, Z. H. and Ledeen, R. W. (2001). "Cerebellar neurons lacking complex gangliosides degenerate in the presence of depolarizing levels of potassium." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 307-312.
- Xia, T., Gao, L., Yu, R. K. and Zeng, G. (2003). "Characterization of the promoter and the transcription factors for the mouse UDP-Gal:betaGlcNAc beta1,3-galactosyltransferase gene." Gene **309**(2): 117-123.
- Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J. L., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K. and Proia, R. L. (2003). "Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3445-3449.
- Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K. and Proia, R. L. (1999). "A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9142-9147.
- Yamashita, T., Wu, Y. P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J. M., Dupree, J. L., Geyer, R., Sandhoff, K. and Proia, R. L. (2005). "Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2725-2730.
- Yin, J., Hashimoto, A., Izawa, M., Miyazaki, K., Chen, G. Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Furuhashi, K., Cheng, F. L., Lin, C. H., Sato, C., Kitajima, K. and Kannagi, R. (2006). "Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells." Cancer Res **66**(6): 2937-2945.
- Yin, J., Miyazaki, K., Shaner, R. L., Merrill, A. H., Jr. and Kannagi, R. (2010). "Altered sphingolipid metabolism induced by tumor hypoxia - new vistas in glycolipid tumor markers." FEBS Lett **584**(9): 1872-1878.
- Young, W. W., Jr., Lutz, M. S. and Blackburn, W. A. (1992). "Endogenous glycosphingolipids move to the cell surface at a rate consistent with bulk flow estimates." J Biol Chem **267**(17): 12011-12015.
- Yu, R. K. (1994). "Development regulation of ganglioside metabolism." Prog Brain Res **101**: 31-44.
- Yu, R. K. and Bieberich, E. (2001). "Regulation of glycosyltransferases in ganglioside biosynthesis by phosphorylation and dephosphorylation." Mol Cell Endocrinol **177**(1-2): 19-24.
- Yu, R. K., Bieberich, E., Xia, T. and Zeng, G. (2004). "Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system." J Lipid Res **45**(5): 783-793.

- Yu, R. K., Macala, L. J., Taki, T., Weinfield, H. M. and Yu, F. S. (1988). "Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain." J Neurochem **50**(6): 1825-1829.
- Yu, R. K., Nakatani, Y. and Yanagisawa, M. (2009). "The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain." J Lipid Res **50 Suppl**: S440-445.
- Yu, R. K., Yanagisawa, M. and Ariga, T. (2007). Glycosphingolipid Structures. Comprehensive Glycoscience. **1**.
- Yuki, N., Sato, S., Miyatake, T., Sugiyama, K., Katagiri, T. and Sasaki, H. (1991). "Motoneuron-disease-like disorder after ganglioside therapy." Lancet **337**(8749): 1109-1110.
- Yuki, N., Susuki, K., Koga, M., Nishimoto, Y., Odaka, M., Hirata, K., Taguchi, K., Miyatake, T., Furukawa, K., Kobata, T. and Yamada, M. (2004). "Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(31): 11404-11409.
- Yuki, N., Taki, T., Inagaki, F., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Handa, S. and Miyatake, T. (1993). "A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure." J Exp Med **178**(5): 1771-1775.
- Yusuf, H. K., Schwarzmann, G., Pohlentz, G. and Sandhoff, K. (1987). "Oligosialogangliosides inhibit GM2- and GD3-synthesis in isolated Golgi vesicles from rat liver." Biol Chem Hoppe Seyler **368**(5): 455-462.
- Zeng, G., Ariga, T., Gu, X. B. and Yu, R. K. (1995). "Regulation of glycolipid synthesis in HL-60 cells by antisense oligodeoxynucleotides to glycosyltransferase sequences: effect on cellular differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8670-8674.
- Zeng, G., Gao, L., Xia, T., Tencomnao, T. and Yu, R. K. (2003). "Characterization of the 5'-flanking fragment of the human GM3-synthase gene." Biochim Biophys Acta **1625**(1): 30-35.
- Zeng, G., Gao, L. and Yu, R. K. (1998). "Isolation and functional analysis of the promoter of the rat CMP-NeuAc:GM3 alpha2,8 sialyltransferase gene 1." Biochim Biophys Acta **1397**(2): 126-130.
- Zeng, G. and Yu, R. K. (2008). "Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides." Curr Drug Targets **9**(4): 317-324.
- Zhang, S., Cordon-Cardo, C., Zhang, H. S., Reuter, V. E., Adluri, S., Hamilton, W. B., Lloyd, K. O. and Livingston, P. O. (1997). "Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides." Int J Cancer **73**(1): 42-49.
- Zhao, J., Furukawa, K., Fukumoto, S., Okada, M., Furugen, R., Miyazaki, H., Takamiya, K., Aizawa, S., Shiku, H. and Matsuyama, T. (1999). "Attenuation of interleukin 2 signal in the spleen cells of complex ganglioside-lacking mice." J Biol Chem **274**(20): 13744-13747.
- Zhong, Y., Wu, Y., Li, C., Tang, J., Wang, X., Ren, G., Carr, A., Perez, R. and Guo, W. (2012). "N-Glycolyl GM3 ganglioside immunoexpression in oral mucosal melanomas of Chinese." Oral Dis **18**(8): 741-747.
- Ziulkoski, A. L., Andrade, C. M., Crespo, P. M., Sisti, E., Trindade, V. M., Daniotti, J. L., Guma, F. C. and Borojevic, R. (2006). "Gangliosides of myelosupportive stroma cells are transferred to myeloid progenitors and are required for their survival and proliferation." Biochem J **394**(Pt 1): 1-9.