

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Caracterización de la bioactividad y el potencial inmunomodulador de respuestas de células iNKT de ligandos derivados de α -Galactosilceramida en un modelo de ratón parcialmente humanizado

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Farmacología por:**

Carolina Elisa Schäfer Adriazola

Directores de Tesis: Dr. Flavio Salazar – Dr. Leandro Carreño

Santiago de Chile

Abril 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Carolina Elisa Schäfer Adriazola

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctorado en Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Flavio Salazar

Co-director de Tesis:

Dr. Leandro Carreño

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Mario Herrera-Marschitz

Dra. Caroll Beltrán

Dr. Marcelo Ezquer

Dr. Álvaro Lladser

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han brindado su apoyo y ayuda en la realización de esta tesis. En primer lugar, agradezco a los profesores que me brindaron su valiosa orientación y guía durante mi carrera académica. A mi profesor tutor, el Dr. Leandro Carreño, por su gran apoyo y consejo de principio a fin. Al Dr. Flavio Salazar, ya que su apoyo permitió la realización de este proyecto. También quisiera agradecer a la comisión evaluadora por su valiosa guía y contribución a este trabajo.

Quisiera agradecer a aquellas académicas que voluntariamente me ofrecieron su guía y apoyo, Dra. Carolina Ribeiro y Dra. María Carmen Molina, a quienes admiro profundamente. Sus comentarios y sugerencias me permitieron avanzar significativamente en mi investigación. A todos los académicos y funcionarios del Programa de Inmunología que me apoyaron durante mi estadía en mi primer hogar académico. A la Dra. Katherine Marcelain, Jessica Toro, Dr. Gerald Zapata y Douglas Mattheis, cuya colaboración fue imprescindible para la compleción de este trabajo. A la Dra. Ana María Sandino y el Dr. Felipe Reyes, ya que gracias a su consideración y confianza pude trabajar mientras terminaba este proyecto.

Asimismo, quiero agradecer a mis compañeras y compañeros en este camino académico. Agradezco a Álvaro, Pablo y Richard, por su cariño, apoyo y camaradería, que ha trascendido los límites del laboratorio. A David por sus consejos tanto académicos como de vida. A mis amigas y amigos del programa de doctorado, Karen, Fabi, Sara, Jenaro y Aníbal, por su apoyo inquebrantable de principio a fin. También quiero reconocer a todas las compañeras y compañeros que pasaron por el Programa de Inmunología, en especial a Perry y Mari. A todos los quiero y los admiro mucho, y su presencia hizo esta travesía infinitamente más llevadera.

Quiero agradecer especialmente a mi familia, quienes han sido un apoyo incondicional a lo largo de mi vida y trayectoria académica. En especial, agradezco a mis padres, Carlos y Pamela, por su amor, comprensión y dedicación para acompañarme en los momentos más difíciles de este proceso. A mis queridos hermanos, Paulina y Martín, por brindarme su cariño, apoyo y ánimo en todo momento. A mi abuela Elisa, prima Titi, tía Claudia y a todos los Schafer y Adriazola. Su presencia ha sido fundamental para superar los momentos difíciles y perseverar. También, quiero agradecer a todas las personas que me han brindado un apoyo significativo en este período, ya sea con su consejo o compañía. A mis amigos de la vida, Gonza, Fefi, Nicole, Ivi, Clau, Cristi, Fran, quienes me han brindado su amistad, cariño y apoyo de innumerables maneras.

Finalmente, agradecer a mi compañero de vida, Claudio, a quien admiro profundamente y que con su amor, compañía y dedicación me ha apoyado infinitamente.

Y también a mí misma, por mi resiliencia y perseverancia. Me siento agradecida del aprendizaje que en muchos sentidos me dejó este proceso. Por la confianza renovada con la que finalizo esta etapa y enfrento las siguientes.

Financiamiento

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento de los proyectos FONDECYT N°1160336 y FONDECYT N°1211959 a cargo del Investigador Principal Dr. Leandro Carreño, del Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia IMII P09/016-F y finalmente, de la Beca de Doctorado Nacional ANID N°21171172.

El presente proyecto de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunomodulación, Programa Disciplinario de Inmunología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El trabajo fue realizado bajo la tutela del Dr. Leandro Carreño y del Dr. Flavio Salazar.

Presentaciones en Congresos

Carolina Schäfer, Valentina Carrillo, Daniela Schneider, Romina Falcón, Leandro J. Carreño. **“iNKT cell stimulation by glycolipid ligands modified from α -galactosylceramide results in differential cytokine secretion profiles”**. Exposición de panel en la XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. Puerto Varas, Chile. Octubre 2018.

Carolina Schäfer, Leandro Carreño. **“iNKT cell stimulation by glycolipid ligands modified from α -galactosylceramide results in differential cytokine secretion profiles”**. Comunicación oral corta y panel en el II Simposio de la Asociación Chilena de Inmunología (ASOCHIN) enmarcado en el XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018. Santiago, Chile. Noviembre 2018.

Carolina Schäfer, Álvaro Santibáñez, Matías Gutiérrez-González, Jessica Toro, Katherine Marcelain, Amy R. Howell, Steven A. Porcelli, Leandro J. Carreño. **“iNKT cell stimulation by glycolipid ligands modified from α -galactosylceramide results in differential interleukin-2 secretion profiles”**. Exposición de panel en la American Association of Immunologist Annual Meeting Immunology 2019. San Diego, CA, Estados Unidos. Mayo 2019.

Carolina Schäfer, Álvaro Santibáñez, Cristián Gutiérrez, Pablo Palacios, Fabián Urtubia, Jessica Toro, Katherine Marcelain, Amy R. Howell, Steven A. Porcelli, Leandro J. Carreño. **“Next Generation Sequencing of iNKT cell TCR repertoire identifies diverse clonotypes expanded following α -GalCer-derived ligands inoculation in partially humanized mice”**. Exposición de panel en la III Reunión Anual ASOCHIN 2020. Congreso online. Noviembre 2020.

Carolina Schäfer, Álvaro Santibáñez, Cristián Gutiérrez, Pablo Palacios, Fabián Urtubia, Jessica Toro, Katherine Marcelain, Amy R. Howell, Steven A. Porcelli, Leandro J. Carreño. **“Next Generation Sequencing of iNKT cell TCR repertoire identifies diverse clonotypes expanded following α -GalCer-derived ligands inoculation in partially humanized mice”**. Exposición de panel en el I Congreso de Estudiantes de Posgrado Campus Dra. Eloísa Díaz de la Universidad de Chile. Congreso online. Diciembre 2020.

Carolina Schäfer, Álvaro Santibáñez, Cristián Gutiérrez, Pablo Palacios, Daniela Schneider, Richard García, Amy R. Howell, Steven A. Porcelli, Leandro J. Carreño. **“Characterization of the iNKT cell response following stimulation with α -GalCer-derived C6”-modified ligands in partially humanized mice.”** Exposición de panel en la IV Annual Meeting de la Sociedad Chilena de Inmunología (ASOCHIN). Santiago, Chile. Noviembre 2021.

Carolina Schäfer, Álvaro Santibáñez, Cristián Gutiérrez, Pablo Palacios, Richard García, Douglas J. Matthies, Gerald Zapata-Torres, Amy R. Howell, Steven A. Porcelli, Leandro J. Carreño. **“Structural analysis of iNKT cell stimulation by α -GalCer-derived C6”-modified ligands in partially humanized mice”**. Exposición de panel en la V Annual Meeting de la Sociedad Chilena de Inmunología (ASOCHIN). Santiago, Chile. Noviembre 2022.

Publicaciones

Producto de la Tesis

Artículo de Revisión: “Innate immune cells for immunotherapy of autoimmune and cancer disorders”.

Carolina Schäfer, Gabriel Ascui, Carolina H. Ribeiro, Mercedes Lopez, Rafael Prados-Rosales, Pablo A. González, Susan M. Bueno, Claudia A. Riedel, Andrés Baena, Alexis M. Kalergis & Leandro J. Carreño. *International Reviews of Immunology*. 2017; 36(6):315-37. DOI:10.1080/08830185.2017.1365145.

Artículo de Revisión: “Innate immune cells as key players for melanoma immunotherapy”.

Carolina Schäfer, David Montero, Leandro J. Carreño. *Manuscrito en preparación*.

Artículo Original: “Structural characterization of iNKT cell stimulation by α -GalCer-derived C6"-modified ligands in partially humanized mice”.

Carolina Schäfer, Álvaro Santibáñez, Cristián Gutiérrez, Pablo Palacios, Richard García, Jessica Toro, Katherine Marcelain, Douglas J. Matthies, Gerald Zapata-Torres, Amy R. Howell, Steven A. Porcelli, Leandro J. Carreño. *Manuscrito en preparación*.

Otras Publicaciones

Artículo Original: “Amide-linked C4"-saccharide modification of KRN7000 provides potent stimulation of human invariant NKT cells and anti-tumor immunity in a humanized mouse model”.

Noemi Saavedra-Avila, Santosh Keshipeddy, Matthew J. Guberman-Pfeffer, Ayax Pérez-Gallegos, Neeraj K. Saini, Carolina Schäfer, Leandro J. Carreño, José A Gascón, Steven A. Porcelli and Amy R. Howell. *ACS Chem. Biol.* 2020; (15)12: 3176–3186. DOI: 10.1021/acscchembio.0c00707.

Artículo Original: “Decreased invariant natural killer T-cell-mediated antitumor immune response in patients with gastric cancer”.

Gabriel Ascui, Felipe Gálvez-Jirón, Karina Kramm, Carolina Schäfer, Josefina Siña, Víctor Pola, Francisca Cristi, Carolina Hernández, Macarena Garrido-Tapia, Bárbara Pesce, Marco Bustamante, Paula Fluxá, María C Molina, Carolina H Ribeiro. *Immunology & Cell Biology*. 2020; (98)6:500-513. DOI: 10.1111/imcb.12331.

Indice

| | |
|--|-----------|
| Agradecimientos..... | i |
| Financiamiento..... | ii |
| Presentaciones en Congresos..... | iii |
| Publicaciones..... | iv |
| Abreviaturas..... | vii |
| Resumen..... | ix |
| Abstract..... | x |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Células NKT..... | 2 |
| 1.2. Ligandos de células iNKT..... | 4 |
| 1.3. Desafíos de la inmunoterapia basada en células iNKT..... | 8 |
| 2. Hipótesis..... | 10 |
| 3. Objetivos..... | 11 |
| 3.1. Objetivo general..... | 11 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 11 |
| 4. Materiales y Métodos..... | 12 |
| 4.1. Animales..... | 12 |
| 4.2. Líneas celulares y generación de células dendríticas derivadas de médula ósea..... | 12 |
| 4.3. Reconstitución de glicolípidos para su uso en ensayos in vitro e in vivo..... | 12 |
| 4.4. Activación de células iNKT in vitro..... | 12 |
| 4.5. Activación de células iNKT in vivo..... | 13 |
| 4.6. Citometría de flujo multiparamétrica..... | 13 |
| 4.7. Sorting celular para aislamiento de células iNKT..... | 14 |
| 4.8. Extracción de RNA y preparación de librería TCRα/β..... | 14 |
| 4.9. Modelamiento molecular y métodos computacionales..... | 15 |
| 4.10. Análisis estadístico..... | 15 |

| | | |
|------|---|----|
| 5. | Resultados..... | 16 |
| 5.1. | <i>Poblaciones monoclonales de hibridomas de células iNKT presentan diversos niveles de respuesta frente a la estimulación con el ligando αGalCer</i> | 16 |
| 5.2. | <i>Ligandos derivados de αGalCer con adición de grupo fluorofenilo en la cadena carboxilato evidencian una menor potencia de respuesta en hibridomas de células iNKT.....</i> | 20 |
| 5.3. | <i>Caracterización del perfil de citoquinas inducido por ligandos derivados de αGalCer in vivo. ...</i> | 27 |
| 5.4. | <i>Caracterización de los clonotipos de células iNKT expandidas in vivo luego del tratamiento con αGalCer, AH17-6 y AH17-8</i> | 32 |
| 5.5. | <i>Análisis estructural de las cadenas de TCR α/β e influencia en el reconocimiento de ligandos modificados de αGalCer</i> | 37 |
| 6. | Discusión | 42 |
| 7. | Bibliografía | 48 |

Abreviaturas

| | |
|----------------------------------|---|
| αGalCer | α -Galactosilceramida |
| ACK | Tampón de amonio, cloruro y potasio |
| AP-3 | Proteína adaptadora 3 |
| APC | Células presentadoras de antígenos |
| APC-Cy7 | Alofocianina acoplada a cianina-7 |
| BMDC | Células dendríticas derivadas de médula ósea |
| CAR-NKT | Células NKT con receptor de antígeno quimérico |
| CD | Cluster de diferenciación |
| CDR | Región determinante de complementariedad |
| CXCR6 | Receptor de quimioquinas CXC 6 |
| DC | Células dendríticas |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| dNKT | Células NKT diversas o de tipo II |
| EC50 | Concentración efectiva media |
| ELISA | Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima |
| eLPA | Acido lisofosfatídico |
| FACS | Clasificación de células activadas por fluorescencia |
| FBS | Suero fetal bovino |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FMO | Fluorescencia menos uno |
| GATA3 | Proteína de unión a GATA3 |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos |
| GNPAT | O-aciltransferasa gliceronefosfato |
| hCD1d | CD1d humano |
| KI | <i>Knock in</i> |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IFN-γ | Interferón gamma |
| IL-10 | Interleuquina 10 |
| IL-17 | Interleuquina 17 |
| IL-2 | Interleuquina 2 |

| | |
|--------------------------------|--|
| IL-4 | Interleuquina 4 |
| iNKT | Células NKT invariantes o de tipo I |
| MAIT | Linfocitos T asociados a mucosas |
| mCD1d | CD1d de ratón |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| NGS | Secuenciación de Nueva Generación |
| NK | Células <i>natural killer</i> |
| NKT | Células <i>natural killer</i> T |
| NKT_{FH} | Celulas NKT cooperadoras foliculares |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PE | Ficoeritrina |
| PECy7 | Ficoeritrina cianina 7 |
| PerCP | Complejo peridinina-clorofila-proteína |
| pLPE | Lisofosfatidiletanolamina |
| PLZF | Proteína de la leucemia promielocítica con dedos de zinc |
| PMA | Forbol 12-miristato 13-acetato |
| RORγT | Receptor huérfano gamma relacionado con RAR |
| RPMI | Medio Roswell Park Memorial Institute |
| Tbet | Factor de transcripción T-box de linfocitos T |
| TCR | Receptor de linfocito T |
| Th | Linfocito T colaborador |
| TLR | Receptor de tipo Toll |
| WT | <i>Wild type</i> |

Resumen

Las células NKT invariantes son linfocitos T no convencionales que expresan un receptor de linfocito T semi-invariante capaz de reconocer ligandos glicolipídicos presentados en la molécula de superficie CD1d. El compuesto α -galactosilceramida puede inducir en estas células una respuesta de citoquinas potente pero diversa. Para desarrollar inmunoterapias más focalizadas, se han sintetizado ligandos derivados de α GalCer con modificaciones químicas para inducir respuestas inmunes más específicas. En esta tesis doctoral se investigó la capacidad inmunomoduladora de ligandos derivados de α GalCer con modificaciones específicas en la cadena esfingosina y el grupo galactosil en células iNKT, en ratones parcialmente humanizados. Se planteó que aquellos ligandos que poseen un grupo hidroxilo en el C'4 de la cadena esfingosina y el grupo fenilpropionato en C''6 del grupo galactosil son capaces de inducir una respuesta de tipo Th1 y son preferencialmente reconocidos por células iNKT específicas. El objetivo principal del proyecto fue explorar la relación entre la estructura de los ligandos y su potencial inmunomodulador mediante la inducción de respuestas de tipo Th1, y determinar la capacidad de los ligandos seleccionados para activar subpoblaciones de células iNKT. Se evaluaron los ligandos derivados de α GalCer *in vitro* mediante la estimulación de hibridomas de células iNKT e *in vivo* mediante su inyección en ratones hCD1d knock in. Los resultados demostraron que ligandos tales como AH10-7, AH17-5 y AH17-6 indujeron una respuesta potente de tipo Th1, evidenciada por altos niveles de secreción de IFN- γ detectados en suero y por una alta producción de citoquinas por células iNKT determinada por citometría de flujo. Mediante Secuenciación de Nueva Generación de las células iNKT expandidas luego de la inyección de diferentes ligandos, se demostró que el repertorio de TCR- β es diverso e influenciado por la estructura del ligando. Análisis estructurales revelaron diferencias importantes en el reconocimiento del ligando en contexto de CD1d humano comparado con CD1d de ratón. En conclusión, este trabajo contribuye al conocimiento sobre la capacidad inmunomoduladora de ligandos derivados de α GalCer y su relación con su estructura molecular en células iNKT en ratones parcialmente humanizados. Los resultados encontrados en este trabajo pueden tener importantes implicancias para el desarrollo de futuras aplicaciones en inmuno-farmacología.

Abstract

Invariant natural killer T cells are unconventional T cells that express a semi-invariant α/β TCR with the ability to recognize glycolipid ligands presented by the surface molecule CD1d. α -Galactosylceramide is a ligand that can induce a potent yet diverse cytokine response. To develop more targeted immunotherapies, modified versions of α GalCer have been synthesized to elicit specific immune responses. Thus, the main aim for this thesis project was to evaluate the immunomodulatory capacity of α -GalCer derived ligands with specific modifications in the sphingosine chain and the galactosyl portion, in partially humanized mice. It was proposed that ligands with a hydroxyl group in the C'4 of the sphingosine chain and a phenylpropionate group in C"6 of the galactosyl portion are able to induce a type-Th1 response and are preferentially recognized by specific iNKT cells. Mainly, we proposed to explore the relationship between structure of the ligands and immunomodulatory potential via induction of Th1-like responses and to determine the ability of selected ligands to activate subpopulations of iNKT cells. Briefly, α -GalCer derivatives were evaluated both in vitro via stimulation of iNKT cell hybridomas and in vivo by injection in CD1d knock-in mice. Ligands such as AH10-7, AH17-5 and AH17-6 were found to induce a potent Th1-like response in vivo as evidenced by high IFN- γ secretion levels detected in serum of stimulated animals and high cytokine production by iNKT cells observed by flow cytometry. Analysis of the expanded iNKT cells through Next Generation Sequencing, following injection of different ligands, showed that the TCR- β repertoire is diverse and influenced by ligand structure. Structural analysis also revealed important differences in ligand recognition between human and mouse CD1d. This study contributes to our understanding of the immunomodulatory potential of modified α GalCer derivatives and their correlation with ligand structure on iNKT cells in partially humanized mice. The findings presented here may have implications for the development of future immunopharmacology applications.

1. Introducción

La regulación del sistema inmune para fines terapéuticos ha surgido durante los últimos años como una estrategia viable y prometedora para el tratamiento de desórdenes tales como enfermedades autoinmunes y cáncer. Esto se debe a que, en general, los procedimientos farmacológicos actuales no son curativos y conllevan efectos secundarios indeseados. En consecuencia, se ha vuelto cada vez más importante identificar nuevos blancos terapéuticos celulares y moleculares con la capacidad de modificar el curso de los mecanismos patológicos existentes (Michelle Xu, Pu et al. 2017) (Benson, Brewer et al. 2014). Entre los enfoques más estudiados actualmente se encuentran las inmunoterapias que se dirigen a la modulación de respuestas antígeno específicas. Estas terapias implican el estudio de células del sistema inmune adaptativo, como los linfocitos T CD4 y CD8 convencionales, así como de células presentadoras de antígenos profesionales, como las células dendríticas (DC), que se encuentran en la interfase de la inmunidad innata y adaptativa (Restifo, Dudley et al. 2012).

Recientemente, se ha renovado el interés por el estudio de las células pertenecientes al sistema inmune innato como posibles blancos terapéuticos, debido a su alta plasticidad y habilidad para ejercer una respuesta rápida y potente, y por su capacidad de modular la respuesta inmune adaptativa (Schafer, Asci et al. 2017). Para ello, se han estudiado los blancos moleculares del sistema inmune innato, tales como los receptores de tipo Toll (TLRs) y proteínas del sistema del complemento, así como blancos celulares tales como neutrófilos, monocitos, DC y células *natural killer* (NK), entre otras. Durante las últimas décadas, se han descrito poblaciones de linfocitos T no convencionales que por sus características se han clasificado como células pertenecientes al sistema inmune innato. Entre los más relevantes se encuentran los **linfocitos T invariantes asociados a mucosa (MAIT)**, los **linfocitos T $\gamma\delta$** y las **células citotóxicas naturales (NKT)**, que componen aproximadamente el 5-10% de los linfocitos circulantes (Pellicci, Koay et al. 2020, Singh, Szaraz-Szeles et al. 2022). Estos linajes linfocitarios no convencionales se originan en el timo y poseen receptores de linfocito T (TCR), pero a diferencia de los linfocitos T convencionales, estos TCRs poseen una diversidad limitada y son capaces de reconocer antígenos de distinta naturaleza, generalmente no peptídica. Particularmente, el presente trabajo se enfoca en el estudio de las células NKT, sus ligandos y su influencia en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa.

1.1. Células NKT

Las **células NKT**, llamadas así por sus características morfológicas y funcionales similares tanto a los linfocitos T como a las células NK, son capaces de reconocer antígenos de naturaleza lipídica a través de su TCR. Además, se caracterizan por expresar en su superficie receptores que también se encuentran en las células NK, incluyendo el receptor inhibitorio NKG2A, el receptor Fc de baja afinidad CD16 y varios receptores activadores como DNAM-1, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 y 2B4 (Krijgsman, Hokland et al. 2018). Poseen un rol importante en la modulación de procesos de respuesta inmunitaria frente a patógenos, tumores, alérgenos y autoantígenos (Carreño, Kharkwal et al. 2014). Además, se ha observado que la frecuencia de las células NKT circulantes disminuye en enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus y artritis reumatoide, lo que sugiere un rol protector de estas células contra la autoinmunidad (Van Kaer 2006). Por otro lado, se ha evidenciado que las células NKT pueden aumentar su frecuencia luego de tratamientos contra el cáncer (Godfrey, Le Nours et al. 2018), lo que generalmente se asocia con un buen pronóstico de la progresión de la enfermedad. Adicionalmente, las células NKT poseen propiedades citotóxicas mediadas por perforina y granzima B, lo que les permite ejercer actividad citolítica contra células tumorales, ya sea mediante la ligación de su TCR o por activación promovida por citoquinas presentes en el ambiente tumoral (Ustjanzew, Sencio et al. 2022).

Como se mencionó anteriormente, las células NKT se caracterizan por expresar un TCR capaz de reconocer antígenos de naturaleza glicolipídica tanto endógenos como exógenos, presentados por la **molécula CD1d**, que pertenece a la familia de MHC de clase I (MHC-I). Esta molécula es expresada en todas las células nucleadas, pero su expresión es mayor en células presentadoras de antígenos profesionales, como los linfocitos B y las DC (Dougan, Kaser et al. 2007). A diferencia de MHC-I, CD1d posee una estructura no polimórfica (Borg, Wun et al. 2007) y se considera una molécula clave para la selección, el desarrollo y el reconocimiento de las células NKT en el timo y en la periferia (Godfrey, Hammond et al. 2000). En ratones y humanos, CD1d presenta una estructura conservada, aunque existen algunas diferencias entre especies, como diferentes afinidades por ligandos lipídicos y TCRs de células NKT (Pellicci, Patel et al. 2009). Además, poseen diferentes propiedades de tráfico intracelular, ya que la asociación con la proteína adaptadora AP-3 es necesaria para la correcta migración de CD1d de ratón (**mCD1d**) al lisosoma, pero no de CD1d humano (**hCD1d**) (Sugita, Cao et al. 2002, Elewaut, Lawton et al. 2003). A pesar de estas diferencias,

la conservación evolutiva de CD1d en ambas especies se hace patente ya que las células NKT de ratón pueden reconocer el mismo antígeno glicolípido en contexto de CD1d humano o murino y viceversa. Esta reactividad cruzada ocurre a pesar de que los polimorfismos observados entre especies pueden generar un posicionamiento distinto de algunos ligandos en el sitio de unión. Esto indica una gran plasticidad del sistema TCR-lípido-CD1d y permite evaluar una gran cantidad de antígenos en ambas especies (Godfrey, McCluskey et al. 2005).

De acuerdo con el repertorio de TCRs expresados en su superficie, las células NKT se clasifican en dos subtipos principales. Las **células NKT de tipo I o invariantes (iNKT)** poseen un TCR semi-invariante compuesto por una cadena $V\alpha 14-J\alpha 18$ en ratones y $V\alpha 24$ en humanos, las cuales pueden asociarse a una variedad de cadenas $V\beta$ en ratones (principalmente $V\beta 8$, $V\beta 7$ y $V\beta 2$) y a $V\beta 11$ en humanos (Kronenberg 2005) (Cameron, Pellicci et al. 2015). Por otro lado, las células **NKT de tipo II**, también llamadas **células NKT diversas (dNKT)**, poseen un repertorio más amplio de TCRs debido a su uso heterogéneo de las cadenas $\alpha\beta$ (Tatituri, Watts et al. 2013). Ambas poblaciones reconocen ligandos con una estructura común: una cabeza polar unida a colas hidrofóbicas, siendo el grupo polar el que interactúa principalmente con el TCR. Algunos ligandos son reconocidos de forma preferencial por uno u otro subtipo, siendo α -Galactosilceramida el ligando prototipo reconocido por las células iNKT, mientras que las células dNKT reconocen ligandos como sulfátido y cerebrosidos (Tiwary, Berzofsky et al. 2019), aunque esto aún es materia de investigación (Stax, Tuengel et al. 2017). De acuerdo con la evidencia existente ambas poblaciones poseen potencial inmunomodulador, pero aunque las células dNKT se encuentran en mayor proporción que las células iNKT, no han sido estudiadas de manera tan extensiva debido a limitantes para su identificación y purificación (Shissler, Bollino et al. 2016, Tiwary, Berzofsky et al. 2019). Por lo tanto, en este trabajo nos enfocamos en el estudio de las células iNKT.

Funcionalmente, las células iNKT pueden ser clasificadas en función de la expresión de factores de transcripción que generan perfiles efectores definidos y conservados, similares a los perfiles Th1, Th2 y Th17 de los linfocitos T CD4 convencionales. Concretamente, las células NKT1, NKT2 y NKT17 se caracterizan principalmente por la producción de $IFN-\gamma$, IL-4 e IL-17, respectivamente (Wang and Cardell 2017). Además, se caracterizan por la expresión de factores de transcripción específicos, tales como Tbet para NKT1, GATA3 para NKT2 y ROR γ T para NK17. Es importante destacar que PLZF se expresa en todos los subtipos de células iNKT, ya que es fundamental para el desarrollo de sus funciones efectoras en el timo (Savage, Constantinides et al.

2008). No obstante, su nivel de expresión es particularmente elevado en células del subtipo NKT2. Asimismo, se han descrito otros subtipos de células iNKT, como las células NKT cooperadoras foliculares o NKT_{FH}, y las células NKT10, que se caracterizan por la producción de IL-10. Esto evidencia la gran plasticidad de las células NKT y su posible relevancia en diversos procesos fisiológicos.

Desde el punto de vista terapéutico, una de las ventajas que ofrecen las células iNKT consiste en su capacidad para secretar grandes cantidades de citoquinas y quimioquinas diversas de manera rápida tras la activación por antígeno. Numerosos estudios han demostrado que las células iNKT poseen transcritos de mRNA preformados para citoquinas como IFN- γ e IL-4, lo que les permite iniciar su síntesis y secreción sólo minutos después de la ligación de su TCR (Matsuda, Gapin et al. 2003). Por lo anterior, se ha definido que las células iNKT presentan un fenotipo parcialmente activado, similar al de los linfocitos T de memoria (D'Andrea, Goux et al. 2000). Esta habilidad de responder rápidamente y sin necesidad de exposición previa al antígeno posiciona a estas células como un blanco atractivo para la inmunoterapia (McEwen-Smith, Salio et al. 2015). En efecto, las células iNKT han demostrado ser capaces de modular el mecanismo de la respuesta inmunológica en su compleja red de efectores celulares y moleculares e influenciar la generación de respuestas inflamatorias versus regulatorias (Nelson, Lukacs et al. 2021).

1.2. Ligandos de células iNKT

La identificación del ligando derivado de la esponja marina *Augelus mauritanus*, α -galactosilceramida (α GalCer ó KRN7000), que induce una potente estimulación de células iNKT tanto humanas como de ratón, permitió perfeccionar las herramientas de estudio de esta población celular principalmente a través de la generación de tetrámeros de CD1d pulsados con ligando, cuya utilidad es poder detectar y aislar a estas células mediante citometría de flujo (Carreno, Saavedra-Avila et al. 2016). El glicolípido α GalCer se caracteriza por la presencia de un ácido graso de cadena larga C26:0 y una cadena esfingosina, lo que forma la porción ceramida de la molécula, unidas a un grupo galactosil a través de un enlace α -glicosídico. La capacidad de α GalCer, un compuesto proveniente de una esponja marina, para estimular de manera tan potente a esta población de linfocitos T no convencionales ha sido objeto de debate entre los investigadores, ya que en un principio se cuestionó su rol fisiológico. Actualmente, la evidencia indica que α GalCer es un ligando exógeno, ya que en mamíferos no se han identificado enzimas capaces de sintetizar el anómero α

de galactosilceramida. Recientemente, se ha descrito que ciertas bacterias comensales del microbioma intestinal humano y de ratón, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus* y *Prevotella copri*, son capaces de sintetizar α GalCer, destacando su posible participación en la actividad antitumoral ejercida por las células iNKT, principalmente contra tumores sólidos del sistema digestivo (Ustjanzew, Sencio et al. 2022). Esta podría ser la fuente de las cantidades mínimas de α GalCer que se han detectado en diversos tejidos humanos y murinos.

En contraste, se ha descrito que las enzimas glucosilceramida sintasas en mamíferos sólo pueden sintetizar anómeros β , cuya capacidad de activar las respuestas de células iNKT se ha evaluado en diversos estudios (Ustjanzew, Sencio et al. 2022). Esto contrasta con los ligandos microbianos que son reconocidos como antígenos por las células iNKT, ya que la mayoría presenta en su estructura lipídica la unión a una porción azúcar mediante un enlace α (Rossjohn, Pellicci et al. 2012). Este enlace genera que la porción carbohidrato presente una conformación plana en la zona de unión a CD1d. Dado que la mayoría de los glicolípidos en mamíferos presentan un enlace β -glicosídico, se ha propuesto aclarar la conformación del complejo TCR-ligando-CD1d en las células iNKT en ese caso. Diversos estudios (Pellicci, Clarke et al. 2011, Yu, Girardi et al. 2011) han demostrado que, para el reconocimiento de los ligandos β -anoméricos, se induce una conformación planar similar a la observada en los ligados con enlace α . Esta forma de mimetismo en la conformación del ligando conlleva un gasto energético mayor en la unión con ligandos β -anoméricos, lo que sugiere que esta interacción es de baja afinidad. Lo anterior puede ser relevante en cuanto a la selección de un repertorio apropiado de células iNKT durante el desarrollo, ya que se espera que estas células mantengan una baja afinidad por ligandos endógenos pero una mayor afinidad en la interacción con antígenos exógenos que presentan el enlace α (Gapin, Godfrey et al. 2013).

La identificación de los ligandos endógenos de las células iNKT ha sido un tema de investigación de gran relevancia para elucidar el mecanismo de desarrollo celular de esta población a partir de precursores tímicos. Además, esto posee relevancia fisiológica significativa, ya que las células iNKT requieren de dos señales para desencadenar una respuesta: la ligación del TCR y la presencia de un ambiente inflamatorio. La presentación de ligandos endógenos por células presentadoras de antígenos en la periferia permite la activación de las células iNKT en contextos patológicos sin la necesidad de ligandos exógenos (Mattner, Debord et al. 2005).

Inicialmente, se propuso que el glicosfingolípido lisosomal con enlace β , isoglobotrihexosilceramida (iGb3), podría ser un compuesto endógeno con un rol en la selección tímica de las células iNKT ya que ha demostrado ser capaz de estimular células iNKT tanto de ratones como de humanos (Zhou, Mattner et al. 2004). Sin embargo, estudios posteriores han desacreditado esta hipótesis debido a que no se ha detectado la presencia de iGb3 en el timo de ratones o humanos (Speak, Salio et al. 2007) y se ha descubierto que la enzima responsable de su síntesis está ausente en humanos (Christiansen, Milland et al. 2008). Además, se ha demostrado que el desarrollo y función de las células iNKT en ratones es normal en ausencia de la enzima sintasa de iGb3 (Porubsky, Speak et al. 2007), lo que sugiere que este compuesto no es necesario para la selección de estas células en el timo. Por lo anterior, es probable que existan otros compuestos más relevantes y/o redundantes para la selección de las células iNKT en el timo.

Uno de los ligandos que sí se han encontrado a nivel fisiológico en humanos y ratones es la β -glucosilceramida (β -GlcCer). Se ha demostrado que este compuesto tiene la capacidad de activar a las células iNKT en la periferia en presencia de señales coestimuladoras, y estudios posteriores han identificado a β -GlcCer como un lípido endógeno que podría mediar la activación de las células iNKT en respuesta a señales de daño microbiano (Memon, Holleran et al. 2001). Este lípido es relativamente abundante en los tejidos linfáticos y se ha encontrado que activa de manera potente a las células iNKT tanto en humanos como en ratones. Además, se ha observado que β -GlcCer se acumula durante procesos infecciosos (Brennan, Tatituri et al. 2011). Por lo tanto, se ha determinado que β -GlcCer es un ligando propio relevante a nivel fisiológico para las células iNKT. Estudios e modelos murinos han demostrado que la administración de β -GlcCer tiene potencial anticancerígeno (Inafuku, Li et al. 2012). Asimismo, la depleción de la enzima glucosilceramida sintasa provoca una disminución en la cantidad de células iNKT en tejidos y también en su capacidad de proliferación (Popovic, Rabionet et al. 2017). A pesar de esto, no se ha encontrado evidencia que sugiera que β -GlcCer sea un ligando involucrado en la selección tímica de células iNKT, ya que no es capaz de estimular células iNKT autorreactivas (Zhou, Xia et al. 2021). Por lo tanto, se necesitan más estudios para comprender completamente el papel de β -GlcCer en la activación y selección de las células iNKT.

Por otro lado, se ha evidenciado que la deficiencia de la enzima O-aciltransferasa gliceronefosfato (GNPAT) en ratones conlleva alteraciones en el desarrollo de las células iNKT. La GNPAT es una enzima esencial en la síntesis de los lípidos éter en el peroxisoma (Facciotti,

Ramanjaneyulu et al. 2012) por lo que estos hallazgos sugieren que los fosfolípidos con enlace éter podrían ser biológicamente relevantes para el sistema iNKT-CD1d (Bratkiewicz and Dent 2012). Efectivamente, se han encontrado fosfolípidos de este tipo en el timo de ratones (Bratkiewicz and Dent 2012). Con el fin de evaluar esta hipótesis, se utilizó un análogo sintético de plasmalógeno, lisofosfatidiletanolamina (pLPE), el cual demostró capacidad para estimular células iNKT tanto en humanos como en ratones (Facciotti, Ramanjaneyulu et al. 2012). Se ha observado que tanto pLPE como el ácido lisofosfatídico (eLPA) son importantes para el desarrollo de las células iNKT, aunque se ha evidenciado que un pequeño subgrupo de células iNKT en ratones no pueden sintetizar estos antígenos, lo que sugiere que no son un requerimiento absolutamente necesario (Pellicci, Koay et al. 2020). En un estudio adicional, se analizaron análogos de estos compuestos que carecen del enlace éter, los glicerosfosfolípidos LPE y LPA, y se encontró que no activan a las células iNKT (Zeissig, Murata et al. 2012). Por lo tanto, aún queda por dilucidar el papel específico del enlace éter de estos fosfolípidos en la estimulación de las células iNKT.

Se han identificado otros glicoesfingolípidos presentes en el sistema nervioso central como ligandos estimuladores de la respuesta de células iNKT, así como fosfolípidos que tienen la capacidad de activar a una población reducida de células iNKT que, por otro lado, presentan una respuesta más débil en comparación con los glicolípidos α -anoméricos (O'Keeffe, Podbielska et al. 2015). Por lo tanto, la identificación de ligandos endógenos relevantes sigue siendo un tema de investigación vigente y de intenso debate.

En general, un problema recurrente en los estudios realizados hasta la fecha ha sido la dificultad para excluir la posibilidad de que cantidades traza de compuestos lipídicos puedan añadir un sesgo a los resultados y, en consecuencia, comprometer la validez de las investigaciones llevadas a cabo. Actualmente, se postula la hipótesis de diferentes ligandos endógenos pueden desempeñar funciones redundantes en la selección y desarrollo del repertorio de las células iNKT. También se ha sugerido que diferentes tipos de lípidos pueden promover el desarrollo de células iNKT, de manera que tipos individuales de lípidos seleccionen positivamente subclases de células iNKT con especificidades de TCR ligeramente distintas (Bratkiewicz and Dent 2012).

1.3. Desafíos de la inmunoterapia basada en células iNKT

Independiente de su origen, la capacidad estimuladora de los ligandos de células iNKT se ha investigado con la ayuda de análogos sintéticos similares a α GalCer o derivados de éste. Dado que la administración de α GalCer ha evidenciado actividad anti-carcinogénica en modelos animales, se ha explorado ampliamente su uso en modelos preclínicos con altos niveles de éxito (Nair and Dhodapkar 2017). Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado beneficio terapéutico relevante en los aproximadamente 30 ensayos clínicos con pacientes que se han realizado (Zhang, Springfield et al. 2019). Una posible explicación para este fenómeno se basa en la observación de que α GalCer genera una respuesta mixta de citoquinas anti- y pro-inflamatorias, cancelando el posible efecto terapéutico que se pudiera observar debido a estos mecanismos efectores. Esto hace patente la necesidad de desarrollar ligandos que presenten una respuesta con un perfil definido para futuras aplicaciones en inmunoterapia (Banchet-Cadeddu, Henon et al. 2011). Se han descrito análogos particulares de α GalCer capaces de inducir la producción de IFN- γ y otras citoquinas propias del perfil tipo Th1, que por lo general poseen una estructura con predominancia de grupos apolares y son más liposolubles. Estos ligandos han demostrado ejercer efectos terapéuticos favorables en modelos murinos de cáncer y enfermedades infecciosas (Schmieg, Yang et al. 2003, Kopecky-Bromberg, Fraser et al. 2009). Por otro lado, se han identificado análogos que inducen un perfil de tipo Th2 y se caracterizan por la presencia de grupos polares y presencia de dobles enlaces o cadenas con menor número de carbonos que les confieren propiedades más hidrosolubles (Arora, Kharkwal et al. 2016); éstos se consideran más apropiados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o inflamatorias (Forestier, Takaki et al. 2007).

La diferencia de reactividad de los ligandos entre especies supone otro desafío importante para el estudio de las células iNKT como posible blanco terapéutico en enfermedades. Un ejemplo de esto es α -C-GalCer, un derivado de α GalCer capaz de inducir un perfil tipo Th1 en células murinas con gran potencia, pero que en células humanas no ha demostrado una activación potente como para considerarse una alternativa terapéutica adecuada (Li, Chen et al. 2009). Un análogo esfingosina de α GalCer, llamado AH03-1, también demostró ser un potente activador de células murinas, sin embargo, tampoco es un ligando eficiente para células humanas (Dangerfield, Cheng et al. 2012). Se ha propuesto que estas diferencias en el nivel de activación podrían estar determinadas por las diferencias estructurales entre CD1d humano y murino, además de diferencias entre poblaciones de células iNKT restringidas por CD1d (Brigl and Brenner 2004). Para resolver este

problema, se generó un modelo de ratón parcialmente humanizado en el cual se expresa la molécula CD1d humana (hCD1d-KI) por recombinación homóloga bajo control del promotor endógeno de mCD1d (Wen, Rao et al. 2013). Este modelo tiene la característica de presentar una proporción similar al humano en cuanto a células iNKT respecto a los linfocitos totales, ya que en el ratón *wild type* esta proporción es mucho mayor, lo que podría dar cuenta de la disparidad de resultados en ambos organismos (Kita, Naidenko et al. 2002).

La utilización del ratón hCD1d-KI ha permitido evaluar la manera en la cual diversas modificaciones de ligandos derivados de α GalCer influyen en la respuesta de células iNKT. Como se mencionó anteriormente, existen ligandos que inducen una respuesta potente de citoquinas de tipo Th1 en el ratón, pero no en células humanas. Este es el caso del ligando AH03-1, en el cual está ausente el grupo hidroxilo en carbono 4 de la cadena esfingosina, característico de α GalCer. En un trabajo en conjunto de los grupos de Porcelli y Howell se logró restaurar su actividad en células humanas mediante la adición de un grupo éster en la cabeza galactosil, y esto también fue comprobado en un modelo de melanoma en ratones parcialmente humanizados hCD1d-KI (Chennamadhavuni, Saavedra-Avila et al. 2018). Este ligando modificado fue identificado como AH10-7 y ha sido utilizado en numerosos estudios de nuestro grupo y colaboradores. En otro estudio subsecuente, los investigadores incorporaron grupos aromáticos en la cabeza galactosil mediante un enlace amida en el carbono 4, lo que se encontró potenciaba las capacidades inmunogénicas de la respuesta en el ratón hCD1d-KI (Saavedra-Avila, Keshipeddy et al. 2020). Dados los resultados promisorios de este estudio, nuestro objetivo en el actual proyecto de tesis fue evaluar la bioactividad de otros ligandos similares, que presentan inserciones de grupos aromáticos en el C''6 del grupo galactosil, con ausencia o presencia del grupo hidroxilo en C'4, y comparar las respuestas obtenidas en contexto de presentación en mCD1d versus hCD1d, como una forma de continuar con la validación de este modelo para estudios preclínicos.

2. Hipótesis

Ligandos derivados de α GalCer que poseen el grupo hidroxilo en C'4 de la cadena esfingosina adicionalmente al grupo fenilpropionato en C"6 del grupo galactosil, son capaces de inducir una respuesta potente de tipo Th1 y además son reconocidos de forma preferencial por células iNKT con secuencias específicas de TCR- β en el ratón parcialmente humanizado, hCD1d *knock in*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Explorar la relación entre la estructura de ligandos derivados de α GalCer y su potencial inmunomodulador de respuestas de tipo Th1 mediante la activación de subpoblaciones de células iNKT.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Identificar ligandos derivados de α GalCer con mayor potencia estimuladora en ensayos *in vitro* con hibridomas derivados de células iNKT.
- 3.2.2. Caracterizar la respuesta de citoquinas *in vivo* de los ligandos derivados de α GalCer seleccionados y determinar los perfiles de activación inducidos en las células iNKT.
- 3.2.3. Determinar la relación entre estructura de ligandos derivados de α GalCer y la secuencia del TCR- β expresado por las células iNKT que responden principalmente a estos ligandos.

4. Materiales y Métodos

4.1. Animales

Ratones C57BL/6 y hCD1d-KI fueron mantenidos en el bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, de acuerdo con los lineamientos del comité de bioética. Se utilizaron animales de 6 a 8 semanas de edad para todos los estudios.

4.2. Líneas celulares y generación de células dendríticas derivadas de médula ósea

Hibridomas policlonales de células iNKT fueron generados por sorting celular de células NKT de bazo de ratones C57BL/6 o hCD1d *knock-in* y posterior fusión con la línea de linfoma BW5147. Las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) fueron generadas a partir de cultivo primario de precursores de médula ósea de ratones WT o hCD1d-KI en presencia de GM-CSF por 8 días.

4.3. Reconstitución de glicolípidos para su uso en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Para los ensayos *in vitro*, diluciones stock de glicolípidos fueron preparadas a 100 μM en DMSO (Sigma) como se describe en (Chennamadhavuni, Saavedra-Avila et al. 2018). Antes de su uso, los viales fueron homogenizados mediante vortex, incubados a 80°C, sonicados por 5 minutos y luego diluidos a 10 μM en medio precalentado a 37°C (RPMI-1640 con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina). Esta solución fue diluida con medio suplementado previo a la estimulación de las células para obtener las concentraciones finales indicadas en cada experimento. Para los ensayos *in vivo*, los glicolípidos fueron solubilizados en DMSO en una concentración 20 mM. Fueron subsecuentemente diluidos a una concentración de 2 mM con PBS y Tween-20 al 0.5%. Esta solución fue diluida en un factor de dilución 1:10 con PBS pre-calentado a 80°C inmediatamente previo a la inyección en ratones, resultando en una solución 200 μM . Se inyectaron 4 nmoles de glicolípido en 200 μl , en vehículo con composición final de PBS + 0.1% DMSO + 0.05% Tween-20. Los ligandos derivados de αGalCer con modificación en C6'' fueron donados por la Dra. Amy Howell (University of Connecticut), mientras que αGalCer y OCH se obtuvieron de forma comercial (Avanti Polar Lipids).

4.4. Activación de células iNKT *in vitro*.

Se utilizaron BMDC como presentadoras de antígeno glicolipídicos. Para ello, se generaron a partir del protocolo anteriormente establecido y se incubaron en presencia de glicolípidos en cantidades crecientes durante 24 horas. Posteriormente, los hibridomas de células iNKT fueron

cosechados y cultivados en una placa de 96 pocillos de fondo cónico, en presencia de 100.000 células dendríticas para obtener una relación 1:1. Al cabo de 24 horas, se colectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C para la posterior determinación de IL-2 mediante ELISA. Para la determinación de curvas dosis respuesta se utilizó un rango de concentraciones de glicolípido de 0,01 a 1000 nM.

4.5. Activación de células iNKT *in vivo*

Para determinación del perfil de citoquinas inducidos por los ligandos derivados de α GalCer, ratones C57BL/6 fueron inyectados vía intraperitoneal con una dosis de 4 nmol de glicolípido o vehículo. Se realizó la colección de una muestra de sangre periférica al cabo de 2 y 24 horas posteriores de la inyección, para cuantificar mediante ELISA la producción de las citoquinas IL-4 e IFN- γ , respectivamente. Para el análisis de poblaciones de linfocitos por citometría de flujo, se obtuvieron esplenocitos los cuales fueron procesados como se describe a continuación.

4.6. Citometría de flujo multiparamétrica

Los hibridomas de células iNKT fueron caracterizados mediante tinción con un tetrámero de CD1d pulsado con α GalCer y acoplado a fluorocromos APC o PE, y con los siguientes anticuerpos de BD Biosciences: anti-TCR- β -FITC (H57-597), anti-NK1.1-PE (PK136) and anti-B220-PerCP (RA3-6B2). Para los experimentos *in vivo*, las suspensiones celulares fueron preparadas a partir de bazo en buffer de tinción FACS (2% FBS, 0.09% azida de sodio) previa remoción de eritrocitos mediante buffer de lisis ACK. Se identificaron las poblaciones de células iNKT a través de los marcadores de superficie descritos anteriormente, sumados a CD4-APC-Cy7 (GK1.5) y CD8 α -Pacific Blue (53-6.7). Estas poblaciones también fueron caracterizadas por su producción de citoquinas mediante tinción intracelular con el kit Foxp3 Fixation/Permeabilization kit (eBioscience). Las células fueron previamente incubadas con anticuerpo anti-CD16/32 para bloquear la unión inespecífica a Fc γ R. Se tiñeron 2×10^6 de células con anti-IL-4-PECy7 (11B11) y anti-IFN- γ -Alexa Fluor 700 (XMG1.2) luego de estimulación con Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, 50 ng/ml) y Ionomicina (1 μ g/ml) durante 5 horas e incubación con Brefeldina A y Monensina A (eBiosciences) durante las 4 horas finales en un incubador a 37°C y 5% de CO₂. Una sonda de viabilidad fue incorporada en todos los ensayos para excluir del análisis a las células muertas (LIVE/DEAD Aqua, ThermoFisher Scientific). Todos los ensayos de citometría de flujo se realizaron en un equipo LSRFortessa (Becton Dickinson) y los datos fueron analizados mediante el programa FlowJo V10.

4.7. Sorting celular para aislamiento de células iNKT

Para la secuenciación del TCR, las células iNKT fueron aisladas a partir del bazo de ratones hCD1d KI previamente inyectados con 4 nmol de glicolípidos, como fue descrito anteriormente. Los esplenocitos fueron colectados 72 horas posteriores a la inyección y los eritrocitos fueron lisados con buffer ACK. Se realizó la tinción de marcadores de superficie con tetrámero CD1d/ α GalCer conjugado a PE, anti-TCR- β -FITC (H57-597) y anti-B220-PerCP (RA3-6B2), en un buffer libre de azida. Las células fueron incubadas con una sonda de viabilidad (LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit, ThermoFisher Scientific) para excluir células muertas del proceso de sorting. El sorting celular fue realizado en un equipo FACS Aria III. Se obtuvieron aproximadamente $1-2 \times 10^4$ de células por grupo y la síntesis de cDNA fue realizada inmediatamente después con los reactivos del kit SMARTer Mouse TCR α/β Profiling Kit (Takara Bio USA, Inc.). Se siguió el protocolo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.8. Extracción de RNA y preparación de librería TCR α/β

Se realizó la extracción de RNA total de 1×10^7 hibridomas de células iNKT mediante el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron mantenidas en 300 μ l del reactivo RNA Protect Cell Reagent (Qiagen) a -20°C hasta la extracción. Para los ensayos de secuenciación *in vivo*, las células iNKT sorteadas totales fueron utilizadas directamente como templado para la generación de la librería. Las librerías fueron generadas con SMARTer Mouse TCR α/β Profiling Kit (Takara Bio USA, Inc.) para Secuenciación de Próxima Generación y fueron validadas mediante el análisis de fragmentos de DNA en el equipo Fragment Analyzer (Advanced Analytical). Adicionalmente, fueron cuantificadas mediante fluorescencia utilizando el equipo Qubit (ThermoFisher Scientific). Las librerías fueron llevadas a una concentración de 4 nM para su denaturación, y luego fueron diluidas a pM, incluyendo el control interno PhiX al 7.5% (Illumina, Cat. No. FC-110-3001). La secuenciación de las librerías fue realizada en un equipo Illumina MiSeq utilizando el reactivo de 600 ciclos MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina, Cat. No. MS-102-3003) con lecturas de finales pareados de 2x300 pares de bases. Los datos fueron analizados usando el programa MiXCR (Bolotin, Poslavsky et al. 2015). Las frecuencias de los clonotipos fueron determinadas por el número asociado de lecturas de las secuencias correspondientes.

4.9. Modelamiento molecular y métodos computacionales

Las estructuras de hCD1d y mCD1d fueron modeladas por homología mediante el servidor SWISS-MODEL (Schwede, Kopp et al. 2003) utilizando como plantillas las estructuras cristalinas 3VWK y 3HE7 a una resolución de 2.94 Å y 2.80 Å, respectivamente (Wun, Ross et al. 2012) (Pellicci, Patel et al. 2009). Las secuencias obtenidas experimentalmente de los TCR fueron modeladas mediante el programa de Rosetta TCRmodel (Gowthaman and Pierce 2018). Los ligandos AH17-6, AH17-8 y α GalCer se construyeron y optimizaron mediante gaussian16 (Frisch, Trucks et al. 2016), posteriormente se asignaron las cargas Gasteiger para cada átomo. Los acoplamientos moleculares para los complejos de los CD1d y CD1d-TCR con los ligandos mencionados anteriormente fueron realizados mediante Autodock Vina (Trott and Olson 2010). Los sistemas para los complejos obtenidos a partir del acoplamiento molecular fueron solvatados en una caja de agua TIP3P con un volumen de 100 x 100 x 100 Å³, se añadieron iones Na⁺ y Cl⁻ 0.15M mediante el servidor CHARMM-GUI (Jo, Kim et al. 2008). Se consideró el estado de protonación predominante a pH 7.4 para cada residuo. Las simulaciones de dinámica molecular para cada sistema fueron llevadas a cabo mediante AMBER18 (Case, Cheatham et al. 2005) utilizando el campo de fuerza FF19SB para los aminoácidos y GAFF2 para los ligandos (Tian, Kasavajhala et al. 2020) (He, Man et al. 2020). Inicialmente los sistemas se minimizaron durante 5000 pasos, posteriormente se calentaron gradualmente de 0 a 300 K y equilibraron durante 125 ps en condiciones NVT, finalmente se realizó una etapa producción de 50 ns en condiciones NPT. Se aplicó el algoritmo SHAKE para restringir los átomos de hidrógeno, mientras que las interacciones electrostáticas de largo alcance se calcularon empleando el método Ewald de malla de partículas. Las simulaciones se realizaron utilizando un dt de 4.0 fs en conjunto al reparto de masa de hidrógeno (Hopkins, Le Grand et al. 2015).

4.10. Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism version 8 para todos los análisis estadísticos realizados. Las pruebas estadísticas utilizadas en cada experimento se indican en los pies de figura correspondientes.

5. Resultados

5.1. Poblaciones monoclonales de hibridomas de células iNKT presentan diversos niveles de respuesta frente a la estimulación con el ligando α GalCer

Con el objetivo de establecer un sistema de *screening* para identificar ligandos que pudieran inducir una respuesta potente en las células iNKT, se aislaron y caracterizaron hibridomas monoclonales generados a partir de células iNKT provenientes de ratones hCD1d KI y C57BL/6 (*wild type* o WT). Previamente, se generaron hibridomas a partir de la fusión de una línea celular de linfoma tímico, BW5147, con células iNKT aisladas mediante sorting celular a partir de esplenocitos marcados con tetrámetro de CD1d- α GalCer acoplado a proteína fluorescente y con anticuerpos monoclonales anti-TCR- β y anti-NK1.1, moléculas de superficie expresadas por las células iNKT. Se utilizaron iNKT aisladas de ratones hCD1d KI para la molécula CD1d humana y también provenientes de ratones WT con el objetivo de comparar la presentación de los ligandos en contexto de hCD1d y mCD1d. Para ello, se utilizaron poblaciones monoclonales de hibridomas de células iNKT las cuales fueron obtenidas mediante dilución límite. Estos hibridomas monoclonales fueron caracterizados por su nivel de expresión de TCR- β en superficie y por su reactividad al tetrámetro CD1d- α GalCer mediante citometría de flujo. Fueron seleccionados 27 clones generados a partir de ratones hCD1d-KI (denominados con la inicial K) y 7 clones WT (denominados con la inicial B) que presentaban la mayor expresión de estos parámetros ([Figura 1](#)).

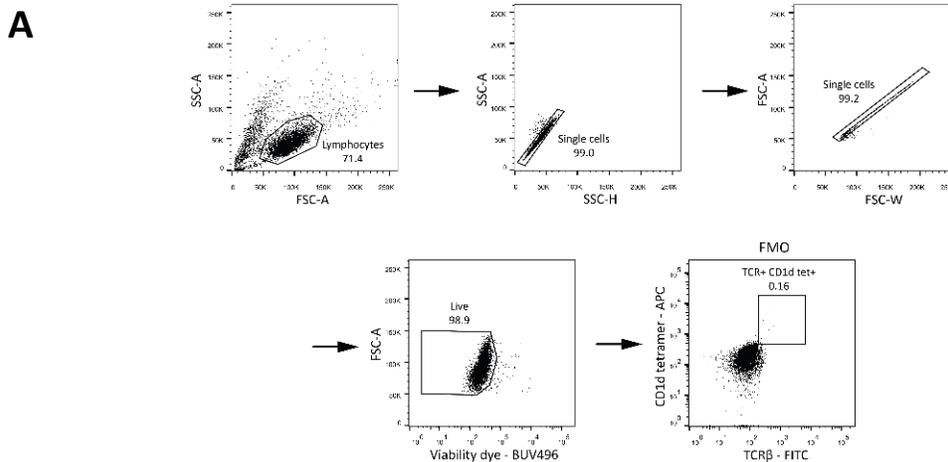


Figura 1. Selección y caracterización por citometría de flujo de poblaciones monoclonales de hibridomas de células iNKT hCD1d-KI y WT. (Continúa en la siguiente página)

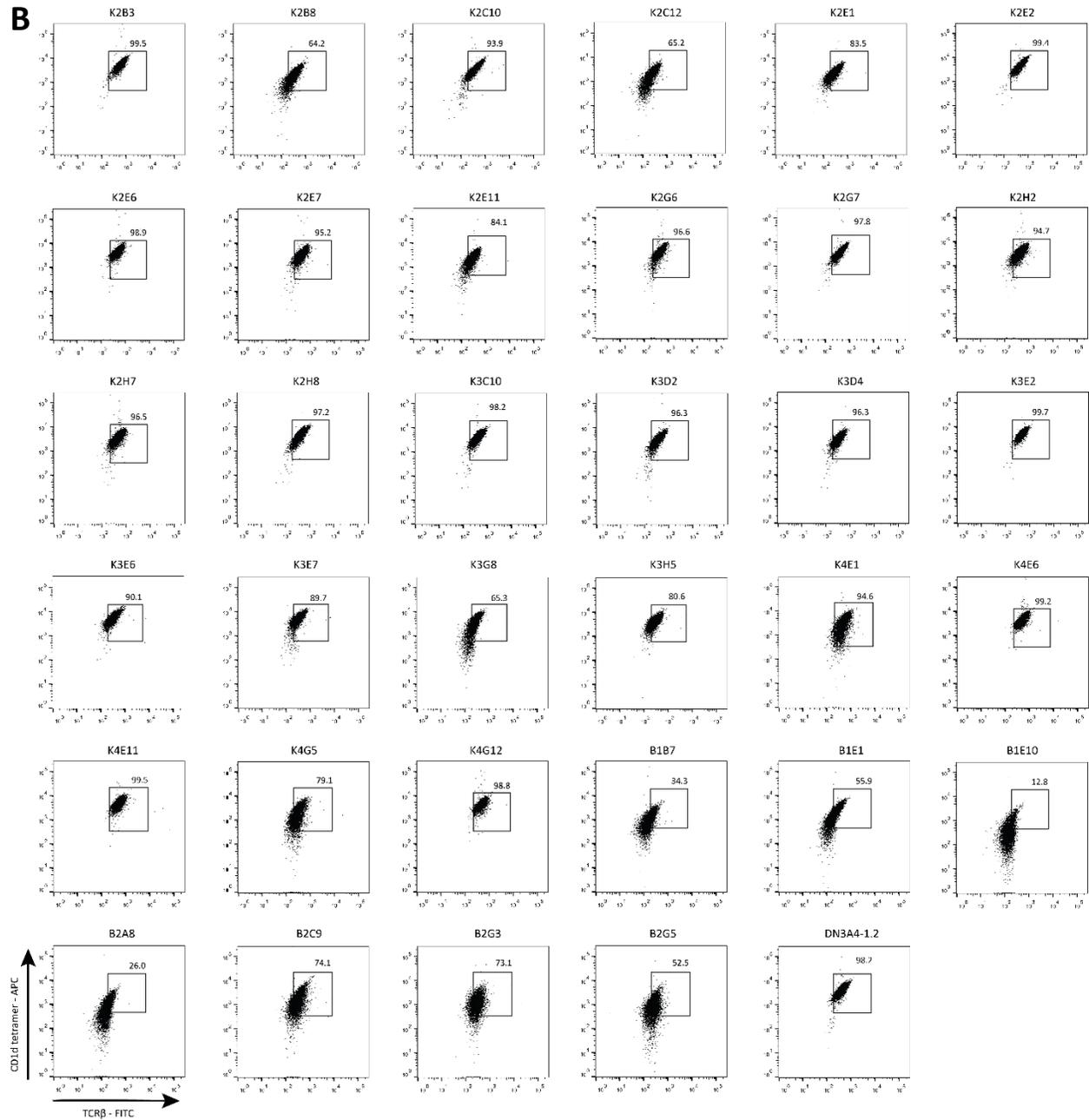


Figura 1. Selección y caracterización por citometría de flujo de poblaciones monoclonales de hibridomas de células iNKT hCD1d-KI y WT. Hibridomas monoclonales de células iNKT fueron aislados mediante dilución límite y posteriormente caracterizados según su reactividad al tetrámero CD1d- α GalCer acoplado al fluorocromo APC y su expresión de TCR según citometría de flujo. **(A)** Estrategia de *gating* y control FMO para la selección de las células doble positivas. **(B)** Las líneas celulares monoclonales derivadas de ratones hCD1d-KI (serie K) y aquellas provenientes de ratones C57BL/6 *wild-type* (serie B) fueron caracterizadas según su expresión de TCR β y reactividad a tetrámero de CD1d pulsado con α GalCer. Adicionalmente, se incluyó en el análisis un hibridoma de células iNKT de ratón, DN3A4-1.2.

Se evaluó la activación de los 27 clones hCD1d KI y 7 clones WT frente a la estimulación con el ligando prototipo α GalCer presentado en el contexto de hCD1d o de mCD1d, mediante el cultivo con células dendríticas derivadas de médula ósea generadas a partir de ratones hCD1d KI y WT con 100 nM de este glicolípido. Como control, se incluyeron ensayos de estimulación del hibridoma de células iNKT de ratón, DN3A4-1.2, el cual ha sido ampliamente estudiado (Yu, Im et al. 2005). La capacidad de cada hibridoma de responder al estímulo con el ligando se determinó según la cantidad de IL-2 secretada al sobrenadante, cuantificada mediante la técnica de ELISA sándwich. A partir de estos ensayos, se evidenció que los hibridomas monoclonales presentan una diversa capacidad de respuesta frente al estímulo con 100 nM de α GalCer ([Figura 2](#)). Un aspecto relevante para evaluar en este ensayo fue identificar clones que favorecieran el reconocimiento de α GalCer en el contexto de hCD1d por sobre mCD1d. Estadísticamente no se observaron diferencias significativas entre la activación de los clones individuales al ser estimulados con α GalCer en contexto de hCD1d o mCD1d, excepto para los clones K4E1 y K3H5, en los cuales se evidencia una mayor respuesta cuando el ligando es presentado por mCD1d ($p=0,018$ y $p=0,458$ respectivamente). En cuanto a los hibridomas derivados de ratones WT, el único que presentó diferencias significativas fue B2A8, el cual evidenció una mayor respuesta frente al ligando presentado por hCD1d ($p=0,004$). El segundo factor evaluado fue la capacidad de los clones de secretar una mayor cantidad de IL-2 en comparación al resto, para obtener una mayor sensibilidad en el estudio de ligandos potenciales y detectar aquellos compuestos que pudieran presentar una mayor potencia farmacológica. Entre los hibridomas con mayor bioactividad frente al estímulo con α GalCer, destacaron K3C10, K3G8 y K2C10, con una secreción de IL-2 que supera los ~ 50 ng/ml. Esto fue confirmado mediante pruebas estadísticas para determinar que la secreción de IL-2 de estos hibridomas fuera significativamente mayor a la mayoría de los clones KI que fueron evaluados. En base a estos resultados y para ensayos posteriores se seleccionaron hibridomas monoclonales que presentaron diversos niveles de respuesta: K2C10 y K3C10, que fueron catalogados como altamente respondedores al estímulo con α GalCer; K2G7 que fue considerado como un hibridoma capaz de presentar una menor respuesta al ligando; y finalmente B2G7, hibridoma derivado del ratón WT que presenta una respuesta a α GalCer mayor que el hibridoma de ratón prototipo, DN3A4-1.2.

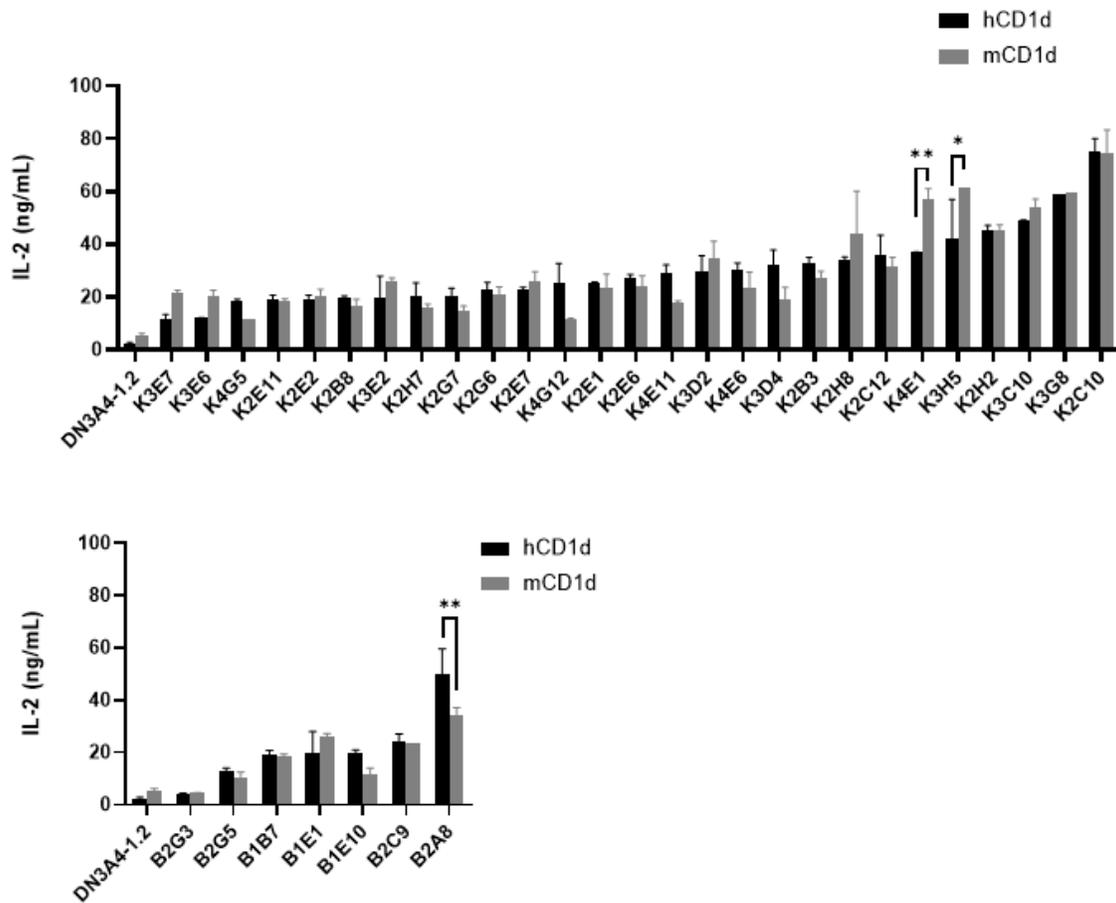


Figura 2. Estimulación de hibridomas monoclonales de células iNKT con el ligando α GalCer. Hibridomas monoclonales de células iNKT provenientes de ratones hCD1d-KI (arriba) y WT (abajo) fueron estimulados con 100 nm de α GalCer durante 24 horas, luego de las cuales la secreción de IL-2 fue cuantificada en sobrenadantes mediante ELISA. La presentación del ligando fue evaluada en contexto de las molécula hCD1d y mCD1d mediante la utilización de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) generadas a partir de ratones hCD1d-KI o WT, respectivamente. Las diferencias entre la secreción de IL-2 en respuesta a α GalCer presentado en contexto de hCD1d o mCD1d para cada hibridoma fueron determinadas mediante la prueba estadística ANOVA de dos vías con post test de Sidak (* $p<0,05$; ** $p<0,01$). Las diferencias de la secreción máxima de IL-2 en respuesta a α GalCer presentado en contexto de hCD1d entre hibridomas fueron evaluadas mediante ANOVA de una vía con post test de Tukey.

5.2. Ligandos derivados de α GalCer con adición de grupo fluorofenilo en la cadena carboxilato evidencian una menor potencia de respuesta en hibridomas de células iNKT

Con el objetivo de identificar ligandos capaces de inducir una respuesta potente en las células iNKT, se analizó la bioactividad de glicolípidos derivados de α GalCer sintetizados por nuestros colaboradores (Chennamadhavuni, Saavedra-Avila et al. 2018). Estos ligandos se caracterizan por presentar diversos grupos aromáticos sustituyentes posicionados en el carbono 6 del grupo galatosil (C''6), así como también por la adición de un grupo fluorofenilo en la cadena de ácido carboxílico y la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo posicionado en el carbono 4 de la cadena esfingosina (C'4). Tal como se detalla en la [Figura 3](#), los ligandos que incluyen el grupo éster fenilacetato en C''6 corresponden a AH17-2, AH17-5 y AH17-7, mientras que aquellos que incluyen el grupo fenilpropionato son AH10-7, AH17-3, AH17-6, AH17-8. AH17-1 no posee modificaciones en C''6 pero sí incluye el grupo fluorofenilo en la cadena del ácido carboxílico, característica que comparte con AH17-2, AH17-3 y AH17-4. Por último, los glicolípidos se pueden diferenciar por aquellos que poseen el grupo hidroxilo en C'4 de la cadena esfingosina (AH17-4, AH17-5 y AH17-6) y aquellos en los que se removió este grupo funcional (AH10-7, AH17-1, AH17-2, AH17-3, AH17-7 y AH17-8).

Como se mencionó anteriormente, se seleccionaron hibridomas que presentaron diversos niveles de respuesta de IL-2 en los ensayos de estimulación con α GalCer: K2C10, K3C10 y K2G7, los cuales son derivados del ratón hCD1d KI, y B2G5 el cual fue derivado del ratón WT. Adicionalmente se incluyó el hibridoma DN3A4-1.2 como referencia. Se realizaron ensayos de co-cultivo entre estos hibridomas y BMDC provenientes de ratón hCD1d KI o WT, pulsadas con concentraciones crecientes de cada ligando para evaluar la capacidad de estos compuestos de inducir respuestas de IL-2 en los hibridomas monoclonales, en contexto de hCD1d y mCD1d.

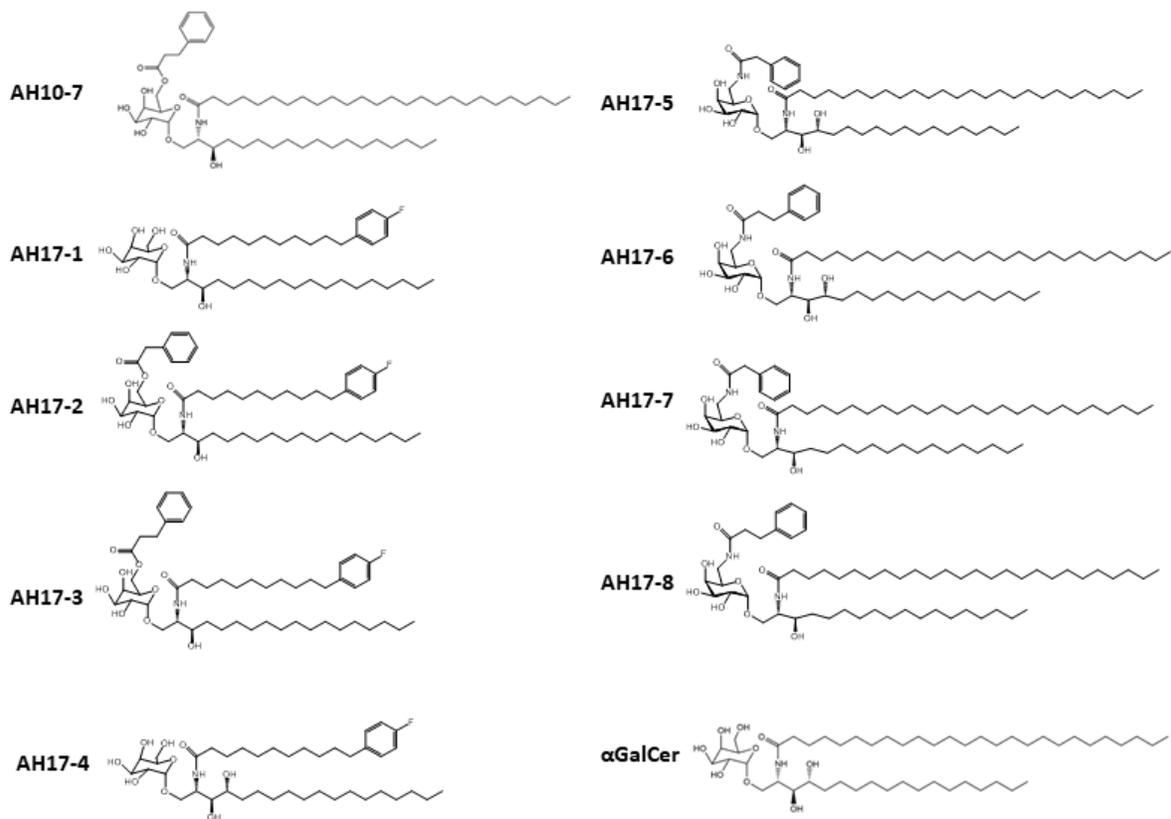


Figura 3. Estructuras moleculares de ligandos derivados de α GalCer. Las estructuras moleculares de los ligandos derivados de α GalCer difieren principalmente en los grupos sustituyentes posicionados en el carbono 6 del grupo galatosil (C'6), en la adición de un grupo fluorofenil en la cadena de ácido carboxílico y en la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo posicionado en el carbono 4 de la cadena esfingosina (C'4).

A partir de estos ensayos, se obtuvieron las curvas dosis-respuesta que indicaron la bioactividad de cada ligando en los diferentes hibridomas monoclonales de células iNKT ([Figura 4](#)). En general, se observaron tendencias similares de respuesta de IL-2 de los hibridomas monoclonales frente a los diversos ligandos. AH17-1, AH17-2 y AH17-3 son ligandos que demostraron tener una baja bioactividad en los hibridomas, dado que la respuesta de IL-2 no alcanza un punto de saturación, incluso a concentraciones altas como 1000 nM de glicolípido. Como se mencionó anteriormente, estos ligandos tienen en común en su estructura la ausencia del grupo hidroxilo en C'4 y la presencia de un grupo fluorofenilo en el extremo final de la cadena del carboxilato, que además presenta una longitud más corta que en α GalCer. Cabe destacar que, en AH17-4 -que también presenta el grupo fluorofenilo en el extremo del carboxilato- parece reestablecerse la bioactividad de la estructura del ligando al poseer el grupo hidroxilo en C'4, evidenciando la importancia de este grupo funcional en esa posición. Esta observación se repite con el ligando AH10-7, el cual también carece de este grupo funcional, y en nuestro sistema de *screening* no fue capaz de inducir una respuesta potente.

En términos generales, se observó una mayor bioactividad en los ligandos que conservan la cadena carboxilato del compuesto original α GalCer, pero que presentan la adición del éster fenilpropionato o fenilacetato en C'6, tales como AH17-5, AH17-6, AH17-7 y AH17-8. Además, se observó que la presencia del grupo C'4-OH en el ligando AH17-5 favorece una mayor producción de IL-2 en comparación con AH17-7, el cual carece del grupo hidroxilo en C'4 pero presenta la sustitución del mismo grupo éster fenilacetato que AH17-5. Por otra parte, la adición del grupo éster con cadena más larga, fenilpropionato, parece reestablecer la bioactividad del ligando que se pierde al eliminar el grupo C'4-OH, ya que la estimulación con AH17-6 y AH17-8 presenta niveles similares de respuesta de IL-2. Asimismo, se observó que la presentación de los ligandos en el contexto de mCD1d favorecía una mayor respuesta de IL-2, especialmente notable en el hibridoma K2C10, lo que podría dar cuenta de diferencias individuales en los TCR de estos hibridomas monoclonales.

A partir de las curvas dosis-respuesta generadas se realizó el cálculo del parámetro EC50, correspondiente a la concentración a la cual se alcanza la mitad de la respuesta máxima ([Figura 5](#)). Dado que en los ensayos con los ligandos AH10-7, AH17-1, AH17-2 y AH17-3 no se alcanzó respuesta máxima entre 100 y 1000 nM de glicolípido, estos ligandos fueron excluidos del análisis de EC50. Para una mejor visualización, los valores se graficaron como el inverso de EC50, lo que indica que, a mayor valor, mayor potencia del ligando para ese hibridoma particular. El objetivo de este análisis

fue identificar ligandos capaces de inducir una respuesta potente y además que la potencia de la respuesta fuera mayor al ser presentados en el contexto de hCD1d versus mCD1d. Según los análisis estadísticos, sólo se encontraron diferencias significativas en el hibridoma K3C10: para el ligando AH17-4, el cual tuvo una mayor potencia de respuesta al ser presentado por hCD1d, y para AH17-8, cuya respuesta fue más potente al ser presentados por mCD1d. Esta tendencia se mantiene en los demás hibridomas, pero no alcanza significancia estadística. Para los demás ligandos tampoco se observan diferencias significativas en cuanto a la presentación en hCD1d versus mCD1d, por lo que no se puede concluir a partir de este análisis si existen ligandos capaces de inducir una respuesta cuya potencia se vea favorecida en el contexto de hCD1d, además de AH17-4. Por otro lado, también se consideró en el análisis estadístico comparar la potencia de la respuesta de cada compuesto versus el resto de los ligandos en cada hibridoma. En hCD1d no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los ligandos en los hibridomas evaluados, sin embargo, en contexto de mCD1d se evidenció que AH17-4 fue el ligando menos potente en los clones K2G7, K3C10 y B2G5. A pesar de que AH17-4 posee una presentación preferencial en contexto de hCD1d, la magnitud de la respuesta de IL-2 es menor a los otros ligandos evaluados. Por el contrario, AH17-5 y AH17-6 se perfilaron como ligandos capaces de producir una respuesta más potente tanto en hCD1d como en mCD1d.

A partir de estas observaciones preliminares, se puede concluir que la adición del grupo fluorofenilo en la cadena esfingosina disminuye drásticamente la actividad de los ligandos AH17-1, AH17-2 y AH17-3, siendo reestablecida levemente por la adición del hidroxilo en C'4 en AH17-4. Por otro lado, la adición del grupo aromático en C''6 confiere una potencia igual o superior a la de α GalCer, particularmente en los ligandos AH17-5 y AH17-6. Esto también destaca la importancia del grupo hidroxilo en C'4 para la actividad de los ligandos derivados de α GalCer, dada la mayor potencia de respuesta de los ligandos AH17-5 y AH17-6 sobre sus contrapartes AH17-7 y AH17-8.

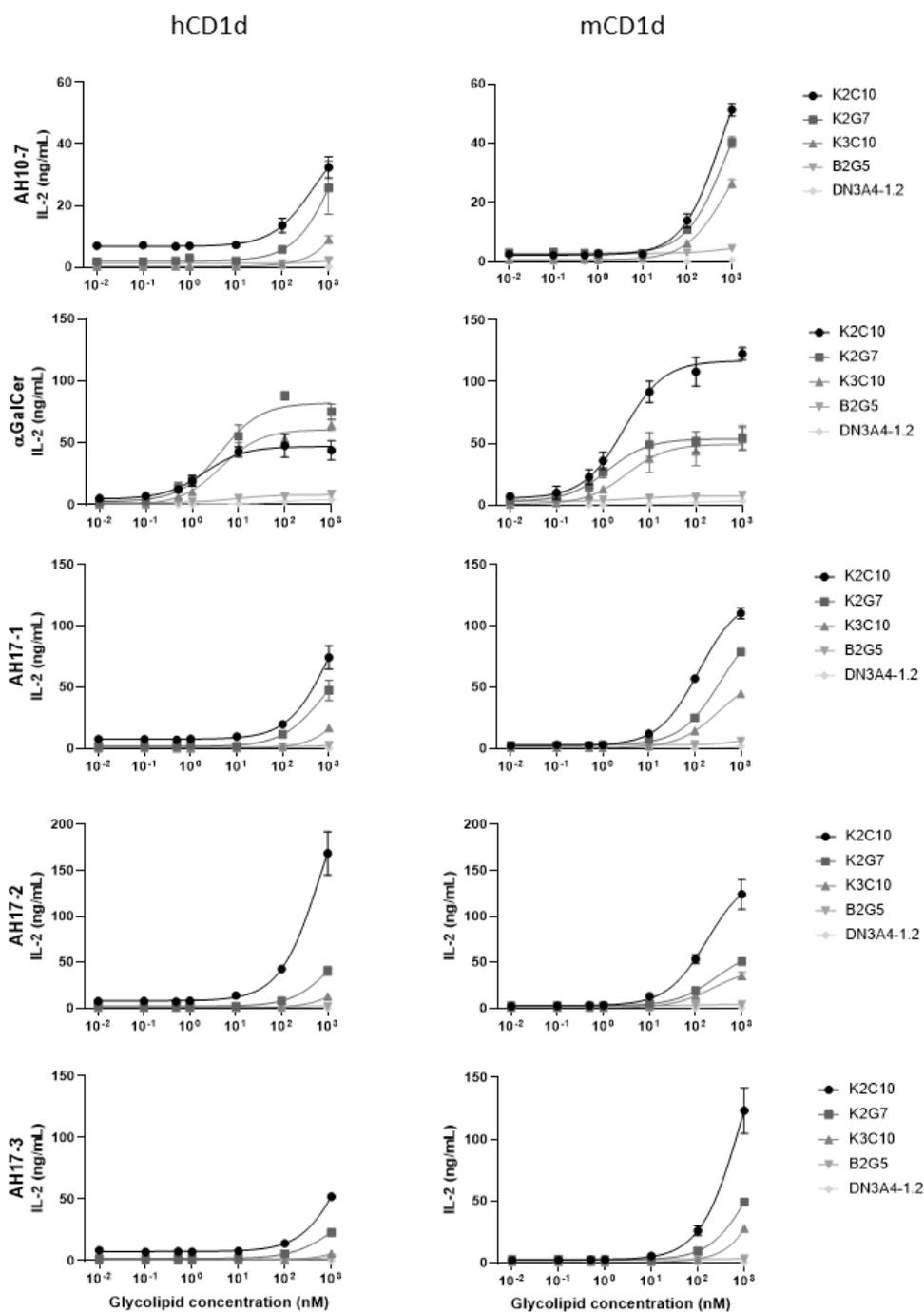


Figura 4. Curvas dosis-respuesta de poblaciones monoclonales de hibridomas de células iNKT hCD1d-KI frente al estímulo con ligandos derivados de α GalCer. *Continúa en la siguiente página.*

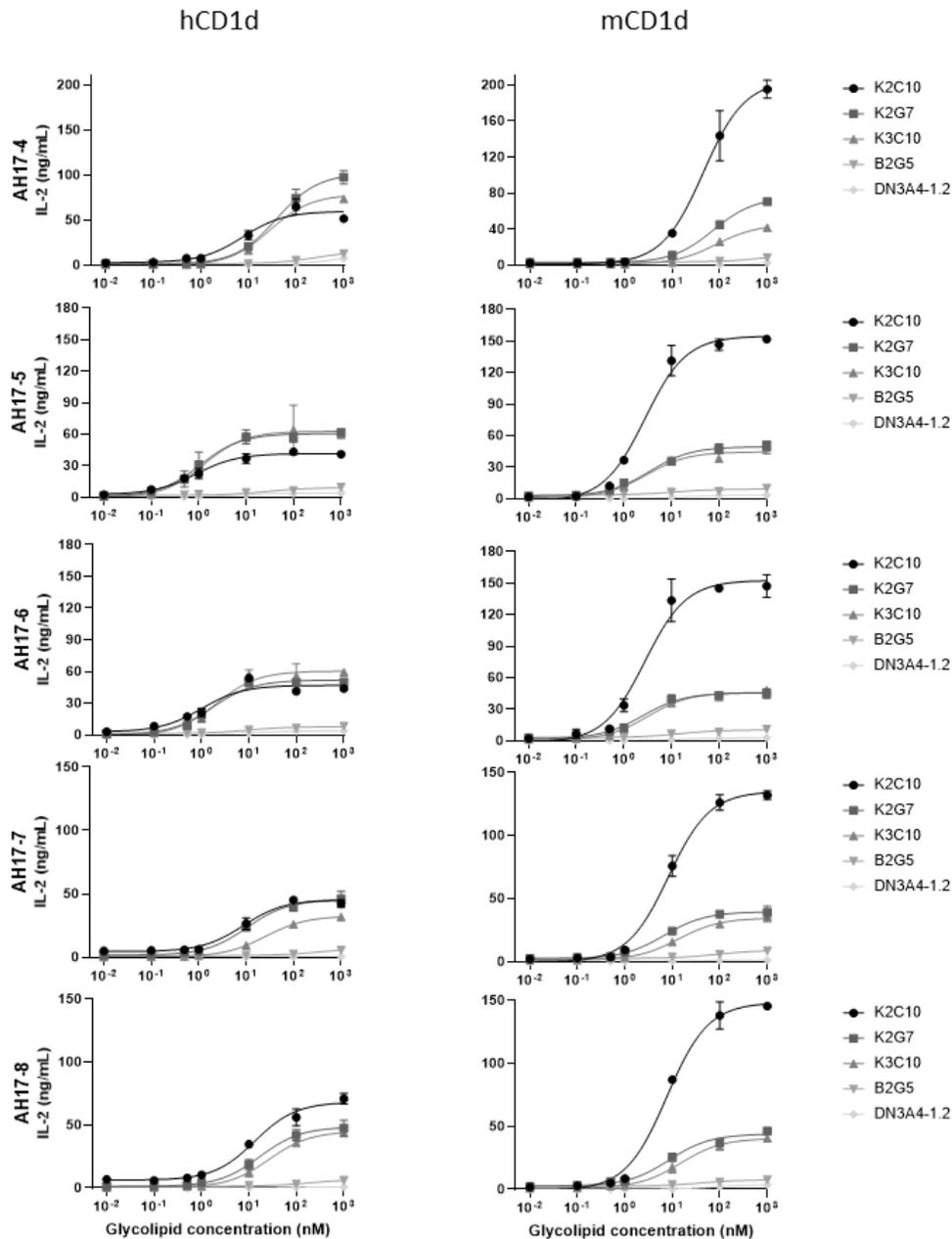


Figura 4. Curvas dosis-respuesta de poblaciones monoclonales de hibridomas de células iNKT hCD1d-KI frente al estímulo con ligandos derivados de α GalCer. Se generaron curvas dosis-respuesta para una selección de hibridomas monoclonales que presentaban diversos niveles de respuesta a α GalCer. Los hibridomas monoclonales de iNKT fueron co-cultivados con BMDC derivadas de ratones hCD1d-KI (hCD1d) y WT (mCD1d), previamente pulsadas con los glicolípidos correspondientes en las concentraciones indicadas. Luego de 24 horas de estímulo, se determinaron los niveles de secreción de IL-2 en el sobrenadante mediante ELISA. Los datos fueron ajustados a un modelo de curva dosis/respuesta de 3 parámetros en el programa GraphPad Prism.

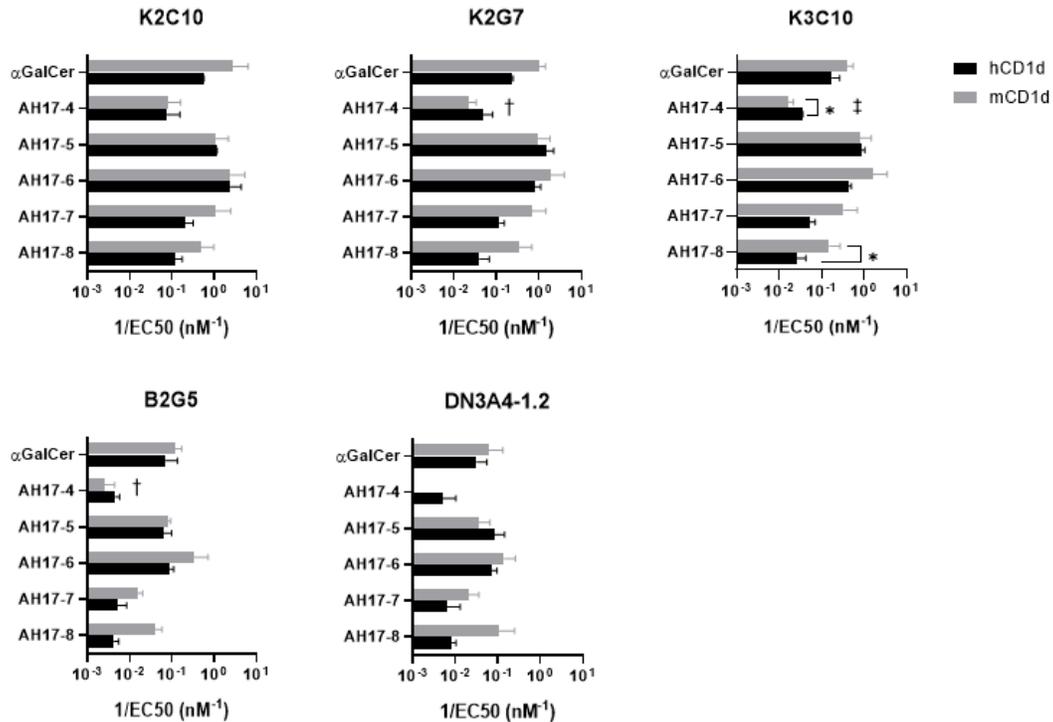


Figura 5. Cálculo de EC50 a partir de las curvas dosis respuesta generadas para cada ligando glicolípídico. A partir de las curvas dosis-respuesta de glicolípidos que alcanzaron a llegar a una meseta de secreción máxima de IL-2, se calcularon los parámetros de EC50 mediante transformación de datos y regresión en el programa GraphPad Prism. Para evaluar diferencias en la potencia de cada ligando al ser presentado en contexto de hCD1d versus mCD1d se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con post test de Sidak (* p<0,05). Para comparar la potencia entre ligandos presentados en contexto hCD1d o mCD1d en cada hibridoma se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías con post test de Tukey († p<0,05; ‡ p<0,01).

5.3. Caracterización del perfil de citoquinas inducido por ligandos derivados de α GalCer *in vivo*.

Para determinar el tipo de respuesta de citoquinas que inducen los ligandos derivados de α GalCer previamente evaluados en los ensayos *in vitro*, se realizó un experimento *in vivo* en el cual se inyectaron 4 nanomoles de glicolípido por vía intraperitoneal (i.p.) a ratones C57BL/6. Para este ensayo, consideramos evaluar los ligandos que habían demostrado una respuesta potente en los ensayos *in vitro* anteriormente descritos, tales como AH17-5, AH17-6 y AH17-8. Dentro de la serie AH17, también se incluyeron AH17-1 y su análogo AH17-4, los cuales indujeron una respuesta menos potente *in vitro*, para evaluar si esto también se replicaba *in vivo*. Adicionalmente se incluyó AH10-7 por ser un ligando previamente estudiado por nuestros colaboradores, quienes describieron su capacidad de inducir potentes respuestas de tipo Th1 *in vivo*, y el ligando OCH ya que previamente se ha descrito su capacidad de inducir *in vivo* una respuesta de tipo Th2 (Sullivan, Nagarajan et al. 2010).

Luego de 72 horas posteriores a la inyección, se realizó la extracción de esplenocitos de los animales tratados para la evaluación de producción de citoquinas mediante tinción intracelular y citometría de flujo, dado que se ha determinado previamente que transcurrido ese tiempo es cuando se observa una mayor proliferación de células iNKT *in vivo* (Sieling, Chatterjee et al. 1995). Los esplenocitos fueron tratados con Brefeldina A y Monensina A durante 1 hora a 37°C con 5% de CO₂; durante las 4 horas siguientes el cultivo se realizó en presencia de PMA y Ionomicina, o vehículo como control. Mediante citometría de flujo, las células iNKT se definieron como la población positiva para tetrámetro CD1d- α GalCer y para TCR- β dentro del *gate* de células B220 negativas, para excluir linfocitos B presentes en el bazo. A partir del análisis de estos parámetros, se observó que la frecuencia de las células iNKT aumenta significativamente al cabo de 72 horas de la inyección i.p. de α GalCer, AH17-6 y AH17-8 ($p < 0,05$) y en mayor medida luego de la inyección de AH10-7 y AH17-5 ($p < 0,001$). OCH, AH17-1 y AH17-4 no demostraron inducir una proliferación significativamente mayor al vehículo ([Figura 6](#)).

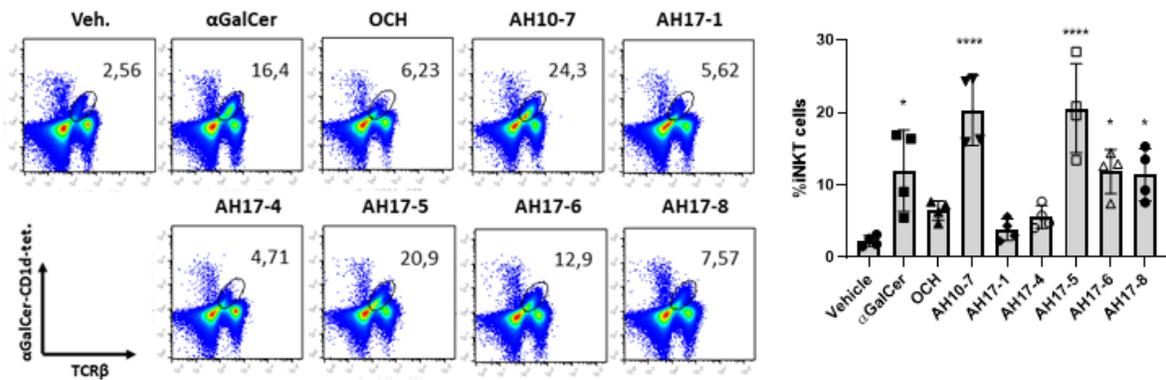


Figura 6. Ligandos derivados de α GalCer inducen diferentes niveles de proliferación de células iNKT *in vivo*. Se inyectaron 4 nmol de los distintos glicolípidos en ratones C57BL/6 para evaluar la naturaleza de la respuesta inmune inducida por cada ligando. Luego de 72 horas posterior a la inyección, la proliferación de células iNKT inducida por los ligandos fue determinada mediante citometría de flujo al evaluar la frecuencia de células TCR- β^+ y reactivas a tetrámero. N = 4 (animales por grupo). Se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía con post test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Adicionalmente, se evaluó la producción de IL-4 en la población de células iNKT y se determinó que los glicolípidos AH10-7 y AH17-6 son capaces de inducir niveles de producción de IL-4 que son significativos en comparación al vehículo ($p < 0,001$ y $p < 0,05$ respectivamente), luego de 72 horas desde la inyección i.p., evidenciado tanto por la frecuencia como por la intensidad de fluorescencia media (MFI) en las células iNKT productoras de IL-4 ([Figura 7A](#)).

En cuanto a la producción de IFN- γ por las células iNKT, se observa una inducción significativa ante el tratamiento con α GalCer, AH10-7 ($p < 0,0001$), AH17-6 ($p < 0,001$) y AH17-5 ($p < 0,05$) según la frecuencia de células positivas para IFN- γ . La misma tendencia se encuentra al realizar el análisis de MFI con la diferencia de que el efecto de AH17-5 deja de ser estadísticamente significativo ([Figura 7B](#)).

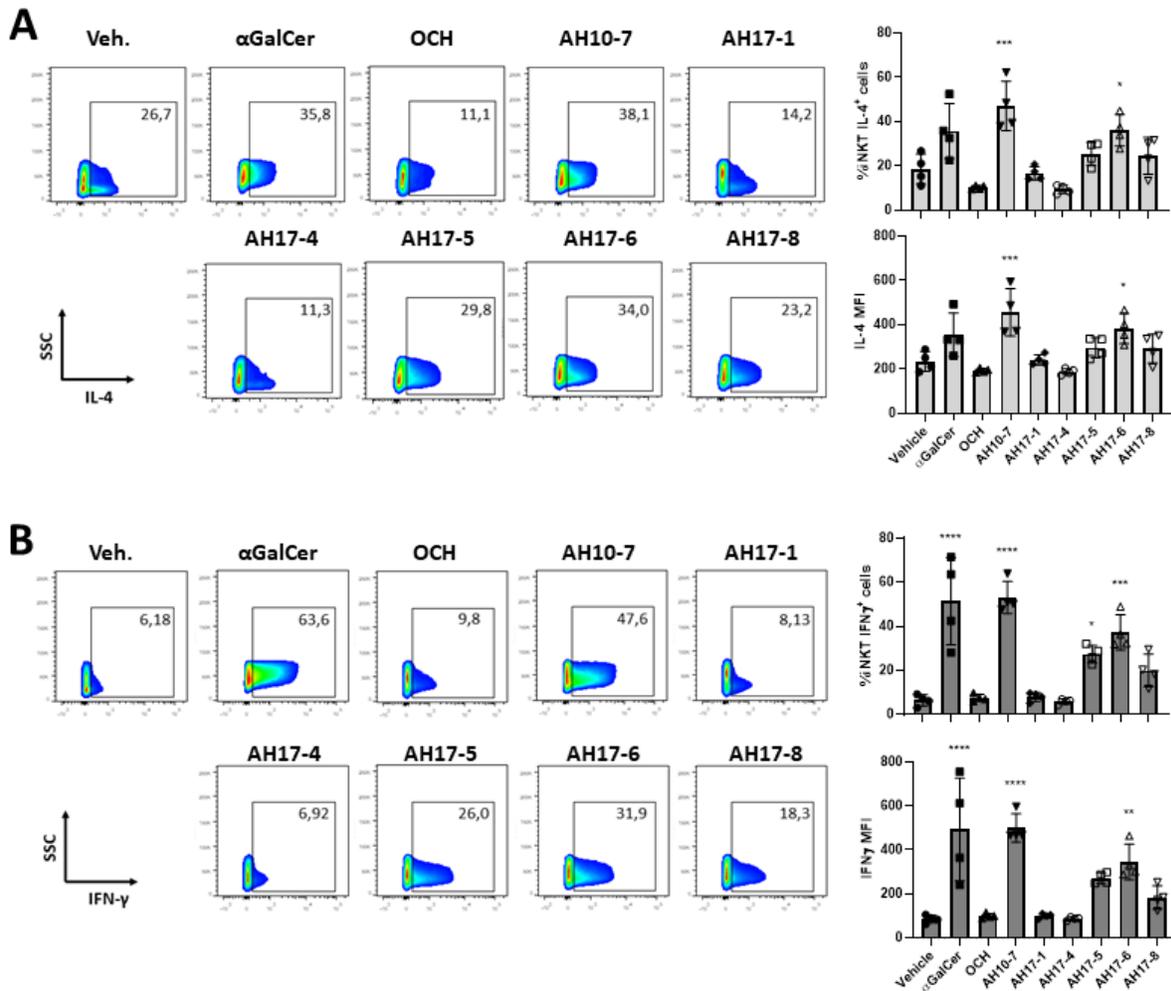


Figura 7. Ligandos derivados de α GalCer inducen producción diferencial de IL-4 e IFN- γ por células iNKT expandidas *in vivo* en ratones *wild-type*. Se inyectaron 4 nmol de los distintos glicolípidos en ratones C57BL/6 para evaluar la naturaleza de la respuesta inmune inducida por cada ligando. Luego de 72 horas posterior a la inyección, se evaluó la producción de **(A)** IL-4 e **(B)** IFN- γ por las células iNKT mediante tinción intracelular con anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromo, evaluados por citometría de flujo, previo tratamiento de los esplenocitos con PMA, ionomicina, Brefeldina A y Monensina A. N = 4 (animales por grupo). Se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía con post test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Mediante ELISA, se evaluó la secreción de IL-4 e IFN- γ en suero luego de 2 y 24 horas posteriores a la inyección, respectivamente. Este ensayo tiene como característica que, a diferencia de la citometría de flujo, considera la secreción de citoquinas por parte de todos los componentes celulares de la respuesta inmune periférica, lo que permite observar un panorama más global en cuanto al perfil efector que se induce. Se evidenció por este método que el ligando AH10-7 es capaz de inducir una secreción significativa de IL-4 en comparación al vehículo ($p < 0,0001$) seguido por AH17-5 ($p < 0,01$), α GalCer y OCH ($p < 0,05$). En cuanto a la secreción de IFN- γ , el ligando AH10-7 también es capaz de inducir una producción significativamente mayor de esta citoquina ($p < 0,0001$) seguido por α GalCer y AH17-6 ($p < 0,01$) y finalmente AH17-5 ($p < 0,05$) ([Figura 8](#), arriba).

Mediante el cálculo de la relación IFN- γ /IL-4 se puede establecer cuáles ligandos inducen una respuesta de tipo Th1. α GalCer se considera como un ligando de tipo Th0, por lo tanto, se utilizó esa relación como referencia para los otros compuestos. A partir de este parámetro, se puede concluir que sólo los ligandos AH17-6 y AH17-8 presentan un perfil similar de respuesta de tipo Th1. Los ligandos OCH, AH17-1 y AH17-4 podrían considerarse de tipo Th2 ya que se observaron niveles cercanos al límite de detección de IFN- γ luego de la inyección con estos glicolípidos, mientras que AH17-5 y AH10-7, en nuestros análisis, se comporta como ligando de tipo Th0 ([Figura 8](#), abajo).

Al comparar con la bioactividad demostrada por estos ligandos *in vitro*, destaca particularmente el ligando AH10-7, ya que induce una potente respuesta *in vivo* sin embargo esto no se observó en ensayos de estimulación *in vitro*. Por el contrario, AH17-6 es un ligando capaz de inducir una respuesta potente tanto *in vivo* como *in vitro*. Al comparar los ligandos AH17-6 y AH17-8, cuya única diferencia estructural corresponde al grupo hidroxilo en el C'4 de la cadena esfingosina presente en AH17-6 pero no en AH17-8, se evidenció que ambos ligandos son capaces de inducir un perfil de tipo Th1, sin embargo, por la producción de IFN- γ se observa una respuesta más potente con la inyección de AH17-6. Esto indicaría que el grupo hidroxilo en C'4 marca una diferencia en la potencia de la respuesta de citoquinas, a pesar de que pueda influir en una mayor producción de IL-4 debido a la característica polar que le confiere al ligando (Arora, Kharkwal et al. 2016).

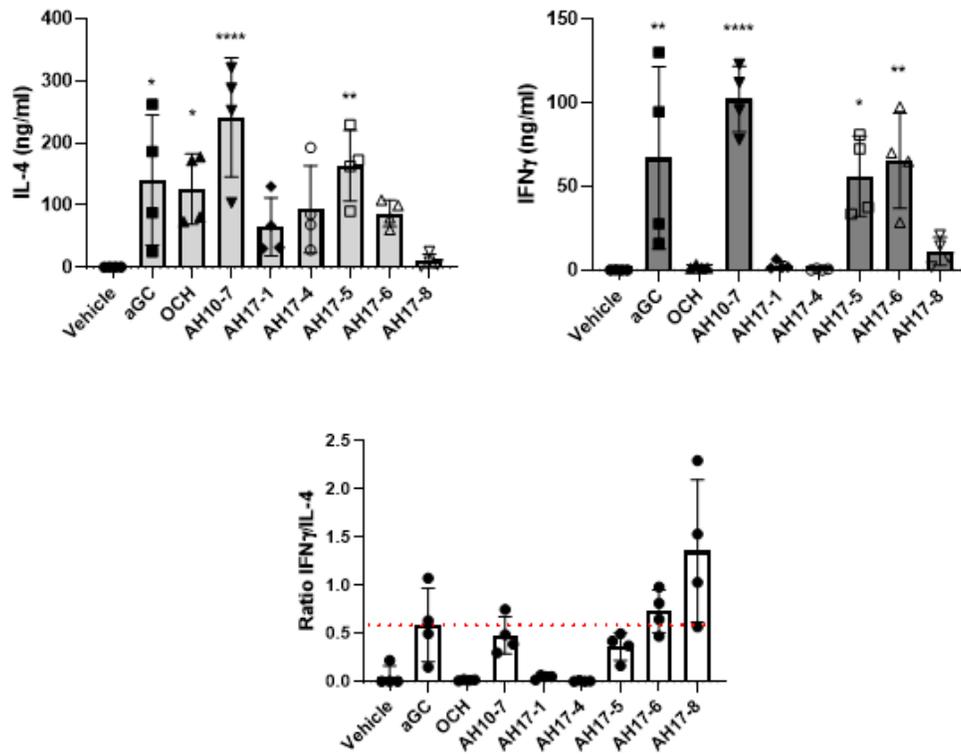


Figura 8. Ligandos derivados de α GalCer inducen secreción diferencial de IL-4 e IFN- γ en suero de ratones *wild-type*. Se inyectaron 4 nmol de los distintos glicolípidos en ratones C57BL/6 para evaluar la naturaleza de la respuesta inmune inducida por cada ligando. La secreción de IL-4 e IFN- γ en suero fue evaluada mediante ELISA luego de 24 y 48 horas, respectivamente. Se determinó la razón entre la producción de IFN- γ e IL-4 para diferenciar los perfiles de activación de tipo Th1 o tipo Th2. N = 4 (animales por grupo). Se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía con post test de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

5.4. Caracterización de los clonotipos de células iNKT expandidas *in vivo* luego del tratamiento con α GalCer, AH17-6 y AH17-8

A pesar de que las células iNKT poseen un TCR semi-invariante, se ha propuesto que la influencia de la cadena V β puede ser importante en el reconocimiento de antígeno y en la naturaleza de la respuesta inducida por éste (Tuttle, Krovi et al. 2018). Por lo tanto, en este proyecto se propuso evaluar la frecuencia de uso de las cadenas V α -V β en células iNKT expandidas *in vivo* luego de la estimulación con ligandos derivados de α GalCer que indujeron respuestas potentes en los ensayos anteriores. Por su similitud estructural, escogimos evaluar la expansión de clonotipos de células iNKT en respuesta a la inyección con AH17-6 y AH17-8, incluyendo el ligando α GalCer para comparación. Se estandarizó un protocolo de expansión de células iNKT en ratones hCD1d-KI, mediante inyección intraperitoneal de los ligandos anteriormente mencionados. Luego de 72 horas, los esplenocitos fueron recolectados y sometidos a tinción con anticuerpos de superficie y tetrámetro CD1d- α GalCer para detectar la población de células iNKT (B220-TCR- β^+ tetrámero CD1d- α GalCer $^+$). Esta población fue enriquecida mediante *sorting* celular por fluorescencia activada (FACS). En general para todos los tratamientos se obtuvo una cantidad de 10.000 a 20.000 células, las cuales fueron lisadas y utilizadas directamente como templado para la síntesis de cDNA con el kit de perfilamiento de TCR, SMARTer Mouse TCR α/β de Takara (Clontech). En este kit también se encuentran los componentes necesarios para realizar las reacciones de PCR que amplifican el templado y que añaden los *tags* de Illumina necesarios para realizar la secuenciación de las cadenas completas de TCR α/β mediante Secuenciación de Nueva Generación (NGS).

En base a este experimento, la determinación de la secuencia de la cadena de TCR de las poblaciones de células iNKT expandidas *in vivo* demostró que la mayoría de las células expresan la cadena TRAV11D-TRAJ18 o V α 14-J α 18, tal como era esperado para la población de células iNKT (datos no mostrados). En cuanto al uso de cadenas β , se observa una gran diversidad de clonotipos de células iNKT expandidos luego de la inyección de los glicolípidos ([Figura 9](#)). Para los animales tratados con α GalCer, se evidencia un uso más frecuente del re-arreglo TRBV13-2-TRBJ2-7 (12,79%), mientras que para los animales tratados con AH17-6 y AH17-8, el clonotipo más frecuentemente identificado corresponde a TRBV13-2-TRBJ1-2 (13,76 y 17,92% respectivamente). Al considerar el uso total de los segmentos J independientemente de su apareamiento con el segmento V, se observa que TRBJ1-2 es expresado de forma más frecuente en las células iNKT bajo cualquier tratamiento. Por otro lado, en cuanto al uso del segmento V, la mayoría de las células iNKT evidencian la expresión de TRBV13-2, también denominado β 8.2 (~60% en todos los tratamientos)

y, en segundo lugar, de TRBV29 ó $\beta 7$ (~20% en todos los tratamientos), las cuales son expresadas en la mayoría de las células iNKT del ratón C57BL/6 según se ha reportado previamente (Wun, Cameron et al. 2011).

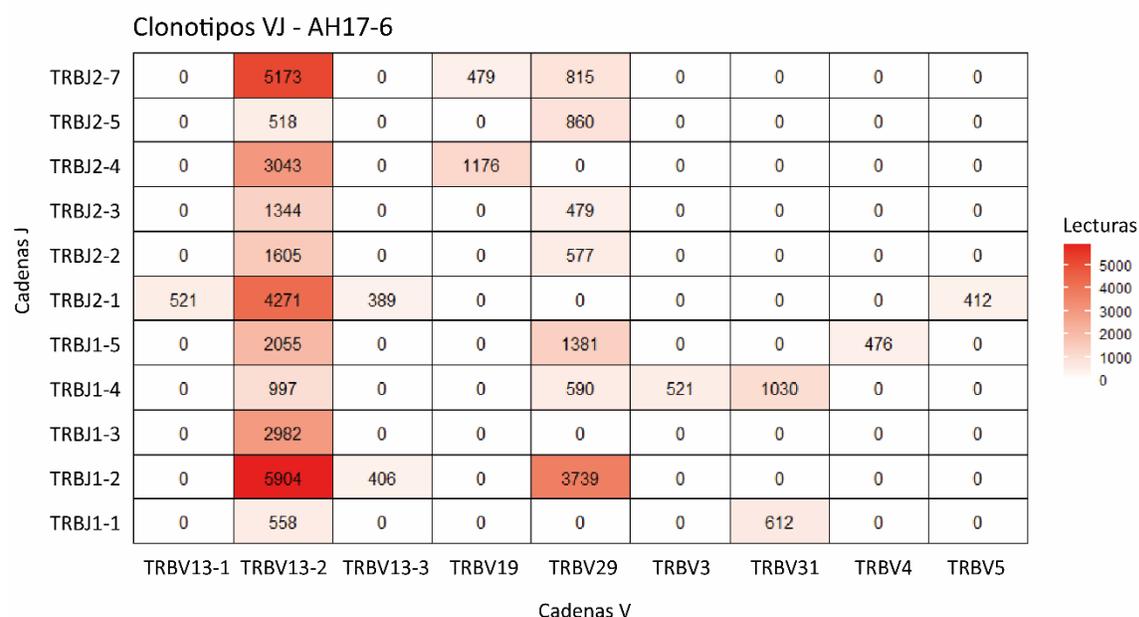
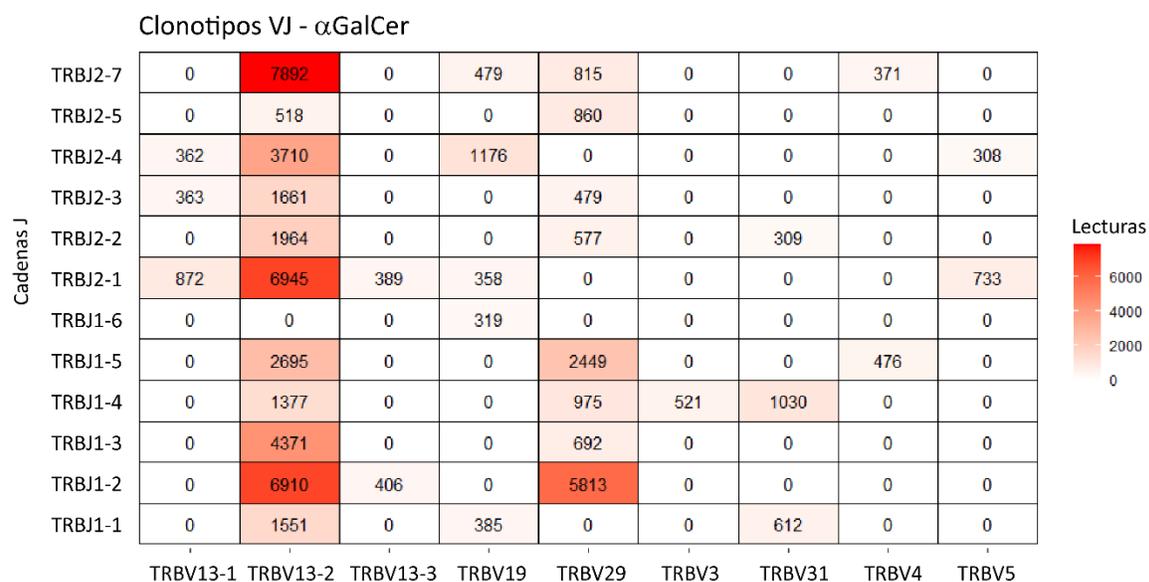


Figura 9. Clonotipos de TCR de células iNKT expandidas luego de la inyección con ligandos derivados de α GalCer en ratones hCD1d-KI. (Continúa en la siguiente página)

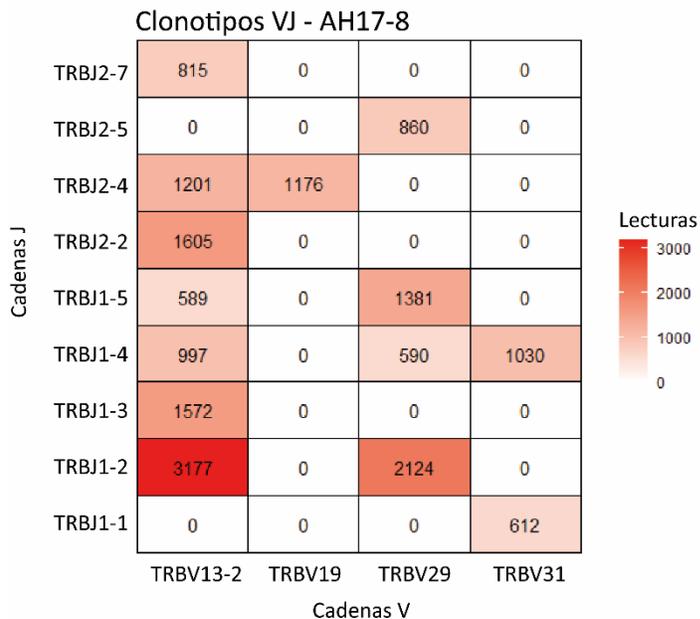


Figura 9. Clonotipos de TCR de células iNKT expandidas luego de la inyección con ligandos derivados de α GalCer en ratones hCD1d-KI. Luego de 72 horas posterior a la inyección de glicolípidos en ratones hCD1-KI, esplenocitos fueron recolectados y las células iNKT fueron aisladas mediante *sorting* celular. Las librerías fueron generadas con el kit de perfilamiento TCR α/β SMARTer Profiling Kit y secuenciadas en un equipo Illumina MiSeq utilizando el kit de 600 ciclos, MiSeq Reagent Kit v3. Los datos fueron analizados usando el paquete de software MiXCR para ensamblaje de clonotipos.

Dentro de las regiones determinantes de complementariedad (CDR por sus siglas en inglés), el loop CDR3 β es la única región hipervariable en el TCR de las células iNKT (Matulis, Sanderson et al. 2010). A partir de los logos de secuencia del segmento CDR3 β ([Figura 10A](#)), se observa la expansión de una población más diversa en cuanto a secuencia aminoacídica luego del tratamiento con α GalCer y AH17-6, comparado con la región de CDR3 β con menor variabilidad que se observa en clonotipos expandidos por el tratamiento con AH17-8. Por lo tanto, a partir de esta observación se puede postular que AH17-8 induce la expansión de una menor cantidad de células iNKT (debido a que la cantidad de lecturas también fue menor, como se ve en la [Figura 9](#)) y además es un ligando más selectivo. Posiblemente, el grupo hidroxilo en C'4 genera una interacción importante con la molécula hCD1d y/o con el TCR de ratón, por lo que su ausencia genera una menor bioactividad por parte de AH17-8 al ser reconocido por un menor repertorio de TCR, o al generar interacciones más débiles.

Al analizar la composición aminoacídica de las secuencias CDR3 β con cada tratamiento ([Figura 10B](#)), se encuentra que con α GalCer los CDR3 β de los clonotipos expandidos poseen en promedio un punto isoeléctrico más bajo que con AH17-8, probablemente por la mayor presencia de residuos de ácido glutámico en los clonotipos expandidos por α GalCer. Adicionalmente, en comparación con α GalCer, en los clonotipos expandidos por AH17-6 se encontró una mayor frecuencia de aminoácidos polares. La importancia de la composición aminoacídica de las secuencias de CDR3 β aún es materia de estudio, pero se postula que puede tener una relación indirecta con el reconocimiento preferencial de ligandos con modificaciones químicas específicas.

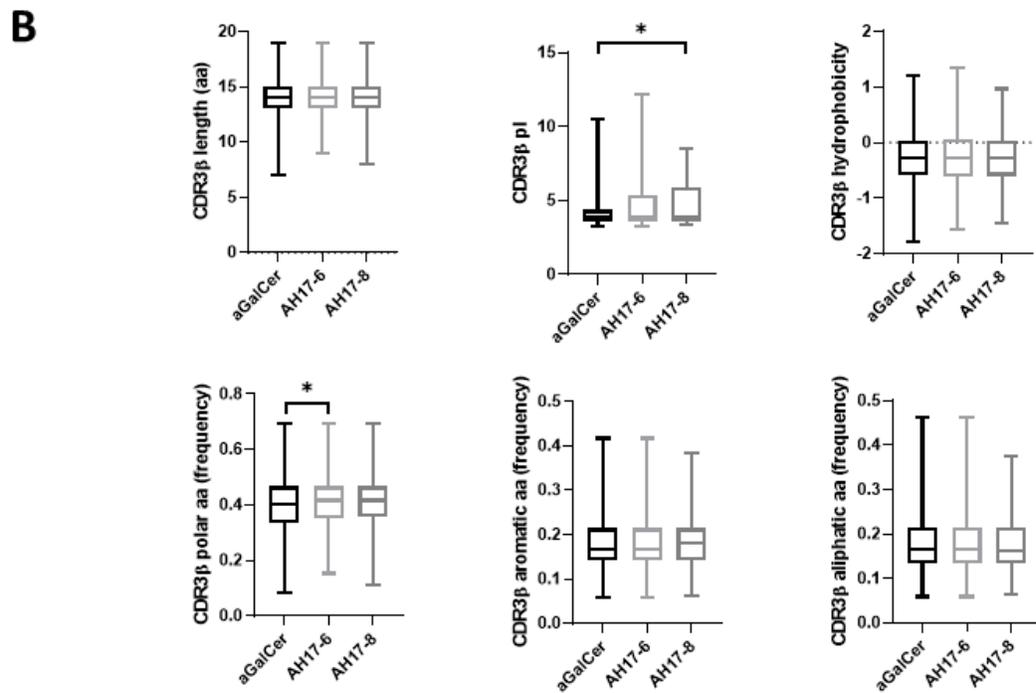
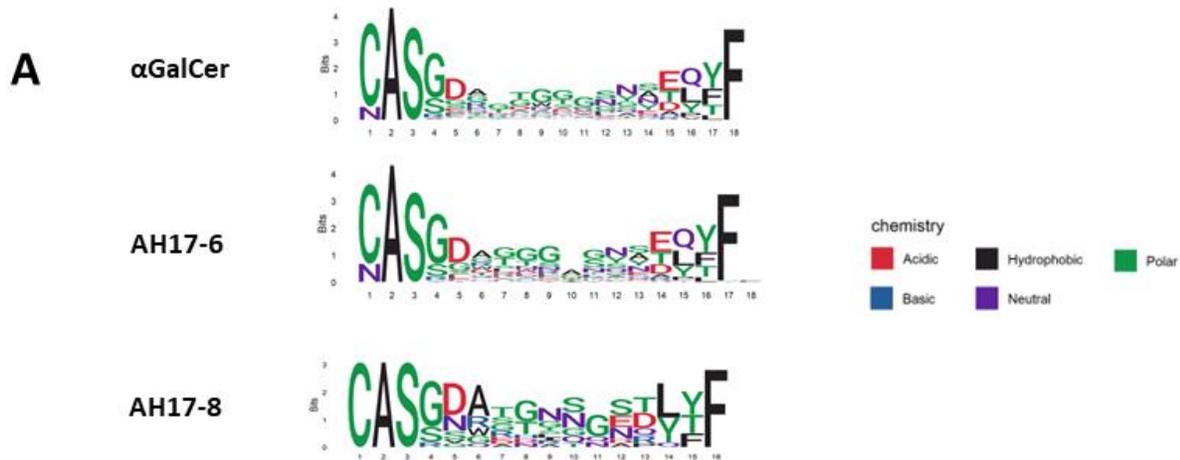


Figura 10. Análisis de la región CDR3β de los TCR de células iNKT expandidas luego de la inyección con ligandos derivados de αGalCer en ratones hCD1d-KI. (A) Logoplots para la región CDR3β de los clonotipos expandidos fueron calculados utilizando el paquete ggplot2 en R. (B) Las propiedades físicoquímicas correspondientes a la región CDR3β de los clonotipos expandidos fueron calculadas utilizando el programa B repertoire. N = 1 (RNA proveniente de 2 animales por tratamiento). Kruskal-Wallis test. * p < 0.05

5.5. Análisis estructural de las cadenas de TCR α/β e influencia en el reconocimiento de ligandos modificados de α GalCer

Para evaluar cómo se relaciona la estructura del TCR de las células iNKT y la bioactividad y potencia de ligandos con diversas modificaciones estructurales, se determinaron las secuencias de TCR expresados por hibridomas evaluados previamente en las [Figuras 4 y 5](#). Se realizó la determinación de secuencias mediante NGS en hibridomas monoclonales ([Tabla 1](#)), con el kit de perfilamiento TCR α/β SMARTer tal como se indicó previamente. La mayor disponibilidad de células de estas líneas inmortalizadas permitió obtener una cantidad de RNA apropiada para extraer y preparar el cDNA desde este templado. Se encontró que todos los clones analizados expresaban la secuencia variable TCR $V\beta 8.2$, con algunas diferencias en el segmento de unión TRBVJ. Particularmente, se observó que los tres clones provenientes de ratón WT analizados comparten el segmento J2-4, mientras que los clones provenientes de ratón hCD1d-KI se dividen en aquellos que expresan el segmento J1-5 y los que expresan J1-3. Dado que es la cadena TCR- α la que interactúa directamente con el ligando glicolípido, no se conoce cuál es la posible influencia de la cadena $V\beta$ y mucho menos del segmento J β en el reconocimiento del ligando por parte de las células iNKT. Se ha propuesto previamente en la literatura que la cadena β podría influenciar indirectamente la unión con el ligando mediante la modificación de la estructura terciaria del TCR de las células iNKT, pero hasta ahora eso no ha sido comprobado.

Tabla 1. Secuencias de TCR de hibridomas monoclonales derivados de ratón hC1d KI y WT.

| Clon | Cepa de origen | TCR α | TCR $V\beta$ | TCR J β | CDR3 β |
|--------------|----------------|-------------------------|--------------|---------------|------------------|
| K2C10 | hCD1d-KI | $V\alpha 14-J\alpha 18$ | $V\beta 8.2$ | J1-5 | CASGGGAGNQAPLF |
| K2G7 | hCD1d-KI | $V\alpha 14-J\alpha 18$ | $V\beta 8.2$ | J1-5 | CASGGGAGNQAPLF |
| K3C10 | hCD1d-KI | $V\alpha 14-J\alpha 18$ | $V\beta 8.2$ | J1-5 | CASGGGAGNQAPLF |
| K4E6 | hCD1d-KI | $V\alpha 14-J\alpha 18$ | $V\beta 8.2$ | J1-5 | CASGGGAGNQAPLF |
| K2B3 | hCD1d-KI | $V\alpha 14-J\alpha 18$ | $V\beta 8.2$ | J1-3 | CASGDGTGNTLYF |
| K2H7 | hCD1d-KI | $V\alpha 14-J\alpha 18$ | $V\beta 8.2$ | J1-3 | CASGDGTGNTLYF |
| B1E1 | WT | $V\alpha 14-J\alpha 18$ | $V\beta 8.2$ | J2-4 | CASGDMGGQSQNTLYF |
| B2A8 | WT | $V\alpha 14-J\alpha 18$ | $V\beta 8.2$ | J2-4 | CASGDMGGQSQNTLYF |
| B2G5 | WT | $V\alpha 14-J\alpha 18$ | $V\beta 8.2$ | J2-4 | CASGDMGGQSQNTLYF |

Por otro lado, en los ensayos funcionales con los hibridomas de células iNKT, se observaron diferencias en la potencia con la que los clones podían responder a las concentraciones máximas de ligandos, evidenciando una diferencia intrínseca e individual de cada hibridoma monoclonal. Para evaluar si esta diferencia podría estar fundamentada en el cambio en composición aminoacídica del segmento CDR3 β se propuso establecer modelos de los TCR evaluados mediante herramientas bioinformáticas como el modelamiento molecular de las secuencias determinadas en estos hibridomas de células iNKT. Este modelamiento se basó en la homología de las secuencias con estructuras previamente cristalizadas y conocidas, mediante el protocolo RosettaTCR Model ([Figura 11](#)). Se escogieron las secuencias más completas de un clon representativo para cada grupo que comparte expresión del segmento J. Luego de que se obtuvieron modelos estables, se procedió a realizar un análisis de *docking* de ligandos y dinámica molecular para establecer la conformación más probable y de menor energía que adquieren los ligandos en el sitio de unión de las moléculas hCD1d y mCD1d en contacto con los tres modelos de TCR evaluados. En la [Figura 12](#) se muestran las figuras representativas de estos análisis de dinámica molecular. Una de las características observadas que ya se había descrito previamente en literatura, es que hay ciertos residuos no conservados entre hCD1d y mCD1d. Particularmente, en hCD1d hay un residuo de triptófano (W153/160) en el lugar de un residuo de glicina en mCD1d (G155). Esta sustitución parece ser importante en la conformación que adopta el ligando en la molécula CD1d, ya que en mCD1d se observa que el grupo aromático en la cabeza galactosil, modificación que comparten AH17-6 y AH17-8, se encuentra preferentemente inclinado hacia la molécula mCD1d, mientras que en el contexto de hCD1d este grupo aromático se encuentra plegado hacia el solvente, posiblemente por el impedimento estérico que ejerce el residuo de triptófano. Se desconoce que implicancia pueda tener esta sustitución en el reconocimiento del ligando en un contexto humano o de ratón, pero un impedimento estérico y un cambio en el ángulo del grupo galactosil que es reconocido por el TCR de las células iNKT podría explicar una menor bioactividad de los ligandos con este grupo aromático en hibridomas del ratón hCD1d KI versus WT ([Figuras 4 y 5](#)).

En cuanto al efecto de las diferencias estructurales entre ambos ligandos, como se mencionó anteriormente, la única diferencia entre AH17-6 y AH17-8 es que en este último se eliminó el grupo hidroxilo en C'4 de la cadena esfingosina. Como se había propuesto, estos hidroxilos vecinales (que están presentes en el ligando original, α GalCer) son importantes en la interacción con residuos de aspartato D80 y D151/153, los cuales se encuentran conservados entre hCD1d y

mCD1d. Esto podría explicar que la bioactividad de AH17-8 sea menor que la de AH17-6 en ambos sistemas, ya que presumiblemente la unión con el CD1d sería más débil.

Al comparar entre las distintas cadenas de TCR-J β evaluadas, se puede observar que efectivamente existen diferencias en cuanto a los residuos que interactúan de forma más directa con el ligando. A pesar de que la cadena TCR- α esté conservada en todos los clones evaluados, se evidencian diferencias en las interacciones moleculares relevantes de residuos presentes en la cadena TCR- α además de la cadena TCR- β . Particularmente para el ligando AH17-6, se observa que la cadena que más favorece interacciones con residuos es J1-5, ya que el ligando se encuentra interactuando directamente con residuos de asparagina del loop CDR2 α (N28 ^{α 1}) y del loop CDR3 β (N96 ^{β 3}) posiblemente a través de puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno del grupo galactosil. Un residuo de arginina en el loop CDR3 α (R92 ^{α 3}) se mantiene conservado en los tres TCR-J β evaluados y es relevante en la interacción con mCD1d, sin embargo, esta interacción directa se pierde al enfrentarse con hCD1d en TCR- β J2-4 y J1-5. En cuanto al reconocimiento del ligando AH17-8, aparentemente existe una presentación favorable en contexto de TCR- β J1-3, ya que se evidencia una mayor cantidad de interacciones con residuos del TCR al comparar con J1-5, por ejemplo, con el residuo de arginina en el loop CDR3 α (R92 ^{α 3}) además de la interacción con el residuo de asparagina del loop CDR2 α (N28 ^{α 1}) que se mantienen tanto en contacto con hCD1d como con mCD1d.

No se realizaron ensayos de medición directa de la afinidad entre el complejo TCR/CD1d-ligando, sin embargo, a partir de la determinación de estas dinámicas moleculares podemos concluir que la naturaleza del TCR- β sí puede influir en las interacciones predominantes tanto con CD1d como con el ligando, y que la naturaleza del ligando también puede influir en establecer interacciones más o menos estables con determinadas cadenas del TCR de células iNKT.

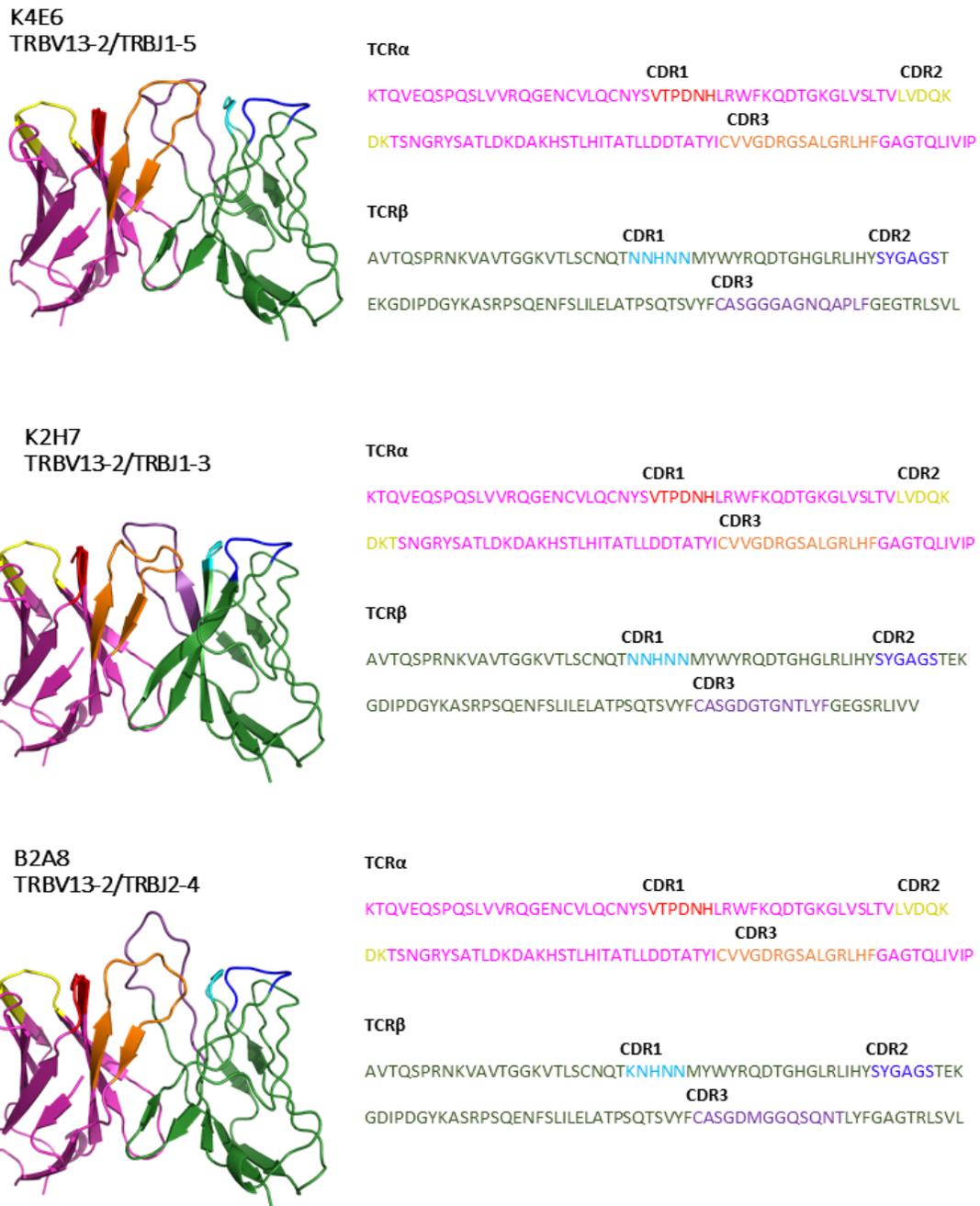


Figura 11. Modelamiento por homología de TCRs expresados por hibridomas monoclonales de células iNKT. Se realizó la secuenciación de las cadenas de TCR expresadas por los hibridomas monoclonales de células iNKT aislados de ratón WT y hCD1d-KI. A partir de las secuencias más frecuentes se realizó el modelamiento por homología de las estructuras terciarias de los receptores mediante el protocolo RosettaTCR Model.

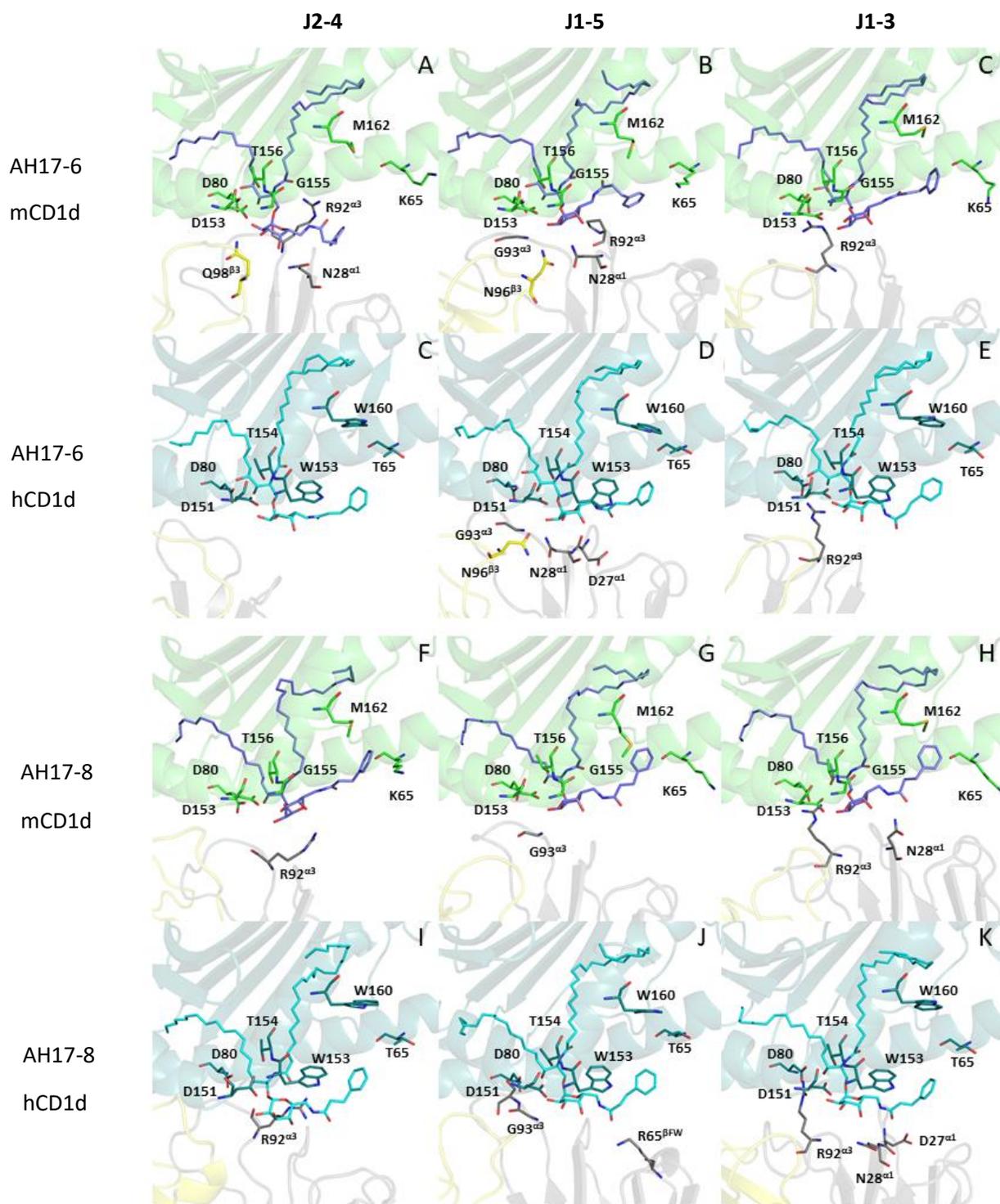


Figura 12. Docking de ligandos derivados de α GalCer en TCR expresados por hibridomas de células iNKT en contexto de hCD1d y mCD1d. A partir del modelamiento del TCR V β 8.2 J2-4 expresados en hibridomas de células iNKT derivados de ratón WT, y de TCRs V β 8.2 J1-5 y J1-3 expresados en los hibridomas de células iNKT de ratones hCD1d-KI se realizaron ensayos de docking molecular para evaluar la unión de los ligandos AH17-6 y AH17-8 al ser presentados a estos TCR en contexto de hCD1d y mCD1d.

6. Discusión

Una de las dificultades para el estudio de las respuestas de células iNKT se debe a que su baja frecuencia en el organismo complica la obtención de células para cultivo primario. Por ello, los ensayos con hibridomas derivados de células iNKT han surgido como una alternativa viable y conveniente para el *screening* de ligandos derivados de α GalCer y evaluación de su capacidad de activación de la respuesta de esta población celular con prometedoras proyecciones terapéuticas (Nyambayar, Iwabuchi et al. 2007). Una de las líneas de hibridomas más ampliamente utilizadas para el estudio de ligandos de células iNKT corresponde a DN3A4-1.2, sin embargo, la utilización de esta línea conlleva ciertas desventajas, tales como la baja producción de IL-2 que en algunos casos no permite evaluar la actividad de los ligandos con suficiente sensibilidad. La importancia de obtener hibridomas provenientes del ratón hCD1d KI radica en la necesidad de generar sistemas de estudio de las respuestas de células iNKT que permitan establecer conclusiones más aplicables en el ámbito clínico, dado que en el pasado diversos estudios con ligandos de células iNKT demostraron gran promesa terapéutica en modelos de ratón, sin embargo, fallaron en demostrar eficacia en ensayos clínicos con humanos (Zhang, Springfield et al. 2019). Se plantea que la utilización de hibridomas derivados de ratones hCD1d KI pueda evidenciar una respuesta más fidedigna a ligandos glicolipídicos que poseen una mayor bioactividad en el organismo humano, dado que dichos hibridomas se generan a partir de células iNKT que fueron seleccionadas en el timo gracias a la interacción con la molécula CD1d humana. En general, todos los hibridomas monoclonales estudiados provenientes del ratón hCD1d KI tuvieron una mayor activación con α GalCer que el hibridoma modelo, DN3A4-1.2, posicionándose como herramientas válidas y útiles para el estudio de la respuesta generada por glicolípidos en células iNKT, en un modelo más cercano a la clínica.

Un objetivo importante dentro del estudio de las células iNKT como blancos de inmunoterapia, es la generación de ligandos con modificaciones químicas que les confieran de la capacidad de inducir respuestas polarizadas de citoquinas. A pesar de ser el ligando prototipo de las células iNKT y de inducir una potente respuesta de citoquinas, α GalCer no ha presentado resultados prometedores en ensayos clínicos (Zhang, Springfield et al. 2019). Se postula que esto podría ser debido a que el perfil de citoquinas que induce este ligando presenta producción de citoquinas tanto antiinflamatorias como proinflamatorias, lo cual se designa como un perfil de “tipo Th0”. Se ha evidenciado que modificaciones químicas que confieren a estas moléculas de propiedades más hidrofílicas favorecen un perfil más antiinflamatorio o de tipo Th2, mientras que modificaciones que

favorecen las interacciones hidrofóbicas favorecen un perfil proinflamatorio o de tipo Th1 (Arora, Kharkwal et al. 2016). Esto es de especial relevancia si el objetivo es identificar ligandos que tengan un potencial terapéutico en patologías tales como enfermedades autoinmunes o cáncer, ya que se requiere de una respuesta inmune dirigida para que se evidencie efectividad a nivel clínico.

Otro aspecto importante dentro del estudio de las células iNKT y su perfeccionamiento como blancos farmacológicos, es el desarrollo de ligandos con una respuesta de mayor potencia, que permita utilizar cantidades menores de compuestos y por lo tanto reduzca la posibilidad de inducción de anergia a largo plazo, fenómeno ampliamente documentado respecto al uso de α GalCer *in vivo* (Sullivan and Kronenberg 2005). Por ello, en el presente estudio nos enfocamos en caracterizar los ligandos derivados de α GalCer en cuanto a su potencia tanto *in vitro* como *in vivo*, y en cuanto al perfil de citoquinas que son capaces de inducir *in vivo* y, a partir de estas observaciones, establecer conclusiones en cuanto a la importancia de las modificaciones químicas específicas en estos compuestos y su relación con el complejo TCR/CD1d-ligando.

Previamente, en estudios que evaluaron el potencial terapéutico del ligando AH10-7, se había evidenciado que la eliminación del grupo hidroxilo en el C'4 suponía una desventaja para el reconocimiento de ligandos en contexto de hCD1d, ya que este grupo funcional forma parte de una interacción importante con esta molécula. Sin embargo, al realizar una modificación en el C''6 que agrega un grupo éster fenilpropionato, se reestableció la potencia en el compuesto AH10-7 y se obtuvo una respuesta inmunológica asociada al perfil de tipo Th1 (Chennamadhavuni, Saavedra-Avila et al. 2018). Por lo anterior, nos propusimos evaluar la bioactividad y potencia de una nueva serie de ligandos que poseen una combinación de estas modificaciones: la presencia o ausencia del grupo hidroxilo en C'4, la adición de un grupo éster fenilpropionato o fenilacetato en C''6 del grupo galactosil, y la adición de un grupo fluorofenilo en la cadena del ácido carboxílico. Dado que los ligandos AH17-1, AH17-2 y AH17-3 que poseen la incorporación del grupo fluorofenilo indujeron bajos niveles de producción de IL-2 en los hibridomas de células iNKT, se determinó que esta modificación es perjudicial para la bioactividad de los ligandos. Posiblemente, la ausencia del grupo hidroxilo en C'4 también influye en la falta de actividad de estos ligandos, ya que en AH17-4 se evidencia una mayor bioactividad. Por ello, se postula que el grupo hidroxilo en C'4 es capaz de conferir una mayor potencia al ligando AH17-4 a pesar de presentar modificaciones perjudiciales como el grupo fluorofenilo. Entre los ligandos sin modificaciones en la cadena carboxilato, se encontró que los más potentes fueron AH17-5 y AH17-6, que poseen diferentes grupos en C''6 pero

comparten el grupo hidroxilo en C'4, confirmando la importancia de este grupo para la bioactividad. Sus análogos en cuanto al grupo éster en C"6, AH17-7 y AH17-8 respectivamente, que carecen del hidroxilo en C'4, poseen levemente menor potencia de la respuesta, pero el grupo éster que comparten parece ser favorable para su bioactividad ya que ésta no se ve significativamente disminuida. En cuanto a la naturaleza del grupo éster en C"6, no parece haber una diferencia relevante en la potencia si éste es fenilacetato o su análogo de cadena más larga, fenilpropionato. En los estudios *in vivo*, se postula que la cadena más larga del grupo fenilpropionato favorece un perfil de citoquinas inclinado al tipo Th1, como se evidencia en la respuesta de AH17-6 (Th1) versus AH17-5 (Th0), lo que se condice con lo observado ampliamente en la literatura respecto a la apolaridad de los sustituyentes y el favorecimiento de la respuesta tipo Th1 (Chennamadhavuni, Saavedra-Avila et al. 2018). Al complementar con los estudios estructurales, podemos concluir que el grupo hidroxilo en C'4 es importante para la actividad de los ligandos derivados de α GalCer debido a su interacción con el residuo conservado D151/153 en CD1d, e idealmente se debe compensar con sustituciones más apolares en posiciones donde no se interfiera con la unión al CD1d y/o TCR, para obtener un perfil de citoquinas inclinado hacia el tipo Th1.

En este proyecto se propuso utilizar el ratón parcialmente humanizado hCD1d KI como una alternativa viable para el estudio de las respuestas de las células iNKT en modelos preclínicos, ya que posee características que lo hacen más cercano al humano y por lo tanto las conclusiones que se generen de este trabajo pueden ser más aplicables a la clínica. Como se evidenció en este trabajo, el reconocimiento de ligandos por parte de hibridomas de células iNKT puede darse en contexto de hCD1d o mCD1d, sin embargo, existen diferencias estructurales entre ambas moléculas que pueden incidir en que esta interacción sea más o menos efectiva para la activación de las células iNKT. Actualmente se están proponiendo nuevos modelos de ratón parcialmente humanizados para el estudio de células iNKT. En una publicación reciente de nuestros colaboradores (Saavedra-Avila, Dellabona et al. 2022), se diseñó una nueva cepa de ratón que, además de presentar la modificación hCD1d KI, expresa la cadena TCR- α de las células iNKT humanas, la cual se asocia a una variedad de cadenas TCR- β de ratón, según sus observaciones. Los autores se refieren a esta nueva cepa como ratón V α KI. En este modelo, evidenciaron que una alta cantidad de linfocitos T expresaron el TCR α/β característico de las células iNKT y eran reactivas a tetrámero de CD1d/ α GalCer, sin embargo, sólo una reducida subpoblación presentaba características canónicas de células iNKT, como la expresión de NK1.1, CXCR6 y altos niveles del factor de transcripción PLZF. Una característica que comparte el ratón V α KI con el ratón hCD1d KI, es la reducción de la frecuencia de células iNKT en comparación

al ratón WT. Se propone que esto puede deberse a las diferencias en el tráfico endosomal que presenta hCD1d en comparación con mCD1d, lo que podría llevar a la presentación de un repertorio distinto de antígenos lipídicos endógenos, resultando en una menor selección positiva o un aumento de selección negativa de precursores de células iNKT en el timo de ratones V α KI y hCD1d KI versus el ratón WT (Sille, Boxem et al. 2009). También se han encontrado notorias diferencias en la actividad y capacidad anti carcinogénica de varios ligandos en estos modelos. Por ejemplo, en otro trabajo de nuestros colaboradores (Saavedra-Avila, Keshipeddy et al. 2020) se describieron ligandos similares a los analizados en este trabajo, con la diferencia de que las modificaciones aromáticas se realizaron en el C'4 del grupo galactosil. Los autores observaron que los ligandos AH10-2 y AH10-3 no fueron capaces de inducir una respuesta en esplenocitos derivados del ratón WT, pero sí en esplenocitos de ratón hCD1d KI. Observaron además una gran actividad anti carcinogénica de AH10-3, expansión de células NKT1 y contracción de la población NKT2, además de una transactivación de células NK significativamente mayor que con la inyección de α GalCer. En su publicación posterior (Saavedra-Avila, Dellabona et al. 2022), encontraron que sólo el ligando AH17-4 (también conocido como 7DW8-5) tuvo un efecto anti carcinogénico tanto en el ratón V α KI como en hCD1d KI y WT, mientras que el ligando AH03-1 demostró efecto terapéutico en hCDd1 y WT pero no en el ratón V α KI. El ligando AH03-1 posee una estructura idéntica a α GalCer con la diferencia de que no posee el hidroxilo en C'4. Estas observaciones fundamentan la idea de que existe una dependencia de la estructura del ligando y el reconocimiento por parte de los repertorios de TCR en las células iNKT presentes en los ratones V α KI, hCD1d KI y WT, lo que también se ha evidenciado en estudios con células iNKT humanas.

Como se indicó anteriormente, existen características generales de los ligandos glicolipídicos que se asocian a una respuesta diferencial de citoquinas: cadenas alifáticas más cortas e insaturadas inducen una respuesta de tipo Th2 mientras que cadenas más largas y grupos funcionales apolares en la cadena alifática y en el grupo carbohidrato inducen una respuesta de tipo Th1. Diversas hipótesis se han propuesto para explicar el mecanismo molecular detrás de esta observación, incluyendo la influencia de localización del complejo CD1d-glicolípido en balsas lipídicas y niveles diferenciales de co-estimulación en la sinapsis inmunológica entre las células presentadoras de antígenos y las células iNKT (Arora, Kharkwal et al. 2016). Adicionalmente, existe evidencia de que los diferentes subtipos de células iNKT tales como las células NKT1, NKT2 y NKT17, los cuales se caracterizan por su perfil de secreción de citoquinas, pueden ser generados a partir de precursores que presentan cierto uso preferencial de cadenas V α -V β (Tuttle, Krovi et al. 2018). Por

lo tanto, fue relevante para el objetivo de este proyecto evaluar la frecuencia de uso de las cadenas $V\alpha$ - $V\beta$ en células iNKT expandidas *in vivo* luego de la estimulación con los ligandos α GalCer, AH17-6 y AH17-8. A pesar de que las células iNKT poseen un TCR semi-invariante, se ha propuesto que la influencia de la cadena $V\beta$ puede ser importante en el reconocimiento de antígeno y en la naturaleza de la respuesta inducida por éste. Tanto en humanos como en ratón, la diversidad de la cadena de TCR- β se genera por la utilización de genes variables TCR D β y J β , y por la adición de nucleótidos no codificados en la línea germinal durante el reordenamiento del gen del TCR- β . Esto resulta en un gran nivel de diversidad del loop CDR3 β y un repertorio policlonal en ambas especies (Cameron, Pellicci et al. 2015). Diversos estudios han indicado que a pesar de que la cadena β del TCR no se une directamente al antígeno reconocido por las células iNKT sino a la molécula de CD1d, sí puede influir en la interacción de la cadena α con el antígeno. En este proyecto, nos propusimos evaluar los posibles mecanismos existentes de identificación diferencial de antígenos por parte de diferentes TCR de células iNKT. Por ejemplo, se ha evidenciado en trabajos previos que frente al estímulo con el ligando iGb3 una mayor proporción de las células iNKT expandidas presentan la cadena $V\beta$ 7 (Cameron, Cheng et al. 2022). En ensayos de reconocimiento de tetrámeros de CD1d unidos a diversos ligandos glicolipídicos, se observa un espectro de afinidad de TCRs con diferentes cadenas β hacia los ligandos OCH y α GalCer, sin embargo, existe un sesgo evidente de reconocimiento de OCH por parte de TCRs con cadena $V\beta$ 8.1 y $V\beta$ 8.2. En cambio, α GalCer es reconocido de forma diferencial por TCRs con cadena $V\beta$ 7 y $V\beta$ 2. Adicionalmente, existe evidencia que sugiere que diferentes subtipos de células iNKT en el timo expresan preferencialmente diferentes cadenas $V\beta$, ya que se ha encontrado correlación entre la expresión de $V\beta$ 7 por parte de las células NKT1, de $V\beta$ 2 por las células NKT2 y de $V\beta$ 8.3 por las células NKT17 (Cameron and Godfrey 2018). Esto sugiere que la identidad de la secuencia del TCR de las células iNKT podría influir en el reconocimiento de diversos antígenos con modificaciones específicas, y en el perfil funcional de estas células, direccionando la respuesta inmune que se pretende inducir.

En nuestras experimentos, encontramos evidencia de que las diferencias observadas en TCR- β de hibridomas de células iNKT, específicamente en el segmento J β , tienen consecuencias estructurales y posiblemente funcionales en el reconocimiento de ligandos modificados de α GalCer presentados tanto en el contexto de hCD1d como de mCD1d. Gran parte de estas diferencias en la interacción TCR/CD1-ligando estaban mediadas por cambios en residuos aminoacídicos de las moléculas hCD1d y mCD1d. Sin embargo, y como se evidenció en este proyecto, existe una influencia de la cadena β en cuanto a los residuos de la cadena α que quedan más expuestos para

la interacción con el ligando, y también hay una dependencia de la estructura del ligando en cuanto a las interacciones preponderantes que se observan tanto con el TCR como con la molécula de CD1d. Esto desafía las concepciones previas que se tenían respecto al TCR- β de las células iNKT, y ensayos adicionales sobre la influencia de la afinidad y tiempos de unión en la naturaleza y potencia de la respuesta de citoquinas serán necesarios para determinar su relevancia biológica. Es necesario no perder de vista la escala de estas observaciones, ya que se analizaron secuencias de hibridomas monoclonales que fueron seleccionados en un principio por su alta afinidad al tetrámero de CD1d/ α GalCer, induciendo posiblemente un sesgo en la diversidad del repertorio obtenido. Es posible que al analizar una mayor diversidad de secuencias de TCR β , como las que se obtienen al analizar células iNKT expandidas *in vivo* por ligandos distintos a α GalCer, se encuentre una mayor cantidad de diferencias entre estas secuencias que tengan influencia en la interacción con los ligandos derivados de α GalCer. Por lo anterior, creemos que es relevante estudiar la influencia de la cadena β del TCR de las células iNKT en el reconocimiento de ligandos, especialmente de ligandos que inducen altos niveles de producción de citoquinas, como AH17-6, y perfiles de activación definidos de la respuesta inmune en modelos pre-clínicos y en estudios *in vitro* con células humanas cuando sea posible, ya que esto permitirá establecer conclusiones relevantes para una futura aplicación clínica. Nuestro análisis supone un punto de partida para lograr discernir las interacciones relevantes para la unión de ligando y receptor en contexto de hCD1d/mCD1d, lo que supondrá una ventaja al evaluar qué modificaciones estructurales en los ligandos puedan conferir de una mayor actividad en el sistema parcialmente humanizado del ratón hCD1d KI y que por lo tanto puedan ser de mayor utilidad en futuras aplicaciones clínicas.

Finalmente, consideramos importante destacar las fortalezas pero no perder de vista las limitaciones de los modelos pre-clínicos en los cuales se realizan estudios relacionados a las células iNKT. Estudios como el presente proyecto pretenden aumentar el conocimiento respecto a la interacción de diversos ligandos con el TCR de células iNKT, que previamente se creía no podía ejercer una afinidad finamente regulada al ser de naturaleza semi-invariante. Actualmente, se ha evidenciado que esto no es así, y la influencia de la cadena β del TCR-iNKT está actualmente en estudio por varios grupos a nivel mundial. Creemos que esto aportará a un mejor entendimiento de la biología de las células iNKT y cómo se pueden modular, ya sea mediante un diseño inteligente de ligandos potencialmente terapéuticos, o a través del desarrollo de nuevas tecnologías basadas en células CAR-NKT.

7. Bibliografía

- Arora, P., S. S. Kharkwal, T. W. Ng, S. Kunnath-Velayudhan, N. K. Saini, C. T. Johndrow, Y. T. Chang, G. S. Besra and S. A. Porcelli (2016). "Endocytic pH regulates cell surface localization of glycolipid antigen loaded CD1d complexes". Chem Phys Lipids **194**: 49-57.
- Banchet-Cadeddu, A., E. Henon, M. Dauchez, J. H. Renault, F. Monneaux and A. Haudrechy (2011). "The stimulating adventure of KRN 7000." Org Biomol Chem **9**(9): 3080-3104.
- Benson, R. A., J. M. Brewer and A. M. Platt (2014). "Mechanisms of autoimmunity in human diseases: a critical review of current dogma." Curr Opin Rheumatol **26**(2): 197-203.
- Bolotin, D. A., S. Poslavsky, I. Mitrophanov, M. Shugay, I. Z. Mamedov, E. V. Putintseva and D. M. Chudakov (2015). "MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling." Nat Methods **12**(5): 380-381.
- Borg, N. A., K. S. Wun, L. Kjer-Nielsen, M. C. Wilce, D. G. Pellicci, R. Koh, G. S. Besra, M. Bharadwaj, D. I. Godfrey, J. McCluskey and J. Rossjohn (2007). "CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor." Nature **448**(7149): 44-49.
- Brennan, P. J., R. V. Tatituri, M. Brigl, E. Y. Kim, A. Tuli, J. P. Sanderson, S. D. Gadola, F. F. Hsu, G. S. Besra and M. B. Brenner (2011). "Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals." Nat Immunol **12**(12): 1202-1211.
- Brigl, M. and M. B. Brenner (2004). "CD1: antigen presentation and T cell function." Annu Rev Immunol **22**: 817-890.
- Brutkiewicz, R. R. and A. L. Dent (2012). "Lipids-capital YA, Cyrillic-U: peroxisome generation of iNKT ligands." Nat Immunol **13**(5): 435-436.
- Cameron, G., J. M. H. Cheng, D. I. Godfrey, M. S. M. Timmer, B. L. Stocker and E. M. Dangerfield (2022). "The NKT cell TCR repertoire can accommodate structural modifications to the lipid and orientation of the terminal carbohydrate of iGb3." RSC Adv **12**(29): 18493-18500.
- Cameron, G. and D. I. Godfrey (2018). "Differential surface phenotype and context-dependent reactivity of functionally diverse NKT cells." Immunol Cell Biol.
- Cameron, G., D. G. Pellicci, A. P. Uldrich, G. S. Besra, P. Illarionov, S. J. Williams, N. L. La Gruta, J. Rossjohn and D. I. Godfrey (2015). "Antigen Specificity of Type I NKT Cells Is Governed by TCR beta-Chain Diversity." J Immunol **195**(10): 4604-4614.
- Carreno, L. J., N. A. Saavedra-Avila and S. A. Porcelli (2016). "Synthetic glycolipid activators of natural killer T cells as immunotherapeutic agents." Clin Transl Immunology **5**(4): e69.
- Carreño, L. J., S. S. Kharkwal and S. A. Porcelli (2014). "Optimizing NKT cell ligands as vaccine adjuvants." Immunotherapy **6**(3): 309-320.

Case, D. A., T. E. Cheatham, 3rd, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang and R. J. Woods (2005). "The Amber biomolecular simulation programs." J Comput Chem **26**(16): 1668-1688.

Chennamadhavuni, D., N. A. Saavedra-Avila, L. J. Carreno, M. J. Guberman-Pfeffer, P. Arora, T. Yongqing, R. Pryce, H. F. Koay, D. I. Godfrey, S. Keshipeddy, S. K. Richardson, S. Sundararaj, J. H. Lo, X. Wen, J. A. Gascon, W. Yuan, J. Rossjohn, J. Le Nours, S. A. Porcelli and A. R. Howell (2018). "Dual Modifications of alpha-Galactosylceramide Synergize to Promote Activation of Human Invariant Natural Killer T Cells and Stimulate Anti-tumor Immunity." Cell Chem Biol **25**(5): 571-584 e578.

Christiansen, D., J. Milland, E. Mouhtouris, H. Vaughan, D. G. Pellicci, M. J. McConville, D. I. Godfrey and M. S. Sandrin (2008). "Humans lack iGb3 due to the absence of functional iGb3-synthase: implications for NKT cell development and transplantation." PLoS Biol **6**(7): e172.

D'Andrea, A., D. Goux, C. De Lalla, Y. Koezuka, D. Montagna, A. Moretta, P. Dellabona, G. Casorati and S. Abrignani (2000). "Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells." Eur J Immunol **30**(6): 1544-1550.

Dangerfield, E. M., J. M. Cheng, D. A. Knight, R. Weinkove, P. R. Dunbar, I. F. Hermans, M. S. Timmer and B. L. Stocker (2012). "Species-specific activity of glycolipid ligands for invariant NKT cells." Chembiochem **13**(9): 1349-1356.

Dougan, S. K., A. Kaser and R. S. Blumberg (2007). "CD1 expression on antigen-presenting cells." Curr Top Microbiol Immunol **314**: 113-141.

Elewaut, D., A. P. Lawton, N. A. Nagarajan, E. Maverakis, A. Khurana, S. Honing, C. A. Benedict, E. Sercarz, O. Bakke, M. Kronenberg and T. I. Prigozy (2003). "The adaptor protein AP-3 is required for CD1d-mediated antigen presentation of glycosphingolipids and development of Valpha14i NKT cells." J Exp Med **198**(8): 1133-1146.

Facciotti, F., G. S. Ramanjaneyulu, M. Lepore, S. Sansano, M. Cavallari, M. Kistowska, S. Forss-Petter, G. Ni, A. Colone, A. Singhal, J. Berger, C. Xia, L. Mori and G. De Libero (2012). "Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus." Nat Immunol **13**(5): 474-480.

Forestier, C., T. Takaki, A. Molano, J. S. Im, I. Baine, E. S. Jerud, P. Illarionov, R. Ndonge, A. R. Howell, P. Santamaria, G. S. Besra, T. P. DiIorenzo and S. A. Porcelli (2007). "Improved outcomes in NOD mice treated with a novel Th2 cytokine-biasing NKT cell activator." J Immunol **178**(3): 1415-1425.

Frisch, M. J., G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, Williams, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S.

Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman and D. J. Fox (2016). Gaussian 16 Rev. C.01. Wallingford, CT.

Gapin, L., D. I. Godfrey and J. Rossjohn (2013). "Natural Killer T cell obsession with self-antigens." Curr Opin Immunol **25**(2): 168-173.

Godfrey, D. I., K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth and A. G. Baxter (2000). "NKT cells: facts, functions and fallacies." Immunol Today **21**(11): 573-583.

Godfrey, D. I., J. Le Nours, D. M. Andrews, A. P. Uldrich and J. Rossjohn (2018). "Unconventional T Cell Targets for Cancer Immunotherapy." Immunity **48**(3): 453-473.

Godfrey, D. I., J. McCluskey and J. Rossjohn (2005). "CD1d antigen presentation: treats for NKT cells." Nat Immunol **6**(8): 754-756.

Gowthaman, R. and B. G. Pierce (2018). "TCRmodel: high resolution modeling of T cell receptors from sequence." Nucleic Acids Res **46**(W1): W396-W401.

He, X., V. H. Man, W. Yang, T. S. Lee and J. Wang (2020). "A fast and high-quality charge model for the next generation general AMBER force field." J Chem Phys **153**(11): 114502.

Hopkins, C. W., S. Le Grand, R. C. Walker and A. E. Roitberg (2015). "Long-Time-Step Molecular Dynamics through Hydrogen Mass Repartitioning." J Chem Theory Comput **11**(4): 1864-1874.

Inafuku, M., C. Li, Y. Kanda, T. Kawamura, K. Takeda, H. Oku and H. Watanabe (2012). "Beta-glucosylceramide administration (i.p.) activates natural killer T cells in vivo and prevents tumor metastasis in mice." Lipids **47**(6): 581-591.

Jo, S., T. Kim, V. G. Iyer and W. Im (2008). "CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM." J Comput Chem **29**(11): 1859-1865.

Kita, H., O. V. Naidenko, M. Kronenberg, A. A. Ansari, P. Rogers, X. S. He, F. Koning, T. Mikayama, J. Van De Water, R. L. Coppel, M. Kaplan and M. E. Gershwin (2002). "Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer." Gastroenterology **123**(4): 1031-1043.

Kopecky-Bromberg, S. A., K. A. Fraser, N. Pica, E. Carnero, T. M. Moran, R. W. Franck, M. Tsuji and P. Palese (2009). "Alpha-C-galactosylceramide as an adjuvant for a live attenuated influenza virus vaccine." Vaccine **27**(28): 3766-3774.

Krijgsman, D., M. Hokland and P. J. K. Kuppen (2018). "The Role of Natural Killer T Cells in Cancer-A Phenotypical and Functional Approach." Front Immunol **9**: 367.

Kronenberg, M. (2005). "Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes." Annu Rev Immunol **23**: 877-900.

Li, X., G. Chen, R. Garcia-Navarro, R. W. Franck and M. Tsuji (2009). "Identification of C-glycoside analogues that display a potent biological activity against murine and human invariant natural killer T cells." Immunology **127**(2): 216-225.

Matsuda, J. L., L. Gapin, J. L. Baron, S. Sidobre, D. B. Stetson, M. Mohrs, R. M. Locksley and M. Kronenberg (2003). "Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8395-8400.

Mattner, J., K. L. Debord, N. Ismail, R. D. Goff, C. Cantu, 3rd, D. Zhou, P. Saint-Mezard, V. Wang, Y. Gao, N. Yin, K. Hoebe, O. Schneewind, D. Walker, B. Beutler, L. Teyton, P. B. Savage and A. Bendelac (2005). "Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections." Nature **434**(7032): 525-529.

Matulis, G., J. P. Sanderson, N. M. Lissin, M. B. Asparuhova, G. R. Bommineni, D. Schumperli, R. R. Schmidt, P. M. Villiger, B. K. Jakobsen and S. D. Gadola (2010). "Innate-like control of human iNKT cell autoreactivity via the hypervariable CDR3beta loop." PLoS Biol **8**(6): e1000402.

McEwen-Smith, R. M., M. Salio and V. Cerundolo (2015). "The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity." Cancer Immunol Res **3**(5): 425-435.

Memon, R. A., W. M. Holleran, Y. Uchida, A. H. Moser, C. Grunfeld and K. R. Feingold (2001). "Regulation of sphingolipid and glycosphingolipid metabolism in extrahepatic tissues by endotoxin." J Lipid Res **42**(3): 452-459.

Michelle Xu, M., Y. Pu, R. R. Weichselbaum and Y. X. Fu (2017). "Integrating conventional and antibody-based targeted anticancer treatment into immunotherapy." Oncogene **36**(5): 585-592.

Nair, S. and M. V. Dhodapkar (2017). "Natural Killer T Cells in Cancer Immunotherapy." Front Immunol **8**: 1178.

Nelson, A., J. D. Lukacs and B. Johnston (2021). "The Current Landscape of NKT Cell Immunotherapy and the Hills Ahead." Cancers (Basel) **13**(20).

Nyambayar, D., K. Iwabuchi, E. Hedlund, S. Murakawa, K. Shirai, C. Iwabuchi, Y. Kon, Y. Miyazaki, Y. Yanagawa and K. Onoe (2007). "Characterization of NKT-cell hybridomas expressing invariant T-cell antigen receptors." J Clin Exp Hematop **47**(1): 1-8.

O'Keeffe, J., M. Podbielska and E. L. Hogan (2015). "Invariant natural killer T cells and their ligands: focus on multiple sclerosis." Immunology **145**(4): 468-475.

Pellicci, D. G., A. J. Clarke, O. Patel, T. Mallewaey, T. Beddoe, J. Le Nours, A. P. Uldrich, J. McCluskey, G. S. Besra, S. A. Porcelli, L. Gapin, D. I. Godfrey and J. Rossjohn (2011). "Recognition of beta-linked self glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors." Nat Immunol **12**(9): 827-833.

Pellicci, D. G., H. F. Koay and S. P. Berzins (2020). "Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and gammadelta T cells emerge." Nat Rev Immunol **20**(12): 756-770.

Pellicci, D. G., O. Patel, L. Kjer-Nielsen, S. S. Pang, L. C. Sullivan, K. Kyparissoudis, A. G. Brooks, H. H. Reid, S. Gras, I. S. Lucet, R. Koh, M. J. Smyth, T. Malleveay, J. L. Matsuda, L. Gapin, J. McCluskey, D. I. Godfrey and J. Rossjohn (2009). "Differential recognition of CD1d-alpha-galactosyl ceramide by the V beta 8.2 and V beta 7 semi-invariant NKT T cell receptors." *Immunity* **31**(1): 47-59.

Popovic, Z. V., M. Rabionet, R. Jennemann, D. Krunic, R. Sandhoff, H. J. Grone and S. Porubsky (2017). "Glucosylceramide Synthase Is Involved in Development of Invariant Natural Killer T Cells." *Front Immunol* **8**: 848.

Porubsky, S., A. O. Speak, B. Luckow, V. Cerundolo, F. M. Platt and H. J. Grone (2007). "Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5977-5982.

Restifo, N. P., M. E. Dudley and S. A. Rosenberg (2012). "Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response." *Nat Rev Immunol* **12**(4): 269-281.

Rossjohn, J., D. G. Pellicci, O. Patel, L. Gapin and D. I. Godfrey (2012). "Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells." *Nat Rev Immunol* **12**(12): 845-857.

Saavedra-Avila, N. A., P. Dellabona, G. Casorati, N. Veerapen, G. S. Besra, A. R. Howell and S. A. Porcelli (2022). "A humanized mouse model for in vivo evaluation of invariant Natural Killer T cell responses." *Front Immunol* **13**: 1011209.

Saavedra-Avila, N. A., S. Keshipeddy, M. J. Guberman-Pfeffer, A. Perez-Gallegos, N. K. Saini, C. Schafer, L. J. Carreno, J. A. Gascon, S. A. Porcelli and A. R. Howell (2020). "Amide-Linked C4"-Saccharide Modification of KRN7000 Provides Potent Stimulation of Human Invariant NKT Cells and Anti-Tumor Immunity in a Humanized Mouse Model." *ACS Chem Biol* **15**(12): 3176-3186.

Savage, A. K., M. G. Constantinides, J. Han, D. Picard, E. Martin, B. Li, O. Lantz and A. Bendelac (2008). "The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage." *Immunity* **29**(3): 391-403.

Schafer, C., G. Ascui, C. H. Ribeiro, M. Lopez, R. Prados-Rosales, P. A. Gonzalez, S. M. Bueno, C. A. Riedel, A. Baena, A. M. Kalergis and L. J. Carreno (2017). "Innate immune cells for immunotherapy of autoimmune and cancer disorders." *Int Rev Immunol* **36**(6): 315-337.

Schmieg, J., G. Yang, R. W. Franck and M. Tsuji (2003). "Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide." *J Exp Med* **198**(11): 1631-1641.

Schwede, T., J. Kopp, N. Guex and M. C. Peitsch (2003). "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3381-3385.

Shissler, S. C., D. R. Bollino, I. V. Tiper, J. P. Bates, R. Derakhshandeh and T. J. Webb (2016). "Immunotherapeutic strategies targeting natural killer T cell responses in cancer." *Immunogenetics* **68**(8): 623-638.

Sieling, P. A., D. Chatterjee, S. A. Porcelli, T. I. Prigozy, R. J. Mazzaccaro, T. Soriano, B. R. Bloom, M. B. Brenner, M. Kronenberg, P. J. Brennan and et al. (1995). "CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens." Science **269**(5221): 227-230.

Sille, F. C., M. Boxem, D. Sprengers, N. Veerapen, G. Besra and M. Boes (2009). "Distinct requirements for CD1d intracellular transport for development of V(alpha)14 iNKT cells." J Immunol **183**(3): 1780-1788.

Singh, P., M. Szaraz-Szeles, Z. Mezei, S. Barath and Z. Hevessy (2022). "Age-dependent frequency of unconventional T cells in a healthy adult Caucasian population: a combinational study of invariant natural killer T cells, gammadelta T cells, and mucosa-associated invariant T cells." Geroscience.

Speak, A. O., M. Salio, D. C. Neville, J. Fontaine, D. A. Priestman, N. Platt, T. Heare, T. D. Butters, R. A. Dwek, F. Trottein, M. A. Exley, V. Cerundolo and F. M. Platt (2007). "Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5971-5976.

Stax, A. M., J. Tuengel, E. Girardi, N. Kitano, L. L. Allan, V. Liu, D. Zheng, W. J. Panenka, J. Guillaume, C. H. Wong, S. van Calenbergh, D. M. Zajonc and P. van den Elzen (2017). "Autoreactivity to Sulfatide by Human Invariant NKT Cells." J Immunol **199**(1): 97-106.

Sugita, M., X. Cao, G. F. Watts, R. A. Rogers, J. S. Bonifacio and M. B. Brenner (2002). "Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells." Immunity **16**(5): 697-706.

Sullivan, B. A. and M. Kronenberg (2005). "Activation or anergy: NKT cells are stunned by alpha-galactosylceramide." J Clin Invest **115**(9): 2328-2329.

Sullivan, B. A., N. A. Nagarajan, G. Wingender, J. Wang, I. Scott, M. Tsuji, R. W. Franck, S. A. Porcelli, D. M. Zajonc and M. Kronenberg (2010). "Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells." J Immunol **184**(1): 141-153.

Tatituri, R. V., G. F. Watts, V. Bhowruth, N. Barton, A. Rothchild, F. F. Hsu, C. F. Almeida, L. R. Cox, L. Eggeling, S. Cardell, J. Rossjohn, D. I. Godfrey, S. M. Behar, G. S. Besra, M. B. Brenner and M. Brigl (2013). "Recognition of microbial and mammalian phospholipid antigens by NKT cells with diverse TCRs." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(5): 1827-1832.

Tian, C., K. Kasavajhala, K. A. A. Belfon, L. Raguette, H. Huang, A. N. Miguez, J. Bickel, Y. Wang, J. Pincay, Q. Wu and C. Simmerling (2020). "ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution." J Chem Theory Comput **16**(1): 528-552.

Tiwary, S., J. A. Berzofsky and M. Terabe (2019). "Altered Lipid Tumor Environment and Its Potential Effects on NKT Cell Function in Tumor Immunity." Front Immunol **10**: 2187.

Trott, O. and A. J. Olson (2010). "AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." J Comput Chem **31**(2): 455-461.

Tuttle, K. D., S. H. Krovi, J. Zhang, R. Bedel, L. Harmacek, L. K. Peterson, L. L. Dragone, A. Lefferts, C. Halluszczak, K. Riemony, J. R. Hesselberth, A. Rao, B. P. O'Connor, P. Marrack, J. Scott-Browne and L. Gapin (2018). "TCR signal strength controls thymic differentiation of iNKT cell subsets." Nat Commun **9**(1): 2650.

Ustjanzew, A., V. Sencio, F. Trottein, J. Faber, R. Sandhoff and C. Paret (2022). "Interaction between Bacteria and the Immune System for Cancer Immunotherapy: The alpha-GalCer Alliance." Int J Mol Sci **23**(11).

Van Kaer, L. (2006). "Role of invariant natural killer T cells in immune regulation and as potential therapeutic targets in autoimmune disease." Expert Rev Clin Immunol **2**(5): 745-757.

Wang, Y. and S. L. Cardell (2017). "The Yin and Yang of Invariant Natural Killer T Cells in Tumor Immunity-Suppression of Tumor Immunity in the Intestine." Front Immunol **8**: 1945.

Wen, X., P. Rao, L. J. Carreno, S. Kim, A. Lawrenczyk, S. A. Porcelli, P. Cresswell and W. Yuan (2013). "Human CD1d knock-in mouse model demonstrates potent antitumor potential of human CD1d-restricted invariant natural killer T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(8): 2963-2968.

Wun, K. S., G. Cameron, O. Patel, S. S. Pang, D. G. Pellicci, L. C. Sullivan, S. Keshipeddy, M. H. Young, A. P. Uldrich, M. S. Thakur, S. K. Richardson, A. R. Howell, P. A. Illarionov, A. G. Brooks, G. S. Besra, J. McCluskey, L. Gapin, S. A. Porcelli, D. I. Godfrey and J. Rossjohn (2011). "A molecular basis for the exquisite CD1d-restricted antigen specificity and functional responses of natural killer T cells." Immunity **34**(3): 327-339.

Wun, K. S., F. Ross, O. Patel, G. S. Besra, S. A. Porcelli, S. K. Richardson, S. Keshipeddy, A. R. Howell, D. I. Godfrey and J. Rossjohn (2012). "Human and mouse type I natural killer T cell antigen receptors exhibit different fine specificities for CD1d-antigen complex." J Biol Chem **287**(46): 39139-39148.

Yu, E. D., E. Girardi, J. Wang and D. M. Zajonc (2011). "Cutting edge: structural basis for the recognition of beta-linked glycolipid antigens by invariant NKT cells." J Immunol **187**(5): 2079-2083.

Yu, K. O., J. S. Im, A. Molano, Y. Dutronc, P. A. Illarionov, C. Forestier, N. Fujiwara, I. Arias, S. Miyake, T. Yamamura, Y. T. Chang, G. S. Besra and S. A. Porcelli (2005). "Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3383-3388.

Zeissig, S., K. Murata, L. Sweet, J. Publicover, Z. Hu, A. Kaser, E. Bosse, J. Iqbal, M. M. Hussain, K. Balschun, C. Rocken, A. Arlt, R. Gunther, J. Hampe, S. Schreiber, J. L. Baron, D. B. Moody, T. J. Liang and R. S. Blumberg (2012). "Hepatitis B virus-induced lipid alterations contribute to natural killer T cell-dependent protective immunity." Nat Med **18**(7): 1060-1068.

Zhang, Y., R. Springfield, S. Chen, X. Li, X. Feng, R. Moshirian, R. Yang and W. Yuan (2019). "alpha-GalCer and iNKT Cell-Based Cancer Immunotherapy: Realizing the Therapeutic Potentials." Front Immunol **10**: 1126.

Zhou, D., J. Mattner, C. Cantu, 3rd, N. Schrantz, N. Yin, Y. Gao, Y. Sagiv, K. Hudspeth, Y. P. Wu, T. Yamashita, S. Teneberg, D. Wang, R. L. Proia, S. B. Lavery, P. B. Savage, L. Teyton and A. Bendelac (2004). "Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells." Science **306**(5702): 1786-1789.

Zhou, D., C. Xia, P. G. Wang, Z. Li, W. Zhang, G. Ni and J. Cheng (2021). "Genetic Studies of Natural Glycosphingolipid Ligands for NKT Cells." Methods Mol Biol **2388**: 13-25.