



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LRBA EN LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR
DE LA CÉLULA B (BCR)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LBD. PÉREZ PÉREZ DANIELA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
DR. SALVADOR FONSECA CORONADO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN, UNAM

CD. MX.,

ABRIL, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



OFICIO CPCB/384/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 18 de febrero de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **PÉREZ PÉREZ DANIELA** con número de cuenta **308145928**, con la tesis titulada **"DETERMINACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LRBA EN LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE LA CÉLULA B (BCR)"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. GABRIELA LÓPEZ HERRERA**:

Presidente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Vocal: DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
Secretario: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO
Suplente: DRA. LAURA BERRÓN RUÍZ
Suplente: DRA. ADRIANA KARINA CHÁVEZ RUEDA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 28 de marzo de 2019

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A la beca CONACyT 818438, el apoyo PAEP y beca CEP para la realización de Maestría y asistencia a Congresos.

Al proyecto 154472 CONACyT, la Unidad de Investigación de Inmunodeficiencias del Instituto Nacional de Pediatría, lugar donde se realizó el presente proyecto.

Finalmente, a la Doctora Gabriela López Herrera, mi Tutora Principal, y al Comité Tutoral conformado por el Doctor José Luis Maravillas Montero y el Doctor Salvador Fonseca Coronado, por asesorarme y guiarme en mi formación como Maestra en Ciencias.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco en primer lugar a mis padres y a mi hermana por el apoyo en cada decisión que he tomado para realizar mis estudios.

A Adrián por tu amistad todos estos años y acompañarme en los altibajos que me han traído hasta aquí. Gracias por ser, gracias por estar

A Diana por ser la mejor amiga que puedo tener, te quiero.

A mis amigos Sergio, Víctor, Priscila, Clara, Rubén, Rafael, Ana, Rebeca, Yubia y Karla, por alegrarse de mis éxitos y estar en mis fracasos.

A mis compañeros de laboratorio Lupita, Gaby, Migue, Darwin, Mizael, Diego, Raquel y Karen, por su amistad, ayudarme siempre que lo necesité y hacerme el trabajo más llevadero. A Caro y Eduardo, por su apoyo y amistad en la realización de este proyecto. A Amairani por ofrecerme su ayuda y abrirme las puertas de su casa en Xalapa.

A la Doctora Gabriela López Herrera, no sólo por hacer que este proyecto fuera posible, también por su calidad humana y todo el apoyo académico y personal a lo largo de estos años.

A los Doctores Laura Berrón y Alejandro Zentella, por ayudar en mi formación.

Al Laboratorio del Doctor Leopoldo Santos Argumedo del Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de investigaciones Avanzadas CINVESTAV y al Laboratorio de Citometría de Flujo de la Universidad Veracruzana a cargo del Doctor Juan Carlos Rodríguez Alba, por el apoyo en la realización del presente proyecto.

Al Doctor Manfred W. Kilimann del Departamento de Neurobiología Molecular del Instituto Max-Planck para Medicina Experimental y el Doctor Bodo Grimbacher de la Facultad de Medicina en la Universidad de Freiburg, por proporcionarnos la cepa de ratones utilizados en el proyecto.

Por último, agradezco a mi alma máter, la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas por tercera ocasión y ser mi motivo de orgullo.

“Por mi raza hablará el espíritu”

Esta tesis está dedicada a mi familia, a la UNAM y a México.

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
Linfocitos B	4
Maduración periférica de linfocitos B	5
Receptor de la célula B (BCR)	7
Inmunodeficiencia Común Variable	8
Estructura de LRBA	10
Lrba en ratón	11
Localización de LRBA y su interacción con PKA	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS PARTICULARES	15
METODOLOGÍA	
1. Animales de experimentación	16
2. Genotipificación	16
a) Extracción de DNA genómico a partir de colas de ratón	16
b) Extracción de DNA genómico a partir de esplenocitos de ratón	17
c) Reacción de amplificación	18
3. Obtención de esplenocitos	18
4. Cultivo celular	18
5. Evaluación funcional	19
a) Diferenciación periférica	19
b) Apoptosis de linfocitos B	19
c) Activación de linfocitos B	20
d) Determinación de proliferación celular	20
e) Marcadores membranales	21
6. Análisis estadístico	21
METODOLOGÍA ADICIONAL	
1. Desarrollo de una línea celular humana <i>LRBA</i> ^{-/-}	22
a) Características del plásmido CRISPR-Cas9/LRBA	22
b) Transformación de <i>E. coli</i> con plásmido CRISPR-Cas9/LRBA	23
c) Purificación del plásmido CRISPR-Cas9/LRBA	23
d) Transfección del plásmido CRISPR-Cas9/LRBA a células Raji	24
e) Purificación de células por dilución limitante	24
2. Evaluación de expresión de LRBA	25
3. Confirmación de mutación	26
a) Amplificación del Exón 2 de <i>LRBA</i>	26
b) Purificación de amplicones	27
c) Reacción de secuenciación	27
d) Purificación de reacción de secuenciación	27
e) Análisis de secuencias obtenidas	28
4. Evaluación de autofagia por Western blot de LC3-I/II	28

RESULTADOS	
A) Genotipificación de ratones	29
B) Diferenciación periférica	30
C) Apoptosis	35
D) Activación de linfocitos B	37
E) Proliferación de linfocitos B	38
F) Expresión de proteínas membranales en linfocitos B	40
G) Expresión de LRBA en células transfectadas	43
H) Determinación de la mutación introducida en línea deficiente de LRBA	44
I) Autofagia en células transfectadas	45
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
CONCLUSIONES	55
LITERATURA CITADA	56
Anexo 1. Preparación de soluciones y medios de cultivo	61
Anexo 2. Primers utilizados	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Activación de linfocitos B	5
Figura 2. Desarrollo periférico de linfocitos B	6
Figura 3. Estructura proteica de Lrba	11
Figura 4. Plásmido CRISPR-Cas9/LRBA	22
Figura 5. Esquema de dilución para separación de clonas	25
Figura 6. Genotipificación de ratones	29
Figura 7. Diferenciación periférica de linfocitos B en ratones	30
Figura 8. Subpoblaciones de linfocitos B esplénicos en condiciones basales	31
Figura 9. Subpoblaciones de linfocitos B a 6 horas de cultivo	32
Figura 10. Subpoblaciones de linfocitos B a 48 horas de cultivo	32
Figura 11. Subpoblaciones de linfocitos B a 96 horas de cultivo	33
Figura 12. Porcentaje subpoblaciones de linfocitos B a diferente tiempo de cultivo	34
Figura 13. Apoptosis de linfocitos B	35
Figura 14. Apoptosis de linfocitos B a 6 horas de cultivo	36
Figura 15. Expresión de CD69 en linfocitos B a 12 horas de cultivo	37
Figura 16. Activación temprana de linfocitos B	38
Figura 17. Proliferación de linfocitos B	39
Figura 18. Proliferación de linfocitos B a 96 horas de cultivo	39
Figura 19. Expresión de marcadores membranales en linfocitos B	41
Figura 20. Análisis estadístico de la expresión de marcadores de membrana de linfocitos B	42
Figura 21. Expresión de LRBA en Raji transfectada con CRISPR/Cas9-LRBA	43
Figura 22. Secuenciación de exón 2 de LRBA en línea celular Raji transfectada con CRISPR-Cas9-LRBA	44
Figura 23. Autofagia de línea celular Raji	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Expresión de marcadores de superficie de subpoblaciones de linfocitos B en periferia	6
Tabla 2. Genes asociados a Inmunodeficiencia Común Variable	9
Tabla 3. Poblaciones leucocitarias en pacientes con deficiencia de LRBA	10
Tabla 4. Comparación entre características de pacientes con ICV y ratones <i>Lrba</i> ^{-/-}	12

Abreviaturas

AKAP.- Anchor kinase A protein

AKT/PKB- Protein kinase B

AMPC.- Adenosín monofosfato-3',5' cíclico

BCDP.- BEACH containing domain protein

BCR.- B-cell receptor.

BEACH- Beige and Chediak-Higashi domain

BLK- B-cell linker kinase gene

BLNK- B-cell linker kinase

BTK- Bruton's tyrosine kinase

BW-GFP.- BEACH and WD green fluorescent protein

Cas9- CRISPR associated protein 9

CD.- Cluster differentiation

cDNA.- Complementary deoxyribonucleic acid.

Célula Treg.- Célula T reguladora.

ConA-like- Concavalin A (ConA)-like lectin binding domain

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CTLA-4.- Cytotoxic T lymphocyte antigen 4

CVID.- Common variable immunodeficiency

DAG- Diacyl glycerol

DNA.- Deoxyribonucleic acid

Dominio BEACH.- beige and Chediak-Higashi

Dominio ConA-like.- Concavalin A-like lectin binding

Dominio PH.- Plekstrin Homology-like

Dominio VHS.- VPS (vacuolar protein sorting)-27, Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) domain and STAM (signal transducing adaptor molecule)

EDTA.- Etyl diamino tetra-acetic acid

ERK- Extracellular signal-regulated kinase.

et al. .- y colaboradores.

HRP.- *Horseradish* peroxidase

HSA- Heat stable antigen

ICOS- Inducible T cell costimulator precursor

ICV – Inmunodeficiencia común variable

Ig.- Inmunoglobulina

IL.- Interleucina

IMF.- Intensidad media de fluorescencia

IP3- Inositol trifosfato

ITAM- Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs

LC3.- Light chain 3

LIR.- LC3 Interacting Region

LPS.- Lipopolisacárido

LRBA.- Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein humana

Lrba.- Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor protein murina

LRBA.- Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor gen humano

Lrba.- Lipopolysaccharide responsive beige-like anchor gen murino

LYST.- Lysosomal trafficking regulator

MAPK- Mitogen-Activated Protein Kinases

MHC.- major histocompatibility complex

mL.- Mililitro

μL.- Microlitro

μM.- Micromolar

mRNA.- Messenger ribonucleic acid
NFAT- Nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B.- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NF κ B2- Nuclear Factor Kappa B subunit 2
NF κ B1- Nuclear Factor Kappa B Subunit 1
NSMAF.- Neutral sphingomyelinase activation-associated factor
OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man
PBS.- Phosphate buffered saline
PH- Plekstrin Homology
pH.- Potencial de Hidrógeno.
PI3KCD- Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit
PI3KR1- Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase regulatory subunit 1
PKA.- Protein kinase A
PKC- Protein kinase C
PLC- γ - Phospholipase C gamma
PRKDC- Protein Kinase DNA-Activated Catalytic subunit
PVDF.- polifluoruro de vinilideno
RAC2- Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 precursor
RAG- Recombination-activating gene
Repetidos WD40.- Repetidos que contienen Triptófano (W) y Ácido aspártico (D).
RPMI.- Roswell Park Memorial Institute medium
RNA.- Ribonucleic acid.
sIg- Surface immunoglobulin
Src- Stored response chain
Syk- Spleen tyrosine kinase
TCR- T Cell Receptor
Th2 – T helper 2
Tris-HCl.- tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorhídrico
TWEAK- Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis
VAV1- Vav Guanine nucleotide Exchange factor 1
VHS- VPS (vacuolar protein sorting)-27, Hrs. (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) domain and STAM (signal transducing adaptor molecule
WD40- Tryptophan and aspartic acid 40

RESUMEN

LRBA (Lipopolysaccharide Responsive Beige-like Anchor) es una proteína que se expresa de forma ubicua en las células, sin embargo, su expresión es inducible en linfocitos y macrófagos. *LRBA* es un gen cuyas mutaciones se asocian a Inmunodeficiencia Común Variable (ICV), enfermedad caracterizada por la disminución de anticuerpos en suero, defectos en diferenciación a linfocitos B de memoria, infecciones bacterianas recurrentes, desórdenes inflamatorios, autoinmunidad y esplenomegalia. Aunque actualmente se conoce el papel de LRBA en el reciclamiento de CTLA-4 en linfocitos T reguladores, su función en linfocitos B es desconocida. A la fecha, existen dos modelos murinos deficientes de la proteína *Lrba* (*Lrba*^{-/-}), en los que no se ha podido reproducir la inmunodeficiencia o desórdenes autoinmunes, sin embargo, se han encontrado anomalías en la expresión de CTLA-4 por parte de linfocitos T reguladores y disminución de linfocitos B-1. En el presente proyecto, se diseñaron una serie de experimentos que permitieron evaluar algunas funciones de linfocitos B esplénicos en el modelo murino *Lrba*^{-/-}. Debido a que el receptor de la célula B (BCR) es uno de los receptores más relevantes en estas células, nuestra pregunta de investigación fue si *Lrba* participa en la señalización del BCR. Para dicho objetivo, se evaluaron y compararon las funciones más importantes involucradas en la señalización del BCR: diferenciación, apoptosis, activación y proliferación. Se encontró que *Lrba* podría participar en la diferenciación periférica de linfocitos B, puesto que los ratones *Lrba*^{-/-} presentan una mayor cantidad de células transicionales 1 y una menor cantidad de transicionales 2, con respecto a su contraparte *Lrba*^{+/+}. Se evaluó la activación celular mediante la expresión de CD69, sin observar diferencias; tampoco se encontraron alteraciones en la apoptosis de estas células. Por último, se determinó que los linfocitos B *Lrba*^{-/-} presentan una proliferación marcadamente reducida con respecto a su contraparte silvestre tras activar vía BCR, sugiriendo que *Lrba* es importante para dicho proceso. Aunado a lo anterior, se determinó que *Lrba* participa en la expresión correcta de ciertos marcadores membranales, pues los ratones *Lrba*^{-/-} expresan una menor cantidad de CD21 y hay una mayor expresión de MHC-II y CD44, lo que sugiere que *Lrba* podría estar implicada en la movilización de estos receptores. Por último, se describe la construcción de una línea celular humana deficiente de LRBA lograda mediante la tecnología CRISPR-Cas9, en la cual se confirmó la ausencia de la proteína y se identificó una mutación puntual. En este modelo, se realizó un ensayo de autofagia, proceso relacionado con LRBA. Se encontró que en la línea celular hay una disminución de autofagia, sin embargo, deberán realizarse más ensayos que permitan confirmar este comportamiento.

ABSTRACT

LRBA (Lipopolysaccharide Responsive Beige-like Anchor) is a protein expressed ubiquitous in cell, however, its expression is inducible in lymphocytes and macrophages. Deleterious mutations in LRBA are associated to Common Variable Immunodeficiency (CVID), characterized by hypogammaglobulinemia, defects in memory B cell differentiation, recurrent bacterial infections, inflammatory disorders, autoimmunity and splenomegaly. Although participation is currently known of LRBA in CTLA-4 recycling on T regulatory cells, the function on B cells is still unknown. There are two deficient murine models of *Lrba* (*Lrba*^{-/-}), without immunodeficiency or autoimmunity, but they have defects in CTLA-4 expression and B-1 cells decreased. In this project, we evaluated B cell functions from splenic cells in *Lrba*^{-/-} model. B cell receptor (BCR) is one of the most relevant receptor in B cells, so, our research was focused on LRBA participation of BCR signaling. For this objective, we evaluated and compared the most important functions involved in BCR signaling; differentiation, apoptosis, activation and proliferation. We founded that *Lrba* could be involved in peripheral B cell differentiation, because the *Lrba*^{-/-} mice have more Transitional 1 cells and less Transitional 2 cells, compared to *Lrba*^{+/+}. B cell activation was evaluated by CD69 expression, and the results not demonstrated differences, suggesting that *Lrba* is not important for cellular activation; no differences were found in apoptosis. Ultimately, was demonstrated that *Lrba*^{-/-} B cells have a markedly reduced proliferation, compared to wild type counterpart after BCR activation, suggesting that *Lrba* is important for this process. In addition, it was determined that *Lrba* is important for the expression of certain membrane markers, because *Lrba*^{-/-} B cells express less of CD21 and more MHC-II and CD44, suggesting that *Lrba* could be implicated in mobilization of this receptors. Additionally, we described a human cell line model characterized by deficient LRBA expression, obtained by CRISPR-Cas9 technology, which confirmed the absence of protein and a punctual mutation was identified. In this model, an autophagy assay was carried out, a process related to LRBA function. It was found a reduction in autophagy in this model, however, more test should be done to confirm this behavior.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El sistema inmunológico se vale de ciertas moléculas y células con la finalidad de detectar y defender al organismo de agentes externos y para la eliminación de células cancerosas. La respuesta que se genera, puede dividirse funcionalmente en innata y adaptativa (Actor, 2014).

La respuesta innata involucra barreras físicas, como la piel y mucosas, así como factores bioquímicos tales como péptidos antimicrobianos, enzimas y complemento, que actúan de forma inmediata tras el encuentro con un antígeno o patógeno. Otro componente importante en la respuesta innata es la participación de células como neutrófilos y macrófagos, especializados en la fagocitosis de microorganismos. Además de su rapidez, no se requiere un contacto previo con el antígeno para eliminar a un posible patógeno y en la mayoría de los casos, la respuesta inmunológica innata puede eliminar al agente infeccioso (Actor, 2014).

Por otro lado, la respuesta inmunológica adaptativa es más rápida y eficiente cuando ocurre un segundo encuentro con el antígeno. Las células responsables de esta respuesta son los linfocitos T y B, que llevan a cabo el reconocimiento del antígeno a través de receptores membranales tales como TCR (receptor de la célula T) y BCR (receptor de la célula B), lo que provocará una respuesta específica, que deberá ser no reactiva ante lo propio y capaz de generar memoria inmunológica (Toche, 2012). Dado que las células de interés en este proyecto son las células B, a continuación, se describen algunas de sus características más importantes.

LINFOCITOS B

Los linfocitos B son células capaces de reconocer antígeno en su forma nativa, y tras este reconocimiento, son capaces de procesarlo y presentarlo en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II); además, la activación del BCR con el antígeno induce la activación y diferenciación a linfocitos B de memoria o células plasmáticas, las cuáles son las responsables de la producción de inmunoglobulinas, cuya función es la de reconocer específicamente a los antígenos, con la finalidad de neutralizar ó eliminar al patógeno (Murphy, Travers, & Walport, 2009).

La producción de anticuerpos es un proceso que puede llevarse a cabo de forma T dependiente o T independiente (Fainboim & Geffner, 2013). En la respuesta T independiente, no se requiere de la cooperación de los linfocitos T y el antígeno reconocido activa de forma policlonal a los linfocitos B. Los antígenos que desencadenan esta respuesta son moléculas multivalentes y generalmente de alto peso molecular, lo que les permite inducir múltiples entrecruzamientos con la inmunoglobulina de membrana del linfocito B y efectuar altos niveles de activación. Comúnmente son polisacáridos o lipopolisacáridos que dan como resultado, la producción de inmunoglobulinas de isotipo IgM, por parte de las células plasmática a las que activan (Figura 1A) (Pihlgren et al., 2013).

Por otro lado, en la respuesta T dependiente, el antígeno es de naturaleza peptídica, el cual entra en contacto con el BCR, y es internalizado, procesado y presentado en una molécula de MHC-II, a través del cual interactúa con linfocitos T. Se requiere de la participación de los linfocitos Th2, específicamente a través de una serie de proteínas membranales, por ejemplo: CD28 y CD40L que interactúan con los receptores CD80/CD86 y CD40 del linfocito B, para inducir el cambio de isotipo y la producción de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgE (Figura 1B) (Moser & Leo, 2010).

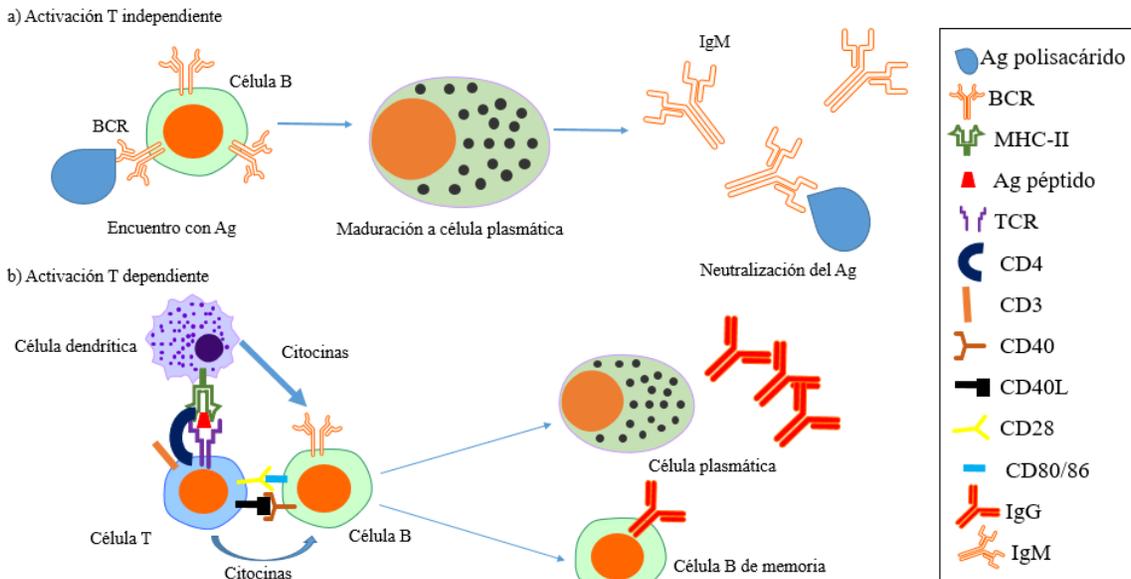


Figura 1. Activación de linfocitos B. Respuesta T independiente, en donde se muestra que los linfocitos B son capaces de montar una respuesta de anticuerpos frente a antígenos con epítomos repetitivos como es el caso de los polisacáridos (a), y respuesta T dependiente en el que se requiere antígenos de tipo proteico por parte de los linfocitos B para la cooperación de células T (b). Editado de Moser y Leo, 2010 y motifolio.com.

Para que ocurra el reconocimiento del antígeno, es indispensable que los linfocitos B superen una serie de etapas de maduración en las que se eliminan una gran cantidad de células que reconocen moléculas propias del organismo, y se conservan los linfocitos B que expresan en su membrana el receptor de célula B o BCR, que está destinado para reconocer antígenos ajenos al organismo y será importante para procesos como activación, proliferación, diferenciación y apoptosis de éstas células (Bellanti, 2012).

MADURACIÓN PERIFÉRICA DE LINFOCITOS B

La maduración de los linfocitos B inicia en la médula ósea, con una célula troncal pluripotente, que, con las señales del microambiente correctas, puede dar lugar a un linfocito B que exprese en su membrana un BCR que no sea autorreactivo. Al salir a la circulación, el linfocito B requiere de señales adicionales en los órganos linfoides secundarios que le permitan activarse de forma correcta y llevar a cabo sus funciones efectoras, lo que se conoce como maduración o diferenciación periférica de linfocitos B (Gu & Rajewsky, 2004).

El desarrollo periférico de los linfocitos B, puede dividirse en diferentes estadios de diferenciación de acuerdo al fenotipo y proteínas membranales en dichas células. Se ha demostrado que cuando los linfocitos B migran de la médula ósea hacia el bazo, muestran un fenotipo inmaduro conocido como células transicionales 1, expresando IgM (Figura 2). En esta fase, las células con BCR autorreactivo son sujetos a selección negativa, para asegurar un repertorio libre de linfocitos B reactivas a lo propio

(Chung, Silverman, & Monroe, 2003). Posterior a dicha selección, las células transicionales 1, se diferencian a células transicionales 2, que co-expresan IgM e IgD y pueden entrar a la zona folicular del bazo. Al tener contacto con el antígeno vía BCR, las células transicionales 2 pueden proliferar y diferenciarse a células maduras (Figura 2).

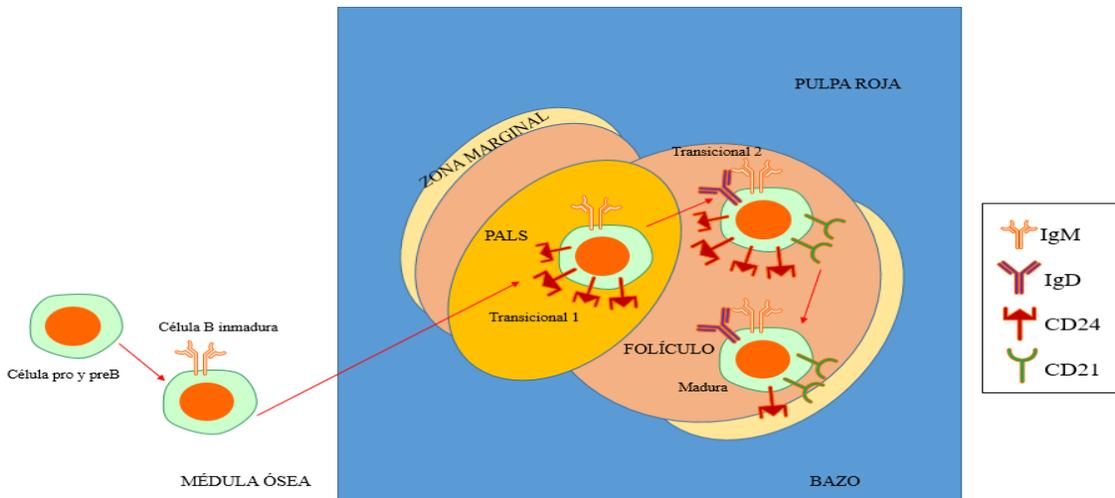


Figura 2. Desarrollo periférico de linfocitos B. Una vez que ocurren los mecanismos necesarios en los estadios proB y preB, se expresa correctamente la IgM de membrana en el linfocito B, considerado como linfocito B inmaduro. La célula viaja hacia los sinusoides de la médula ósea y puede migrar al bazo por la arteriola central. Aquí, el linfocito B se denomina transicional 1. Si supera la selección negativa, migra a la zona folicular, expresa IgD y adquiere el fenotipo de transicional 2. Una vez teniendo contacto con el antígeno, puede proliferar y diferenciarse a célula Madura (Editado de Chung, et al., 2003).

Existe una serie de marcadores de superficie, que ayudan a la clasificación de las subpoblaciones de linfocitos B inmaduros y transicionales, los cuales se representan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Expresión de marcadores de superficie de subpoblaciones de linfocitos B en periferia (Allman, Ferguson, Letz, & Cancro, 1993).

	Transicionales 1	Transicionales 2	Maduras
sIgM	+++	+++	++
sIgD	-	++	+++
CD21	+/-	+++	++
CD23	-	++	++
HSA (CD24)	+++	+++	+
RAG	+/-	+/-	-
493	+	+	-
AA4	+	+	-
CD62L	-	+	-

NOTA: Aunque también existen las células de zona marginal y se habla de la existencia de células transicionales 3, para fines de la presente tesis, nos referiremos únicamente a las subpoblaciones anteriormente descritas.

Como se puede apreciar, es necesario que la célula B exprese un BCR adecuado para poder llevar a cabo las funciones efectoras, por lo que a continuación se describen algunas características importantes del receptor de la célula B.

RECEPTOR DE CÉLULA B (BCR)

El BCR consiste en una inmunoglobulina de membrana (mIg), la cual está asociada a un heterodímero $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ (CD79a/CD79b), que es responsable de la transmisión de señales al interior de las células a través de sus motivos ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) los cuales tienen residuos de tirosina que son fosforilados tras el entrecruzamiento del BCR con el antígeno. Los ITAMs conforman una secuencia conservada de aminoácidos representada como $YXX(L/I)_{7-12}YXX(L/I)$, donde Y corresponde a los residuos de tirosina, L a leucina, I a isoleucina y X representa a cualquier aminoácido, separados por 7 a 12 aminoácidos (Treanor, 2012). Los motivos ITAM tienen una doble función en la activación por BCR: sirven como sustratos y reclutadores de proteína cinasas (Vale, Kearney, Nobrega, & Schroeder, 2015).

Al inicio de la activación del BCR intervienen tirosina cinasas como Lyn y Syk, aunque se han realizado estudios en los que se muestra que Syk tiene una participación dominante en la activación de BCR (Lamagna, Hu, DeFranco, & C., 2014). Seguido de la fosforilación de los dominios ITAM en $Ig\alpha$ - $Ig\beta$, ocurre un reclutamiento y activación de la proteína adaptadora B-cell linker (BLNK) y otras proteína cinasas, que canalizan la activación de BCR hacia diferentes rutas de señalización. Una vez reclutada BLNK, expone sitios de unión a la tirosina Cinasa de Bruton y a la fosfolipasa C gamma (Btk y $PLC-\gamma$), por lo que se facilita la fosforilación y posterior activación de la fosfolipasa. $PLC-\gamma$ es esencial para la generación de los segundos mensajeros diacil glicerol e inositol trifosfato (DAG e IP_3), que son esenciales para la maduración y mantenimiento de células B. El IP_3 induce la liberación de calcio del retículo endoplásmico y el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) (Reth, Nitschke, Hikida, & Kurosaki, 2015). Otra vía que está involucrada es la activación de proteínas G de bajo peso molecular como Ras y Rac, que conduce a la activación de las MAPK, la cual es relevante para la activación de factores de transcripción que serán mencionados posteriormente.

Existen proteínas que permiten una señalización de BCR con buena calidad y ayudan a la regulación de la acción de Syk, que son los correceptores CD19/CD21/CD81. Por un lado, CD21 conecta los antígenos acoplados a complemento, pues es un receptor de complemento; a través de la interacción con la tetraspanina CD81, puede ligarse al citoesqueleto (Reth, et al., 2015). La principal función de CD19 es activar a fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI3K) la cual induce la formación de fosfatidil-inositol

trifosfato (PIP3), importante para el reclutamiento de moléculas de señalización, tales como BTK y AKT (Clayton et al., 2002) .

Existen diversas vías que convergen con la señalización del BCR, entre las que destacan la participación de cinasas tales como como PKC, AKT (Dal Porto et al., 2004) y como se profundizará más adelante, PKA (Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico) (Levy et al., 1996), lo que proporciona a la vía, componentes que propaguen la señal a través del linfocito B. Finalmente, gracias a estas vías de transducción, se activan factores de transcripción como NF- κ B, NFAT y ERK (Fainboim & Geffner, 2013) que participan en procesos como proliferación, apoptosis y conducen al cambio de isotipo en las células B, es decir, producir inmunoglobulinas diferentes a IgM, (IgG, IgE o IgA) con la ayuda de señales recibidas a través de citocinas y de esta forma, el linfocito B se convierte en célula plasmática secretora de anticuerpos o en célula B de memoria (Bellanti, 2012).

Si ocurren anomalías que afecten al funcionamiento correcto del BCR u otra molécula que intervenga en el correcto funcionamiento del sistema inmunológico, puede manifestarse una inmunodeficiencia. Cuando el daño es provocado a nivel genético, el resultado es una inmunodeficiencia primaria. Para el caso concreto de este trabajo, nos referiremos a la inmunodeficiencia común variable, en la cual, entre otras manifestaciones clínicas, se ve afectado el funcionamiento del linfocito B.

INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE Y LRBA

La Inmunodeficiencia Común Variable (ICV) es un desorden que afecta al funcionamiento del sistema inmunológico con una falla en la diferenciación de linfocitos B que lleva a una reducción en los niveles séricos de al menos dos isotipos de inmunoglobulinas (IgG e IgA) que en algunos casos afecta también los niveles de IgM (Saikia & Gupta, 2016). El diagnóstico se realiza normalmente en población adolescente y adulta, con menor frecuencia en los primeros años de vida. Se estima que la incidencia es de 1:25,000 a 1:50,000, sin embargo, podría ser mayor debido al subdiagnóstico (Tam & Routes, 2013). Las personas con ICV tiene alta susceptibilidad a infecciones bacterianas principalmente en el tracto respiratorio, falla en la respuesta a vacunas (Ameratunga et al., 2014), inflamación intestinal recurrente y, debido a la acumulación de células inmunológicas, pueden presentar linfadenopatías, esplenomegalia y/o hepatomegalia. Cerca del 20% de personas diagnosticadas con ICV, muestran signos de autoinmunidad, específicamente trombocitopenia autoinmune y anemia hemolítica (Cunningham-Rundles, 2008).

Debido a la heterogeneidad de la enfermedad, se plantea que la etiología sea multigénica, sin embargo, una causa monogénica ha sido detectada en 2-10% de los pacientes diagnosticados con ICV (Bogaert et al., 2016). La base de datos OMIM reporta 14 genes asociados a ICV, sin embargo, gracias

a la secuenciación de siguiente generación, se ha acelerado el descubrimiento de genes cuyas mutaciones llevan al desarrollo de ICV, dentro de los cuales, *LRBA* (Lipopolysaccharide Responsive Beige-like Anchor) es el más frecuente (Tabla 2). Se ha logrado encontrar la función e importancia de estos genes tanto en linfocitos T como en linfocitos B, que participan desde niveles de comunicación celular a través de citocinas, como en receptores membranales, proteínas de señalización, andamiaje, reciclamiento celular y factores de transcripción (Bogaert et al., 2016).

Tabla 2. Genes asociados a Inmunodeficiencia Común variable. Se indican las moléculas asociadas a CVID, así como su frecuencia estimada en casos publicados (Bogaert, et al., 2016)

Gen	FRECUENCIA	Gen	FRECUENCIA	Gen	FRECUENCIA
LRBA	26.74	VAV1	0.53	CD19	3.74
PIK3CD	26.74	RAC2	0.53	CD81	0.53
CTLA-4	6.42	BLK	0.53	CD21	1.07
PRKCD	2.14	IKAROS	3.21	CD20	0.53
PLCG2	2.14	IRF2PB	0.53	CD27	4.81
NFKB2	5.35	ICOS	3.74	IL21	0.53
NFKB1	1.6	TWEAK	0.53	IL21R	3.21
PI3KR1	4.81				

NOTA: Para conocer el nombre completo de todos los genes, referirse a la lista de abreviaturas.

La función en células del sistema inmune de la gran mayoría de los genes asociados a ICV, es conocida, sin embargo, en el 2012 se determinaron casos pediátricos de ICV asociados con mutaciones en una proteína cuya función en el sistema inmune era desconocido. El interés principal de la presente tesis está centrado en determinar la relevancia de dicha proteína, la cual se nombró como LRBA.

Se trata de una proteína de alto peso molecular (319 kDa para su isoforma más larga), es intracelular y la deficiencia de la misma, se caracteriza por una disminución de inmunoglobulinas circulantes, disminución de linfoproliferación frente a mitógenos, disminución de autofagia, presencia de autoinmunidad, así como apoptosis incrementada (Lopez-Herrera et al., 2012). Los pacientes con mutaciones homocigotas en LRBA, se acompañan en su mayoría, de una carencia de la expresión de la proteína en células mononucleares de sangre periférica. Otro hallazgo es la disminución en la supervivencia de las células B cuando son sometidas a condiciones de privación de nutrientes, con respecto a las células de testigos, así como una reducción en el proceso de autofagia (López-Herrera, et al., 2012). En cuanto a las subpoblaciones de las células B, en una buena parte de los pacientes hay

disminución de células B totales, células B de memoria con y sin cambio de isotipo y plasmablastos (Tabla 3). Recientemente, se observó también una disminución en las células T reguladoras (Tabla 3), lo que coincide con procesos autoinmunes en buena parte de las personas con deficiencia de LRBA (Gamez-Díaz et al., 2015), así como un deficiente reciclamiento de CTLA4 en los linfocitos T, una molécula importante para inhibir la activación celular y por lo tanto relevante en el mecanismo de tolerancia inmunológica (Lo et al., 2015).

Tabla 3. Poblaciones leucocitarias en pacientes con deficiencia de LRBA (Gámez-Díaz, et al., 2015)

POBLACIÓN CELULAR	Niveles reducidos	Niveles normales	Niveles aumentados
Leucocitos totales	43%	52%	5%
Linfocitos totales	33%	64%	5%
Células T totales	13%	82%	5%
Células T CD4+	18%	82%	
Células T CD8+	23%	72%	5%
Células T reguladoras*	73%	27%	
Células NK	37%	63%	
Células B totales*	75%	25%	
Células B naive	25%	37%	38%
Células B de memoria sin cambio de isotipo*	55%	28%	17%
Células B de memoria con cambio de isotipo*	80%	20%	
Plasmablastos*	92%	8%	
Células B transicionales	36%	28%	36%

NOTA: Se presentan los porcentajes de un total de 22 pacientes con deficiencia de LRBA. * se resaltan las poblaciones con niveles reducidos en más del 50% de la población estudiada.

ESTRUCTURA DE LRBA

Con base en su secuencia de aminoácidos se han predicho los dominios que contiene (Figura 3), aunque solo se han logrado cristalizar sus dominios PH-BEACH. Cabe señalar que la función de sus dominios se ha propuesto en su mayoría con base en la homología con otras proteínas. Cercano al extremo N-terminal se encuentra el dominio tipo Concavalina A (Con A-like), el cual se cree que podría unirse a oligosacáridos asociados a proteínas de tráfico vesicular; a continuación, se encuentra el dominio VHS, que se considera que podría reconocer membranas de tráfico vesicular provenientes de aparato de Golgi.

LRBA contiene además dos motivos RII, los cuáles se ha propuesto que tienen capacidad de unión a la subunidad reguladora de PKA (Proteína cinasa dependiente de AMPc), enzima de la cual se hablará más adelante. En el caso del dominio PH (homología a pleckstrina), se ha observado que tiene una fuerte interacción con el dominio BEACH (beige and Chediak Higashi syndrome domain), que podrían funcionar para reclutar patrones de unión involucrados en la unión a vesículas (Wang & Lockey, 2014).

LRBA pertenece a la familia de BCDPs (proteínas que contienen el dominio BEACH, por sus siglas en inglés), las cuales tienen función de andamiaje y tráfico vesicular, y se han relacionado a un conjunto de enfermedades importantes en humanos. Ejemplos de estas proteínas son LYST, que está asociada al síndrome de Chediak-Higashi, y la proteína NBEAL2, relacionada al síndrome de plaquetas grises (Cullinane, Schäfer, & Huizing, 2013).

Además, se ha observado que los dominios PH-BEACH y Con-A like, interactúan con CTLA-4 (Lo, et al., 2015). Por último, proximal al extremo C-terminal se encuentran cinco repetidos WD40, un motivo estructural de aproximadamente de 40 aminoácidos que termina en un dipéptido de triptofano y aspartato; en el caso de LRBA, dentro de WD40 se presenta una secuencia similar a LIR, que son regiones de interacción con LC3, una molécula importante en el proceso de autofagia (Wang, et al., 2014).

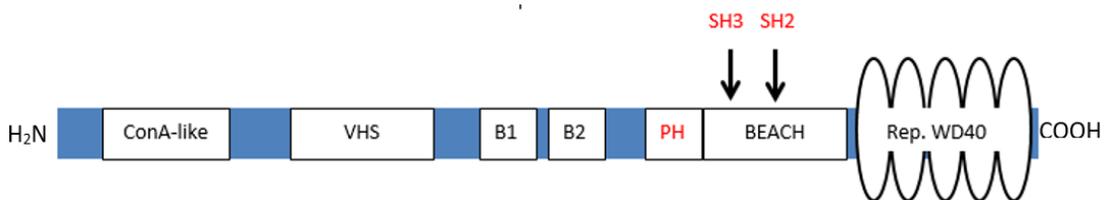


Figura 3. Estructura proteica de Lrba. ConA-like, Concavalin A (ConA)-like lectin binding domain; VHS, [VPS (vacuolar protein sorting)-27, Hrs (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) domain and STAM (signal transducing adaptor molecule)]; B1 y B2, sitios de unión a la subunidad reguladora RII de PKA; PH, Plekstrin Homology (PH)-like domain; BEACH, beige and Chediak-Higashi domain; Repetidos WD40, por los aminoácidos Triptófano-Ácido aspártico. SH2 (Src homology 2), SH3 (Src homology 3). Editada de Wang, et al., 2014.

Lrba EN RATÓN

Lrba fue descrita inicialmente en modelos murinos donde se demostró que tras estimular con lipopolisacárido bacteriano (LPS), el mRNA de *Lrba* se sobreexpresa. Esta molécula se encuentra de forma ubicua en las células, pero hay una elevación de su transcrito en macrófagos y células B (Wang, 2001). En ratón se han encontrado tres isoformas de la proteína: Lrba- α (2856 aa), Lrba- β (2792 aa) y Lrba- γ (2779 aa) que difieren en su extremo C-terminal por el número de repetidos WD y con expresión diferencial en órganos inmunológicos y no inmunológicos. De acuerdo al alineamiento realizado entre el gen murino con sus ortólogos, destaca una gran homología entre el gen murino (*Lrba*) y el humano (*LRBA*) (Wang, 2001), mientras que en la proteína son 90% idénticas (2587/2859) y 94% positivas (2969/2859) (López-Herrera, et al., 2012).

En 2017 se publicaron dos trabajos diferentes en los que se describe el fenotipo de ratones *Lrba*^{-/-}, encontrándose que aún existen limitaciones para reproducir la ICV en modelos animales. En el primer trabajo, publicado por Gámez-Díaz et al., 2017, utilizaron ratones con una delección en el exón 4 de *Lrba*, en los que se presentaron niveles normales de inmunoglobulinas, excepto de IgA, que se encontró

elevada. Por otro lado, se observó la expresión aberrante de CTLA-4 y CD25 en células T reguladoras en los ratones *Lrba*^{-/-}, sin embargo, no muestran signos de autoinmunidad y los niveles de IgM e IgG antinucleares son normales. Además, no presentan anomalías en la proliferación de células B tras ser estimuladas con LPS, diferente a lo observado en linfocitos B de pacientes con deficiencia de *LRBA* estimulados con mitógenos.

Por otro lado, Burnett, Parish, Masle-Faquhar, Brink, & Goodnow, 2017) utilizaron un modelo *lrba*^{-/-} con una deleción en el exón 37, similar a lo que ocurre en algunos pacientes con ICV, en el cual, tampoco se observó una desregulación inmune, con conteos nomales de subpoblaciones de linfocitos T y B, niveles normales de Ig séricas, excepto IgG2b, que es mayor en los ratones con deficiencia de *Lrba*. Como en el modelo de Gámez-Díaz, se observa un déficit en la expresión de CTLA-4 en las células T reguladoras y los niveles de Foxp3 disminuyen en los ratones *Lrba*^{-/-} de 26 semanas de edad. Otro hallazgo interesante, es que, en ambos ratones *lrba*^{-/-}, se observó una disminución en la cantidad de linfocitos B-1 en la cavidad peritoneal, lo que podría indicar una función importante de *Lrba* en estas células y ayudaría a entender mejor su mecanismo de acción (Gámez-Díaz, et al., 2017 y Burnett, et al., 2017).

Los hallazgos en los ratones *Lrba*^{-/-} se resumen en la Tabla 4 y se comparan con lo observado en pacientes con ICV.

Tabla 4. Comparación entre las características de pacientes con ICV y ratones *Lrba*^{-/-} (López-Herrera et al., 2012, Gámez-Díaz et al., 2015, Gámez-Díaz, et al., 2017 y Burnett, et al., 2017).

	PACIENTES <i>LRBA</i>^{-/-}	Ratón <i>Lrba</i>^{-/-} Gámez-Díaz	Ratón <i>Lrba</i>^{-/-} Burnett
Células T reguladoras	Disminuidas	Disminuidas	Disminuidas
Linfocitos B	Disminuidas	Normales	Normales
Hipogammaglobulinemia	Sí	No	No
Autoinmunidad	Sí	No	No
IgA sérica	Normal o disminuida	Elevada	Normal
IgG2b sérica	No reportado	Normal	Elevada
CTLA-4 membranaral	Disminuido	Disminuido	Disminuido
Células B-1	No aplica	Disminuidas	Disminuidas
Proliferación de células B frente a mitógenos	Disminuida	Normal	Normal
Apoptosis de células B	Elevada	No reportado	No reportado
Autofagia de células B	Disminuida	No reportado	No reportado

A pesar que no se ha logrado reproducir completamente la desregulación inmune provocada por el déficit de Lrba en modelos murinos, vale la pena utilizar estos modelos para explorar ciertos mecanismos de los linfocitos B que no se han indagado aún. Puesto que se considera que Lrba podría participar en el tráfico vesicular de diversas proteínas involucradas en la activación correcta del linfocito B, y como consecuencia de sus funciones celulares, a continuación se describen algunos descubrimientos de la interacción de Lrba con distintas moléculas.

LOCALIZACIÓN DE LRBA Y SU INTERACCIÓN CON PKA

Actualmente se desconoce la función exacta de LRBA, sin embargo, existen algunos ensayos que indican que podría ser una proteína importante en el tráfico vesicular intracelular, pues se ha observado co-localizado con proteínas que se encuentran en el sistema trans-Golgi, proteínas endosomales, tubulina (Reiser, Li, Lockey, & Jia-Wang, 2014) y proteínas membranales como EGFR y NOTCH (Wang, et al., 2004). Además, se ha encontrado una co-localización con las subunidades reguladoras RII β , RII α y catalítica de PKA en ensayos de microscopía confocal de fluorescencia (Reiser et al., 2014).

Como se mencionó anteriormente, se han predicho sitios de unión a las subunidades reguladoras de PKA (PKA-R), por lo que podría regular la acción de dicha enzima (Wang et al., 2014). Cabe aclarar, que, aunque en el presente proyecto de momento no se busca encontrar asociaciones de LRBA con PKA o alguna otra evaluación de dicha enzima, es importante resaltar la importancia de ésta en el correcto funcionamiento de las células B que pudiera dar indicio de la participación de LRBA con procesos asociados a PKA.

Como su nombre lo indica, PKA es una enzima que en presencia de AMP cíclico (AMPC) fosforila a ciertos blancos en residuos de serina o treonina, con la finalidad de activarlos y que lleven a cabo sus funciones efectoras. El AMPC se considera miembro del grupo de segundos mensajeros que proviene de la acción de la adenilato ciclasa sobre el ATP. La enzima PKA consta de cuatro subunidades: dos reguladoras (PKA-R) y dos catalíticas (PKA-C); el AMPC debe unirse a las subunidades reguladoras, que permite la liberación de las subunidades catalíticas con capacidad de realizar la fosforilación de residuos de serina y de treonina (Mathews, van Holde, & Ahern, 2002).

Se ha descrito que PKA participa en diversos procesos celulares, como son proliferación, diferenciación y apoptosis, en los cuales también se requiere de transcripción de genes. PKA tiene diversos substratos en el linfocito B, un ejemplo es NF- κ B, un factor de transcripción que al ser

activado promueve la expresión de genes necesarios para la proliferación celular, como son citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Gerlo et al., 2011). Otro sustrato es la enzima AID (activation-induced cytidine deaminase), que induce el cambio de isotipo en células B, por lo que se considera importante en la diferenciación de linfocitos B a células de memoria y a células plasmáticas (Basu et al., 2005). También puede activar a Bad, un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 importante en las células B, por lo que PKA promueve la apoptosis en células B inmaduras tras ser estimuladas con anticuerpos anti-IgM (Malissein, Verdier, Ratinaud, & Troutaud, 2003).

A su vez, se ha sugerido que PKA participa en la señalización del receptor de células B, la enzima muestra co-localización con BCR a través de una de sus subunidades reguladoras (PKA-R1 α) cuando las células B son estimuladas con anticuerpos anti-IgM (Levy et al., 1996).

Dado que la deficiencia de LRBA se asocia con defectos funcionales de las células B, resulta interesante determinar si los linfocitos B *Lrba*^{-/-} presentan defectos en la activación, proliferación y diferenciación y si el BCR pudiera ser el receptor por medio del cual *Lrba* señalice, por esto, este trabajo plantea evaluar diversas funciones celulares tras la activación vía BCR en los linfocitos B *Lrba*^{-/-}.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La función exacta de LRBA en los linfocitos B es desconocida. Dado que la deficiencia de esta proteína resulta en alteraciones en la activación del linfocito B, por lo que es interesante determinar si LRBA participa en la activación de la célula vía BCR.

HIPÓTESIS

Si *Lrba* participa en la señalización de BCR, entonces las células B *Lrba*^{-/-} y estimuladas por esta vía, tendrán defectos en apoptosis, activación y proliferación celular.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los linfocitos B *Lrba*^{-/-} presentan defectos funcionales al ser estimulados vía BCR en comparación con células *Lrba*^{+/+}, para conocer el papel de *Lrba* en la señalización de BCR.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener linfocitos B *Lrba*^{-/-} y *Lrba*^{+/+} y tras estimular vía BCR:
 - Evaluar y comparar la diferenciación periférica por la proporción de células transicionales y maduras.
 - Evaluar y comparar la apoptosis mediante el ensayo de Anexina V y Yoduro de propidio.
 - Evaluar y comparar la activación celular mediante la expresión de CD69, I-Ab, CD44 y CD38.
 - Evaluar y comparar la proliferación celular mediante la dilución de CFSE.
 - Evaluar y comparar la autofagia mediante la presencia de LC3-II.

METODOLOGÍA

1. Animales de experimentación.

En este trabajo se obtuvieron ratones *Lrba*^{+/-}, que fueron donados por el Dr. Manfred W. Kilimann del Instituto Max Planck (Burnett et al., 2017). Dado que los ratones obtenidos fueron heterocigotos, se inició su reproducción en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, por lo que este trabajo incluyó la genotipificación para la correcta identificación de ratones *Lrba*^{-/-}.

En este trabajo se analizaron dos grupos de ratones: ratones silvestres (*Lrba*^{+/+}) y homocigotos para la mutación en el gen (*Lrba*^{-/-}), ambos en el fondo genético C56BL/6J. La mutación presente en los ratones *Lrba*^{-/-} consiste en la eliminación del exón 4, el cual se detectó como se detalla a continuación.

2. Genotipificación de ratones

Para obtener el DNA genómico de los ratones, se utilizaron dos muestras: cola de ratón y células obtenidas de bazo. La genotipificación con células de bazo únicamente se realizó con fines confirmatorios.

a) Extracción de DNA genómico a partir de colas de ratón

Se cortó de 1 a 2 mm de cola de ratón y se colocó en un tubo de 100 µL para PCR y se agregaron 50 µL de Solución Alcalina de Lisis (para ver preparación, consultar Anexo 1), y se aseguró que el tejido estuviera completamente sumergido. La mezcla se incubó 60 minutos a 95°C.

Posteriormente, se agregaron 50 µL de Buffer de Neutralización (Anexo 1) y se disgregó el tejido empleando un pipeteo suave. Se centrifugó y se recolectó el sobrenadante, en el cual se cuantificó la concentración y la pureza del DNA por espectrofotometría.

Finalmente, se realizaron diluciones con una concentración final de 50ng/µL de DNA para realizar la reacción de amplificación. Se utilizó agua inyectable como diluyente.

b) Extracción de DNA genómico a partir de esplenocitos de ratón

Se utilizaron 1×10^6 esplenocitos para obtener el DNA y se resuspendieron en 500 µL de Cell Lysis Solution (QIAGEN, Venlo, Países bajos). Se mezcló por pipeteo hasta que se formó una solución no viscosa.

Posteriormente, se agregaron 250 µL de solución de precipitación de proteína (QIAGEN) y se mezcló por agitación vigorosa. Para separar las proteínas, se centrifugó a 3273 xg por 10 minutos a temperatura

ambiente y se recolectó el sobrenadante. Si el sobrenadante apareció turbio, se repitieron las centrifugaciones hasta que la solución fuera nítida.

Se midió el volumen del sobrenadante y se agregó el mismo volumen de 2-propanol grado biología molecular de (Sigma Aldrich, St Louis Missouri, USA) por las paredes del tubo y se agitó por inmersión hasta que se formó la hebra de DNA. Se centrifugó por 10 minutos y se decantó con cuidado. Finalmente se realizaron dos lavados con etanol grado biología molecular (Sigma Aldrich) a una concentración de 75% y se dejó secar toda la noche. Se resuspendió el DNA con 50 µL de agua inyectable o Solución de rehidratación de DNA (Promega, Madison Wisconsin, USA) y se calculó la concentración de DNA y pureza.

Finalmente, se realizaron soluciones con una concentración de 50ng/µL de DNA para realizar la reacción de amplificación. Se utilizó agua inyectable como diluyente.

c) Reacción de amplificación

Como se mencionó en la introducción, el ratón utilizado para este trabajo, se obtuvo por la delección del exón 4 del gen *Lrba*, por lo que se realizaron dos reacciones de amplificación para su genotipificación: una que abarcó del exón 3 al exón 4 (E3Fw-E4Rv) y otra del exón 3 al intrón 4 (E3Fw-I4Rv).

Se realizó una mezcla de reacción para 25 µL:

PCR Buffer (NewEngland Biolabs, Ipswich Massachusetts, USA) 10x	2.5 µL
MgCl₂ (New England) 50 mM	0.75 µL
dNTP's (Thermo Scientific, Walthman Massachusetts, USA)10 mM	0.5 µL
Primer Forward 25 µM	0.2 µL
Primer Reverse 25 µM	0.2 µL
Taq polimerasa (New England)	0.125 µL
Agua inyectable	19.725 µL
DNA (50 ng/µL)	1 µL

Las condiciones de amplificación fueron: 5 minutos a 92°C y 40 ciclos de: 95°C 30 segundos, 58°C 30 segundos, 72°C 60 segundos. Por último una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Para visualizar los productos de amplificación, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa (Amresco, Conshohocken PA, USA) al 2% por 40 minutos a 100mV. En cada pozo se mezclaron 5 µL del producto de amplificación con 1 µL de buffer de carga (Anexo 1). Una vez concluida la electroforesis, se tiñó el gel 15 minutos en solución de Bromuro de etidio 0.04% y se realizó su visualización empleando una fuente de luz ultravioleta en el equipo ChemiDoc™ XRS+ (BIORAD, Hercules CA, USA). Los resultados esperados fueron los siguientes:

	E3Fw-E4Rv	E3Fw-I4Rv
<i>Lrba</i> ^{+/+}	648 pb	1270 pb
<i>Lrba</i> ^{+/-}	648 pb	~700 pb
<i>Lrba</i> ^{-/-}	--	~700 pb

Para consultar la secuencia de los primers utilizados, dirigirse a Anexo 2.

A continuación, se detallan las condiciones finales a las que se trabajó para obtener los resultados que se presentarán más adelante.

3. Obtención de esplenocitos

Se practicó eutanasia en tres ratones de cada grupo, y se obtuvo el bazo de cada uno. Posterior a la maceración del órgano y un lavado con buffer salino de fosfatos (PBS), se obtuvieron los esplenocitos con solución de lisis de eritrocitos (Anexo 1). Se agitó por inmersión y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

Una vez realizados dos lavados con PBS, se resuspendió en RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10% (Anexo 1) y se realizó el conteo de células viables por la tinción negativa con azul de tripano.

Posteriormente, las células fueron congeladas en medio de congelación (Anexo 1). Algunas de las determinaciones fueron realizadas en las células recién extraídas, de ser así, se especificará más adelante. Otras determinaciones se realizaron en células que estuvieron almacenadas en nitrógeno líquido, y se utilizaron posterior a la confirmación del genotipo empleando DNA obtenido a partir de esplenocitos.

4. Cultivo celular

Para los ensayos funcionales, se cultivaron 1×10^5 esplenocitos descongelados en placas estériles de 96 pozos con 150 μ L de medio a diferentes tiempos, dependiendo de la función a evaluar, con las siguientes condiciones:

CONDICIÓN	RPMI suplementado	IL-4	LPS	F(ab) ₂ Anti-mouse IgM
Sin estímulo	SI			
IL-4	SI	33.3 ng/mL		
LPS	SI	33.3 ng/mL	100 ng/mL	
α IgM	SI	33.3 ng/mL		10 μ g/mL
α IgM/LPS	SI	33.3 ng/mL	100 ng/mL	10 μ g/mL
MARCA	Sigma Aldrich	*	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA	JacksonImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA

NOTA: *La IL-4 utilizada fue facilitada por el laboratorio del Dr. Leopoldo Santos Argumedo de CINVESTAV Unidad Zacatenco.

En todos los casos se incubó a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

5. Evaluación funcional

a) Diferenciación periférica

Se evaluó la proporción de células transicionales 1 (T1), transicionales 2 (T2) y maduras (M) en el bazo en condiciones basales y a las 6, 48 y 96 horas de cultivo bajo las condiciones descritas anteriormente.

Para separar las poblaciones, se utilizó la clasificación propuesta por Loder et al., 1999 en donde se detectan los marcadores CD21/CD35 y CD24 en los linfocitos B. Para esto, una vez concluido el tiempo de cultivo, se cosecharon las células y se realizó un lavado con PBS. A continuación, se agregaron los anticuerpos anti-mouse CD21/CD35 PE (eBioscience, Santa clara CA, USA), anti-mouse CD24 (BioLegend, San Diego CA, USA) y anti-human/Mouse CD45R/B220 APC (BioLegend). Se incubó en la oscuridad a 4°C por 15 minutos y se realizó un segundo lavado. Finalmente se fijaron las células con una solución de PBS-paraformaldehído al 0.37% y se analizaron las células en el citómetro FACs Aria (Becton-Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA).

Las células B transicionales y maduras se identificaron mediante la expresión diferencial de los marcadores CD21/CD35 y CD24 en una región positiva para B220 como se indica en la siguiente tabla:

	CD21/CD35	CD24
TRANSICIONALES 1	+/-	+++
TRANSICIONALES 2	+++	+++
MADURAS	++	+

Para analizar las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos B, se seleccionaron en primer lugar los eventos únicos, posteriormente se seleccionaron los linfocitos por su tamaño y granularidad. Los linfocitos B se seleccionaron por la expresión de B220 y, por último, se determinaron los porcentajes de las poblaciones por la expresión diferencial de CD21 y CD24. Todo lo anterior con el uso del Software FlowJo v 8.7 (Tree Star Inc).

b) Apoptosis de linfocitos B

Se evaluó el proceso de apoptosis de las células congeladas a tiempo cero y seis horas posteriores a su descongelación bajo las condiciones de cultivo descritas anteriormente.

Se realizó una suspensión celular con una densidad de 1×10^5 células resuspendidas en buffer de unión (eBioscience), libre de trazas de calcio u otros metales. Posteriormente, se agregaron 3.5 μ L de anexina V FITC (eBioscience) a 100 μ L de suspensión celular, se incubaron 10-15 minutos a temperatura ambiente y se realizó un lavado con buffer de unión, resuspendidas finalmente en 200 μ L. Por último,

se agregaron 2.5 μ L de yoduro de propidio (PI) (eBioscience) y se analizaron los resultados en el citómetro de flujo, protegidos de la luz a 4°C.

Para analizar este proceso, se consideraron tres poblaciones: vivas, en apoptosis temprana y muertas. Una vez seleccionados los linfocitos B, se utilizó un gráfico de tinción de anexina V-FITC y PI, en el que las células negativas para ambos colorantes, se consideraron como vivas; las células positivas para anexina V y negativas para PI consideradas como apoptóticas; por último las células positivas para ambos colorantes se consideraron como células muertas.

c) Activación de linfocitos B

Se evaluó la activación de linfocitos B bajo las condiciones anteriormente descritas, comparando los niveles de expresión basales y tras el estímulo:

Se detectó la expresión de CD69 membranal con el anticuerpo anti-ratón CD69 PE/Cy7 (BioLegend) a las 12 horas de cultivo. Una vez concluido el tiempo de cultivo, se cosecharon las células y el procedimiento de tinción fue el mismo que el descrito para la detección de subpoblaciones.

Para analizar la activación, se seleccionaron los linfocitos B y posteriormente se realizó un histograma de la expresión de CD69 y se calculó la intensidad media de fluorescencia (IMF), con la herramienta de FlowJo v 8.7 (Tree Star Inc, Saint Ashland OR, USA).

d) Determinación de la proliferación celular

Se realizó una dilución de CellTrace CFSE (Life technologies, Carlsbad CA, USA) en PBS a una concentración final de 1 μ M. Las células a analizar se lavaron con PBS en un tubo de 15 mL y se resuspendieron en 1 mL de CFSE previamente diluido para 1x10⁶ células.

Se colocaron 3 minutos en una estufa de CO₂ a 37°C y se resuspendieron por inmersión cada 60 segundos. Se detuvo la reacción con 4 mL de PBS con suero fetal bovino (SFB) al 8% a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 4°C y se lavaron dos veces con PBS-SFB 2% frío.

Finalmente, se resuspendieron en 1 mL de RPMI suplementado y se continuó con el cultivo por 96 horas con cada una de las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Una alícuota fue tomada para la medición inicial.

Concluido el tiempo de estímulo, se tiñeron las células con anti-B220 como se describió anteriormente. Se resuspendieron las células en PBS y se adicionó PI para seleccionar los linfocitos B viables. Finalmente, se analizaron en el citómetro FACs Aria y posteriormente en el software FlowJo.

Para determinar el porcentaje de proliferación, una vez seleccionados los linfocitos B viables, se obtuvieron histogramas para determinar el porcentaje de células que diluyeron CFSE, consideradas como células que proliferaron.

e) Marcadores membranales

Se detectó la expresión de CD44 con el anticuerpo anti-humano/ratón CD44 PerCP/Cy5.5 (BioLegend), MHC-II con el anticuerpo anti-ratón IA/E PE (BioLegend) y e IgM con el anticuerpo anti-ratón IgM PE/Cy7 (eBioscience) en condiciones basales y el procedimiento de tinción fue el mismo que el descrito anteriormente.

Como en el caso de la activación, para analizar la expresión de los marcadores, se seleccionaron primero los linfocitos B y posteriormente, se realizó un histograma para calcular la IMF.

6. Análisis estadístico

Para determinar diferencias significativas entre los resultados de cada grupo de ratones, se aplicó la prueba estadística de t de Student no pareada. Se utilizó un intervalo de confianza de 95%, en el cual se consideraron como diferencias significativas a los resultados con una p menor a 0.05 (*), mientras que las diferencias muy significativas con una p menor a 0.005 (**).

METODOLOGÍA ADICIONAL

1. Desarrollo de una línea celular humana de *LRBA*^{-/-}

a) Características del plásmido CRISPR-Cas9/LRBA

Adicional a los ensayos indicados anteriormente, se realizaron experimentos para obtener una línea celular humana deficiente de LRBA, mediante la tecnología CRISPR-Cas9 (facilitado por el Dr. Leopoldo Santos-Argumedo, del laboratorio de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-Unidad Zacatenco), con el plásmido representado en la Figura 4.

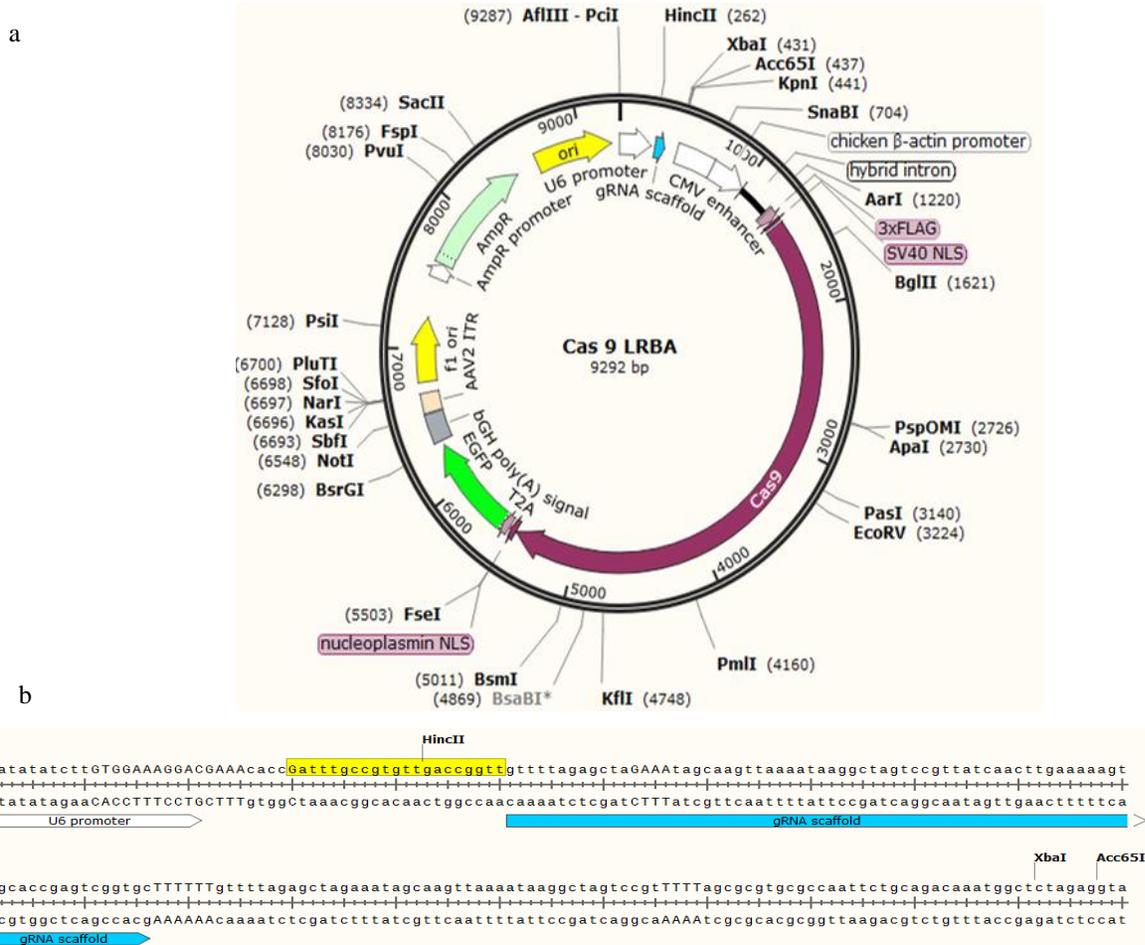


Figura 4.

Plásmido CRISPR-Cas9 LRBA. a) Se presenta el diagrama del plásmido utilizado, con una extensión de 9292 pares de bases. Se indican los sitios susceptibles a enzimas de restricción y se resalta elementos importantes que lo componen. En morado se indica la secuencia para codificar la enzima Cas9 y las señales de entrada y salida del núcleo (NLS). Además, el plásmido codifica a la proteína verde fluorescente (EGFP) que permitió identificar a las células que habían sido transfectadas. Se indica también la posición del RNA guía (gRNA) con secuencia complementaria en el exón 2 del gen de LRBA. También tiene una secuencia para codificar el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) que permitió seleccionar a las bacterias transformadas con el plásmido. Se indican también las regiones reguladoras y promotoras de cada uno de los genes que codifica el plásmido. b) Secuencia de gRNA (amarillo) y gRNA de andamiaje (azul).

b) Transformación de *E. coli* con plásmido CRISPR-Cas9/LRBA

Con la finalidad de obtener una buena cantidad de plásmido, se amplificó su expresión en bacterias *E. coli*.

Se adicionaron 750 ng del plásmido CRISPR-Cas9/LRBA a 50 μ L de bacterias competentes con CaCl_2 (1×10^6 bacterias), previamente descongeladas y la mezcla se incubó 30 minutos en hielo. Posteriormente se realizó el choque térmico en baño María a 42°C por 60 segundos y después se regresó al hielo por 60 segundos.

Se adicionaron 100 μ L de caldo Luria-Bertani (Amresco) atemperado, y una vez realizado este paso, se incubó 60 minutos a 37°C en agitación a 60 rpm. El total de volumen se depositó en 50 mL de medio Luria-Bertani con una concentración de ampicilina de 150 $\mu\text{g/mL}$.

Se incubó toda la noche a 37°C en agitación, para su posterior purificación.

c) Purificación de plásmido CRISPR-Cas9/LRBA

La purificación del plásmido se hizo empleando el kit MidiPrep® (Qiagen). Brevemente, se centrifugó el cultivo de bacterias a $3273g$ por 15 minutos a 4°C , se resuspendió el pellet en 4 mL de buffer B1 por pipeteo y se transfirió a un tubo nuevo de 15 mL.

Se agregaron 4 mL de buffer B2 y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces hasta que la solución se volviera completamente azul. Se incubó por 5 minutos a 4°C . Posteriormente se agregaron 4 mL de buffer B3 atemperado a 4°C y se mezcló por inversión 4 a 6 veces hasta que la solución se volviera blanca por la precipitación de proteínas, sin restos de azul. Se incubó en hielo 15 minutos, se mezcló por inversión y centrifugó a $3273 \times g$ 15 minutos a 4°C . Se colectó el sobrenadante y se repitieron las centrifugaciones hasta que el sobrenadante apareció claro y sin residuos.

Las columnas QIAGEN tip 100 se equilibraron con 4 mL de buffer QBT hasta que se vació por gravedad y entonces se aplicó el sobrenadante bacteriano. Una vez que se vació la columna, se lavó dos veces con 10 mL de buffer QC. Posteriormente se eluyó el DNA con 5 mL de buffer QF y se colectó el eluido en un tubo nuevo de 15 mL. La precipitación de DNA se llevó a cabo con 3.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión y se centrifugó a $3273 \times g$ 30 minutos a 4°C . El sobrenadante se decantó cuidadosamente. Se realizaron dos lavados con 2 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente. Finalmente el DNA se obtuvo por centrifugación $3273 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente y decantación cuidadosa.

El DNA se mantuvo durante 12 horas en una campana de flujo laminar para permitir la evaporación de los solventes empleados durante su extracción, una vez seco, se redisolvió con 200 μ L de buffer TE pH 8.0. Finalmente, se determinó el rendimiento y la pureza mediante espectrofotometría.

d) Transfección de plásmido CRISPR-Cas9/LRBA a células Raji

Una vez purificado el plásmido, se transfectó a la línea celular Raji (facilitada por el laboratorio del Dr. Leopoldo Santos-Argumedo, del laboratorio de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-Unidad Zacatenco), de la siguiente forma:

En placas de 12 pozos, se colocaron 1.5×10^6 células con 1 mL de RPMI sin antibiótico y 10% de SFB. Se dejaron sedimentar en incubación a 37°C . Por otro lado, se mezclaron 100 μL de medio Opti-MEM de ThermoFisher® con el volumen correspondiente a 2 μg del plásmido. En otro tubo, se mezclaron 100 μL de medio Opti-MEM y 4 μL de Lipofectamine 2000 de Invitrogen® previamente homogeneizada. Posteriormente, se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de incubación, se agregaron 200 μL del complejo DNA lipofectamina por goteo y bien distribuido a las células de la placa. Se incubaron a 37°C con atmósfera de CO_2 al 5% y 24 horas después se agregó 1 mL de RPMI suplementado.

Las células transfectadas fueron seleccionadas por la expresión de la proteína GFP o por dilución limitante.

e) Purificación de células por dilución limitante

Se realizó una suspensión celular con una densidad de 2×10^4 células/mL. En una placa estéril de 96 pozos, se agregaron 100 μL de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino en cada uno de los pozos, excepto en la posición A1.

Se agregaron 200 μL de la suspensión celular en A1 y se tomaron 100 μL para depositar en B1. Se mezcló por pipeteo evitando la formación de burbujas y se repitió la dilución 1:2 en toda la columna. Se desecharon 100 μL de H1. Se agregaron 100 μL adicionales de medio en la columna 1 y se transfirieron 100 μL de esta columna a la segunda (A2-H2). Las diluciones 1:2 se repitieron en las siguientes columnas y se desecharon 100 μL de los pozos de la última columna (A12-H12), quedando 100 μL en cada pozo (Figura 5). Se agregaron 100 μL de RPMI suplementado adicionales a cada pozo y se incubó a 37°C sin agitación en incubadora con 5% de CO_2 .

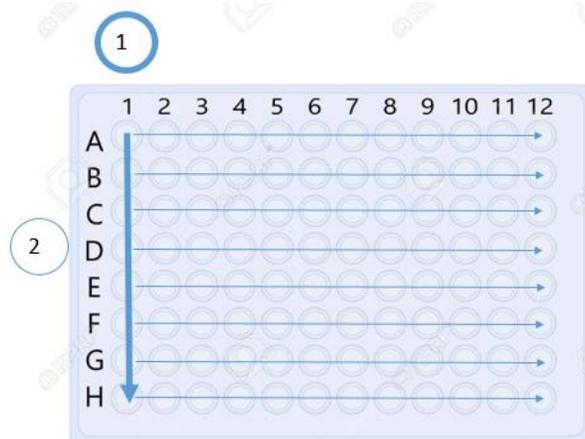


Figura 5. Esquema de dilución para separación de clonas. 1) Se realizan diluciones 1:2 en la primera columna (A1 a H1) y se desechan 100 μ L del pozo H1. 2) Se realizan diluciones 1:2 a partir de la columna 1 hacia la columna 12. Se desechan 100 μ L de la última columna. Por último se agregan 100 μ L de RPMI suplementado a cada pozo. Las clonas se detectaron como colonias únicas en el cultivo después de 5 a 7 días. Transcurridos aproximadamente 7 días más, las células con refringencia y sin inclusiones (viables), se transfirieron a una placa de 12 pozos con 1.5 mL de medio RPMI suplementado para continuar con su proliferación y utilizar las células en ensayos de detección de LRBA, por medio de Western blot.

2. Evaluación de expresión de LRBA

Con la finalidad de determinar si las clonas obtenidas tras la dilución limitante presentaban una ausencia en la expresión de LRBA, se realizó un gel de poliacrilamida con un gradiente de concentración de 6% a 18%, y gradiente de pH 6.8 y 8.5. Para ver la preparación de soluciones en Western blot, dirigirse al Anexo 1.

Se obtuvieron las proteínas a partir de 1 a 2 millones de células previamente centrifugadas. Posterior a esto, se lisaron con 100 μ L de buffer de lisis por cada millón de células por pipeteo en tubos de 1.5 mL, evitando crear burbujas y se incubó por 10 minutos en frío.

Centrifugar a 13500 rpm 10 minutos a 4°C en microcentrífuga. Se colectó el sobrenadante lo más rápido posible, para evitar resuspensión de pellet.

Se cuantificaron las proteínas en el espectrofotómetro Epoch (BioTek, Winooski VT, USA) a 595 nm por la adición del reactivo de Coomassie (SIGMA) y con ayuda de una curva de calibración de BSA (albúmina bovina sérica)(Thermo Fisher Scientific). Se agregó el buffer Laemli adicionado con 5% de β -mecaptoetanol y se incubó a Baño María por 5 minutos.

Se colocó el volumen correspondiente a 30 μ g de proteína en cada pozo y se efectuó la electroforesis con buffer Tris-Glicina y 1% de SDS a 80 V una hora y 100 V por cuatro horas. El marcador de peso molecular utilizado fue HR Spectra Protein Ladder (40 a 300 kDa) (Thermo Fisher Scientific).

Concluido el tiempo de electroforesis, se procedió a realizar la transferencia en membranas de PVDF previamente equilibradas en etanol al 70% y después en buffer de transferencia Tris-Glicina y 5% de isopropanol.

Se ensambló el sándwich de transferencia y se colocó en cámara húmeda, permitiendo la transferencia a 45 V por una noche, a 4°C. Concluido el tiempo de transferencia, se colocó la membrana en TBS-Tween 0.1% y se lavó en agitación por 5 minutos. Posteriormente se realizó el bloqueo con una solución de TBS-Tween y leche al 3% en agitación por 30 minutos.

Las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal conejo anti-humano LRBA ab121601 (Novus Biologicals, Centennial CO, USA) a una concentración de 1:500 en leche al 1% en TBS-Tween (solución de lavado) y se incubó toda la noche a 4°C. Se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado y posteriormente se colocó el anticuerpo secundario cabra Anti-conejo IgG HRP (Jackson ImmunoResearch) a una concentración de 1:3000. Se incubó por 90 minutos en agitación a temperatura ambiente.

Se realizaron tres lavados con leche 1% y se procedió a revelar con SuperSignal West Femto Maximum Sensivity Substrate (Thermo Scientific) y se dio lectura en el equipo ChemiDoc XRS+ (BIORAD).

Para revelar GAPDH, se utilizó el anticuerpo Anti-G3PDH (Trevigen, Gaithersburg MD, USA) en una concentración 1:10,000 y se incubó en agitación por 90 minutos. Después se realizaron tres lavados y se continuó el revelado como en el caso de LRBA.

3. Confirmación de mutación

a) Amplificación del Exón 2 de *LRBA*

Las clonas en las que se observó la ausencia de LRBA, se obtuvo DNA como ya se mencionó previamente y para determinar si se introdujo una mutación por medio del sistema CRISPR-CAS9, se secuenció el exón 2 de LRBA. La extracción de DNA en la línea celular se realizó como se indicó en el procedimiento para extraer DNA genómico de esplenocitos.

Ya que el RNA guía del plásmido Cas9-LRBA está dirigido al exón 2 de *LRBA*, lo primero que se realizó fue una reacción de amplificación con las siguientes condiciones:

Se realizó una mezcla de reacción para 25 μ L:

PCR Buffer 10x	2.5 μ L
MgCl₂ 50 mM	0.75 μ L
dNTP's 10 mM	0.5 μ L
Primer Forward 25 μM	0.2 μ L
Primer Reverse 25 μM	0.2 μ L
Taq polimerasa	0.125 μ L
Agua inyectable	19.725 μ L
DNA (solución 50 ng/μL)	1 μ L

Las condiciones de amplificación fueron: 5 minutos a 95°C y 40 ciclos de: 95°C 30 segundos, 64°C 30 segundos, 72°C 60 segundos. Por último una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Para visualizar los productos de amplificación, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa (Amresco) al 2% por 40 minutos a 100 V. En cada pozo se mezclaron 5 µL del producto de amplificación con 1 µL de buffer de carga. Una vez concluida la electroforesis, se tiñó el gel 15 minutos en solución de bromuro de etidio 0.04% y se dio lectura en el equipo ChemiDoc™ XRS+ (BIORAD). El tamaño de la banda esperado es de ~650 pb.

b) Purificación de amplicones

En las muestras que mostraron banda en el gel de agarosa, se agregó 1.5 µL de la siguiente mezcla, con la finalidad de aumentar la pureza:

Exonucleasa I (Thermo Scientific)	0.5 µL
TSAP (Promega)	0.1 µL
Multicore Buffer (Thermo Scientific)	0.9 µL

Se incubó a 37°C por 15 minutos y 80°C por 15 minutos.

c) Reacción de secuenciación

Una vez purificado el producto de amplificación, se realizó la mezcla de secuenciación con el kit Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied biosystems, Foster City CA, USA) de la siguiente forma:

DMSO	0.5 µL
Buffer 5x	2 µL
Big Dye	0.8 µL
Primer 25 mM	0.4 µL
DNA	1 µL (~150ng)
Agua inyectable	5.3 µL

Esta mezcla fue realizada para cada primer (E2Fw y E2Rv) y las condiciones de reacción fueron las siguientes: 96°C por 3 minutos y 40 ciclos de: 96°C 10 segundos, 64°C 5 segundos y 60°C 5 minutos. Por último 60°C por 10 minutos y 10°C.

d) Purificación de reacción de secuenciación

Se agregaron 45 µL de solución SAM del kit de purificación BigDye® Xterminator™ (Applied Biosystems) se agitó vigorosamente por 30 minutos. Concluido el tiempo de agitación, se centrifugó 5 minutos a 13500 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se mantuvo a -30°C protegido de la luz hasta que fueron procesadas.

e) Análisis de las secuencias obtenidas

Una vez obtenidos los datos de secuenciación, se analizaron en el programa Chromas v2.6.5 (Technelysium Pty Ltd, Pauling Foothill Ranch CA, USA) para visualizar los electroferogramas. Para identificar la mutación introducida, se utilizó la herramienta bioinformática BLAST para comparar la secuencia obtenida en secuenciación, con la secuencia blanco reportada en la base de datos. Cuando se identificó alguna mutación, se comprobó la integridad de la secuencia en el programa Chromas.

4. Evaluación de autofagia por Western blot de LC3-I/II.

Se realizó un gel de poliacrilamida con un gradiente de concentración de 6% y 15%, y gradiente de pH 6.8 y 8.5. La preparación y cuantificación de muestras proteicas fue de la misma forma que para LRBA. También se colocó el volumen correspondiente a 30 µg en cada pozo y el marcador de peso molecular fue Page Ruler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) de Thermo Fisher Scientific.

Se realizó la electroforesis por 60 minutos a 80 V y 3 horas a 100 V hasta que la banda de menor peso molecular haya recorrido alrededor del 90% del gel. La transferencia fue en cámara semiseca a 15 V por 30 minutos y posteriormente se lavó con TBS-Tween 0.1% e igual que LRBA, un bloqueo con Leche al 3% por 30 minutos.

El anticuerpo Anti-humano LC3-I/LC3-II ab58610 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) se colocó en una concentración 1:1000 y se incubó toda la noche a 4°C. Los pasos siguientes se llevaron a cabo igual que al revelar LRBA.

Para determinar el proceso de autofagia, se calculó la relación de intensidad de banda de LC3-II entre la intensidad de banda de la proteína de carga GAPDH por densidad óptica.

RESULTADOS

A) Genotipificación de ratones

Con la finalidad de determinar la delección del exón 4 de *Lrba*, se realizaron dos reacciones de amplificación para cada ratón. En la Figura 6 se observa que para el ratón *Lrba*^{+/+} solamente hay dos amplicones, uno correspondiente a la longitud del exón 3 al exón 4 (E3E4), con una longitud entre 600 y 700 pb, y otro correspondiente a la longitud del exón 3 al intrón 4 (E3I4) con una longitud de aproximadamente 1200 pb. Para el ratón *Lrba*^{+/-}, existen tres amplicones en total: uno correspondiente al E3E4 con una longitud entre 600 y 700 pb; para la reacción E3I4 existen dos amplicones, uno correspondiente al alelo silvestre, con una longitud aproximada de 1200 pb, y otro correspondiente al alelo mutado con una longitud entre 700 y 800 pb. Por último, en el ratón *Lrba*^{-/-}, no ocurre la amplificación del E3E4, debido a la eliminación del exón 4 en ambos alelos, y en la reacción E3I4, hay una amplificación de 700 a 800 pb, lo que confirma que en ambos alelos fue eliminado el exón 4. En los últimos carriles, se muestran los controles negativos (C-) y controles positivos de alelos silvestres (C+) de cada reacción de amplificación.

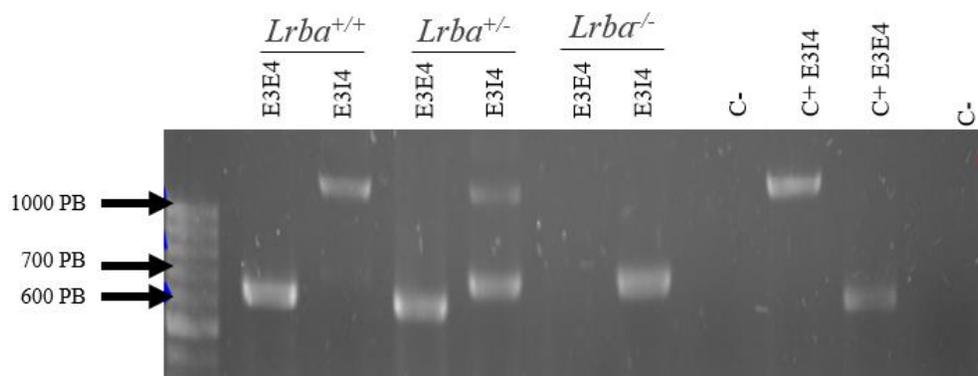


Figura 6. Genotipificación de ratones. Se indican los resultados del PCR para amplificar el exón3-exón4 (E3E4) y el exón3-intrón4 (E3I4) provenientes de los ratones utilizados en el proyecto. Aunque no se analizaron ratones heterocigotos a la mutación (*Lrba*^{+/-}), se muestran las bandas amplificadas.

B) Diferenciación periférica

Se obtuvieron los porcentajes en condiciones basales de las subpoblaciones de linfocitos B: transicionales 1 (T1), transicionales 2 (T2) y maduras (M) por la expresión membranal de CD21 y CD24 a partir de linfocitos B220 positivos en los ratones previamente genotipificados. En la Figura 7 se muestran las proporciones de subpoblaciones de linfocitos B. Al realizar el análisis estadístico, se encontró que hay una mayor proporción de células T1 en los ratones *Lrba*^{-/-} comparado con su contraparte *Lrba*^{+/+}, mientras que hay menor porcentaje de células T2 en los ratones *Lrba*^{-/-}; la diferencia es significativa en las T1 al calcular el número de células, es decir, hay un mayor número de T1 en los ratones *Lrba*^{-/-}. Con respecto a las células maduras, no existe ninguna diferencia significativa entre los grupos de ratones (Figura 8).

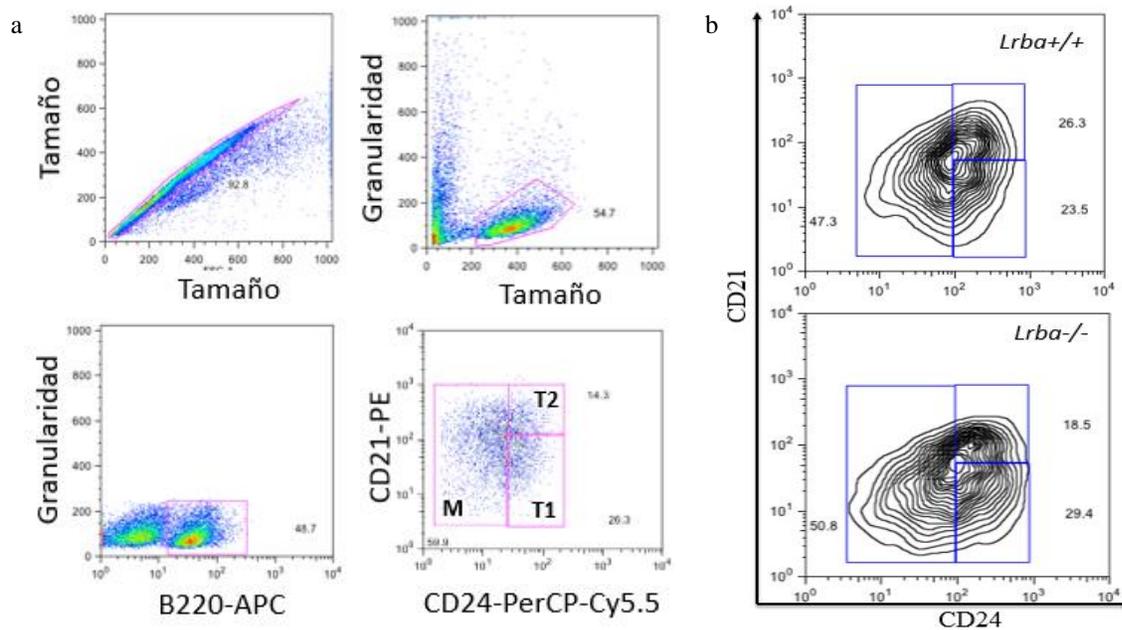


Figura 7. Diferenciación periférica de linfocitos B en ratones. a) Panel de selección de subpoblaciones de linfocitos B esplénicos. Para determinar la proporción de células B transicionales 1 (T1), transicionales 2 (T2) y maduras (M) se realizó en primer lugar la selección de singletes mediante el gráfico de Tamaño-Tamaño (FSC-A vs FSC-H), posteriormente se seleccionaron los linfocitos por sus características de tamaño y granularidad. Se utilizó el marcador B220 para seleccionar los linfocitos B y a partir de éstos, se graficó la expresión de los marcadores CD21 y CD24 para distinguir las subpoblaciones, según lo propuesto por Loder, et al., en 1999. b) Gráfico representativo de las proporciones de T1, T2 y M en bazo. En la imagen superior, se muestran los resultados del ratón *Lrba*^{+/+}, y en la imagen inferior al ratón *Lrba*^{-/-}.

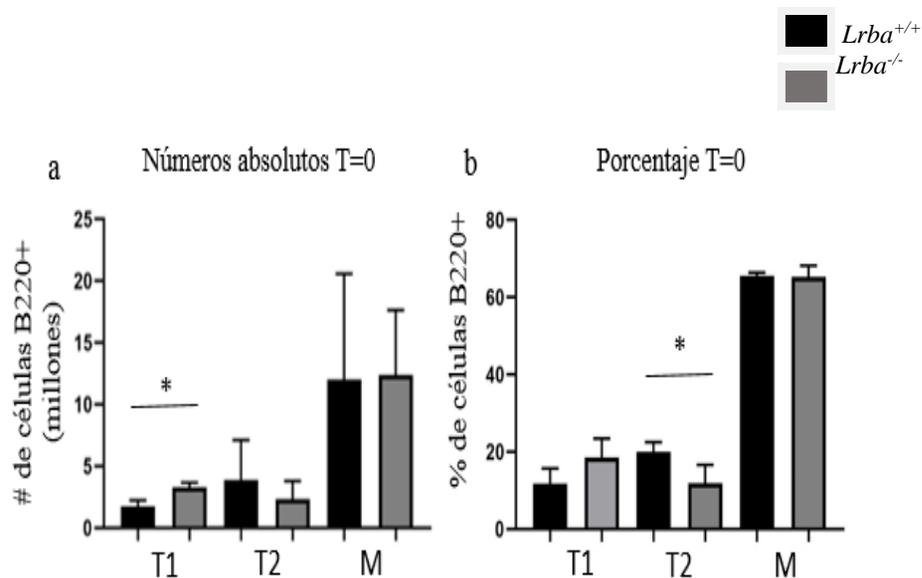


Figura 8. Subpoblaciones de linfocitos B esplénicos en condiciones basales. a) Se muestra el gráfico de números absolutos de cada subpoblación de linfocitos B B220 positivos en condiciones basales. Hay una diferencia significativa en el número de transicionales 1, existe un mayor número en los ratones *Lrba*^{-/-} que en los ratones *Lrba*^{+/+}. b) Gráfico de porcentaje de cada una de las subpoblaciones de linfocitos B B220 positivos en condiciones basales. El porcentaje de transicionales 2 es menor en los ratones *Lrba*^{-/-} que en los ratones *Lrba*^{+/+}, cuya diferencia es estadísticamente significativa. En ambos gráficos, se observa que las células Maduras se conservan en las mismas proporciones en ratones *Lrba*^{-/-} que en los ratones *Lrba*^{+/+}. (n=3) Prueba estadística: t de Student. *= p<0.05. Las barras negras representan a los ratones *Lrba*^{+/+} y las barras grises a los ratones *Lrba*^{-/-}.

Debido a las diferencias encontradas en células transicionales, se decidió evaluar el porcentaje de las subpoblaciones a diferentes tiempos de cultivo, con la finalidad de identificar alguna diferencia con estimulación vía BCR, ya que se ha reportado que el entrecruzamiento de BCR en transicionales 1 lleva a apoptosis, mientras que en las transicionales 2, permite su proliferación.

Para dicho propósito, se trabajó con células conservadas a -70°C, por lo que se determinó el porcentaje de las subpoblaciones en condiciones basales, en las cuales, se pierde la significancia estadística, pero se conservan las tendencias observadas en células recién purificadas (Figura 9a).

En la determinación de subpoblaciones a seis horas de cultivo se buscó encontrar alguna diferencia que reflejara una menor o mayor sobrevivencia de las células. No hay ninguna diferencia significativa en las T1 entre los grupos de ratones. En el caso de las T2, se observa una diferencia significativa cuando las células son cultivadas con Anti-IgM y LPS. En las células maduras se observó una diferencia significativa cuando son cultivadas únicamente con IL-4 (Figura 9b).

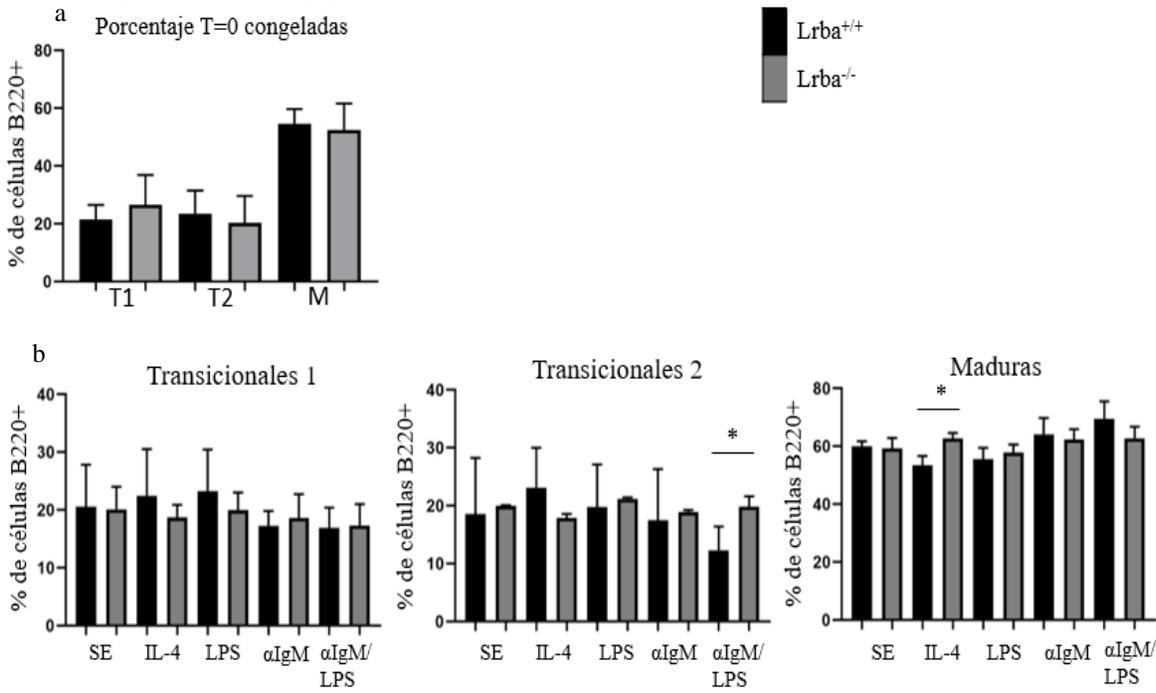


Figura 9. Subpoblaciones de linfocitos B a 6 horas de cultivo. a) Subpoblaciones de linfocitos B en condiciones basales, después de ser descongeladas. b) Subpoblaciones de linfocitos B a 6 horas de cultivo. En el gráfico de la izquierda se muestra el porcentaje de transicionales 1 en cada condición de cultivo. El gráfico central es de las transicionales 2 y el de la derecha de las células maduras. (n=3) Prueba estadística: t de Student. *= p<0.05. Las barras negras representan a los ratones *Lrba*^{+/+} y las barras grises a los ratones *Lrba*^{-/-}.

La siguiente determinación se realizó a 48 horas de cultivo, ya que se plantea que es el tiempo que toma una transicional 1 en convertirse a transicional 2. No se observó ninguna diferencia significativa en las distintas subpoblaciones bajo ninguna condición (Figura 10).

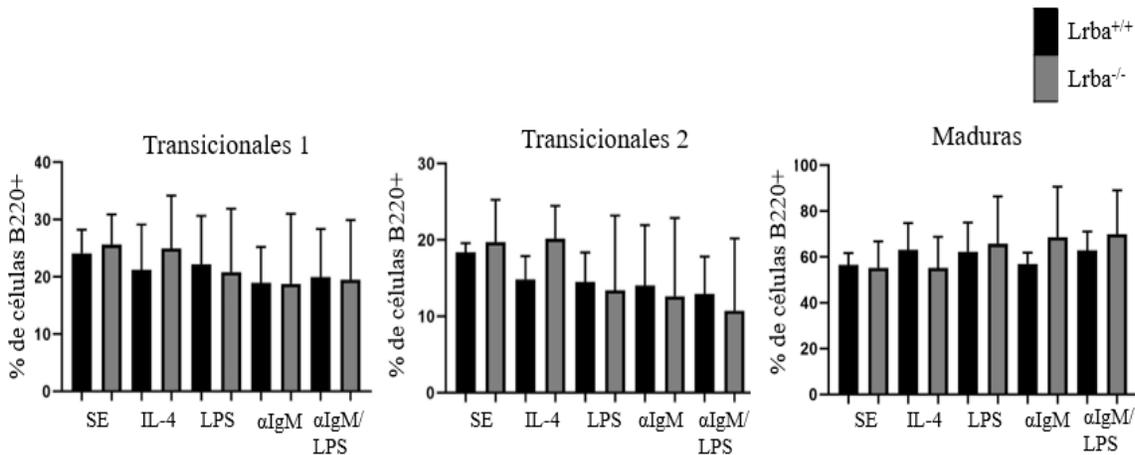


Figura 10. Subpoblaciones de linfocitos B a 48 horas de cultivo. (n=3) Prueba estadística: t de Student. Las barras negras representan a los ratones *Lrba*^{+/+} y las barras grises a los ratones *Lrba*^{-/-}.

La última determinación fue realizada a 96 horas de cultivo, que como en el resultado anterior, no hay ninguna diferencia significativa (Figura 11). Se eligió este tiempo de cultivo, porque se platea que es el tiempo requerido por una célula transicional para concluir su maduración en bazo.

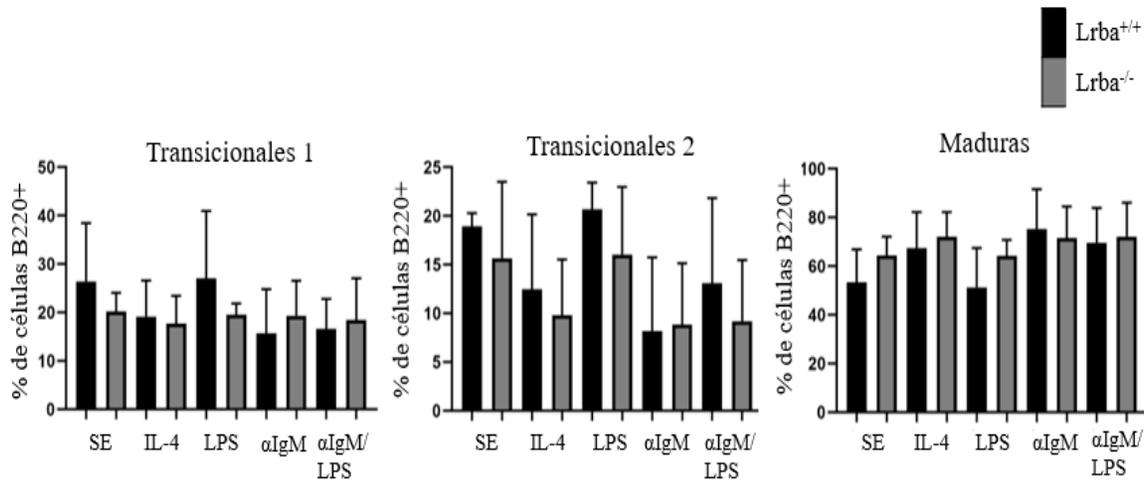


Figura 11. Subpoblaciones de linfocitos B a 96 horas de cultivo. (n=3) Prueba estadística: t de Student. Las barras negras representan a los ratones *Lrba*^{+/+} y las barras grises a los ratones *Lrba*^{-/-}.

Con la finalidad de describir el comportamiento de las proporciones de subpoblaciones a través del tiempo de cultivo, se realizó un análisis de cada subpoblación cultivada con IL-4 o con IL-4/Anti-IgM, y se compararon los dos grupos de ratones.

Aunque se mencionó que no hay ninguna diferencia significativa, se puede observar que en el caso de las células T1, en condiciones basales hay un mayor porcentaje en los ratones *Lrba*^{-/-}, mientras que después de 6 horas de cultivo, hay un menor porcentaje de esta población que en ratones *Lrba*^{+/+} en ambas condiciones de cultivo (Figura 12a).

En el caso de las T2, se observa que el comportamiento es similar en ambos grupos de ratones, al igual que las células maduras (Figura 12b y 12c). En general, se observa que, a mayor tiempo de cultivo, el porcentaje de células transicionales disminuye y el porcentaje de células maduras aumenta, en ambos grupos de ratones.

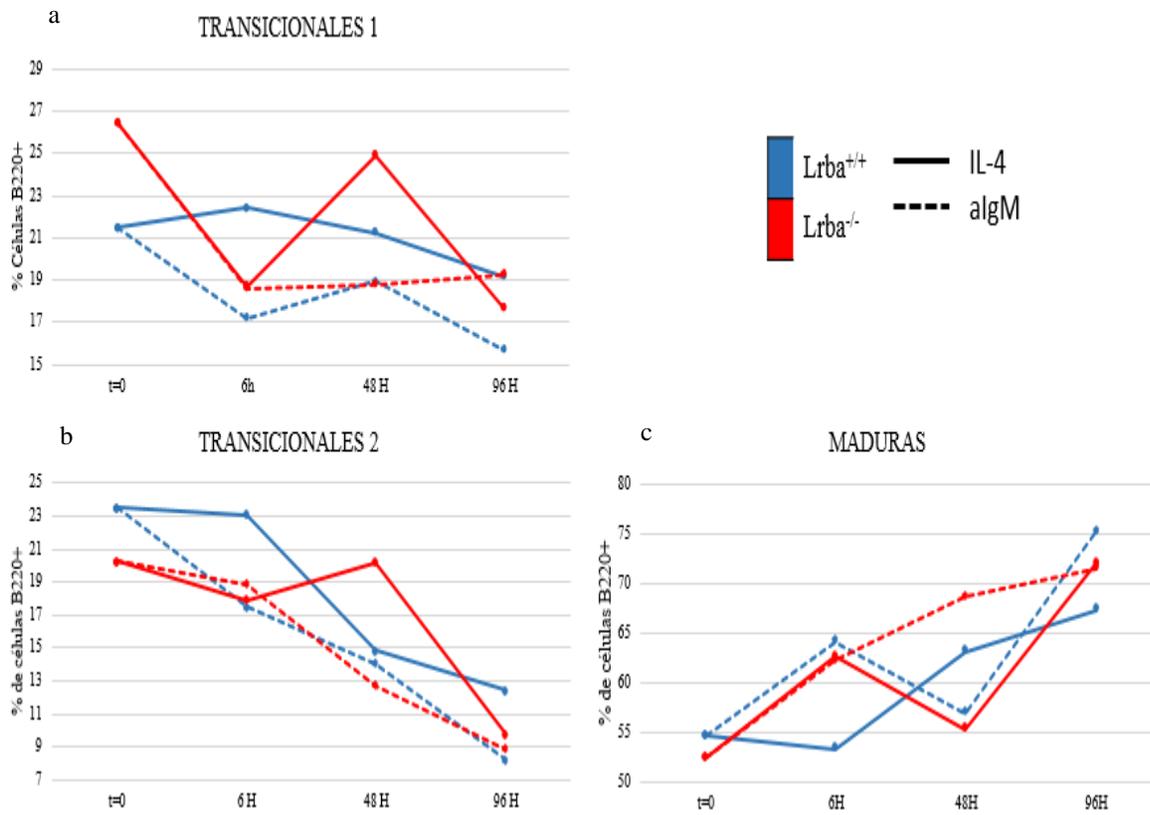


Figura 12. Porcentaje de subpoblaciones de linfocitos B a diferentes tiempos de cultivo. a) Gráfico de porcentaje de transicionales 1 a 0, 6, 48 y 96 horas de cultivo en presencia sólo de IL4 ó de IL4+anti-IgM. b) Gráfico de porcentaje de transicionales 2 a 6, 48 y 96 horas. c) Gráfico de porcentaje de maduras a 6, 48 y 96 horas. (n=3) Las líneas azules corresponden a los ratones *Lrba*^{+/+} y las líneas rojas a los ratones *Lrba*^{-/-}. Las líneas continuas corresponden al cultivo con IL-4 y las líneas punteadas al cultivo con Anti-IgM.

C) Apoptosis

Uno de los defectos asociados a ICV, es el aumento de apoptosis de linfocitos B, por lo que se realizaron ensayos de apoptosis en los ratones utilizados. Para dicho fin, se seleccionaron los linfocitos B220 positivos y se llevó a cabo una doble tinción con anexina V y yoduro de propidio a seis horas de cultivo. Se consideraron como células vivas a las células negativas para anexina V y negativas para yoduro de propidio, las células en apoptosis temprana fueron positivas para anexina V y negativas para yoduro de propidio, y, por último, las células muertas positivas para ambos marcadores (Figura 13). Aunque se esperaba un mayor porcentaje de células apoptóticas y muertas en los ratones *Lrba*^{-/-}, al realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratones a las seis horas de cultivo con los diferentes estímulos (Figura 14).

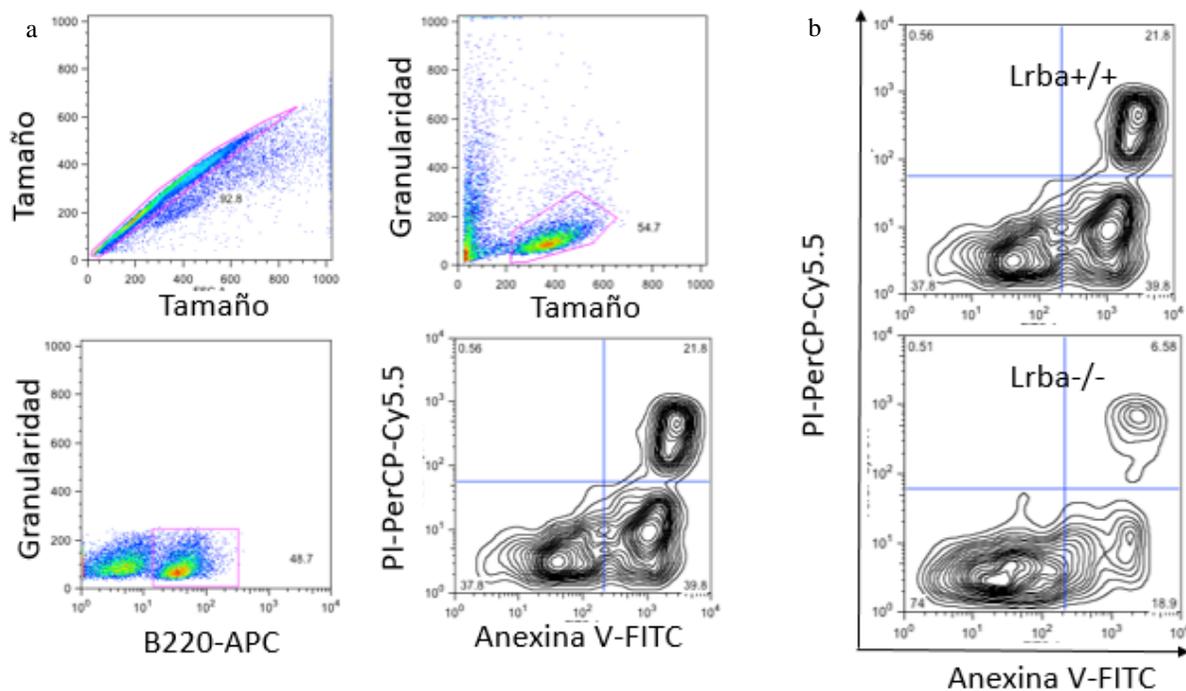


Figura 13. Apoptosis de linfocitos B. a) Panel de selección para apoptosis. En primer lugar, se seleccionaron los eventos únicos al graficar tamaño contra tamaño, posteriormente la selección de linfocitos por su tamaño y granularidad. Como en el caso de diferenciación, se utilizó el marcador B220 para seleccionar los linfocitos B. Por último, se realizó un gráfico de anexina V y PI para determinar los porcentajes de células vivas, muertas y apoptóticas. b) Gráfico representativo de apoptosis en linfocitos B de ratones *Lrba*^{-/-} y ratones *Lrba*^{+/+}.

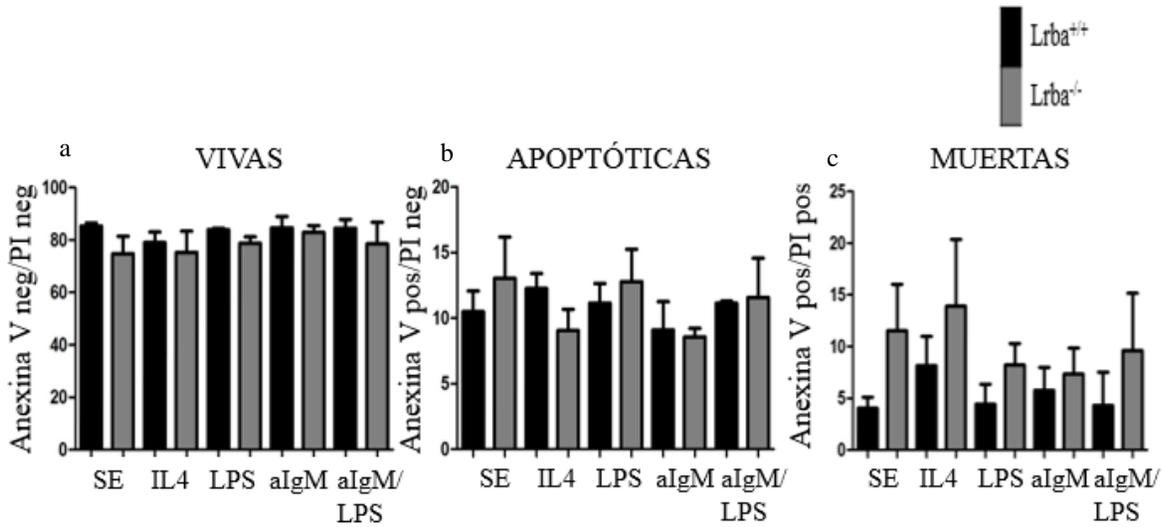


Figura 14. Apoptosis de células B a 6 horas de cultivo. a) Gráfico de porcentaje de linfocitos B vivos en diferentes condiciones de cultivo. b) Gráfico de porcentaje de linfocitos B apoptóticos. Se observa que aunque no se encontró ninguna diferencia significativa, hay un mayor número linfocitos B *Lrba*^{-/-} apoptóticos en condiciones sin estímulo. c) Gráfico de porcentaje de linfocitos B muertos. No se observa ninguna diferencia significativa, aunque, al igual que en apoptosis temprana, hay un mayor porcentaje de células muertas cuando no hay un estímulo extra o en las condiciones IL-4 e IL-4/aIgM/LPS en los ratones *Lrba*^{-/-}. (n=3) Prueba estadística: t de Student. Las barras negras representan a los ratones *Lrba*^{+/+} y las barras grises a los ratones *Lrba*^{-/-}.

D) Activación de linfocitos B

Uno de los defectos asociados a la deficiencia de LRBA en pacientes con ICV, es una activación disminuida en linfocitos B. En este trabajo, se utilizó a CD69 como marcador de activación de linfocitos B y el panel de selección utilizado fue similar al que se indica para la evaluación de marcadores relacionados con BCR. Se encontró que la expresión de CD69 en linfocitos B es similar entre los dos grupos de ratones, por lo que no hay ninguna diferencia significativa (Figuras 15 y 16).

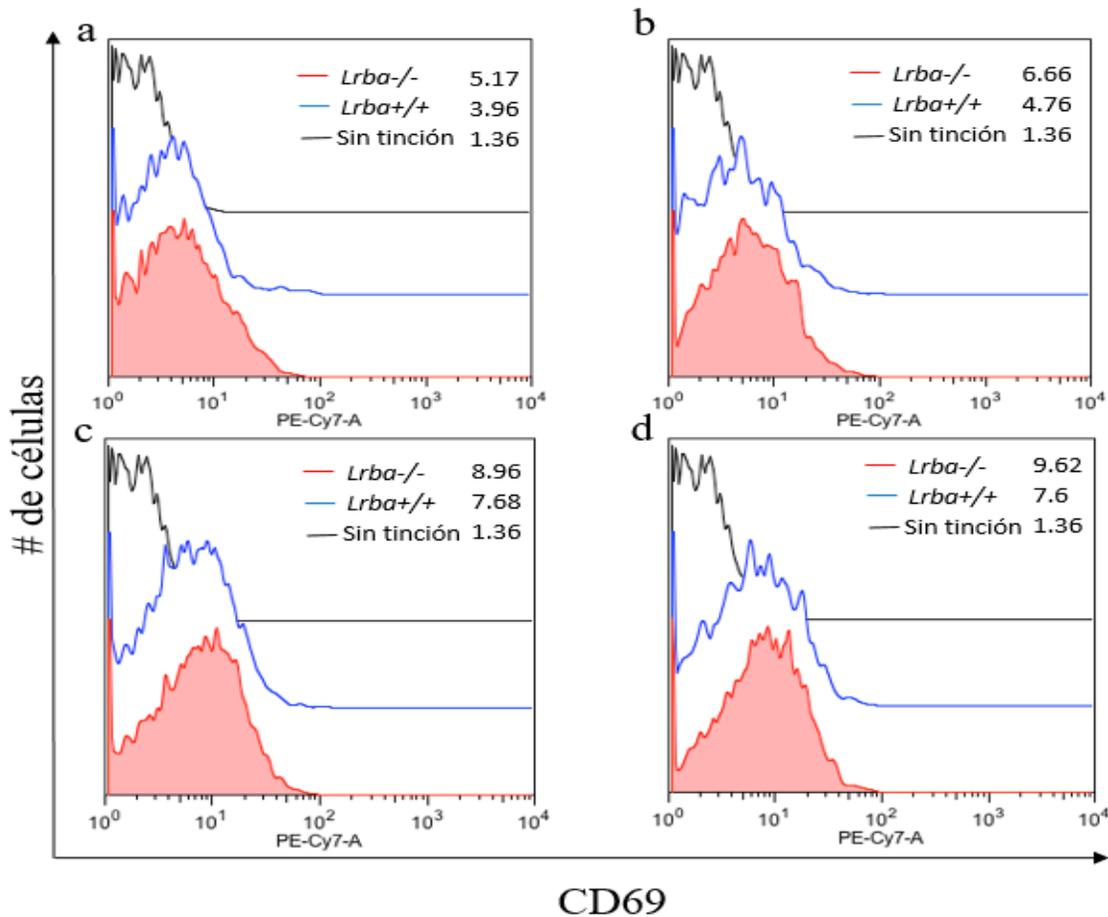


Figura 15. Expresión de CD69 en linfocitos B a 12 horas de cultivo. a) Histograma de expresión en condiciones con IL-4 b) Histograma de expresión en cultivo con IL-4 y Anti-IgM. c) Histograma de expresión en cultivo con IL-4 y LPS. d) Histograma de expresión en cultivo con IL-4, Anti-IgM y LPS. Se empalmaron tres histogramas: en negro el correspondiente a las células sin tinción, en azul para las células *Lrba*^{+/+} y en rojo las células *Lrba*^{-/-}. Se indican las IMF de cada muestra.

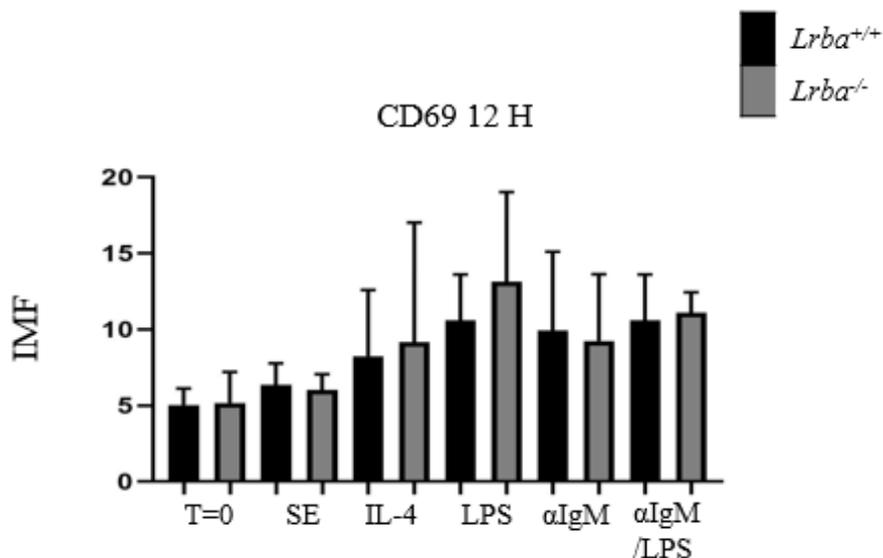


Figura 16. Activación temprana de linfocitos B. a) Gráfico de expresión de CD69 en linfocitos B a 12 horas de cultivo. No se observan diferencias significativas entre los ratones *Lrba*^{-/-} y *Lrba*^{+/+}, aunque con el estímulo IL-4/LPS se expresa más en los linfocitos B *Lrba*^{-/-} (n=3) Prueba estadística: t de Student. Las barras negras representan a los ratones *Lrba*^{+/+} y las barras grises a los ratones *Lrba*^{-/-}.

E) Proliferación de linfocitos B

Se evaluó la proliferación de linfocitos B con los estímulos ya indicados para lo cual, de la misma forma que con los análisis anteriores, se seleccionaron los linfocitos B a partir de eventos únicos y se consideraron como células vivas a las negativas para yoduro de propidio. Con la selección de células que salieran del histograma principal para CFSE (FITC), se obtuvo el porcentaje de proliferación (Figura 17a). Se encontró que los linfocitos B *Lrba*^{-/-} proliferan en un menor porcentaje que los *Lrba*^{+/+} cuando son cultivadas con anti-IgM (Figura 17b y Figura 18).

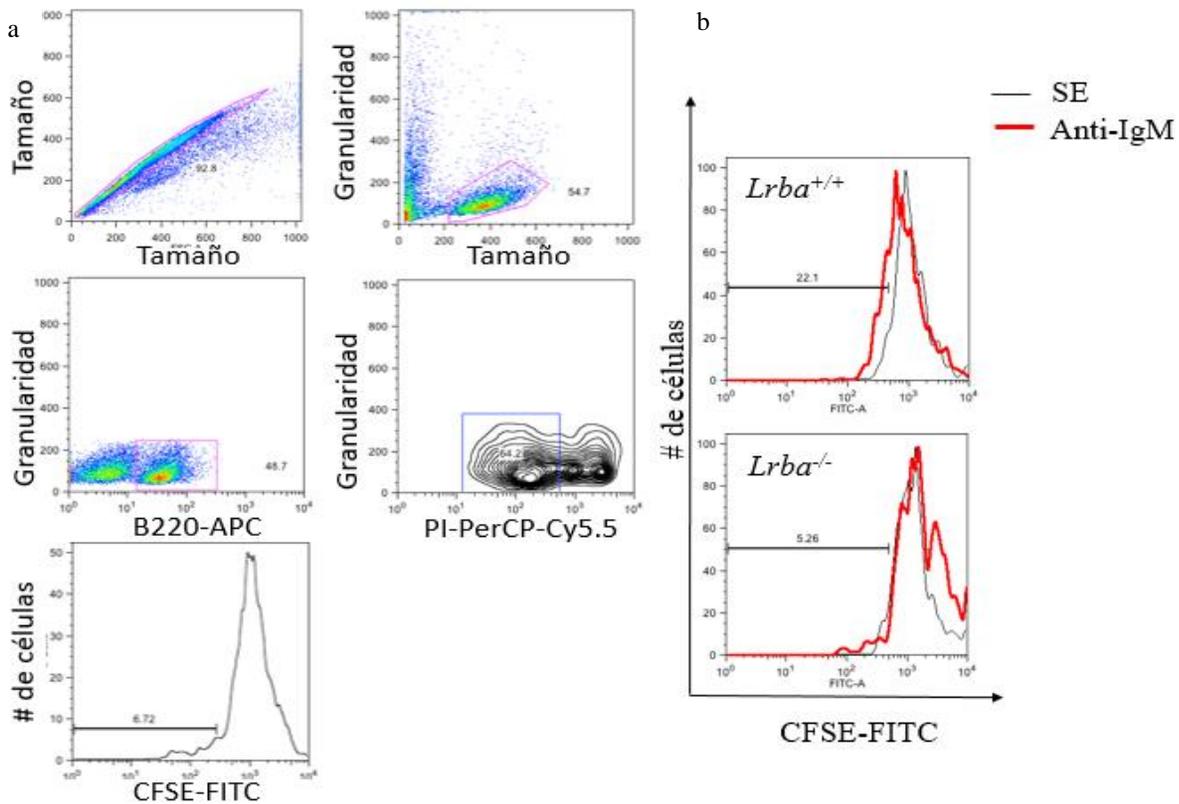


Figura 17. Proliferación de linfocitos B. a) Panel de selección para obtener el porcentaje de proliferación. Se seleccionaron los linfocitos B como se describió anteriormente, y las células vivas fueron las negativas para PI. Se obtuvo el porcentaje de proliferación al seleccionar las células que salieran del histograma principal. b) Gráfico representativo de proliferación de linfocitos B estimulados vía BCR. Se observa que hay una menor proliferación de linfocitos B *Lrba*^{-/-} cuando son tratados con anti-IgM.

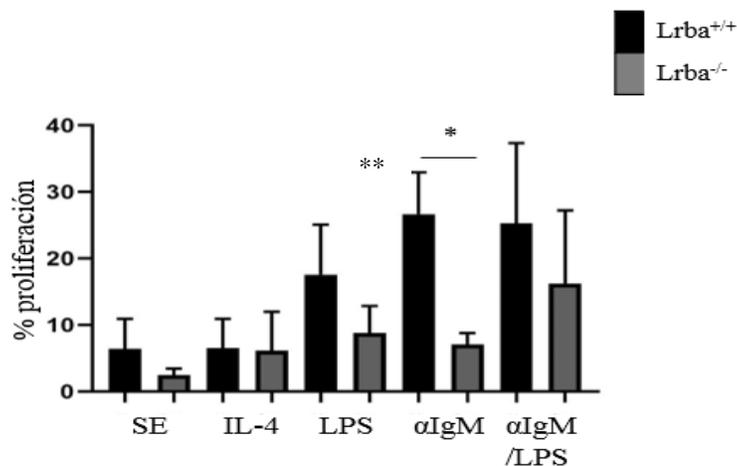


Figura 18. Proliferación de linfocitos B a 96 horas de cultivo. Se muestra el gráfico de porcentaje de linfocitos B220+ vivos en proliferación. Hay una menor proliferación inducida vía BCR en los linfocitos B *Lrba*^{-/-} con respecto a los linfocitos B *Lrba*^{+/+}. La diferencia es muy significativa. Aunque en las condiciones LPS y αIgM/LPS no hay una diferencia significativa, también hay una tendencia a menor proliferación en los ratones *Lrba*^{-/-}. (n=3) Prueba estadística: t de Student. *= p<0.05, **= p<0.005. Las barras negras representan a los ratones *Lrba*^{+/+} y las barras grises a los ratones *Lrba*^{-/-}

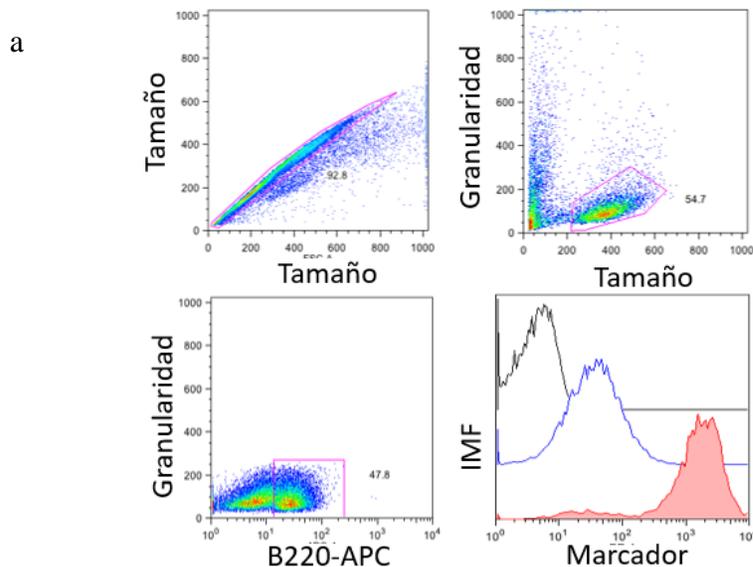
F) Expresión de proteínas membranales en linfocitos B

Dado que LRBA se ha asociado con el adecuado reciclamiento de proteínas de membrana en linfocitos T, cómo es el caso de CTLA-4, analizamos la expresión membranal de algunas de las moléculas importantes para desencadenar una respuesta adecuada de linfocitos B, en condiciones basales.

Similar a los ensayos de apoptosis y diferenciación, se seleccionaron los eventos no agrupados, posteriormente se seleccionaron los linfocitos por su tamaño y granularidad y finalmente se seleccionaron los linfocitos que expresaron B220. Para cuantificar la expresión de los marcadores, se calculó la IMF de cada uno. En primer lugar, se evaluó la expresión de CD21 membranal y se encontró que los linfocitos B *Lrba*^{-/-} expresan una menor cantidad, con respecto a los ratones *Lrba*^{+/+} (Figura 19b y 20a)

Debido a que se encontró una menor expresión de CD21 en los ratones *Lrba*^{-/-}, se buscó si había defecto en otros marcadores. Nuestros resultados muestran que hay una mayor expresión de MHC-II (I-A) (Figura 19c) y CD44 (Figura 19d) en los ratones *Lrba*^{-/-}, en condiciones basales, lo cual es estadísticamente significativo para ambos casos (Figura 20d y 20f),

Por otro lado, se encontró que hay una menor expresión de IgM membrana (referido en este trabajo como BCR) (Figura 19e) y una mayor expresión de B220 (Figura 19f) en los ratones *Lrba*^{-/-}. Al realizar el análisis estadístico, se encontró que, en estos últimos dos marcadores, no hay una diferencia significativa (Figura 20b y 20c).



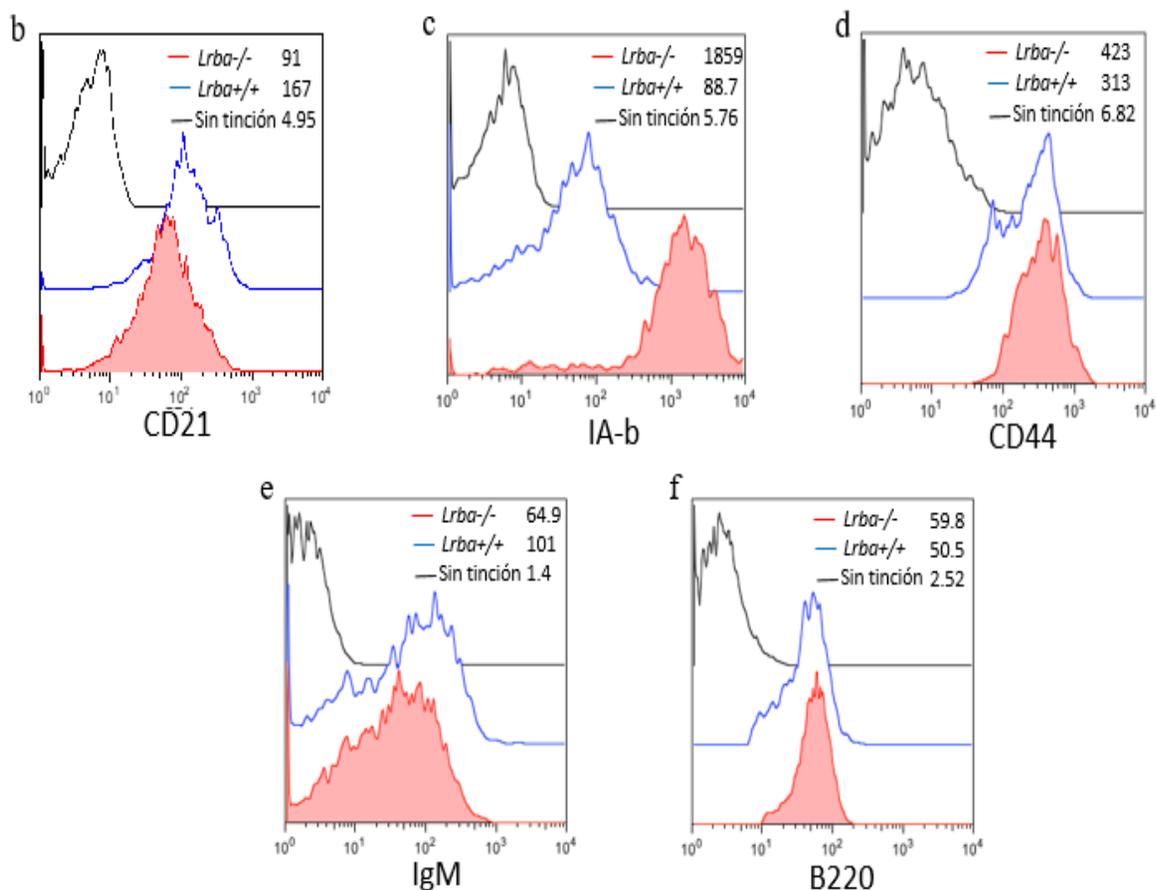


Figura 19. Expresión de marcadores membranales en linfocitos B. a) Panel de selección para la evaluación de marcadores membranales. En primer lugar, se seleccionaron los eventos únicos para evitar analizar las células que estuvieran agrupadas entre sí. Después se seleccionaron los linfocitos por su tamaño y granularidad. Los linfocitos B fueron seleccionados por la expresión de B220, a partir de los cuales se realizó un histograma para cada marcador, en el cual se indicó la intensidad media de fluorescencia (IMF). Se empalmaron tres histogramas: *Lrba*^{-/-}, *Lrba*^{+/+} y el control de las células sin teñir. b) Expresión de CD21 en condiciones basales. c) Expresión de MHC-II (IA-b) en condiciones basales. d) Expresión de CD44 en condiciones basales. e) Expresión de IgM en condiciones basales. f) Expresión de B220 en condiciones basales. Se empalmaron tres histogramas: en negro el correspondiente a las células sin tinción, en azul para las células *Lrba*^{+/+} y en rojo las células *Lrba*^{-/-}. Se indican las IMF de cada muestra.

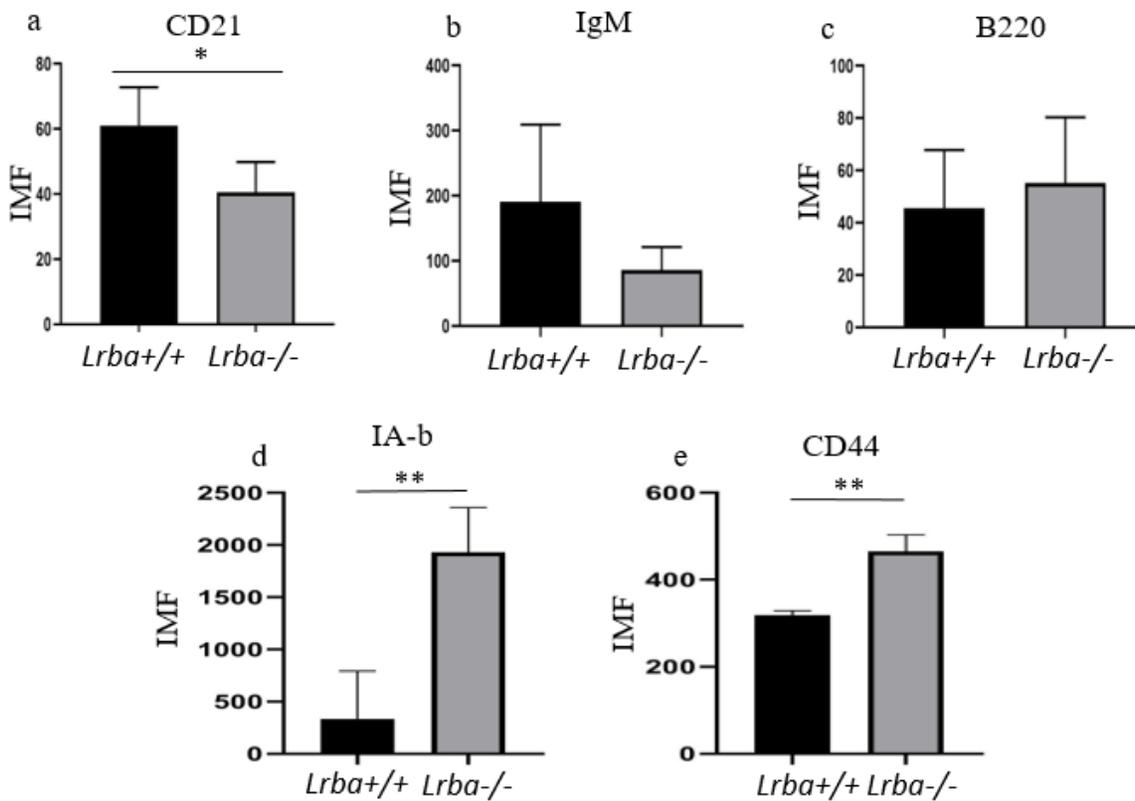


Figura 20. Análisis estadístico de la expresión de marcadores de membrana de linfocitos B. a) Expresión de CD21 membrana en linfocitos B. Se observa que hay una diferencia significativa en la cual los linfocitos de ratones *Lrba*^{-/-} muestran una menor expresión. b) Expresión de IgM membranal. Hay una menor expresión en ratones *Lrba*^{-/-}, aunque esta diferencia no es significativa. c) Expresión de B220 en linfocitos B220 positivos. Hay una expresión discretamente mayor en linfocitos *Lrba*^{-/-} aunque no es significativo. d) Expresión de IA/E (MHC-II) en condiciones basales, hay una mayor expresión de MHC-II en los ratones *Lrba*^{-/-} comparado con los ratones *Lrba*^{+/+}. Expresión de CD44 en condiciones basales. Se observa que hay una mayor expresión de CD44 en condiciones basales para los linfocitos B deficientes de *Lrba*, lo cual es estadísticamente significativo. (n=3) Prueba estadística: t de Student. **= p<0.005. Las barras negras representan a los ratones *Lrba*^{+/+} y las barras grises a los ratones *Lrba*^{-/-}.

G) Expresión de LRBA en células transfectadas

Como se describió en el procedimiento experimental, se intentó obtener por medio de la tecnología CRISPR-Cas9, una línea celular deficiente de la proteína LRBA. Una vez realizada la transfección y purificación de las células, se determinaron dos clones con ausencia de expresión de LRBA, denominadas clones D6 y S (obtenida por sorting en citómetro de flujo (Figura 21a). También se muestran los resultados de otras clones obtenidas por dilución limitante y se encontró que algunas expresan menor cantidad de proteína, que podría indicar una mezcla de células que expresan la proteína con células que no la expresan. Aunque se hicieron diluciones sucesivas de estas muestras, no se continuó con la purificación (Figura 21b).

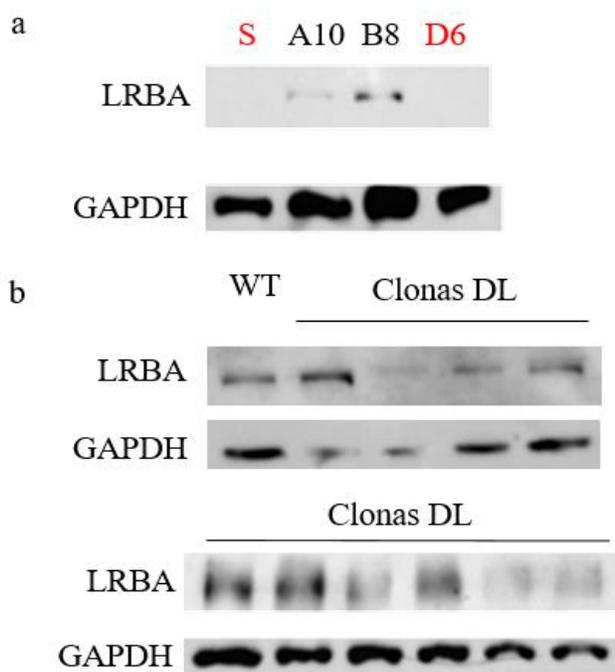


Figura 21. Expresión de LRBA en línea celular Raji transfectada con plásmido CRISPR/Cas9 LRBA. a) Western blot de clones obtenidas por separación en citometría de flujo por expresión de proteína verde fluorescente (S) y separadas por dilución limitante (A10, B8 y D6). El resultado fue confirmado por duplicado. En rojo se resaltan las células en las que no se detectó LRBA. B) Western blot de distintas clones obtenidas por dilución limitante. En el panel superior se muestran las bandas correspondientes a la proteína LRBA, y en el panel de abajo, la proteína control GAPDH.

H) Determinación de la mutación introducida en línea deficiente de LRBA

Una vez que se observó que la línea celular no expresaba LRBA, se procedió a secuenciar el exón 2 de *LRBA* para identificar la mutación introducida por el plásmido. Se encontró una mutación puntual GTC(GUC) que lleva a un cambio de aminoácido no sinónimo de ácido aspártico por valina en la posición 17 (Asp17Val) (Figura 22).

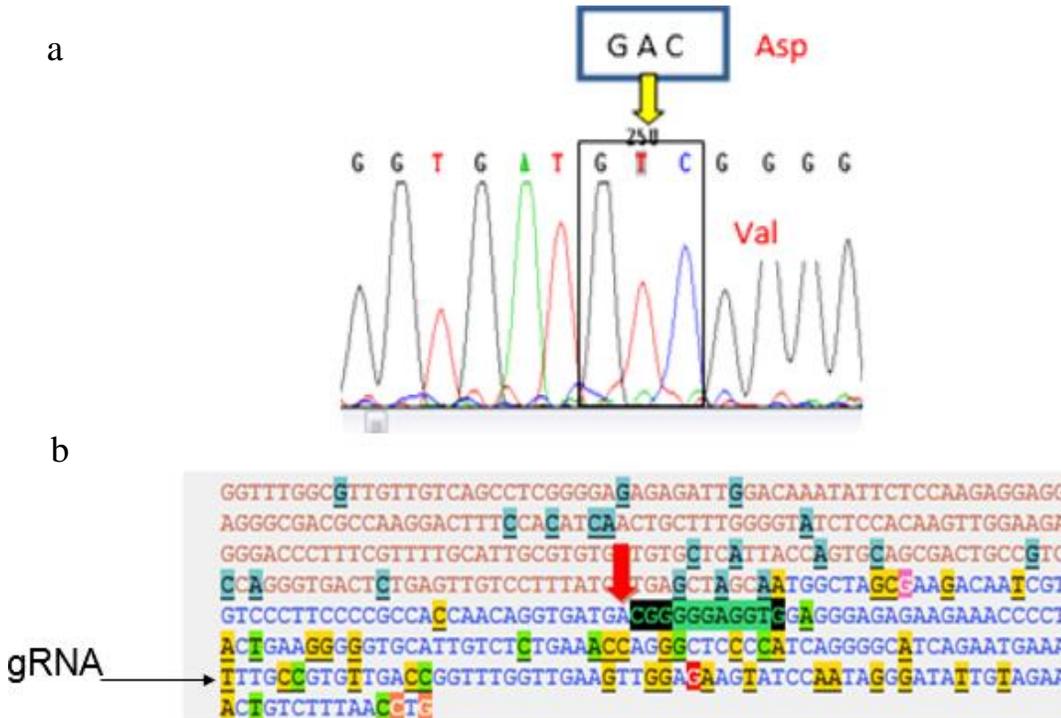


Figura 22. Secuenciación del exón 2 de *LRBA* en línea celular Raji transfectada con CRISPR-Cas9 LRBA. Se seleccionó a la línea S para continuar con la secuenciación del exón 2 y en el inciso a se muestra el histograma del fragmento de la secuencia en donde se identificó una mutación puntual introducida por el plásmido. El cambio de una adenina por una timina conduce a un cambio de aminoácido no sinónimo de aspartato por valina en la posición 17 (Asp17Val). b) Se muestra la secuencia del exón 2 de *LRBA* obtenida en la base de datos Ensembl. La flecha roja indica la posición de la mutación introducida, que está dentro de la región codificante del gen (letras azules). La flecha negra indica la posición en donde inicia la secuencia blanco del RNA guía (gRNA) del plásmido utilizado. Los resultados de secuenciación fueron confirmados por duplicado.

I) Autofagia en células transfectadas

Debido a que LRBA podría estar implicado en el proceso de autofagia de linfocitos B, se realizó un ensayo de autofagia en la línea celular utilizada al cultivarla en medio de cultivo RPMI sin suero. Como se observa en la Figura 23, hay una reducción de la autofagia en la línea celular deficiente de LRBA, sin embargo, deberán realizarse más experimentos que permitan confirmar el hallazgo.

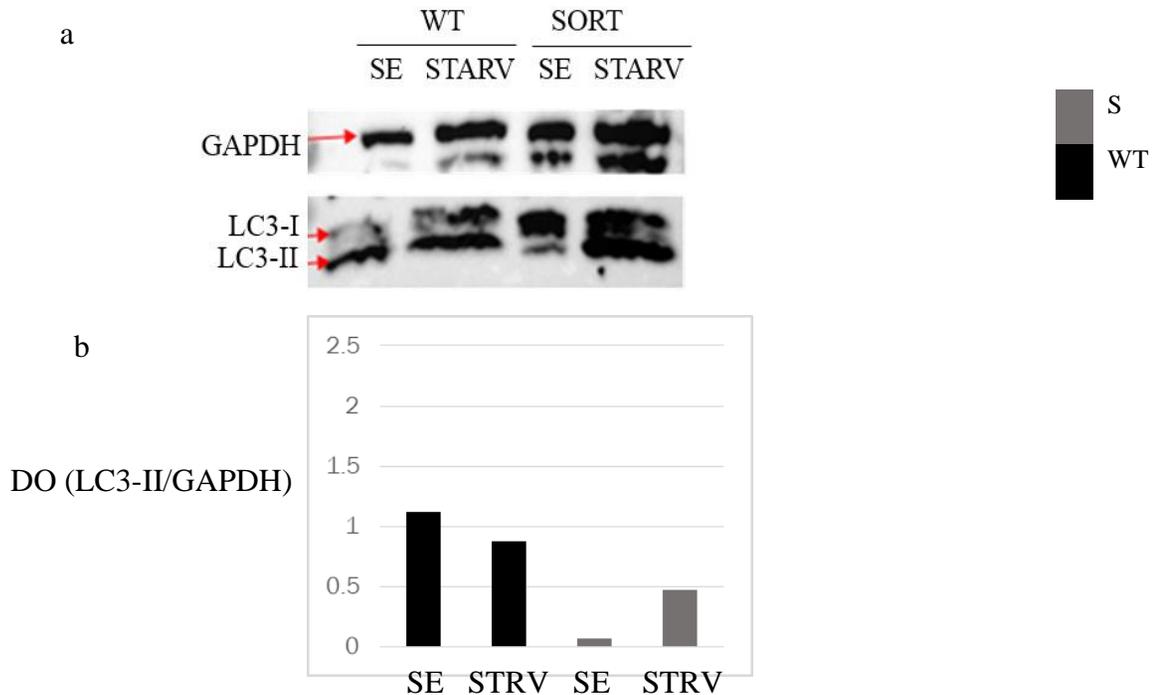


Figura 23. Autofagia de línea celular Raji. a) Western blot de LC3-II en línea celular Raji transfectada con el plásmido CRSPR-Cas9 LRBA. Se indica en el panel superior las bandas correspondientes a la proteína GAPDH y en el panel inferior las bandas de las isoformas LC3-I y LC3-II. b) Análisis representativo de la autofagia en Raji deficiente de LRBA. Se obtuvo una relación de la densidad óptica de LC3-II entre GAPDH, para determinar el nivel de autofagia en las células. Se observa que hay un menor nivel de autofagia en las células que no expresan LRBA, especialmente en la condición sin estímulo. S= células deficientes de LRBA; SE= Sin estímulo; SRV, SRTV= cultivo con privación de nutrientes. Resultados provenientes de un ensayo único.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las personas con ICV, con deficiencia de LRBA, presentan una reducción en las células B de sangre periférica, específicamente en los últimos estadios de diferenciación: células B de memoria con y sin cambio de isotipo y plasmablastos, lo cual se ve reflejado en la reducción de inmunoglobulinas séricas (Gamez-Díaz et al., 2015).

Cuando los linfocitos B salen de la médula ósea, tienen un fenotipo inmaduro, por lo que éstas células se diferencian a un estadio terminal en órganos linfoides como el bazo (Allman et al., 1993).

Por esta razón, se inició explorando las proporciones de subpoblaciones de linfocitos B en uno de los órganos linfoides más importantes de mamíferos, el bazo. En estudios anteriores, se encontró que la expresión de la proteína *Lrba* de ratones, aumenta de forma diferencial cuando los linfocitos B son estimulados con LPS bacteriano, dicho aumento en la expresión de *Lrba* es mayor y significativo en las células B maduras, comparadas con las células Transicionales 1 y Transicionales 2, lo que fue un primer indicio de la participación de *Lrba* en la diferenciación periférica de linfocitos B (Pérez-Pérez, 2016).

Dado que a lo largo de este trabajo se realizaron cruces de ratones *Lrba*^{+/-} para obtener los ratones deficientes, fue necesario genotipificar a dichos ratones antes de realizar los ensayos presentados en éste trabajo. Como se muestra en la Figura 6, se trabajaron con células de ratones *Lrba*^{-/-} que muestran la mutación, y los ratones ensayados presentan dicha deficiencia genética que consiste en la eliminación de exón 4.

El análisis de la diferenciación periférica demuestra que existen algunas diferencias en las subpoblaciones de linfocitos B esplénicos recién obtenidos del bazo. Este resultado indica que *Lrba* podría participar en algún proceso que intervenga en la diferenciación periférica de linfocitos B, específicamente en alguno que ayude al paso de células transicionales 1 hacia transicionales 2, que provoque que haya un bloqueo en la diferenciación, resultando en un incremento en la proporción de transicionales 1 y provoque la disminución de transicionales 2 (Figura 8).

Un aspecto determinante en la maduración de linfocitos B, es la señalización que se origine a través del BCR, pues también hay selección positiva y negativa en el bazo. Por un lado, en transicionales 1, la estimulación vía BCR conduce a anergia o apoptosis, lo que da lugar a la selección negativa. Esto ocurre como punto de control de células autorreactivas, por lo que la señalización vía BCR en esta subpoblación, puede conducir a la activación de vías apoptóticas (Su & Rawlings, 2002). Una elevación de células transicionales 1, podría implicar que las células deficientes de *Lrba* en dicho

estadio de maduración, no responden de la misma forma a la estimulación vía BCR y por lo tanto, no llevar a cabo el proceso de apoptosis en el mismo nivel que lo que ocurre en células B normales.

Además, se sabe que existe una gran cantidad de pacientes con ICV asociada a mutaciones deletéreas en *LRBA* con trastornos autoinmunes tales como anemia hemolítica o púrpura trombocitopénica (Gámez-Díaz, et al., 2015). Actualmente, se ha demostrado que una causa es que LRBA interviene en la movilización y reciclamiento correcto de CTLA-4, una molécula reguladora del sistema inmunológico y expresada en la membrana de linfocitos T reguladores (Lo, B., et al., 2015), sin embargo, al encontrar una elevación de células T1 en el bazo de ratones *Lrba*^{-/-}, se podría sugerir que hay una mayor probabilidad de que células B autorreactivas evadan la apoptosis en la selección negativa en bazo, lo que podría indicar otro mecanismo que participa en la generación de autoinmunidad.

Una vez que las células B T1 han superado selección negativa en condiciones normales, pueden ingresar a la zona folicular del bazo en donde se convierten en células T2, que generan una respuesta diferente en la estimulación vía BCR. En este caso, ocurre selección positiva, pues una respuesta al antígeno, demuestra que la célula tiene un BCR óptimo que le permita activarse y madurar hacia célula B madura. Por lo tanto, la estimulación vía BCR en las células T2 lleva a la proliferación y diferenciación (Chung et al., 2003). Debido a que se encontró una disminución significativa en la proporción de células transicionales 2 en los ratones deficientes de *Lrba*, se fortalece la hipótesis de la supuesta participación de *Lrba* en la señalización de BCR, dirigida a la diferenciación periférica.

Dados los defectos observados en la proporción de linfocitos B transicionales recién extraídos del bazo, nos preguntamos si la estimulación vía BCR tendría algún impacto sobre la diferenciación *in vitro* de éstas células, por esto, se diseñó un experimento que nos permitió observar si había alguna diferencia en las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos B analizadas ante la estimulación vía BCR.

En primer lugar, se analizaron las subpoblaciones de linfocitos B a 6 horas de cultivo, con la finalidad de identificar si ocurría algún cambio relacionado a una mayor susceptibilidad a apoptosis en las células transicionales observadas en condiciones basales. Como se observa en la Figura 9, no se observaron diferencias entre los dos grupos de ratones, sin embargo, es interesante mencionar que, aunque en condiciones basales el porcentaje de Transicionales 1 es mayor en los ratones deficientes de *Lrba*, tras 6 horas de cultivo, esta tendencia se pierde e incluso hay un menor número de células de dicha subpoblación (Figura 12). Este resultado, podría sugerir que, las células T1 deficientes de *Lrba* podrían ser más susceptibles a entrar en apoptosis una vez que son cultivadas. Sin embargo, se puede observar que, aunque no es significativo, parece haber proporción mayor de células T1 en los ratones *Lrba*^{-/-} cuando son estimuladas vía BCR (Figura 9b). Es necesario realizar más ensayos con el objetivo

de determinar si dicha observación es o no significativa, ya que podría indicar que las células transicionales 1 deficientes de *Lrba*, tienen menor susceptibilidad a entrar en apoptosis cuando son estimuladas a través de su BCR y sería posible proponer otro mecanismo por el cual se presenta autoinmunidad en pacientes con deficiencia de LRBA, pues un mayor número de T1, podría sugerir que están escapando a la selección negativa y tienen una mayor probabilidad de ser autorreactivas.

Por otro lado, se observa que hay un mayor porcentaje de T2 en los ratones *Lrba*^{-/-} cuando son estimuladas con anti-IgM y LPS simultáneamente. Esto es interesante, ya que en el caso de los ratones *Lrba*^{+/+} y *Lrba*^{-/-}, el porcentaje de transicionales 2 no se modifica cuando se estimulan vía BCR, a las 6 horas de cultivo (Figura 9c). Lo anterior podría indicar que también existe algún mecanismo que se ve afectado en las células transicionales 2 cuando son sometidas a algún estímulo vía BCR y que posiblemente, la señalización vía TLR4, podría tener un papel importante en la respuesta de esta subpoblación celular, sin embargo, harían falta experimentos que permitieran definir la participación de *Lrba* en esta subpoblación linfocitaria.

Por último, se observa que hay un mayor porcentaje de células B maduras en los ratones *Lrba*^{-/-} cuando son cultivadas en presencia sólo de IL-4 a 6 horas de cultivo (Figura 9d). Es probable que esta diferencia se deba a que hay una menor proporción de células B T1 y T2 en esta condición y que esto afecte de forma indirecta en la proporción de los linfocitos B maduros. No podría atribuirse esta diferencia a una mayor diferenciación en esta condición porque a 6 horas de cultivo no es posible atribuirlo a una maduración *in vitro*, como se discutirá más adelante.

Posterior a este ensayo, se analizaron las proporciones de las subpoblaciones de linfocitos B a 48 horas de cultivo, ya que se ha reportado que las células transicionales 1 se diferencian a transicionales 2 en un periodo aproximado a las 48 horas (Loder, et al., 1999), por lo que de forma indirecta, se buscó identificar si existe alguna anomalía en este proceso en las células deficientes de *Lrba*. Como se observa en la Figura 10, no existe alguna diferencia significativa a este tiempo de cultivo, por lo que, con nuestros experimentos no fue posible detectar algún defecto en las transicionales 1 que evitara su progresión a transicionales 2.

Por último, se realizó una determinación a 96 horas de cultivo, con base en lo reportado en 1993 por Allmann, et al., en el que señala que la maduración periférica es completada en el plazo de 4 días. Es importante destacar que, bajo nuestras condiciones de trabajo, se logró producir diferenciación *in vitro* por entrecruzamiento de BCR, ya que, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de ratones, es muy claro el aumento del porcentaje de células maduras en las condiciones anti-IgM y anti-IgM/LPS (Figura 13c). Cabe destacar que además, en estas condiciones se conserva una tendencia similar a la observada en condiciones basales, en donde hay un mayor proporción de T1 y

menor de T2 en los ratones *Lrba*^{-/-}. A pesar de estos resultados, al no encontrar ninguna diferencia significativa, no es posible definir la participación de *Lrba* en la diferenciación periférica de linfocitos B vía BCR *in vitro*.

Además de la diferenciación de los linfocitos B, la señalización del BCR está implicada en la apoptosis de las células B. La apoptosis o muerte celular programada es fundamental en el desarrollo y mantenimiento de células en organismos multicelulares, y es un proceso que de ser desregulado, se asocia a numerosas enfermedades. En el caso de las células B y los linfocitos B, la tolerancia a lo propio se da por un mecanismo de apoptosis, evitando enfermedades autoinmunes (Rathmell & Thompson, 2002).

A pesar de los antecedentes de la apoptosis exacerbada en la deficiencia de LRBA en pacientes con ICV, en el caso de los linfocitos B murinos no se observaron defectos en apoptosis en las condiciones de cultivo empleadas. Como se observa en la Figura 13, tanto el porcentaje de células vivas, en apoptosis y muertas entre los ratones *Lrba*^{+/+} y *Lrba*^{-/-} fue similar entre ambos grupos de ratones, por lo que, con los ensayos realizados, no es posible probar que *Lrba* participe en la apoptosis de células B y que esté vinculada a la señalización de BCR.

Dado que los datos de apoptosis obtenidos se restringen a los linfocitos B totales, sería interesante determinar si esto ocurre en todas las subpoblaciones de linfocitos B analizadas (T1, T2 y maduras), por lo que, valdría la pena diseñar un panel que permitiera distinguir el proceso de apoptosis en cada una de las poblaciones de linfocitos B analizadas.

Otro proceso importante en el funcionamiento de linfocitos B, es su activación y existen ciertas moléculas que se expresan en la membrana de éstas células que permiten monitorear este proceso. CD69 es una lectina tipo-C que se expresa en diferentes poblaciones leucocitarias (Craston et al., 1997), el entrecruzamiento de CD69 induce señales intracelulares (Testi, Ambrosio, De Maria, & Santoni, 1994); ésta proteína se utiliza como marcador temprano de activación, por esta razón realizamos la detección de CD69 a las 12 horas de cultivo.

Aunque se ha reportado que los pacientes con ICV tienen una activación de linfocitos B deficiente (López-Herrera, et al., 2012), en la Figura 16 no existe ninguna diferencia significativa en la expresión de CD69 entre los dos grupos de ratones, lo que indicaría que *Lrba* no participa en la activación temprana de linfocitos B.

A pesar de que no se determinaron problemas en la activación de las células B, se sabe que la estimulación vía BCR induce también la proliferación de éstas células. Uno de los factores de transcripción más importantes en el proceso de supervivencia y proliferación de linfocitos B es NF-κB, especialmente la isoforma c-Rel (Gerondakis, Grumont, Rourke, & Grossmann, 1998). La vía clásica

de NF- κ B participa en la progresión del ciclo celular durante la activación de la señalización de BCR, pues c-Rel se requiere para la progresión de la fase G1 a fase S (Grumont et al., 1998), mientras que la progresión de la fase S a fase G2 parece ser independiente de NF- κ B. Se ha sugerido que NF- κ B es dispensable en la proliferación de centro germinal, pero es de suma importancia en las células B naive (Gerondakis & Siebenlist, 2010).

En este trabajo, al evaluar la actividad proliferativa de las células *Lrba*^{-/-}, se observó una diferencia significativa en el porcentaje de proliferación de linfocitos B al ser estimulados vía BCR, en el cual las células B *Lrba*^{-/-} muestran una proliferación reducida con respecto a la observada en las células *Lrba*^{+/+} (figura 18). Este resultado es muy interesante, puesto que permite probar nuestra hipótesis de trabajo, ya que demuestra que *Lrba* participa en la señalización del BCR y su deficiencia afecta la proliferación celular, sería interesante explorar si *Lrba* podría tener una influencia en la activación de NF- κ B. Aunque no se ha demostrado la interacción con este factor de transcripción, como se ha sugerido desde los antecedentes, LRBA es considerada como una proteína con capacidad de unirse a PKA (Reiser et al., 2014; Wang & Lockey, 2014). Actualmente, en nuestro equipo, se realizan ensayos que ayudan a comprobar que esta interacción es real y que, por lo tanto, LRBA podría funcionar como proteína de anclaje a esta cinasa. La relevancia funcional que esto trae consigo, es que se ha demostrado que PKA activa NF- κ B (Gerlo et al., 2011), con lo que se puede sugerir que éste sería el papel de LRBA en la proliferación de los linfocitos B generada por señalización a través del BCR.

Por otro lado, aunque no se observan diferencias significativas en la proliferación con otras condiciones de estimulación empleadas en este estudio, existe una tendencia interesante al emplear el estímulo a través de TLR-4 con LPS, se observó una menor proliferación en los linfocitos B *Lrba*^{-/-}; se ha demostrado que la isoforma NF- κ B1 es indispensable para la proliferación dirigida vía TLR-4 (Sha, Liou, Tuomanen, & Baltimore, 1995), por lo que sería interesante investigar si hay una participación diferencial de *Lrba* en la señalización de TLR-4.

Dado que LRBA se ha visto involucrado con el reciclamiento de CTLA4, una proteína membranal que participa en la supresión inmunológica, en este trabajo evaluamos los niveles de expresión de diversas proteínas expresadas por el linfocito B y que son importantes para su adecuado funcionamiento.

Como se observa en el gráfico a de la Figura 20a, observamos una reducción significativa en la expresión de CD21 en los linfocitos B de ratones *Lrba*^{-/-} comparado con su contraparte *Lrba*^{+/+}. Aunque aún estamos alejados de conocer la causa por la que CD21 está disminuido en las células B deficientes de *Lrba*, y que incluso se reporte una elevación de células B CD21^{low} en pacientes con ICV (Rakhmanov et al., 2009) estos antecedentes pueden dar pie a nuevos experimentos que demuestren la importancia de *Lrba* en el reciclamiento de CD21 o en la inducción de la síntesis de dicha proteína.

Referente al impacto de este resultado, se ha demostrado que la estimulación vía CD21, induce la expresión de moléculas co-estimuladoras del linfocito B como B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), que interactúan con CD28 y CTLA-4, por lo que son importantes en cooperación célula T-célula B y en la regulación de la respuesta inmunológica (Kozono et al., 1998). Además, se ha reportado que el co-entrecruzamiento de BCR y CD21, puede rescatar de apoptosis a las células B esplénicas y a la línea celular WEHI-231.7, que son linfoma de células B murinas, cuando son estimuladas sólo vía BCR (Kozono, Duke, Schleicher, & Holers, 1995). Además, los ratones *Cr2^{-/-}*, tienen una disminución de producción de anticuerpos (Chen, Wang, Srinivasula, Alnemri, & Cooper, 1999), que coincide con lo reportado por (Thiel et al., 2012), en la que asocia mutaciones heterocigotas en CD21 con ICV en humanos. También se ha demostrado que se requiere de CD21 para la retención de linfocitos B en el folículo y su supervivencia en el centro germinal (Carroll, 1998).

Por otro lado, valdría la pena examinar la expresión de los otros dos componentes del correceptor de células B: CD19 y CD81, pues de estar alterados en su expresión, implicaría defectos en la activación del correceptor de la célula B, pues la función principal del correceptor es la de facilitar la señalización con una menor cantidad de antígeno requerido (Carroll, 1998).

Además de CD21 se determinó una expresión disminuida de IgM membranal (referido como BCR), que, aunque no es significativo, podría tener implicaciones en la señalización de la célula B (Figura 20b). Este hallazgo es importante, ya que, aunque aún existen preguntas acerca de la activación del BCR, hay modelos que sugieren que para que se lleve a cabo, las moléculas de BCR deben distribuirse de tal forma que puedan oligomerizarse y producir una señal intracelular (Yang & Reth, 2016), por lo que una disminución de IgM membranal podría implicar que no hayan suficientes moléculas de BCR cercanas para realizar un entrecruzamiento capaz de producir una señalización efectiva. De manera adicional, también se observó una tendencia al aumento de la molécula B220 o CD45R en los linfocitos B *Lrba^{-/-}* (Figura 20c), que se trata de una fosfatasa membranal que participa como regulador negativo de la señalización del BCR. Su mecanismo de acción se basa en retirar enzimáticamente los grupos fosfato de activadores de las señales río debajo de BCR (Treanor, 2012). Esto implicaría, que, aunque exista cierta señal producida por el entrecruzamiento de IgM de membrana, podría haber una mayor regulación negativa por parte de B220; sin embargo, sería necesario realizar más ensayos para determinar si las diferencias observadas en la expresión de IgM y de B220 son significativa.

Además de producir anticuerpos una vez que se diferencian a células plasmáticas, los linfocitos B tienen como función la presentación de antígeno a través de MHC-II, el cual es reconocido por el receptor de la célula T (TCR) en los linfocitos T (Siemasko & Clark, 2001). De manera interesante, los

linfocitos B deficientes de *Lrba*, muestran una sobreexpresión de MHC-II membranaral en condiciones basales (Figura 20d).

Una vez que el MHC-II es expresado en la membrana del linfocito B, ocurre la interacción linfocito T- linfocito B y además, al contar con un dominio citoplasmático, MHC-II puede inducir señalización en los linfocitos B. Se ha reportado que las células B MHC-II⁺ tienen una mayor ventaja en procesos como proliferación, diferenciación y cambio de isotipo (Giles, Kashgarian, Koni, & Shlomchik, 2015). Además, el entrecruzamiento de MHC-II con anticuerpos agonistas induce la movilización de calcio intracelular, producción de cAMP y activación de PKC, Src y cinasas de la familia MAP (Cambier et al., 1987; Jin et al., 2008), por lo que el resultado mostrado en este proyecto cobra una importancia valiosísima, ya que abre las puertas a un nuevo blanco de investigación dirigido hacia la importancia de *Lrba* en la señalización en células B.

Aunque por el momento no se puede tener una idea clara que explique la sobreexpresión de MHC-II en linfocitos B deficientes de *Lrba*, podría surgir una hipótesis en la que se plantee que, como en el caso de CTLA-4, *Lrba* pudiera interactuar con MHC-II o bien, influya en la regulación de su expresión. Como antecedente, se tiene que MHC-II tiene dominios citoplasmáticos que son altamente conservados en las dos isoformas de ratones (I-A e I-E) (Harton, 2018) los cuales pudieran interactuar con *Lrba* ya sea de forma directa o indirecta. Otro antecedente interesante es que, aunque aún se desconoce el mecanismo completo por el cual se regula la expresión de MHC-II, en células dendríticas se ha encontrado que MHC-II es sensible a ubiquitinación en sitios específicos. Cuando no ocurre la reacción de ubiquitinación, se lleva a cabo la acumulación de MHC-II en la membrana, lo que coincide con la maduración de células dendríticas (Shin et al., 2006). Esto podría dar una pista de otro mecanismo que pudiera estar implicado en la sobreexpresión de MHC-II.

Hasta el momento, no existen datos en los que se reporte alguna anomalía en la presentación de antígeno en pacientes con ICV, por lo que nuestros resultados sugieren otra forma de abordar el comportamiento de la enfermedad, pues existen otras inmunodeficiencias que presentan anomalías en la presentación de antígeno. En 1998, Faigle et al., publica un estudio en el que se demostró que en las células de pacientes con síndrome de Chediak-Higashi, hay un defecto en la carga de péptidos en moléculas MHC-II. Se observa que hay lisosomas de gran tamaño y la citotoxicidad celular está gravemente afectada. Esto es interesante, ya que el síndrome de Chediak-Higashi se debe a mutaciones en el gen *LYST* cuya proteína participa en el tráfico vesicular y forma parte de la familia BCP, al igual que LRBA.

Por último, debido a que existen otras células presentadoras de antígeno, tales como las células dendríticas, sería muy interesante evaluar su comportamiento y función en el modelo murino y en los

pacientes, así como la evaluación de moléculas co-estimuladoras importantes en la cooperación con linfocitos T.

Otro marcador alterado en los ratones *Lrba*^{-/-} es CD44, una molécula de adhesión la cual se expresa en todos los leucocitos y su función principal se atribuye a la migración y activación de linfocitos T (Borland, Ross, & Guy, 1998). Sin embargo, su función en linfocitos B aún no está completamente descrita. Se ha reportado que un entrecruzamiento de CD44 en células B de ratón inhibe la proliferación y producción de inmunoglobulinas, pero puede ser rescatada por la adición de anti-IgM y CD40L (Wyant et al., 2005). Además, se ha demostrado que CD44 tiene un papel importante en la diferenciación de células B en órganos linfoides secundarios, pues la expresión de CD44 es elevada en células en reposo y en la activación temprana, mientras que, en los plasmablastos, la expresión de CD44 disminuye (Kremmidiotis & Zola, 1994).

En la Figura 20e, se muestra que al igual que MHC-II, CD44 está expresado en una mayor cantidad en los linfocitos B deficientes de *Lrba*. Esta diferencia es muy significativa en condiciones basales. Estos resultados, permiten sugerir, que *Lrba* podría participar también en el reciclamiento correcto de CD44 o en la regulación de su expresión. Las implicaciones que esto conduce destacan debido a que la expresión de CD44 disminuye en los linfocitos B durante la reacción en el centro germinal e interesantemente, en las estructuras ectópicas tipo centro germinal que se encuentran en algunas enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Högerkorp, Bilke, Breslin, Ingvarsson, & Borrebaeck, 2003), por lo que sería interesante investigar si influye en la patología de ICV.

Como en el caso de MHC-II, no existen reportes de la expresión de CD44 en los pacientes con COVID ni en los modelos murinos *Lrba*^{-/-}, por lo que nuestros resultados proporcionan un nuevo blanco de investigación para entender mejor la función de *Lrba* y cómo afecta al humano.

Finalmente, de forma adicional al objetivo principal de este proyecto, se construyó una línea celular humana de linaje B con fenotipo maduro (Raji) con deficiencia de LRBA. Aunque no se cumplió el objetivo de reproducir los mismos experimentos realizados en el modelo murino, como se observa en la Figura 21, se logró obtener dos líneas celulares que no muestran expresión de la proteína por Western blot. Además, se logró identificar una mutación (Figura 22) que lleva a un cambio de aminoácido no sinónimo en la posición 17 de la proteína (Asp17Val). Debido a que la naturaleza de los aminoácidos involucrados es muy diferente, se sugiere que este cambio pudiera llevar a la degradación de la proteína y por eso no se exprese en las células. No obstante, una perspectiva de este proyecto es realizar transfecciones futuras en las líneas obtenidas, que generen un codón de paro prematuro que asegure que la proteína no se exprese.

Una vez comprobada la ausencia de la proteína, se realizó un ensayo de autofagia, que es un proceso que está disminuido en células B de pacientes con ICV asociado a *LRBA* (López-Herrera, et al., 2012). La autofagia es un proceso de auto-degradación importante para balancear fuentes de energía en momentos críticos del desarrollo y a respuesta a estrés de nutrientes. Es visto como un mecanismo de supervivencia y también ayuda a la depuración de estructuras celulares defectuosas o “viejas” (Glick, Barth, & Macleod, 2010). En las células B, la autofagia juega un papel muy importante sobre todo en el mantenimiento de células B periféricas, supervivencia por estimulación vía TLR-4, diferenciación de plasmablastos y mantenimiento de autoanticuerpos nucleares (Arnold et al., 2016). Además, *LRBA* tiene identificada una región de interacción con LC3, molécula importante en el proceso de autofagia, pues al conjugarse la isoforma LC3-I con fosfatidiletanolamida, se convierte en LC3-II, que le da madurez a la vesícula de autofagia, con lo que se empiezan a reclutar organelos y moléculas destinadas a degradación por autofagia (Tanida, Ueno, & Kominami, 2008). Por esta razón, se evaluó el nivel de LC3-II en la línea celular deficiente de *LRBA*, en la que se encontró que hay un menor nivel de autofagia, con respecto a lo observado en su contraparte silvestre (Figura 23).

Deberán realizarse más ensayos para comprobar este resultado, pero parece un buen inicio para describir el mecanismo de *LRBA* en el proceso de autofagia en células B. Cabe señalar que los ensayos de autofagia no se realizaron en el modelo murino, dado que el proceso de congelación de los esplenocitos no permite el análisis adecuado de dicho ensayo, por lo que en futuros ensayos sería pertinente determinar si los problemas de autofagia observados en células humanas se reproducen en las células B murinas.

CONCLUSIONES

- Lrba es importante en el mantenimiento del número de células Transicionales 1 en el bazo.
- Lrba participa en la proliferación de linfocitos B a través de la señalización de BCR, pues las células deficientes de Lrba presentan defectos en este proceso.
- Lrba participa en la expresión correcta de algunos receptores membranales de linfocitos B: CD21, MHC-II y CD44.
- Lrba no participa en la activación y apoptosis de células B.

LITERATURA CITADA

- Actor, J. (2014). *Introductory Immunology. Basic concepts for interdisciplinary applications*. London, UK: Academic Press, ELSEVIER.
- Allman, D., Ferguson, S., Letz, V., & Cancro, M. (1993). Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen (hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived memory-derived B cells. *Journal of Immunology*, (151), 4431–4444.
- Ameratunga, R., Brewerton, M., Slade, C., Jordan, A., Gillis, D., Steele, R., ... Woon, S. (2014). Comparison of Diagnostic Criteria for Common Variable Immunodeficiency Disorder. *Frontiers in Immunology*, (5), 1–9.
- Arnold, J., Murera, D., Arbogast, F., Fauni, J.-D., Muller, S., & Gros, F. (2016). Autophagy is dispensable for B-cell development but essential for humoral autoimmune responses. *Nature*, 2016(23), 853–964.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., ... Alt, F. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature*, 438(24), 508–511.
- Bellanti, J. (2012). *Immunology IV Clinical applications in health and disease*. (A. Escobar-Gutiérrez & G. Tsokos, Eds.). Washington, USA: I Care Press.
- Bogaert, D., Dullaers, M., Lambrecht, B., Vermaelen, K., De Baere, E., & Haerynck, F. (2016). Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *Journal of Medical Genetics*, 53(9), 575–590.
- Borland, G., Ross, J., & Guy, K. (1998). Forms and functions of CD44. *Immunology*, 1998(3), 139–148.
- Burnett, D., Parish, I., Masle-Faquhar, E., Brink, R., & Goodnow, C. (2017). Murine LRBA-deficiency causes CTLA-4-deficiency in Tregs without progression to immune dysregulation. *Immunology and Cell Biology*, 95(9), 775–788.
- Cambier, J., Newell, M., L., J., McGuire, J., Leach, K., & Chen, Z. (1987). Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature*, 1987(327), 629–632.
- Carroll, M. (1998). CD21/CD35 in B cell activation. *Seminars in Immunology*, 10(4), 279–286.
- Chen, W., Wang, H., Srinivasula, S., Alnemri, E., & Cooper, N. (1999). B cell apoptosis Triggered by Antigen Receptor Ligation Proceeds Via Novel Caspase-Dependent Pathway. *Journal of Immunology*, 1999(163), 2483–2491.
- Chung, J., Silverman, M., & Monroe, J. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune

- competence. *TRENDS in Immunology*, 24(6), 342–348.
- Clayton, E., Bardi, G., Bell, S., Chantry, D., Downes, C., Gray, A., ... Turner, M. (2002). A crucial role for the p110delta subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in B cell development and activation. *Journal of Experimental Medicine*, 196(6), 753–763.
- Craston, R., Koh, M., Mc Dermott, A., Ray, N., Prentice, H., & Lowdell, M. (1997). Temporal dynamics of CD69 expression on lymphoid cells. *Journal of Immunological Methods*, 209(1997), 37–46.
- Cullinane, A., Schäfer, A., & Huizing, M. (2013). The BEACH Is Hot-. A LYST of Emerging Roler for BEACH-Domain Containing Proteins in Human Disease. *Traffic*, (14), 749–766.
- Cunningham-Rundles, C. (2008). Autoimmune manifestations in common variable immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 100(28), 42–45.
- Dal Porto, J., Gauld, S., Merrell, K., Mills, D., Pugh-Bernard, A., & Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Molecular Immunology*, 41(2004), 599–613.
- Fainboim, L., & Geffner, J. (2013). *Introducción a la inmunología humana*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana.
- Gamez-Díaz, L., August, D., Stepensky, P., Revel-Vilk, S., Seidel, M., Noriko, M., & Grimbacher, B. (2015). The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *Journal of Allergic and Clinical Immunology*, 137, 223–330.
- Gámez-Díaz, L., Neuman, J., Jäger, F., Proietti, M., Felber, F., & Jung, S. (2017). Immunological phenotype of the murine Lrba knockout. *Immunology and Cell Biology*, 95(9), 789–802.
- Gerlo, S., Kooijman, R., Beck, I., Kolmus, K., Spooren, A., & Haegeman, G. (2011). Cyclic AMP: a selective modulator of NF-κB action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(23), 3823–3841.
- Gerondakis, S., Grumont, R., Rourke, I., & Grossmann, M. (1998). The regulation and roles of Rel/NF-κB transcription factors during lymphocyte activation. *Current Opinion in Immunology*, 10(3), 353–359.
- Gerondakis, S., & Siebenlist, U. (2010). Roles of the NF-κB Pathway in Lymphocyte Development and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5).
- Giles, J. R., Kashgarian, M., Koni, P., & Shlomchik, M. (2015). B cell-specific MHC class II deletion reveals multiple nonredundant roles for b cell antigen presentation in murine lupus. *Journal of Immunology*, 195(6), 2571–2579.
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanism. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3–12.
- Grumont, R., Rourke, I., O'Reilly, L., Strasser, A., Miyake, K., Sha, W., & Gerondakis, S. (1998). B

- lymphocytes differentially use the Rel and nuclear factor kB1 (NF-kB1) transcription factors to regulate cell cycle progression and apoptosis in quiescent and mitogen-activated cells. *Journal of Experimental Medicine*, 187(5), 663–674.
- Gu, H., & Rajewsky, K. (2004). B cell protocols. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 25–36). New Jersey, USA: Humana Press.
- Harton, J. (2018). Class II MHC cytoplasmic domain-mediated signaling in B cells: A tail of two signals. *Human Immunology*, 80(1), 32–36.
- Högerkorp, C., Bilke, S., Breslin, T., Ingvarsson, S., & Borrebaeck, J. (2003). CD44-stimulated human B cells express transcripts specifically involved in immunomodulation and inflammation as analyzed by DNA microarrays. *Blood*, 101(6), 2307–2313.
- Jin, L., Stolpa, J., Young, R., Pugh-Bernard, A., Refaeli, Y., & Cambier, J. (2008). MHC class II structural requirements for the association with Igalpha/beta, and signaling of calcium mobilization and cell death. *Immunology Letters*, 116(2), 184–194.
- Kozono, Y., Ab, R., Kozono, H., Kelly, R., Azuma, T., & Holers., V. (1998). Cross-linking CD21/CD35 or CD19 increases both B7-1 and B7-2 expression on murine splenic B cells. *Journal of Immunology*, 160(4), 1565–1572.
- Kozono, Y., Duke, R., Schleicher, M., & Holers, V. (1995). Co-ligation of mouse complement receptors 1 and 2 with surface IgM rescues splenic B cells and WEHI-231 cells from anti-surface IgM-induced apoptosis. *European Journal of Immunology*, 25(4), 1013–1017.
- Kremmidiotis, G., & Zola, H. (1994). Changes in CD44 Expression during B cell Differentiation in the Human Tonsil. *Cellular Immunology*, 161(2), 147–157.
- Lamagna, C., Hu, Y., DeFranco, A., & C., L. (2014). B-cell specific loss of Lyn leads to autoimmunity. *Journal of Immunology*, 192(3), 919–928.
- Levy, F., Rasmussen, A., Taskén, K., Skälhegg, B., Huitfeldt, H., Funderud, S., ... Hansson, V. (1996). Cyclic AMP-dependent protein kinase (cAK) in human B cells: co-localization of type I cAK (RI α 2C2) with the antigen receptor during anti-immunoglobulin-induced B cell activation. *European Journal of Immunology*, 26(6), 1290–1296.
- Lo, B., Zhang, K., Lu, W., Zheng, L., Zhang, Q., Kanellopoulou, C., ... Jordan, M. (2015). Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*, 349(6246), 436–440.
- Lopez-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarström, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C., Phadwal, K., ... Grimbacher, B. (2012). Deleterious Mutations in LRBA Are Associated with a Syndrome of

- Immune Deficiency and Autoimmunity. *American Journal of Human Genetics*, 90(6), 986–1001.
- Malissein, E., Verdier, M., Ratinaud, M., & Troutaud, D. (2003). Changes in Bad phosphorylation are correlated with BCR-induced apoptosis of WEHI-231 immature B cells. *Biochimie*, 85(8), 733–740.
- Mathews, C., van Holde, K., & Ahern, K. (2002). *Bioquímica* (3th ed.). Madrid, España: Pearson Educación.
- Moser, M., & Leo, O. (2010). Key concepts in immunology. *Vaccine*, 28(3), C2–C13.
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009). *Inmunobiología de Janeway* (7th ed.). México DF, México: McGraw Hill.
- Pérez-Pérez, D. (2016). *Estandarización de técnicas para la detección de la expresión de Lrba (Lipopolysaccharide Responsive Beige-like Anchor protein) en linfocitos B murinos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pihlgren, M., Silve, A., Madani, R., Giriens, V., Waeckerle-Men, Y., Fettelschoss, A., & Johansen, P. (2013). TLR4- and TIF dependent stimulation of B lymphocytes by peptide liposomes enables T cell-independent isotype switch in mice. *Blood*, 121(1), 85–94.
- Rakhmanov, M., Keller, B., Gutenberg, S., Foerster, C., Hoenig, M., Driessen, G., ... Warnatz, K. (2009). Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13452–13456.
- Rathmell, J., & Thompson, C. (2002). Pathways of Apoptosis in Lymphocyte Development, Homeostasis, and Disease. *Cell*, 109, s97–s107.
- Reiser, M., Li, K., Lockey, R., & Jia-Wang, W. (2014). Lipopolysaccharide Responsive Beige-like anchor Subcellular Localization Involving in Vesicle Trafficking Responsive to Lipopolysaccharide. *Austin Journal of Clinical Immunology*, 1(4), 2381–9138.
- Reth, M., Nitschke, L., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2015). Structure and signaling Function of the B-cell Antigen Receptor and Its Coreceptors. In *Molecular Biology of B cells* (pp. 151–170). Elsevier.
- Saikia, B., & Gupta, S. (2016). Common Variable Immunodeficiency. *The Indian Journal of Pediatrics*, 83(4), 338–344.
- Sha, W., Liou, H., Tuomanen, E., & Baltimore, D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*, 80(2), 321–330.
- Shin, J., Ebersold, M., Pypaert, M., Delamarre, L., Hartley, A., & Mellman, I. (2006). Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature*,

444(2), 115–118.

- Siemasko, K., & Clark, M. (2001). The control and facilitation of MHC class II antigen processing by the BCR. *Current Opinion in Immunology*, 13(1), 32–36.
- Su, T., & Rawlings, D. (2002). Transitional B Lymphocyte Subsets Operate as Distinct Checkpoints in Murine Splenic B Cell Development. *Journal of Immunology*, 168(5), 2101–2110.
- Tam, J., & Routes, J. (2013). Common variable immunodeficiency. *American Journal of Rhinology and Allergy*, 24(7), 260–265.
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods in Molecular Biology*, 445, 77–88.
- Testi, R., Ambrosio, D., De Maria, R., & Santoni, A. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunology Today*, 15(10), 478–482.
- Thiel, J., Kimmig, L., Salzer, U., Grudzien, M., Lebrecht, D., Hagen, T., ... Schlesier, M. (2012). Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *Journal of Clinical Immunology*, 129(3), 801–810.
- Toche, P. (2012). Panoramic vision of the immune system. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457.
- Treanor, B. (2012). B-cell receptor: from resting state to activated. *Immunology*, 136, 21–27.
- Vale, A., Kearney, J., Nobrega, A., & Schroeder. (2015). Development and Function of B Cell Subsets. In F. Alt, T. Honjo, A. Radbruch, & M. Reth (Eds.), *Molecular Biology of B Cells* (pp. 99–119). London, UK: Academic Press, ELSEVIER.
- Wang, J., & Lockey, R. (2014). Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor (LRBA), a novel regulator of human immune disorders. *Austin Journal of Clinical Immunology*, 1(1), 1–9.
- Wyant, T., Fisher, M., McKallip, R., Nagarkatti, P., Nagarkatti, M., & Conrad, D. (2005). Mouse B Activation is Inhibited by CD44 Cross-linking. *Immunology Investigation*, 34(4), 399–416.
- Yang, J., & Reth, M. (2016). Receptor Dissociation and B-Cell Activation. *Current Topics of Microbiology and Immunology*, 393, 27–43.

Anexo 1

Preparación de soluciones y medios de cultivo

a) Soluciones para extracción de DNA a partir de cola de ratón

Solución alcalina de lisis

A 25 mL de agua bidestilada agregar:

- 62.5 μ L de NaOH 10 N (concentración final 25 mM)
- 10 μ L de EDTA disódico 0.5 M (concentración final de 0.2 mM. pH alrededor de 12, no fue necesario ajustarse).

Solución de neutralización

A 24 mL de agua bidestilada agregar:

- 1 mL de Tris-HCl 1 M (concentración final de 40 mM. pH alrededor de 5, no fue necesario ajustarse).

b) Buffer de carga 6x para electroforesis de DNA

- 6.7 mL agua inyectable
- 3.3 mL glicerol
- 0.7 mg azul de bromotimol

c) Buffer de lisis de eritrocitos

NH_4Cl 0.15M, KHCO_3 10 mM, EDTA 100 μ M

d) RPMI suplementado

Para preparar 200 mL:

- 20 mL suero fetal bovino descomplementado estéril (Gibco, Waltham AM, USA)
- 2 mL aminoácidos no esenciales 100x estéril (Sigma-Aldrich)
- 2 mL Piruvato de sodio 100x estéril (Sigma-Aldrich)
- 0.2 mL mercaptoetanol 1000xestéril (Gibco)
- 2 mL Antibiótico/antimicótico 100x (Sigma)

e) Buffer de corrida para electroforesis de DNA (TAE 50x)

- 2 M Tris-base
- 50 mM EDTA

f) Soluciones Western blot

Soluciones para preparación de gel

- Tris-HCl 1 M pH 6.8
- Tris-base 1.5 pH 8.8
- SDS 10%
- APS 10%

Buffer de corrida (1L)

- Tris-Glicina 10x
Tris-base 0.25 M
Glicina 1.92 M
- SDS 0.0001%

Buffer de transferencia

- Tris-Glicina 10x
- Isopropanol 5%

Anexo 2 Primers utilizados

a) PCR genotipificación de ratones

- Ex3_Fw
TCATTATCCAGGAAGGTGAGAG
- Ex4_Rv
TCAAATTATAGCTGGCCAGCAC
- Int4_Rv
ATTATAAGGCAGCTGGCTGAAC

b) PCR Exón 2 *LRBA*

- E2_Fw
TTGTCCCCTCAAACCCTAAAAC
- E2_Rv
AGGTGAGTAGAATTTTGTGTCCC