



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

La Tetraspanina 33 (TSPAN33) en la regulación de la vía Notch en linfocitos B

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Ernesto Acevedo Ochoa

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Constantino III Roberto López Macías
Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica,
Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI", IMSS

Dra. Gladis del Carmen Fragoso González
Dpto. de Inmunología,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Leopoldo Santos Argumedo
Dpto. de Biomedicina Molecular,
Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, IPN

Ciudad de México. Enero, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue financiado por:

*Investigación Básica SEP-CONACYT del Comité
Nacional de Ciencia y Tecnología* de México bajo el proyecto
240314

*Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e
Innovación Tecnológica* de la *Universidad Nacional
Autónoma de México* bajo el proyecto
IA202318

Personalmente, fui acreedor de los apoyos y becas:

Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado de la
Universidad Nacional Autónoma de México según el
apoyo IA202318

*Becas Nacionales del Comité Nacional de Ciencia y
Tecnología* de México según la beca
632393

Becas de Apoyo a la Investigación del *Instituto
Mexicano del Seguro Social* de México según la beca
99097182

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis se realizó bajo la dirección del Dr. José Luis Maravillas Montero y el Dr. Constantino III Roberto López Macías en el laboratorio multidisciplinario de la *Red de Apoyo a la Investigación* en el *Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán*, unidad periférica de la *Coordinación de la Investigación Científica*, parte de la *Universidad Nacional Autónoma de México*.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por los asesores:

Dr. Constantino III Roberto López Macías	<i>Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, IMSS</i>
Dra. Gladis del Carmen Fragoso González	<i>Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM</i>
Dr. Leopoldo Santos Argumedo	<i>Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN, CINVESTAV-IPN</i>

El comité evaluador encargado de la revisión de esta tesis estuvo integrado por los sinodales:

Dra. Gloria Soldevila Melgarejo	<i>Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM</i>
Dra. Rosana Pelayo Camacho	<i>Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, IMSS</i>
Dr. José Luis Maravillas Montero	<i>Red de Apoyo a la Investigación, UNAM</i>
Dra. Diana Gómez Martín	<i>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Secretaría de Salud</i>
Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete	<i>Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN, CINVESTAV-IPN</i>

Se reconoce el invaluable apoyo y asesoría técnica de los encargados de varias unidades de trabajo:

Dra. Zayda Lizbeth Piedra Quintero	<i>Laboratorio de Inmunología, Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN</i>
Dr. Guillermo Juárez Vega	<i>Unidad de Citometría de Flujo, Red de Apoyo a la Investigación, CIC-UNAM</i>
Dr. David Eduardo Meza Sánchez	<i>Unidad de Metabolómica y Proteómica, Red de Apoyo a la Investigación, CIC-UNAM</i>
Dr. Inti Alberto De la Rosa Velázquez	<i>Unidad de Genómica, Red de Apoyo a la Investigación, UNAM</i>
M. en C. Rosa Gloria Rebollar Vega	<i>Unidad de Genómica, Red de Apoyo a la Investigación, UNAM</i>
Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez	<i>Investigadora Comisionada, Red de Apoyo a la Investigación, UNAM</i>
Dr. José Esparza López	<i>Investigador Comisionado, Red de Apoyo a la Investigación, UNAM</i>
Dr. Alejandro López Saavedra	<i>Unidad de Microscopía, Instituto Nacional de Cancerología, Secretaría de Salud</i>

*A mis hermanos **Antonio** y **David**,
por qué juntos seguimos aprendiendo a ser Maestros de la Vida.*

*A mi amiga y compañera de vida **Dana**,
por enseñarme el valor de poder Compartir Tu Felicidad con otra persona.
Siempre cuitos.*

A G R A D E C I M I E N T O S

A mis asesores y tutores, por nunca dejar de apoyarme en todos los aspectos posibles y por la confianza depositada en mí para el desarrollo de este trabajo, pero, sobre todo agradezco infinitamente su paciencia durante mis curvas de aprendizaje.

A todos los sinodales involucrados en la revisión de este trabajo. Agradezco sus valiosos comentarios y retroalimentación sobre este trabajo ya que me permitieron revisar y analizar aspectos y posiciones que previamente había ignorado. Muchas gracias.

Un agradecimiento especial a toda la serie de estudiantes, investigadores y técnicos de laboratorio que a lo largo de mis estudios me han apoyado a través de la enseñanza y sobre todo la práctica. Gracias a ustedes me fue posible acercarme a una gran cantidad de conocimientos y a través de su apoyo directo pude aprender sobre su funcionamiento y aplicación en la investigación.

A mi familia, por ser ese respaldo y soporte infinito que me permite avanzar y continuar en este camino. Todo es gracias a ustedes y sin todo su amor, difícilmente podría tener el honor de escribir estas líneas. Gracias por siempre.

A mi amigo Moisés, porque desde el principio has creído en mí ciegamente y me has apoyado en aspectos y formas inimaginables. Gracias a ti he podido crecer como persona y como investigador, por eso estaré eternamente agradecido.

A mi amigo Efrén, por tu paciencia y comprensión a lo largo de todo este proceso; por darme la oportunidad de compartir espacios, pero, sobre todo te agradezco permitirme conocerte y aprender de ti. Te quiero amigo.

A mi amigo Jiram, por que en poco tiempo me mostraste una amistad sincera y con tu ayuda facilitaste tanto el entendimiento como la superación de muchas situaciones. Sin tu apoyo difícilmente habría podido sobrellevar muchos procesos y por eso estoy agradecido contigo. Te quiero amigo.

A mi compañero Gonzalo, por recordarme y reafirmar en mí, la importancia de la humildad en el trabajo y el liderazgo. Por qué, con tu trabajo, esfuerzo y resiliencia ante la adversidad, me hiciste recular ante mis propios juicios y me obligaste a realizar una retroalimentación sobre mi cosmovisión. Por todo eso y más, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio, por recordarme el valor de tolerancia, el respeto, la honestidad y, sobre todo, la lealtad. En la diversidad del pensamiento, siempre deberá imperar la búsqueda del entendimiento. Gracias.

*El mal que existe en el mundo
proviene casi siempre de la ignorancia,
y la buena voluntad sin clarividencia
puede ocasionar tantos problemas como la maldad.*

*Los hombres son más bien buenos que malos,
y, a decir verdad, esa no es la cuestión,
solo que ignoran más o menos,
y a eso se le puede llamar virtud o vicio.*

*Ya que, el vicio más desesperado
es el vicio de la ignorancia que cree saberlo todo,
y entonces se autoriza a matar.*

*El alma del que mata es ciega,
ya que, no puede haber verdadera bondad o amor sincero,
sin toda la clarividencia posible.*

La Peste – Albert Camus

*Queríamos cambiar el mundo,
pero lo único que logramos,
fue que el mundo,
no nos cambiara a nosotros.*

Las flores del balcón - Ernesto Acevedo

ABSTRACT

Tetraspanins form an evolutionarily conserved protein superfamily involved in the regulation of a wide variety of biological functions in different contexts, all related to their capacity of modulating the spatio-temporal distribution of various molecular partners. TSPAN33 is the last described member of this family in mammals and is controversial on regard of its function. It is highly expressed in erythroblasts, spermatogonia, kidney glomeruli and in activated B cells. Moreover, it's part of the TSPAN8 subgroup characterized for their capacity to directly associate with ADAM10 and regulate its proteolytic activity. The global objective of this project is elucidating the functions of TSPAN33 during antigenic stimulation of B cells and how its association with ADAM10 modulates various signaling pathways. The first section of this work describes the generation of a TSPAN33 deficient model using CRISPR-Cas9 in Raji cells and the inability to isolate null clones. Indeed, after various selection rounds and by evaluating HW equilibrium in edited populations, data shows bias to the formation of heterozygotic clones, probably due to deregulation of ADAM10 activity. Second part of this thesis shows an integral analysis with a set of bioinformatic tools, along with a series of experiments using both TSPAN33 transgenic and deficient Raji cells, to describe its role in NOTCH signaling pathway. By re analyzing public NGS datasets from various biological sources like PBMC's and normal or tumoral tissue biopsies, data shows that TSPAN33 is differentially expressed during normal B cell maturation. Particularly, it is observed in some lymphocytes in human germinal centers and is constitutively expressed in various types of lymphomas derived from these structures, mainly in DLCL and Burkitt subtypes. In fact, TSPAN33 is constitutively expressed by unstimulated Raji cells and is located intracellularly in Golgi vesicles. Moreover, this molecule is rapidly translocated to the surface after IL4/ α CD40 stimulation through a calcium independent pathway. Additionally, data collated in this study describes a correlation between NOTCH receptors, α / γ -secretases and TSPAN33. Indeed, surface levels of these molecules were assessed by flow cytometry and they effectively changed along with TSPAN33 in Raji models. Interestingly, stable expression of TSPAN33 also altered the proliferation and growth capacities of this cells, by inducing a cell cycle arrest in the G2M transition phase. Based on these observations, I hypothesize that TSPAN33 plays a pivotal role as signal modulator during B cell activation, by regulating the maturation and trafficking ADAM10 to the cell surface and into γ -secretase containing microdomains. This complex can modulate the ectodomain shedding and subsequent intramembrane proteolysis of substrates like NOTCH (and possibly others like BAFFR or TACI) in membranes of activated B cells. Thus, this processing can regulate NOTCH and NF κ B target genes expression, including MYC, RELA, 5LO and possibly others. Altogether, this mechanism could play a role in shifting or maintaining the balance of signals present in B cells during antigenic responses and/or lymphomagenesis.

TABLA DE CONTENIDO

SECCIÓN I - GENERACIÓN DE CÉLULAS RAJI *KNOCKOUT* PARA TSPAN33 MEDIANTE EL USO DEL SISTEMA CRISPR/CAS9

CAPÍTULO 1 – MARCO TEÓRICO: INGENIERÍA GENÉTICA Y EL SISTEMA CRISPR-CAS92

1.1	Marco teórico	2
1.1.1	Ingeniería genética y edición genómica: Historia y concepto	2
1.1.2	Edición mediante apareamiento de nucleótidos.....	6
1.1.2.1	Oligonucleótidos formadores de tríplex: TFO	6
1.1.2.2	Interferencia de RNA – inhibición de la transcripción: siRNA, shRNA.	7
1.1.3	Edición mediante nucleasas reprogramadas	9
1.1.3.1	Proteínas que reconocen ADN: ZFN's y TALEN's	9
1.1.3.2	Sistema CRISPR-Cas9	11
1.2	Hipótesis	17
1.3	Objetivos	17
1.3.1	Objetivo general.....	17
1.3.2	Objetivos específicos	17

CAPÍTULO 2 – MATERIALES Y METODOS18

2.1	Esquema general de trabajo	18
2.2	Anticuerpos, medios de cultivo y células.....	19
2.3	Delección de TSPAN33 en humanos.....	19
2.3.1	Diseño de sgRNA y construcción de vectores	22
2.3.2	Clonación de construcciones	23
2.3.3	Comprobación de construcciones por secuenciación y restricción de ADN.....	24

2.4	Transfección y aislamiento de clonas individuales.....	24
2.5	Genotipificación mediante PCR genómico.....	25
2.6	Tinciones por inmunofluorescencia para citometría de flujo	26
2.7	Detección de proteínas por Western blot.....	26
2.8	Estimación de frecuencias de delección y equilibrio Hardy-Weinberg	27
2.9	Análisis estadísticos.....	28
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN		30
3.1	RESULTADOS.....	30
3.1.1	Diseño de sgRNA para TSPAN33	30
3.1.2	Construcción de vectores pSpCas9(BB)-2A-GFP: TSPAN33.....	31
3.1.3	Microporación celular	32
3.1.4	PCR genómico para detección de delecciones	33
3.1.5	Estimación de delecciones y genotipos para el aislamiento de clonas...35	
3.1.6	Aislamiento de clonas individuales y genotipificación por PCR	36
3.1.7	Fenotipificación de la clona Δ T33-005.....	39
3.2	DISCUSIÓN	40
SECCIÓN II - TSPAN33 EN LA REGULACIÓN DE LA VÍA NOTCH		
CAPITULO 4 – MARCO TEÓRICO: NOTCH EN LA BIOLOGÍA DE LOS LINFOCITOS B Y REGULACIÓN POR ADAM10		48
4.1	Marco teórico	48
4.1.1	La vía Notch.....	48
4.1.1.1	Notch en el desarrollo normal y tumoral de los linfocitos B	49
4.1.1.2	Proteólisis-Intramembranosa-Regulada y la modulación proteolítica de Notch.....	52
4.1.2	ADAM10.....	54

4.1.3	Tetraspaninas y microdominios de membrana	55
4.1.4	Tetraspanina 33 (TSPAN33).....	56
4.2	Hipótesis	57
4.3	Objetivos	57
4.3.1	Objetivo general.....	57
4.3.2	Objetivos específicos	57
CAPÍTULO 5 – MATERIALES Y METODOS		58
5.1	Análisis en bases de datos públicas: Gtex, FANTOM5, CCLE, TCGA	58
5.2	Análisis de expresión en microarreglos y sc-RNAseq.....	58
5.3	Expresión de TSPAN33 en inmunohistoquímicas del HPA.....	59
5.1	Anticuerpos, medios de cultivo y células.....	59
5.1	Cinética de expresión de TSPAN33 durante la activación	60
5.2	Microscopia confocal de TSPAN33 por inmunofluorescencia.....	60
5.3	Análisis de la proliferación celular: WST-1, eFluor670, RTCA.....	61
5.4	Análisis de ciclo celular	62
CAPÍTULO 6 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN		63
6.1	RESULTADOS.....	63
6.1.1	Expresión de TSPAN33 en órganos y tejidos sanos.....	63
6.1.1.1	Desarrollo de linfocitos B.....	65
6.1.1.2	Desarrollo renal	69
6.1.1.3	Espermatogénesis.....	72
6.1.2	Expresión de TSPAN33 en líneas celulares y muestras de biopsias primarias de tumores.....	73
6.1.2.1	TSPAN33 como biomarcador de tumores primarios derivados de carcinomas renales y linfomas de células B	77

6.1.3	Caracterización de TSPAN33 en un modelo celular de linfoma de Hodgkin.....	79
6.1.3.1	Expresión de tetraspaninas.....	79
6.1.3.2	Distribución subcelular y cinética de expresión durante la estimulación.....	79
6.1.3.3	TSPAN33 se asocia con los receptores NOTCH y la proteasa ADAM10 en la membrana plasmática.....	83
6.1.3.4	TSPAN33 inhibe parcialmente la proliferación, induce un arresto de ciclo celular y la formación de células gigantes multinucleadas.	86
6.1.4	Expresión de TSPAN33 en biopsias registradas en el HPA	89
6.1.4.1	Linfomas.....	89
6.1.4.2	Carcinoma renal.....	89
6.2	DISCUSIÓN	92
6.2.1	TSPAN33 en tejidos normales.....	92
6.2.2	TSPAN33 en tumores.....	98
SECCIÓN III - SECCIÓN FINAL		
CONCLUSIONES GENERALES		113
PLAN DE DIFUSIÓN		115
8.1	Clases y cursos.....	115
8.2	Congresos.....	118
8.3	Reconocimientos.....	120
8.4	Publicaciones.....	122
LITERATURA CITADA.....		124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales descubrimientos que dieron origen a la edición genómica dirigida.....	4
Figura 2. Edición genómica dirigida basada en escisiones bicatenarias..	4
Figura 3. Número de citas en la base de datos PubMed asociadas a los términos “RNAi” y “CRISPR-Cas9”	8
Figura 4. Número de citas en la base de datos PubMed asociadas a los términos “CRISPR-Cas9”, “TALEN” y “ZFN”	10
Figura 5. Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9.....	14
Figura 6. Diagrama esquemático del flujo de trabajo para la edición genómica dirigida con el sistema CRISPR-Cas9 en la línea celular linfoblastoide humana Raji.....	18
Figura 7. Locus cromosómico de TSPAN33 en humanos.....	20
Figura 8. Esquema de delección y detección de cambios en TSPAN33.....	21
Figura 9. Esquema de ligación al vector pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461).....	23
Figura 10. Distribución de frecuencias genotípicas en una población en equilibrio Hardy-Weinberg.....	28
Figura 11. Construcción de vectores pSpCas9(BB)-2A-GFP dirigidos al locus de TSPAN33.....	31
Figura 12. Microporación de células Raji.....	32
Figura 13. Estandarización del análisis molecular de la región genómica editada.....	34
Figura 14. Frecuencia de delecciones y estimación de genotipos esperados.	35
Figura 15. Detección de clonas con delecciones en el locus genómico de TSPAN33.....	38

Figura 16. Fenotipificación de la delección del locus de TSPAN33 en la clona ΔT33-005.	39
Figura 17. Estructura general de los receptores y ligandos canónicos de la vía de Notch.	48
Figura 18. Mecanismo canónico de transducción de señales a través de la unión de receptores NOTCH y los ligandos canónicos correspondientes.....	Error!
Bookmark not defined.	
Figura 19. Expresión de TSPAN33 en tejidos normales de humano	64
Figura 20. Expresión diferencial de TSPAN33 en diferentes subpoblaciones de linfocitos B.....	66
Figura 21. Distribución de TSPAN33 en médula ósea.....	67
Figura 22. Distribución de TSPAN33 en órganos linfoides secundarios.;	68
Figura 23. Distribución de TSPAN33 en pulmón.	69
Figura 24. Distribución de TSPAN33 en riñones.	70
Figura 25. Distribución de TSPAN33 en riñones.	71
Figura 26. Distribución de TSPAN33 en testículos.....	72
Figura 27. Expresión de TSPAN33 en líneas celulares derivadas de tumores. .	74
Figura 28. Expresión de TSPAN33 en líneas celulares individuales de neoplasias derivadas de linfocitos B y carcinomas renales.	75
Figura 29. Expresión de TSPAN33 en biopsias de tumores primarios.....	76
Figura 30. TSPAN33 como biomarcador en la prognosis de linfomas y carcinomas renales.....	78
Figura 31. Expresión de tetraspaninas en la línea celular Raji.	80
Figura 32. Distribución y cinética de expresión de TSPAN33 en células Raji. ...	81
Figura 33. Distribución subcelular de TSPAN33 en linfocitos y células epiteliales.	82

Figura 34. TSPAN33 regula los niveles de expresión de los receptores NOTCH en células Raji..	84
Figura 35. TSPAN33 interactúa con los receptores NOTCH en la membrana plasmática.....	85
Figura 36. La presencia de TSPAN33 en la membrana inhibe la proliferación celular.l.....	87
Figura 37. La expresión transgénica de TSPAN33 induce un arresto en la fase G2M del ciclo celular.....	87
Figura 38. La expresión transgénica de TSPAN33 induce la formación de células gigantes multinucleadas.	88
Figura 39. Distribución de TSPAN33 en linfomas de células B.....	90
Figura 40. Distribución de TSPAN33 en carcinomas renales.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos físicos, químicos y biológicos para la generación de mutaciones en organismos vivos.....	5
Tabla 2. Secuencia y propiedades físicas de los cebadores utilizados para la detección de cambios en el locus de TSPAN33.	26
Tabla 3. Propiedades de especificidad y actividad de las secuencias utilizadas como sgRNA para la edición de TSPAN33.	30
Tabla 4. Aislamiento clonal de células tratadas con los vectores de edición. ...	37
Tabla 5. Estimación de genotipos de acuerdo a la frecuencia de delección calculada con respecto al número de mutantes observados.	37

SECCIÓN I

GENERACIÓN DE CÉLULAS RAJI *KNOCKOUT* PARA TSPAN33 MEDIANTE EL SISTEMA CRISPR/CAS9

CAPÍTULO I – MARCO TEÓRICO: INGENIERÍA GENÉTICA Y EL SISTEMA CRISPR-CAS9

2.1 Marco teórico

2.1.1 Ingeniería genética y edición genómica: Historia y concepto

La era pre genómica inicio en la década de los 50 con la identificación de la estructura tridimensional del ADN, y con el posterior desciframiento del código genético en los 60 se potencio el interés por el estudio de esta molécula en la que se codifica gran parte de la información necesaria para la vida (Yanofsky 2007; Nirenberg 2004; Nirenberg y Matthaei 1961; Watson y Crick 1953; Crick et al. 1961). Sin embargo, no fue sino con el desarrollo de las primeras estrategias para manipular el ADN y la generación de vectores biológicamente funcionales en los años 70, que se acuño formalmente el concepto de “Ingeniería Genética” (Guttmacher y Collins 2003; Cohen et al. 1973; Mertz y Davis 1972). Esta disciplina es definida como el conjunto de teorías y técnicas que permiten el aislamiento, manipulación y reintroducción de material genético en organismos diferentes. Las metodologías también son conocidas como “Tecnologías del ADN recombinante”, haciendo alusión al carácter artificial del ADN generado a partir de la combinación y/o modificación de material genético proveniente del mismo o diferentes organismos. Para esto, también fue necesaria la identificación de enzimas con capacidad de procesar el ADN, incluyendo: polimerasas, ligasas, endonucleasas de restricción, etcétera; y su aplicación en metodologías como: PCR, secuenciación e hibridación, entre otras. Posteriormente, la comprensión de las implicaciones biológicas del ADN en organismos eucariontes y procariontes, así como la acumulación de innovaciones en el análisis del material genético, incluyendo la capacidad de secuenciar genomas completos y el proyecto del genoma humano, marcaron el inicio de la era genómica que hasta el momento sigue en curso (Figura 1) (Fleischmann et al. 1995).

Gracias a lo anterior, fue posible empezar a realizar estudios más detallados sobre los genes a nivel individual, confirmando la relación gen-mRNA-proteína, mecanismos de regulación, posibles funciones y su asociación con efectos moleculares/fisiológicos (Crick 1970). Para esto, desde los estudios de genética clásicos hasta los trabajos

moleculares actuales, la modulación del contenido y expresión genética tanto en células, como en organismos vivos, ha sido una estrategia fundamental para el estudio de los genes. En este sentido, tras la descripción de los sistemas de reparación y recombinación capaces de reponer alteraciones en el material genético (e.g. radiación), también fueron realizadas las primeras modificaciones genómicas aleatorias y dirigidas en células eucariontes (Smithies et al. 1985; Hinnen, Hicks y Fink 2006; Resnick 1976; Holliday 1964). Para esto, mediante la introducción de ADN donador homólogo linealizado (o circular) y con alguna mutación o secuencia de interés, se puede inducir la integración cromosómica del material por recombinación homóloga (RH) (Orr-Weaver, Szostak y Rothstein 1981; Szostak y Wu 1979). Sin embargo, la ocurrencia normal de la RH en vertebrados superiores es baja (1×10^{-7} - 10^{-6} mutantes/loci) y limita el uso rutinario de esta técnica; no obstante, la introducción de marcadores de selección (ej. genes de resistencia) y otros vehículos de introducción del ADN exógeno (ej. microinyección y electroporación), ha facilitado significativamente el aislamiento de mutantes aleatorios y específicos (Capecchi 2005). Finalmente, basados en que la linealización del ADN donador aumentaba su integración cromosomal y en la capacidad de la endonucleasa-HO de generar un corte bicatenario en una secuencia específica del genoma de *S. cerevisiae*, se observó que el procesamiento enzimático aumentaba la eficiencia de integración a la región en 99.5% (Rudin y Haber 1988). Poco tiempo después, el mismo fenómeno fue descrito en células de ratón, expresando de forma recombinante otra mega-endonucleasa de levadura que reconoce una secuencia particularmente larga (I-Sce I) y de ocurrencia casi única en el genoma de los mamíferos (Rouet, Smith y Jasin 1994). Estos trabajos fueron al mismo tiempo la base conceptual de la “edición genómica dirigida”, ya que, las escisiones bicatenarias en sitios específicos de algún genoma activarán los mecanismos endógenos de reparación, incluyendo: unión de extremos no homólogos y recombinación por homología. Pudiendo así introducir, eliminar y/o modificar secuencias específicas (Figura 2) (Kim 2016).

Es importante señalar que, aunque se ha hecho énfasis en los principales eventos que dieron origen al concepto de edición genómica dirigida, existen otras formas de generar cambios en los genomas (mutagénesis) basadas en varios métodos físicos, químicos

y biológicos (Figura 1). Dichos abordajes y sus combinaciones siguen siendo fundamentales en el estudio del material genético y difieren entre sí, por tener mayor o menor capacidad para generar cambios (frecuencia mutagénica) y en la especificidad de dichos cambios (tipo de mutación) (Tabla 1).

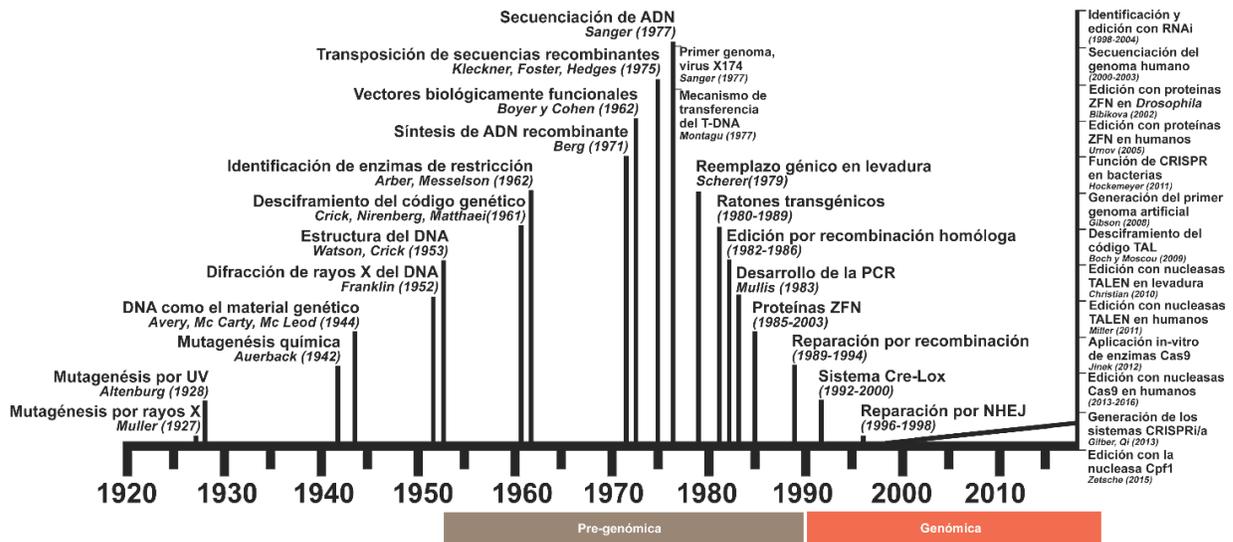


Figura 1. Principales descubrimientos que dieron origen a la edición genómica dirigida.

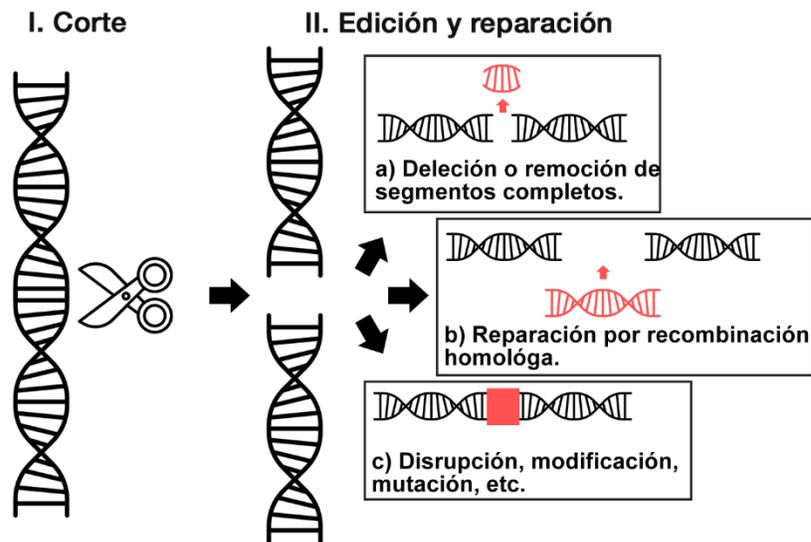


Figura 2. Edición genómica dirigida basada en escisiones bicatenarias. Diagrama esquemático que describe las fases de edición genómica dirigida, en una primera fase debe ocurrir una escisión en el ADN generada por alguna herramienta (ej. nucleasas modificadas). En una segunda fase del proceso, podrán ocurrir diferentes escenarios, incluyendo: delección de segmentos de diferentes tamaños, introducción o modificación de secuencias por recombinación homóloga, introducción de mutaciones y modificaciones puntuales. Todos los anteriores, acompañados de la activación de los mecanismos de reparación del ADN.

Tabla 1. Métodos físicos, químicos y biológicos para la generación de mutaciones en organismos vivos.

Tipo	Agente Mutágeno	Fundamento	Características de la variación	Frecuencia Mutagénica	Ventajas	Desventajas
Químico	Etilnitrosourea	Agente alquilante capaz de alterar e inducir cambios de bases.	Principalmente mutaciones puntuales y en algunos casos deleciones pequeñas.	150×10^{-5} por loci.	Genera cambios en genes individuales, alta eficiencia y fácil producción de mutaciones aleatorias.	Difícil identificación y clonación de mutantes, tasa alta de mutaciones inespecíficas.
	Clorambucilo	Compuesto tipo mostaza de nitrógeno capaz de formar mono aductos covalentes y algunos entrecruzamientos.	Re arreglos cromosomales, deleciones y translocaciones.	120×10^{-5} por loci.	Los re arreglos cromosomales son detectables fácilmente.	Alteración de varios genes, difícil identificación de mutantes individuales.
	Psoraleno	Furanocumarina foto activable capaz de inducir entrecruzamiento intracatenario de nucleótidos.	Cortes bicatenarios capaces de generar mutaciones puntuales o inducir eventos de recombinación.	$40-60 \times 10^{-5}$ por loci.	Capacidad de activar los mecanismos de reparación, entrecruzamiento inducido por la foto activación.	Múltiples modificaciones al DNA, aplicación adicional de radiación.
Físico	Ultravioleta	Formación de dímeros de timina mediante la excitación con radiación de alta energía.	Gran variedad de cambios estructurales y mutaciones puntuales.	$0.85-1.5 \times 10^{-5}$ por loci.	Generación de mutantes relativamente sencilla.	Múltiples modificaciones al DNA, alteración de varios genes, difícil identificación de mutantes individuales.
	Rayos-X	Inducción de cambios mediante radiación ionizante.	Re arreglos cromosomales, deleciones, inversiones y translocaciones.	$15-50 \times 10^{-5}$ por loci.	Los re arreglos cromosomales son detectables fácilmente.	Alteración de varios genes, difícil identificación de mutantes individuales.
Biológico	Espontanea	Cambios inducidos por factores ambientales (e.g. radiación solar).	Mutaciones, cambios puntuales, deleciones pequeñas y re arreglos cromosomales.	5×10^{-6} por loci.	Fenotipos observables.	Difícil identificación de mutantes individuales y una frecuencia de mutación muy baja.
	Edición genética dirigida	Edición genética dirigida por nucleasas (e.g. CRISPR/Cas9).	Según el tipo de nucleasa se pueden realizar una gran variedad modificaciones en secuencias y/o regiones específicas.	Aprox. 100% mutantes.	Modificación de secuencias y/o regiones específicas, diseño de la mutación requerida y alta eficiencia para generar cortes bicatenarios.	Requiere conocimientos amplios del gen a modificar, fenotipos impredecibles y generación laboriosa.
	Transgenes transponibles	Introducción de transposones recombinantes.	Inserción de secuencias específicas mediante elementos transponibles.	Aprox. 5-10% mutantes.	Fácil detección de las modificaciones, posibilidad de insertar fragmentos grandes, relativamente sencillo y barato.	Baja tasa de transgénesis y patrones de integración genómica aleatorios.
	Transgenes virales	Introducción de secuencias recombinantes a través de diferentes vectores virales.	Dependiendo del vector viral permitirá diferentes modificaciones en las secuencias.	Aprox. 5-10% mutantes.	Fácil aislamiento de mutantes, patrón de integración específico.	Generación laboriosa, bajo rendimiento de mutagénesis.
	Compuestos químicos	Mutagénesis inducida durante la micropropagación de plantas para la formación de callos.	Según la combinación de compuestos ocurrirán re arreglos genéticos capaces de inducir la formación de callos.	Dependiendo el compuesto.	Fácil aislamiento de mutantes con fenotipos observables.	Inducción de cambios genéticos aleatorios.
	T-DNA	DNA de transferencia basado en el plásmido inductor de tumores de <i>A. rhizogenes</i> .	Inserción de secuencias recombinantes en el genoma de plantas	Aprox. 80-90% mutantes.	Fácil aislamiento de mutantes, la inserción de secuencias ocurre en zonas transcripcionalmente activas.	Re arreglos cromosomales, aplicación limitada, patrones de integración genómica aleatorios.

2.1.2 Edición mediante apareamiento de nucleótidos

Las metodologías para manipular genomas han permitido avances en la biología desde hace más de 70 años, no obstante, la capacidad de dirigir las modificaciones a secuencias específicas es hasta la fecha, uno de los problemas técnicos más importantes en esta área de la ingeniería genética. En este sentido, los primeros abordajes desarrollados para superar este obstáculo, fueron diseñados en base al reconocimiento de secuencias por apareamiento de bases con fragmentos sintéticos de ADN y RNA (Rakoczy 2001).

2.1.2.1 Oligonucleótidos formadores de tríplex: TFO

Poco después de la descripción de la naturaleza de doble hélice en el ADN, el grupo de Alexander Rich demostró por primera vez la existencia de una conformación de triple hélice en el RNA, mediante experimentos que demostraron relaciones 1:1 y 1:2 durante la formación de polímeros entre cadenas de poly(A) y poly(U), respectivamente (Rich 1989; Felsenfeld y Rich 1957). Posteriormente, las mismas estructuras de tríplex fueron descritas en el ADN, al observar que oligonucleótidos sintéticos podían unirse mediante apareamiento Hoogsteen al surco mayor de regiones ricas en polypurina:polypirimidina de una cadena bicatenaria más larga (Thuong y Hélène 1993). La especificidad de esta interacción represento una oportunidad para dirigir modificaciones químicas a secuencias específicas mediante la generación de “oligonucleótidos formadores de tríplex” (TFO) (Strobel y Dervan 1990; Moser y Dervan 1987). Sin embargo, la aplicación de esta estrategia en condiciones fisiológicas ha encontrado grandes limitaciones por factores como: el nivel de compactación de la cromatina, la degradación celular de los TFO por endonucleasas y la falta de condiciones que favorezcan la formación del tríplex, entre otros (Seidman y Glazer 2003). A pesar de esto, modificaciones en la secuencia de oligonucleótidos incluyendo: intercambio de bases, agentes intercalantes (ej. acridina) y el acoplamiento de otros agentes inductores de escisiones bicatenarias (ej. psoraleno), otorgaron mayor especificidad, permitieron la modificación de genes específicos y la introducción de cambios por RH (Faruqi et al. 2000; Majumdar et al. 1998). Actualmente, esta estrategia sigue siendo utilizada como una alternativa en el repertorio de herramientas

disponibles para la edición genómica dirigida y ha encontrado diversas aplicaciones biotecnológicas, incluyendo terapia génica para el tratamiento de tumores y la modificación genética de hortalizas (Akhter y Rajeswari 2018; Sauer et al. 2016).

2.1.2.2 Interferencia de RNA – inhibición de la transcripción: siRNA, shRNA

La interferencia de RNA (RNAi) es un mecanismo explícitamente supresor de la expresión de genes específicos, mediante la inactivación (silenciamiento) selectiva de los mRNA, utilizando oligonucleótidos de RNA bicatenario homólogo (Ipsaro y Joshua-Tor 2015). Por lo tanto, aunque este no es un método de edición genómica capaz de modificar la línea germinal, es un abordaje relativamente eficiente, económico y que ha contribuido ampliamente durante las últimas dos décadas en el estudio de la función de los genes (Boettcher y McManus 2015). Es importante señalar que, de forma análoga a otros mecanismos de edición genómica dirigida, la supresión de genes por RNAi aprovecha un tipo de maquinaria celular endógena para generar la supresión de secuencias específicas. Inicialmente, los efectos de la RNAi fueron observados como cambios fenotípicos en plantas y hongos (Fagard y Vaucheret 2000). Sin embargo, el concepto formal fue descrito a finales de los 90, cuando se observó que la inyección de segmentos de RNA bicatenarios en embriones de *C. elegans*, eran capaces de reducir significativamente la expresión de genes específicos, un hecho contrario a lo esperado según los estudios con TFO monocatenarios (Fire et al. 1998). El mecanismo principal de este sistema radica en la generación citoplásmica de varios RNA pequeños monocatenarios con capacidad de interferencia (siRNA), a partir de cadenas más largas (Unniyampurath, Pilankatta y Krishnan 2016). Estos precursores bicatenarios son generados por una RNAsa tipo III llamada Dicer, suelen tener un tamaño aproximado de 20pb y extremos salientes con dos nucleótidos junto a un grupo fosfato. Después, los fragmentos son acoplados en el aparato molecular efector del proceso de RNAi, denominado “complejo de silenciamiento inducido por RNA” (RISC). Este complejo se activará con el desenrollamiento dependiente de ATP del RNA, dejándolo como un segmento monocatenario anti sentido capaz de reconocer secuencias y mediante las nucleasas Argonata degradar los mRNA homólogos (Ipsaro y Joshua-Tor 2015; Dykxhoorn, Novina y Sharp 2003). Como se mencionó, este mecanismo es aprovechado para inhibir la expresión de genes, ya que la RNAi también puede ser

activada por la introducción exógena de siRNA sintéticos, mediante los diferentes vehículos de transfección (ej. lipofección, electroporación). Asimismo, pueden ser expresados de forma recombinante vía vectores plasmídicos o virales que codifican para un RNA de horquilla corta (shRNA) que será procesado de forma similar para formar los siRNA (Paddison y Hannon 2002). Sin embargo, al igual que otras herramientas utilizadas para la modulación de la expresión de genes, la especificidad sigue siendo uno de los principales retos durante el uso de esta tecnología (Sigoillot y King 2011). Poco después de su descubrimiento, se describió que el uso de siRNA sintéticos también reprimía la expresión de genes inespecíficos mediante complementariedad limitada y con una tolerancia de hasta 11 nucleótidos (Jackson *et al.*, 2003). Dicha interacción ocurre de forma inespecífica en las regiones 3' no traducidas (UTR) de diversos mRNA, iniciando su represión o degradación (Petersen *et al.* 2006). Mediante este mecanismo, cada siRNA individual podrá modificar la expresión de una gran cantidad de genes y generar fenotipos dominantes, por encima del que pudiera asociarse al locus de interés (Franceschini *et al.* 2014; Petersen *et al.* 2006). Sin embargo, hasta la fecha la inhibición de genes mediante RNAi sigue siendo la metodología más utilizada para el estudio de la función de los genes (Figura 3).

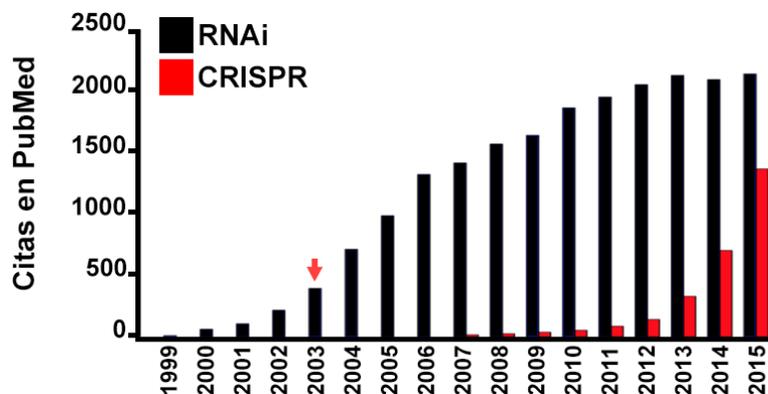


Figura 3. Número de citas en la base de datos PubMed asociadas a los términos “RNAi” y “CRISPR-Cas9”. Se muestran el número de citas anuales en forma de publicación en la base de datos PubMed asociadas a la búsqueda de las palabras clave indicadas. Con una flecha roja se indica el año de la descripción inicial de las secuencias tipo CRISPR.

2.1.3 Edición mediante nucleasas reprogramadas

En años recientes, la descripción de nucleasas reprogramadas capaces de generar cortes bicatenarios en secuencias específicas de ADN, ha incrementado de manera notable la aplicación de la edición genómica dirigida. Este grupo de enzimas pueden clasificarse en cuatro clases, incluyendo: meganucleasas, nucleasas con dedos de cinc (ZFN), nucleasas con efectores similares a activadores de transcripción (TALEN) y la nucleasa del sistema tipo II asociada a las CRISPR (Cas9).

2.1.3.1 Proteínas que reconocen ADN: ZFN's y TALEN's

La enzima FokI fue la primer enzima de restricción identificada con dominios de reconocimiento y escisión de ADN independientes (Lin Li, Wu y Chandrasegaran 1992). Lo anterior fue un descubrimiento crucial, ya que la fusión del dominio catalítico de FokI con proteínas de unión al ADN (e.g. factores de transcripción), permitió la construcción de nucleasas quiméricas capaces de escindir las secuencias reconocidas por estos factores (Kim, Li y Chandrasegaran 1994). Siguiendo este orden de ideas, las quimeras de FokI con dominios de dedos de cinc también fueron capaces de realizar escisiones bicatenarias *in-vitro* adyacentes a una secuencia específica (Kim, Cha y Chandrasegaran 1996). Poco tiempo después, investigadores del mismo grupo reportaron por primera vez la edición genómica dirigida con ZFN en animales y humanos (Bibikova et al. 2002; Urnov et al. 2005). Los dedos de cinc, son dominios proteicos eucariontes presentes en algunos factores de transcripción y están conformados por aproximadamente 30 - 38 aminoácidos capaces de reconocer 3 - 4 nucleótidos específicos, por lo tanto, mediante la combinación y modificación de diferentes dedos de cinc es posible el reconocimiento de secuencias más largas. Sin embargo, la citotoxicidad por la generación de cortes inespecíficos es uno de los principales obstáculos para la utilización de estas nucleasas (Cornu et al. 2008). Además, la interferencia entre los mismos dedos de cinc durante el reconocimiento, representa otro gran obstáculo técnico durante el diseño y optimización de estos dominios (Ramalingam et al. 2011). Por lo que, aunque las ZFN fueron una de las primeras nucleasas artificiales de este tipo, no se logró su implementación rutinaria.

Poco tiempo después, otro tipo de dominios de unión al ADN fueron descritos en la bacteria fitopatogena *Xanthomonas* spp, llamados efectores similares a activadores de transcripción (TALE). A diferencia de los dedos de cinc tienen la propiedad de reconocer nucleótidos individuales, otorgándoles mayor especificidad (Boch et al. 2009; Moscou y Bogdanove 2009). Con lo anterior, al combinar solo 4 tipos de TALE es posible diseñar proteínas capaces de reconocer cualquier secuencia y aplicando el mismo principio de fusión a FokI, generar escisiones bicatenarias adyacentes (Miller et al. 2011; Schmidt et al. 2010). Estas nucleasas adquirieron gran popularidad en poco tiempo y hasta el día de hoy, siguen siendo utilizadas como herramientas de edición genómica dirigida por su bajo índice de citotoxicidad y el grado de especificidad que presentan (Mussolino et al. 2014; Kim et al. 2013). A pesar de lo anterior, una de las complicaciones asociadas al uso de este sistema es la propia generación de la TALEN, ya que requiere el uso de clonación secuencial para construir grandes fragmentos (aprox. 49 – 55 kb), implicando la implementación de técnicas no convencionales (Schmid-Burgk et al. 2012). Con todo y sus implicaciones, la tecnología fue bien aceptada por la comunidad científica, pero fue desplazada poco tiempo después de su descubrimiento por sistemas como la RNAi o más recientemente, el sistema CRISPR-Cas9 (Figura 4).

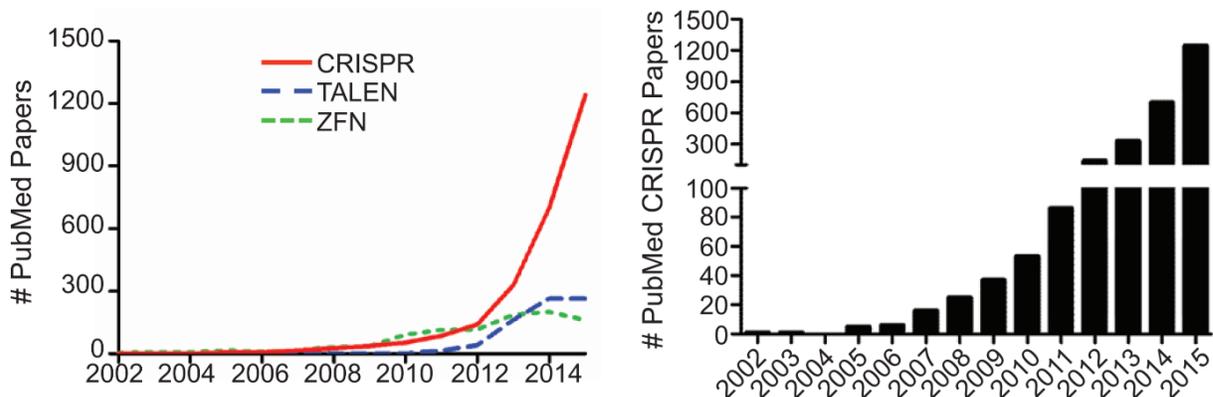


Figura 4. Número de citas en la base de datos PubMed asociadas a los términos “CRISPR-Cas9”, “TALEN” y “ZFN”. A. Comparación del número de citas anuales desde el año 2002 al 2015, asociadas a la búsqueda de las palabras clave descritas previamente. B. Número de citas asociadas a la búsqueda del término “CRISPR-Cas9”.

2.1.3.2 Sistema CRISPR-Cas9

Descubrimiento y biología del sistema CRISPR-Cas9

El acrónimo CRISPR hace alusión a “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente inter espaciadas”, un tipo de secuencias presente en los genomas de diferentes especies de bacterias y archaeas. Estas regiones fueron descritas originalmente en la bacteria *E. coli* como cinco secuencias semi palindrómicas de 29pb, separadas por espaciadores heterogéneos con 32pb y localizadas en regiones cercanas al ORF de un gen (Ishino et al. 1987). Tiempo después, patrones similares también fueron observados en otras especies como: *H. mediterranei*, *S. dysenteriae*, *S. enterica*, *M. tuberculosis*, *H. volcanii*, entre otras (Mojica y Rodriguez-Valera 2016). Sin embargo, no fue hasta el año 2002 que se estableció la nomenclatura oficial de “CRISPR” para referirse a este tipo de secuencias (Jansen et al. 2002). Además, también se describió la existencia de una extensa familia de genes asociada a estas repeticiones (Cas), y que presentaban actividad putativa de nucleasa y helicasa (Jansen et al. 2002). Posteriormente, otros estudios sobre las CRISPR identificó que las secuencias de los espaciadores, presentan homología con elementos del genoma de bacteriófagos y/o plásmidos bacterianos (Bolotin et al. 2005; Mojica et al. 2005). En conjunto, estas observaciones llevaron a proponer que los loci CRISPR-Cas conformaban un sistema natural de defensa contra material genético invasor y que utilizaba el reconocimiento por homología especificado por las CRISPR, para llevar a cabo un silenciamiento similar a la RNAi (Bolotin et al. 2005; Pourcel, Salvignol y Vergnaud 2005). Sin embargo, no fue hasta el año 2007 que se demostró por primera vez que el sistema CRISPR-Cas confería inmunidad contra fagos líticos en bacterias ácido lácticas (Barrangou et al. 2007). Al mismo tiempo, lo anterior sentó las bases para la primera aplicación biotecnológica de este sistema en la industria lechera, al aplicarse para “inmunizar” diferentes lactobacilos y conferir resistencia contra fagos en los procesos productivos.

Por lo tanto, CRISPR-Cas es un sistema de inmunidad adaptativa procarionte con memoria molecular hereditaria, que actúa recopilando y almacenando fragmentos de material genético exógeno de invasiones previas (Horvath y Barrangou 2010). Estos

fragmentos se transcriben en un tipo particular de RNA asociado a estos locus (crRNA), y que al mismo tiempo actuarán en forma de guía para las endonucleasas Cas. Durante procesos invasivos de material genético ajeno, estos complejos podrán de reconocer y escindir las secuencias homologas a los crRNA codificados en las CRISPR. La inmunidad bacteriana ocurre en tres fases: (a) inserción de secuencias invasoras en forma de espaciadores en arreglos CRISPR, (b) transcripción de la CRISPR completa como un pre-crRNA individual que pasará por un proceso de maduración y escisión para generar varios crRNA funcionales y (c) el reconocimiento de secuencias mediante los crRNA, acompañado del procesamiento enzimático para su degradación (Horvath y Barrangou 2010). A partir de esto, se distinguen tres tipos de sistemas CRISPR-Cas (I, II, III), con diferentes requerimientos y componentes tanto para el reconocimiento como procesamiento enzimático (Makarova y Koonin 2015). Durante el reconocimiento, los sistemas tipo I y II requieren de un motivo de 3 nucleótidos en el extremo 5' de los crRNA llamados proto espaciadores (PAM). Para el procesamiento enzimático, los sistemas tipo I y III utilizan un complejo de al menos 5-7 proteínas Cas. En contraste, el sistema tipo II únicamente utiliza a la proteína Cas9 para el reconocimiento y escisión de secuencias de ADN, guiada por el crRNA correspondiente. La anterior, es una propiedad de los sistemas tipo II que ha sido modificada y optimizada para diferentes aplicaciones en ingeniería genética, incluyendo la edición genómica dirigida.

Funcionalidad de Cas9

Inicialmente, la proteína Cas9 fue identificada por análisis bioinformáticos como una proteína multifuncional con dos dominios que presentan actividad de endonucleasa incluyendo uno similar a RuvC y otro tipo HNH (Makarova et al. 2006). Posteriormente, otros estudios confirmaron que este gen es esencial para la protección contra invasiones virales y actúa mediante la generación de escisiones bicatenarias en el ADN con los dominios anteriores (Horvath y Barrangou 2010). Por otro lado, para ejercer su función efectora, el sistema tipo II requiere la expresión de un RNA trans-activador (tracrRNA) para mediar la maduración de los pre-crRNA en bacterias, lo anterior junto con la ribonucleasa III (Chylinski, Rhun y Charpentier 2013). Adicionalmente, en el año 2014 se confirmaron dichas hipótesis con la descripción de

la estructura cristalográfica del complejo CRISPR-Cas9 de *S. pyogenes* como una endonucleasa bilobulada unida al tracrRNA:crRNA (M. Jinek et al. 2014). En un principio, la formación del complejo Cas9 con el dúplex induce cambios conformacionales que a su vez, facilitan la unión con las secuencias de ADN complementarias al crRNA y a través del dominio HNH generar un primer corte adyacente al PAM. Enseguida, el dominio similar a RuvC realizará un segundo corte en la hebra complementaria para completar la escisión de la cadena (Figura 5A). La introducción de mutaciones en uno de los dominios de nucleasa genera formas de Cas9 que realizan cortes monocatenarios tipo “nickasa” (nCas9). Mientras que la mutación de ambos dominios genera una forma “muerta” de la enzima que actúa como proteína de unión a ADN (dCas9). En base a estas observaciones, fue realizada la optimización del dúplex de RNA (tracrRNA:crRNA) para que pudiera ser codificado como un RNA guía individual (sgRNA) (Ran et al. 2013). En comparación a un crRNA bacteriano, los sgRNA son más pequeños y están compuestos por una secuencia de 20 nucleótidos para el reconocimiento, unido a un fragmento mínimo del tracrRNA que actúa como andamio para la unión de Cas9 (Figura 5B). Por lo tanto, este sistema de dos componentes, con la capacidad de ser reprogramado a través de cambios en los 20 nucleótidos de reconocimiento, permite dirigir modificaciones a cualquier secuencia de ADN adyacente a un PAM (Hsu et al. 2013). Finalmente, aunque el acrónimo de CRISPR es ampliamente utilizado para referirse al uso de estos sistemas, la mayoría de sus aplicaciones en ingeniería genética dependen solamente del uso de sgRNA sintéticos, junto con alguna forma recombinante de una endonucleasa Cas.

Aplicaciones en ingeniería genética

En el año 2012, el grupo de Doudna y Charpentier demostró por primera vez la reprogramación del sistema CRISPR-Cas9 para la escisión bicatenaria de secuencias de ADN específicas *in-vitro* (Jinek et al. 2012). Un año después, varios trabajos demostraron la idea de reprogramar la nucleasa a través de la introducción de sgRNA sintéticos para la edición genómica dirigida de genes en bacterias, líneas celulares tumorales, células troncales pluripotenciales humanas y el pez cebra como organismo completo (Ran et al. 2013).

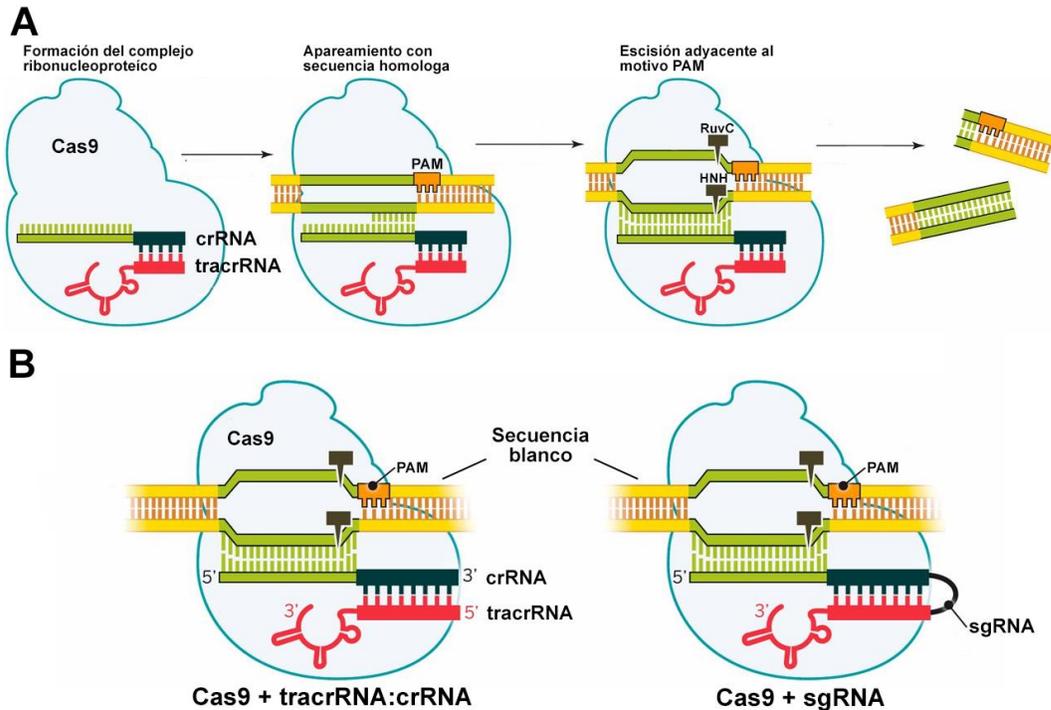


Figura 5. Mecanismo de acción del sistema CRISPR-Cas9. A. Proceso secuencial para la escisión de secuencias específicas desde la formación del complejo Cas9 con el dúplex de RNA que actúa como guía para el reconocimiento y posterior escisión bicatenaria secuencial mediada por los dominios HNH y RuvC respectivamente. B. La adaptación del sistema CRISPR-Cas tipo II de la bacteria *S. pyogenes* implicó la sustitución del dúplex de RNA por especies recombinantes de un solo segmento (sgRNA). Modificado de (Doudna y Charpentier 2014).

Lo anterior, ha dado lugar a la publicación de una gran cantidad de trabajos describiendo el uso de este sistema para realizar diferentes modificaciones en varios organismos, incluyendo: levaduras, ratones, ratas, conejos, moscas de la fruta, gusanos de la seda, nematodos, hongos como *N. crassa*, *D. discoideum* y plantas como *A. thaliana*, tabaco, arroz, sorgo, entre otros (Sander y Joung 2014). Además, la generación de múltiples escisiones bicatenarias puntuales en una o varias secuencias también fue demostrado en células humanas y otros organismos (multiplexado) (Cong et al. 2013). Con lo anterior, esta tecnología ha sido modificada y adaptada para múltiples aplicaciones, incluyendo: inactivación de genes (knock-out), sustitución de genes (knock-in), deleciones genómicas a gran escala, librerías para cribado de genes, ingeniería genética de organismos completos y terapia génica, entre otras (Baliou et al. 2018; Naert y Vleminckx 2018; Canver et al. 2014; Sha et al. 2014; Cheng et al. 2013; Xie y Yang 2013). Además, el uso de variantes como las nickasas para aumentar la ocurrencia de la RH durante la reparación de escisiones y las formas inactivas de

Cas9 para la inhibición transcripcional en forma análoga a la RNAi (CRISPRi), también son alternativas que se han integrado al amplio repertorio de herramientas desarrolladas en torno a este sistema (Boettcher y McManus 2015). Cabe mencionar, que hasta la fecha siguen siendo estudiadas otras variantes de los sistemas CRISPR y que por sus características, han sido optimizados para su aplicación en diferentes metodologías. Por ejemplo, la enzima Cpf1 de los sistemas tipo II de *Prevotella* y *Francisella*, que actúa constitutivamente sin la necesidad de un tracrRNA, genera cortes escalonados que favorecen significativamente la RH y utiliza otros PAM para el reconocimiento (Moon et al. 2018). Sin embargo, hasta el momento el sistema CRISPR-Cas9 de *S. pyogenes* sigue siendo el formato más estudiado y optimizado para su aplicación en la edición genómica dirigida de organismos eucariontes (Figuras 3 y 4).

CRISPR-Cas vs otros sistemas de edición genómica dirigida

Debido al refinamiento y precisión para dirigir modificaciones a secuencias específicas, el sistema CRISPR-Cas se ha convertido en una gran alternativa a los métodos clásicos para la modulación de la expresión genética, incluyendo la edición genómica dirigida. Como se ha revisado previamente, estas tecnologías presentan ventajas y limitaciones inherentes a cada método; sin embargo, la elección de alguna tecnología en particular dependerá del objetivo y diseño experimental utilizado (Boettcher y McManus 2015). En comparación con otros sistemas como las ZFN o las TALEN, que requieren la optimización de proteínas para estandarizar una sola escisión bicatenaria específica; la síntesis de sgRNA en forma de oligonucleótidos permite generar modificaciones de forma relativamente sencilla y económica (Boettcher y McManus 2015). Además, a diferencia del carácter individual de las escisiones realizadas por estas nucleasas, el sistema CRISPR-Cas permite la modificación de múltiples loci mediante la introducción de una cantidad casi ilimitada de sgRNA (“multiplexado”) (Kim 2016). Por otro lado, este sistema también ha empezado a desplazar el uso de otras tecnologías como la RNAi como alternativas para la modulación parcial de la expresión genética. En este sentido, la principal diferencia al comparar RNAi respecto a la edición mediada por CRISPR-Cas, es el carácter permanente y con patrones de herencia Mendeliana en las modificaciones realizadas. Asimismo, por la naturaleza genómica

de los cambios, los genotipos generados pueden ser del tipo nulo (knock-out), mientras que aquellos generados por la RNAi siempre serán de carácter inhibitorio (knock-down). En este orden de ideas, estudios recientes utilizando librerías tanto de sgRNA como de siRNA/shRNA, han demostrado que el sistema CRISPR-Cas es una alternativa más eficiente para la detección de genes esenciales en líneas celulares humanas en comparación con la RNAi (Housden y Perrimon 2016; Morgens et al. 2016). Finalmente, otro trabajo demostró que aunque la eficiencia de ambos sistemas es comparable, la especificidad de los cambios es superior para el sistema CRISPR-Cas, lo que se traduce en una menor susceptibilidad al registro de falsos positivos por la introducción de efectos inespecíficos (Smith et al. 2017). En este sentido, mediante la utilización de ambos sistemas para el estudio de un gen asociado a la formación de diferentes tumores, se demostró la inexactitud de la creencia popular sobre el uso de múltiples shRNA para abatir dichos efectos inespecíficos. Lo anterior, ya que la existencia de una correlación entre el grado de inhibición y el fenotipo biológico observado, no es ninguna evidencia sobre la ausencia de efectos inespecíficos derivados de la RNAi (Peretz et al. 2018). Por el contrario, solo implica la asociación de un fenotipo específico para cada siRNA/shRNA utilizado y las observaciones son una posible suma de los efectos de la inhibición del blanco deseado, así como la de otros mRNA de forma inespecífica. Es importante mencionar, que diferentes estudios también han demostrado que el sistema CRISPR-Cas9 es susceptible a realizar cortes inespecíficos y su utilidad es limitada en algunos escenarios donde puedan desencadenarse mecanismos compensatorios al cambio realizado (Peng, Lin y Li 2016; Hsu et al. 2013). Sin embargo, la apertura de posibilidades para realizar comparaciones sobre los efectos de uno y otro sistema, permite dilucidar la presencia de efectos inespecíficos inherentes al estudio de una o varias secuencias mediante estos abordajes metodológicos.

2.2 Hipótesis

Es posible abatir la expresión de TSPAN33 en la línea celular Raji mediante la delección parcial del locus genómico, utilizando el sistema CRISPR-Cas9.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Eliminar una región del locus de TSPAN33 en la línea celular Raji y aislar clonas individuales sin la expresión de la proteína.

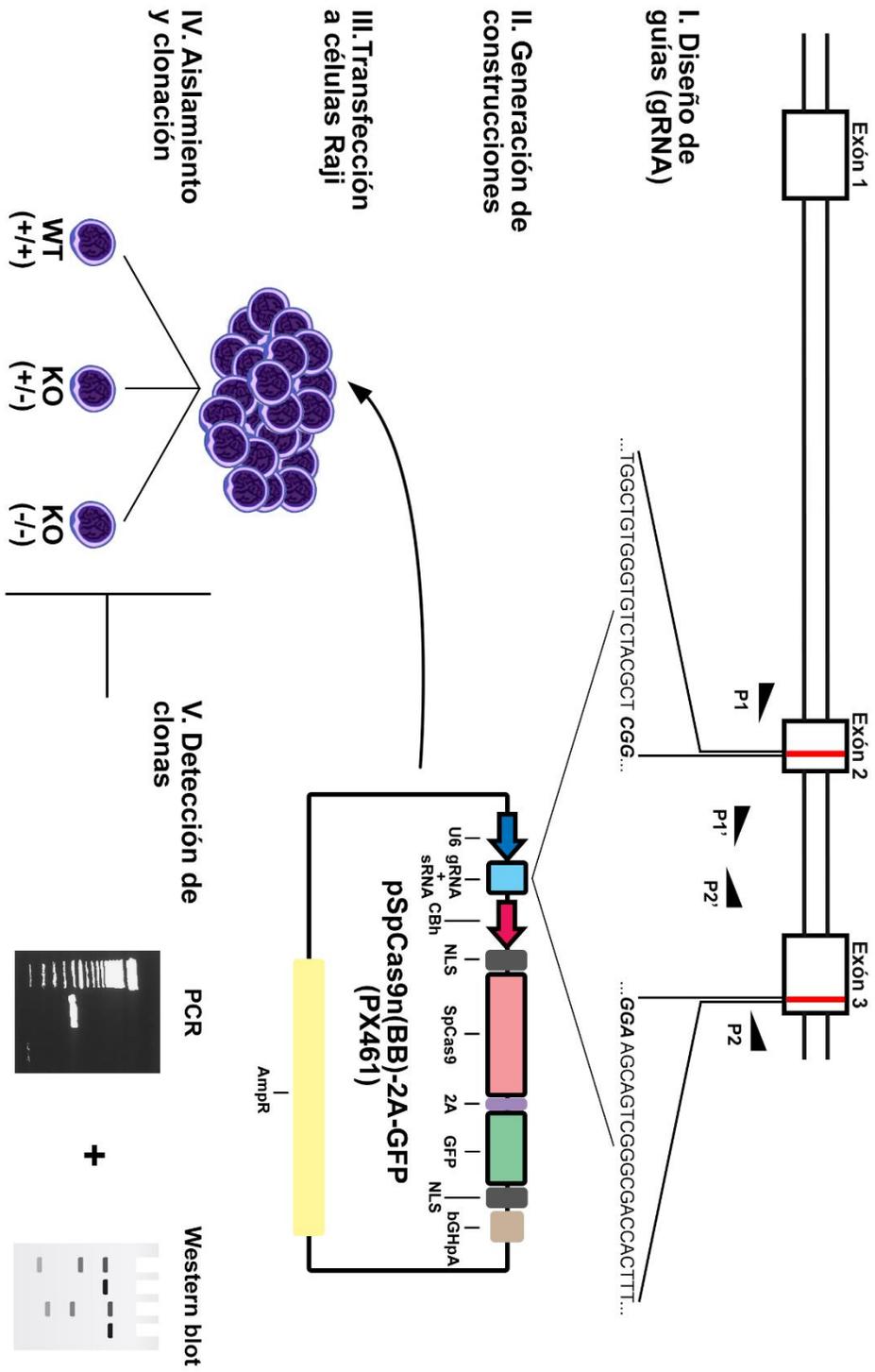
2.3.2 Objetivos específicos

- Diseñar un par de sgRNA de acuerdo a los criterios más recientes y que sean capaces de dirigir modificaciones a todos los transcritos funcionales de TSPAN33.
- Construcción de los sgRNA mediante alineamiento de cebadores y su posterior ligación al vector pSpCas9(BB)-2A-GFP.
- Expansión y clonación de los vectores de edición para su posterior transfección por microporación a células Raji silvestres.
- Aislamiento mediante FACS y genotipificación de delecciones en clonas individuales.
- Fenotipificación de una clona de células Raji sin la expresión de TSPAN33.

CAPÍTULO 2 – MATERIALES Y METODOS

3.1 Esquema general de trabajo

Figura 6. Diagrama esquemático del flujo de trabajo para la edición genómica dirigida con el sistema CRISPR-Cas9 en la línea celular linfoblastoide humana Raji.



3.2 Anticuerpos, medios de cultivo y células

La línea celular humana Raji silvestre fue proporcionada por el laboratorio del Dr. Leopoldo Santos Argumedo, adscrito al Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México. Todos los cultivos celulares fueron mantenidos en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClone®) inactivado, 100U/mL de penicilina G, 100µg/mL de sulfato de estreptomina, 0.3mg/mL de L-Glutamina y 1mM de piruvato de sodio (todos de Gibco®). Los cultivos bacterianos fueron mantenidos en medio Luria-Bertani (Sigma®) sólido y líquido, en algunos casos suplementado con 100µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich®). Los anticuerpos anti TSPAN33 fueron obtenidos de BioLegend® (SA171H2) y AbCam® (ab79130); los anti-Tubulina (C4) de Santa Cruz®.

3.3 Delección de TSPAN33 en humanos

El locus de TSPAN33 se localiza en el cromosoma 7 y presenta un arreglo exón-intrón conservado en vertebrados. Por otro lado, este locus codifica para 4 transcritos distintos, de los cuales tres son formas no-codificantes con funciones desconocidas y solo uno corresponde al mRNA que codifica para la proteína; además, existen cuatro variantes reconocidas del mismo (Figura 7). Para dirigir las escisiones hacia todas las isoformas funcionales de TSPAN33 sin afectar otros transcritos, fueron diseñados sgRNA específicos para los exones 2 y 3 del locus (Figura 8A y 13A; Tabla 3). Estudios previos utilizando este acercamiento han demostrado la ocurrencia de varios escenarios durante el tratamiento con CRISPR-Cas9, incluyendo: deleciones exactas, indels en los sitios de corte individuales e inversiones completas (Figura 8B). Para detectar los cambios derivados del tratamiento con CRISPR-Cas9, fueron diseñados cebadores para PCR que flanquearan el sitio de la delección y otros al interior de la misma (Tabla 2). Por lo tanto, con la aparición/desaparición de los amplicones correspondientes fue posible detectar los tipos de modificaciones realizadas, a excepción de los indels más pequeños (Figura 13D). Sin embargo, el objetivo de este trabajo se centró en la obtención de clones con deleciones completas capaces de inhibir la expresión de TSPAN33.

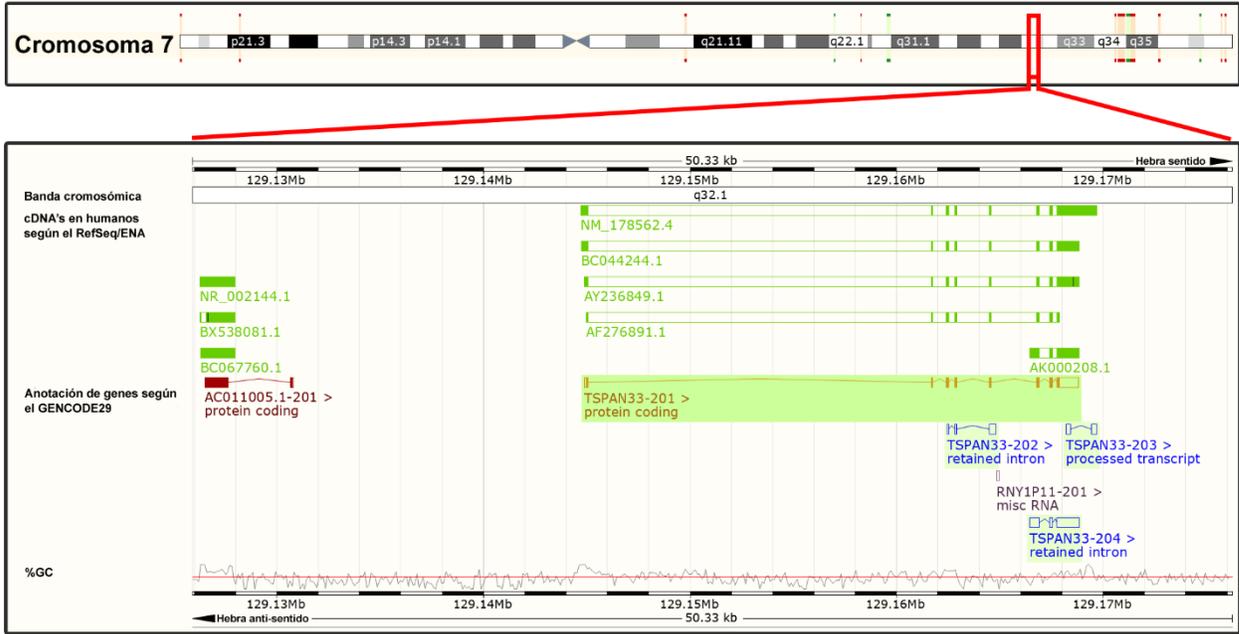
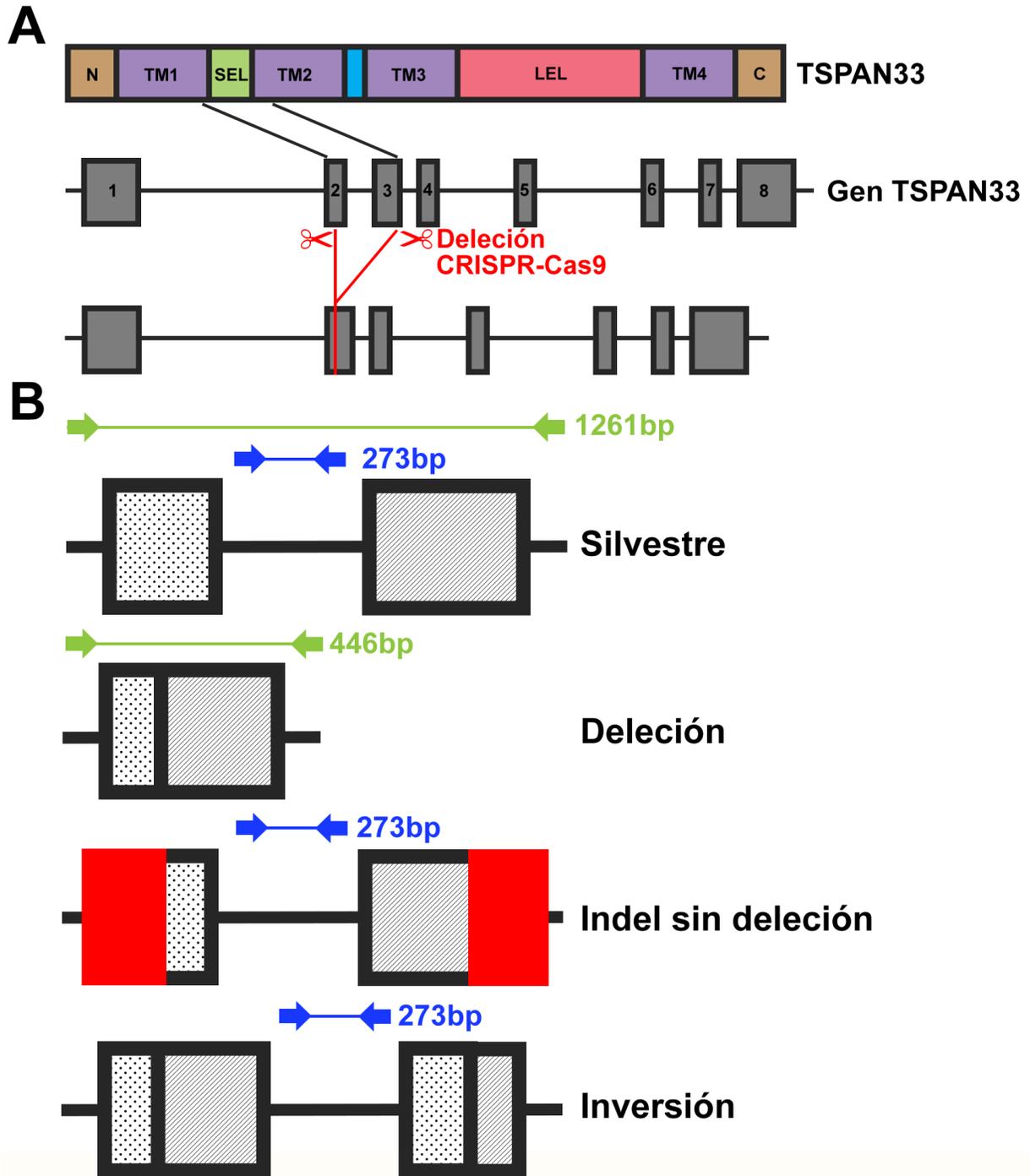


Figura 7. Locus cromosómico de TSPAN33 en humanos. En el panel superior se muestra un esquema representativo del cromosoma 7, con sus diferentes bandas en ambos brazos y se marca la localización exacta de TSPAN33 dentro del recuadro rojo. En el panel inferior se muestra un acercamiento a la región marcada y se muestran: la localización exacta del locus, las diferentes isoformas del mRNA en humanos de acuerdo a la base de datos RefSeq/ENA, la anotación de los genes y transcritos en humanos de acuerdo al GENCODE29, así como el % de GC en la región analizada.



3.3.1 Diseño de sgRNA y construcción de vectores

Para la edición fue utilizado el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP, el cual codifica una forma optimizada de la Cas9 de *S. pyogenes* bajo el promotor CBh. Además, se encuentra unida a la proteína verde fluorescente (GFP) mediante un péptido “auto escindible” (2A); esta funcionará como reportero de expresión del cassette génico. El diseño de los sgRNA fue realizado introduciendo las secuencias putativas de los exones 2 y 3 de TSPAN33 (transcrito: ENST00000486685.2) en la herramienta para la identificación de sitios no repetidos CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). En los ajustes, fue seleccionado el ensamble del genoma humano más reciente y la búsqueda de proto-espaciadores del tipo “NGG”. De la lista de sgRNA candidato fueron seleccionadas las secuencias “TGGCTGTGGGTGTCTACGCT-CGG” localizadas en el exón 2 y “GAGGCAGATGTTCTCGCGGA-GGG” en el exón 3.

Para la generación y ligación de los sgRNA al vector, fue solicitada la síntesis de oligonucleótidos según las secuencias anteriores, así como su forma antiparalela correspondiente (Figura 9; Tabla 3). *Es importante señalar, que debe omitirse la introducción del proto-espaciador NGG*; además, fue incluido el sitio de restricción para la enzima BbsI en el extremo 5' de cada oligonucleótido. Posteriormente, se realizó el alineamiento de los oligonucleótidos por rampa de temperatura al someter una mezcla equimolar (100mM) de cada oligonucleótido a un ciclo de 95°C por 5min y un posterior descenso hasta los 25°C a un ritmo de 5°C/min. De forma paralela, se realizó una digestión enzimática al vector pSpCas9n(BB)-2A-GFP con la enzima BbsI de acuerdo a las condiciones descritas en la siguiente sección. El producto fue separado por electroforénesis en gel de agarosa y purificado a partir de la banda observada siguiendo el protocolo del QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen®). Posteriormente, tanto los sgRNA en forma de dúplex (2µL de una dilución 1:200) y el vector previamente digerido (100ng) fueron sometidos a una reacción de ligación con la enzima T4 ADN ligasa (Thermo®), aplicando las condiciones indicadas por el fabricante. Finalmente, el producto de la ligación fue transformado a bacterias competentes siguiendo el protocolo descrito en la siguiente sección.

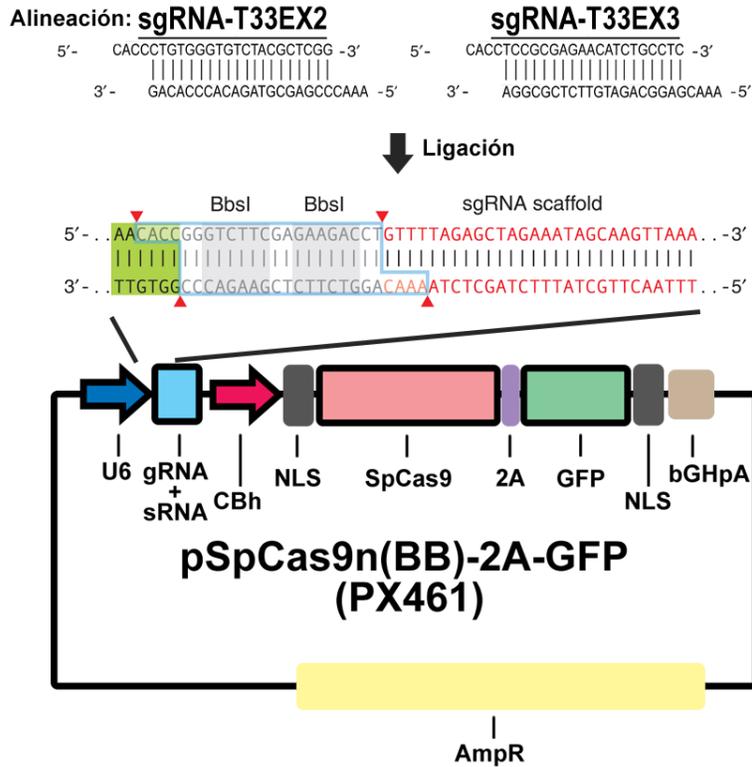


Figura 9. Esquema de ligación al vector pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461). En la parte superior se muestran la forma alineada de los sgRNA diseñados de acuerdo a las secuencias obtenidas e incluyendo el sitio de restricción para BbsI en el extremo 5'. En la parte inferior se muestra un diagrama representativo del vector y un acercamiento al sitio de clonación en el que se introdujeron los sgRNA. Además, en color rojo se indica la secuencia conservada del sgRNA que funciona como andamio para la unión de Cas9, así como, la localización de los diferentes elementos del vector, incluyendo: el promotor U6 para el sgRNA, el promotor CBh para Cas9, las señales de localización a núcleo (NLS), la enzima SpCas9, el péptido auto escindible 2A, el reportero GFP, la señal de poly-adenilación y un cassette de resistencia a ampicilina (AmpR) para expansión en vehículos bacterianos.

3.3.2 Clonación de construcciones

Los vectores fueron transformados por choque de temperatura en células competentes *E. coli* OneShot TOP10 (Invitrogen®). Para esto, 50-100ng de ADN fueron agregados a alícuotas de 50µL de bacterias competentes recién descongeladas, se mezclaron delicadamente e incubaron en hielo por 30m. Al término, fue realizado un choque térmico de 30 segundos a 42°C, sin agitación e incubando en hielo nuevamente por 5m. Después, fueron agregados 950µL de caldo LB e incubaron a 37°C con agitación por 1h. Las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 13,500rpm por 2m, resuspendidas en 100µL de caldo y el volumen total fue inoculado en cajas de Petri con medio LB-agar suplementado con ampicilina a 150µg/mL y fueron incubadas a 37°C por 16h.

Cinco colonias de transformantes positivos fueron seleccionadas, inoculadas en 5mL de caldo LB suplementado con ampicilina e incubadas a 37°C con agitación por 18h. Posteriormente, el ADN plasmídico de estos cultivos fue extraído siguiendo el protocolo descrito para el AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen®). Las muestras obtenidas fueron sometidas a un análisis con enzimas de restricción para comprobar la identificación del plásmido de interés. Para la expansión final, una de las colonias con un patrón de restricción correcto fue seleccionada, inoculada en 150mL de caldo LB con antibiótico e incubada a 37°C por 24h. Posteriormente, el ADN plasmídico se extrajo del cultivo siguiendo el protocolo descrito para el AxyPrep Plasmid Midiprep Kit (Axygen®). Todas las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría UV con el equipo NanoDrop (Thermo Scientific®).

3.3.3 Comprobación de construcciones por secuenciación y restricción de ADN

Para comprobar la integridad de los plásmidos obtenidos en los pasos anteriores fue llevado a cabo una digestión con las endonucleasas de restricción SmaI y NotI (ambas de New England Biolabs®). Las reacciones fueron preparadas con 2µL de amortiguador comercial NEBuffer 10X suplementado con albúmina sérica bovina (específico para cada enzima), 5U de cada enzima, 1µg de ADN plasmídico y agua inyectable en un volumen total de 20µL. La digestión fue realizada incubando a 37 °C por 90m y las enzimas inactivadas a 60°C por 20 m. La selección de los buffers se realizó de acuerdo a la herramienta Double Digest Finder (New England Biolabs®, <http://66.155.211.155/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>). Todas las muestras de ADN fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE (Tris 40mM, ácido acético glacial 20mM, EDTA 1mM y pH 8.3). Las condiciones de separación fueron de 75V por 45m. Los geles fueron teñidos con 0.5µg/mL del colorante comercial SYBR Safe (Thermo®) y observados en un fotodocumentador Chemidoc MP (Bio-Rad®).

3.4 Transfección y aislamiento de clones individuales

El vector purificado en los pasos anteriores fue transfectado por electroporación a células Raji silvestres usando el sistema de transfección Neon (Thermo Scientific®). Para lo anterior, células de un cultivo de alta densidad fueron colectadas por

centrifugación a 1500rpm por 5m y resuspendidas en 1mL de PBS estéril, para conteo en hematocitómetro y determinación de viabilidad con el colorante azul de tripano al 10%. Alícuotas de 2.5×10^5 células viables fueron resuspendidas en 10 μ L de amortiguador “E” para electroporación frío y mezcladas con 1 μ g de una mezcla equimolar de ambas construcciones. Enseguida, las células fueron electroporadas bajo diferentes condiciones de voltaje, tiempo y número de pulsos. Se permitió la recuperación y expresión de las construcciones incubando por 48h en RPMI1640 suplementado con 20% de SFB y *sin antibióticos*. Transcurrido ese periodo, las células GFP+ fueron aisladas clonalmente con un separador celular activado por fluorescencia FACS Aria (Becton Dickinson®) en cajas de 96 pozos con 200 μ L de medio de cultivo suplementado y permitiendo su proliferación final durante 20 días antes de ser expandidas en volúmenes superiores para su tipificación.

3.5 Genotipificación mediante PCR genómico

Para poder comprobar la efectividad del corte, cebadores flanqueando regiones al exterior y al interior de los sitios de corte fueron diseñados para su análisis por PCR (Tabla 2). Mediante este acercamiento, fue posible la detección de varias combinaciones de amplicones y así caracterizar la presencia de cambios derivados del tratamiento con los vectores (Figura 13D). Inicialmente, el material genético de 1×10^6 células Raji silvestres tratadas o no con los vectores fue extraído utilizando el amortiguador comercial DNAzol (Invitrogen®), siguiendo los protocolos del fabricante y resuspendiendo en un volumen adecuado de agua libre de nucleasas. La integridad de las muestras fue corroborada mediante electroforésis en gel de agarosa al 0.75% y utilizando las mismas condiciones de separación descritas previamente. Las reacciones de PCR fueron preparadas con los cebadores indicados (100 μ M) y el ADN genómico (50 η g) extraído como templado. La concentración del resto de los componentes (amortiguador, dNTP's, MgCl₂) fue utilizada de acuerdo a las indicaciones del fabricante, para la enzima recombinante Taq polimerasa (Thermo®). Los ciclos de temperatura del termociclador fueron definidos de acuerdo a protocolos estándar para desnaturalización a 95°C, amplificación a 72°C, considerando una polimerización de 1kb/min e incluyendo una temperatura fija de 60.5°C o un gradiente de 58 - 61°C durante el alineamiento de los cebadores (Figura 13B).

Tabla 2. Secuencia y propiedades físicas de los cebadores utilizados para la detección de cambios en el locus de TSPAN33.

<i>Amplicon ΔT33(-)</i>						
	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Tm	GC%	Auto-comp.	Auto-comp 3'
<i>Sentido</i>	GCAGAGAGTCATCAAGGGCT	20	59.46	55	3	2
<i>Antisentido</i>	GTTAAGGGGAGGCAGTACCC	20	59.48	50	4	0
<i>Amplicon ΔT33(+)</i>						
	Secuencia 5'-3'	Tamaño	Tm	GC%	Auto-comp.	Auto-comp 3'
<i>Sentido</i>	GGGGAGGTGAAAAGATGCTCA	20	59.38	55	3	2
<i>Antisentido</i>	GTCTAGGACCACTCATGGCA	20	58.8	55	4	3

3.6 Tinciones por inmunofluorescencia para citometría de flujo

Las tinciones para citometría de flujo fueron realizadas con anticuerpos específicos contra TSPAN33 y en general, células Raji en suspensión (min. 1×10^6 células) fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en PBS y fijadas con paraformaldehído al 4%. En algunos casos, las membranas celulares fueron permeabilizadas incubando las células por 5m en 1mL de Tritón X-100 al 0.1% en PBS y un lavado posterior. Enseguida, las células fueron incubadas en hielo por 20m con los anticuerpos anotados previamente y utilizando las cantidades recomendadas por el fabricante. Adicionalmente, fue realizada una segunda incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado al fluorocromo TRITC. Por último, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en tubos de poliestireno para su posterior análisis con el citómetro de flujo Accuri C6 (BD®).

3.7 Detección de proteínas por Western blot

No menos de 1×10^6 células fueron colectadas y lisadas incubando por 30m a 4°C en amortiguador para ensayos de radio inmunoprecipitación (RIPA), adicionado con Tritón-X100 al 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche®). Enseguida, fue realizado un aclarado por centrifugación a 14,000rpm. Las concentraciones proteicas de los sobrenadantes obtenidos fueron cuantificadas mediante la técnica colorimétrica de Biuret modificada con ácido bicinconínico, utilizando el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo®). Para determinar la presencia de moléculas específicas en estas fracciones, cantidades iguales de proteína fueron separadas en geles de poliacrilamida al 4% (SDS-PAGE) (Invitrogen®) y las condiciones utilizadas fueron 4h y 100V. Para la

electro-transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad®) se aplicaron 100V durante 1h. Las membranas anteriores fueron bloqueadas durante 2h en amortiguador PBS suplementado con detergente Tween20 al 0.1% (v/v) y albumina sérica bovina (Sigma®) al 1% (p/v). Posteriormente, fueron incubadas con diluciones 1:1000 de los anticuerpos descritos en la sección anterior por 18h a 4°C y agitación orbital constante. Terminado el tiempo, fueron realizados varios lavados extensivos con el amortiguador PBS-Tween. Enseguida, las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón unidos a HRP y lavadas nuevamente, para su revelado con el SuperSignal West Femto Substrate Kit (Thermo®) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las membranas fueron analizadas con un Chemidoc MP (Bio-Rad®).

3.8 Estimación de frecuencias de delección y equilibrio Hardy-Weinberg

Para estimar las frecuencias de delección en función del tamaño de las modificaciones [$f(x)$], fue aplicada la regresión no-lineal siguiente:

$$\text{Formula 1: } f(x) = k1 + k2(x)^{k3}$$

Donde (x), es el tamaño de la delección que se planea realizar y $k1/ k2/ k3$ representan constantes experimentales determinadas con anterioridad y tienen valores de: -2.84, 41.41 y 0.36 respectivamente (Canver et al. 2014).

El principio Hardy-Weinberg es una de las herramientas más importantes y útiles en la genética de poblaciones particularmente, para la determinación de cambios en frecuencias para alelos específicos, en poblaciones finitas, con o sin algún tipo de presión de selección [ej. determinación de genotipos en poblaciones afectadas por anemia falciforme y malaria; (Taiwo, Oloyede y Dosumu 2011)]. En este sentido, la introducción de una delección en el locus de TSPAN33 conlleva a la generación de un alelo alternativo (Δ TSPAN33) con distribución mendeliana después de n generaciones de duplicación celular. Siguiendo este orden de ideas, para este caso la frecuencia con que ocurra una delección o cambio será igual a la frecuencia alélica de Δ TSPAN33. Por lo tanto, para un locus bialélico sencillo compuesto de alelos TSPAN33 silvestres como “A” y alelos Δ TSPAN33 como “a”, podrán existir tres posibles genotipos: AA, Aa y aa.

Las frecuencias alélicas de una población son representadas tradicionalmente con los símbolos $p=A$ y $q=a$. De la misma forma, se asume que la suma de las frecuencias alélicas para un locus con n número de alelos representarán el total del pool genético de dicho locus en una población finita. Por lo tanto, para un locus bialélico con los alelos p y q respectivamente:

$$\text{Formula 2: } p + q = 1$$

Por consiguiente, en base a la frecuencia de alelo determinada con la Formula 1 es posible definir el valor de q ($\Delta TSPAN33$) y a partir de la Formula 2, obtener el valor de p ($TSPAN33$; $p=1-q$). De acuerdo al principio Hardy-Weinberg, para un locus bialélico dentro de una población finita y en ausencia de presiones de selección, las frecuencias genotípicas generadas por los alelos $p+q$ serán estables en el tiempo y determinadas por la ecuación cuadrática siguiente:

$$\text{Formula 3: } p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

La representación gráfica de las frecuencias genotípicas respecto a las frecuencias alélicas de p y q , se muestran a continuación (Figura 10):

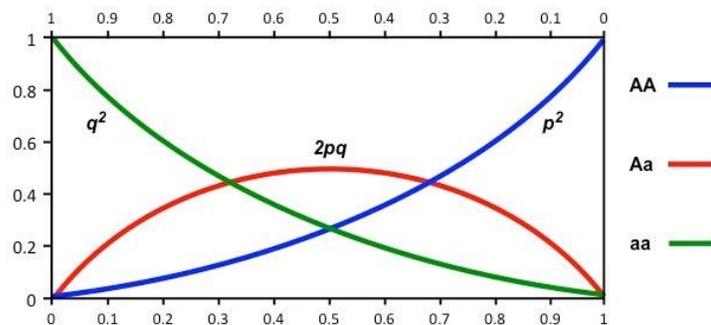


Figura 10. Distribución de frecuencias genotípicas en una población en equilibrio Hardy-Weinberg. En el eje vertical se muestra la distribución de las frecuencias genotípicas correspondientes para cada uno los genotipos AA (azul), Aa (rojo) y aa (verde) en una población que cumple todos los criterios del equilibrio Hardy-Weinberg. En los ejes se muestran las frecuencias para cada genotipo.

3.9 Análisis estadísticos

Para evaluar diferencias significativas entre grupos de datos, fueron realizadas pruebas de análisis de variancia con diseños completamente aleatorizados y una ANOVA de dos vías. Se consideró una diferencia significativa a partir de valores de $p < 0.05$. Los valores, número de repeticiones, así como el número de células (n)

utilizadas en cada análisis se mencionan en los pies de figura. Los resultados están presentados como la media +/- la desviación estándar.

Para analizar diferencias significativas entre la distribución de frecuencias genotípicas observadas y las obtenidas en los experimentos, fue realizada una prueba de bondad de ajuste a la distribución de χ^2 para los equilibrios obtenidos. Se consideró una diferencia significativa, si los valores de χ^2 calculados eran superiores a los reportados en tablas para una $p < 0.05$.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Diseño de sgRNA para TSPAN33

El objetivo principal de este trabajo fue la edición genómica del ORF que codifica para TSPAN33 en la línea celular linfoblastoide Raji. Dos sgRNA dirigidos a los exones 2 y 3 del gen en cuestión fueron diseñados y las secuencias seleccionadas de acuerdo a criterios optimizados para minimizar la inespecificidad y maximizar la actividad del sistema en líneas celulares humanas. Para esto, se utilizó la herramienta digital CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) en la que se integran diferentes algoritmos para la evaluación de ambos parámetros en los sgRNA candidatos (Haeussler et al. 2016). Al introducir las secuencias putativas de los exones 2 (58bp) y 3 (128bp) de TSPAN33 (transcrito: ENST00000486685.2) se obtuvieron 4 y 21 secuencias de sgRNA candidatos para cada exón respectivamente. En base a las propiedades calculadas para cada sgRNA, fue seleccionada una secuencia candidato para cada exón y se sintetizó cada una de ellas en forma de oligonucleótidos antiparalelos con su respectivo sitio de restricción (Tabla 3). Además, todos los blancos inespecíficos de cada guía fueron revisados, encontrando que ninguna de las dos guías presentaba inespecificidad por sitios con un nucleótido desapareado y solo en el caso del sgRNA-T33EX2 se detectaron 3 blancos con dos nucleótidos desapareados. Cabe señalar, que ninguno de estos blancos inespecíficos supone algún elemento esencial para la viabilidad y/o proliferación celular, siendo en su mayoría secuencias no codificantes.

Tabla 3. Propiedades de especificidad y actividad de las secuencias utilizadas como sgRNA para la edición de TSPAN33.

Exón	Secuencia homóloga	Índice de especificidad	# Loci Inespecíficos	Inespecíficos 0-1-2-3-4	Índice de delección p/micro homología	Índice de efectividad
2	TGGCTGTGGGTGTCTACGCT <u>CGG</u>	87	128	0-0-3-8-117	5-65pb	54
3	GAGGCAGATGTTCTCGCGGA <u>GGG</u>	90	78	0-0-0-17-61	4-71pb	59

Exón, número de exón en el locus de TSPAN33 al que se dirige el sgRNA; **Secuencia homóloga**, secuencia nucleotídica en sentido 5'-3' homóloga a la secuencia del locus; **Índice de especificidad**, calculo teórico de la especificidad del sgRNA de acuerdo a un algoritmo base por base (Hsu et al. 2013); **# Loci Inespecíficos**, número de blancos inespecíficos con desapareo de 0 hasta 4 nucleótidos; **Inespecíficos 0-1-2-3-4**, número de blancos inespecíficos de acuerdo a 0-1-2-3-4 nucleótidos desapareados; **Índice de delección por micro homología**, tamaño estimado de los indels por micro homología en los sitios de corte (Bae et al. 2014); **Índice de efectividad**, calculo teórico de la actividad del sgRNA de acuerdo a dos algoritmos base por base (Doench et al. 2016, 2014).

4.1.2 Construcción de vectores pSpCas9(BB)-2A-GFP: TSPAN33

Los sgRNA fueron alineados y ligados al vector pSpCas9(BB)-2A-GFP siguiendo un protocolo publicado previamente (Ran et al. 2013). Dichas construcciones fueron expandidas en una cepa comercial de bacterias competentes y sometidas a selección positiva por resistencia a ampicilina. Se obtuvo una eficiencia de transformación de 124UFC/ μg_{ADN} para el sgRNA-T33EX2 y 386UFC/ μg_{ADN} para el sgRNA-T33EX3 (Figura 11A). Como control positivo se transformó al vector vacío y como control negativo el vector digerido. Para validar la introducción de las construcciones en el vehículo bacteriano, cinco colonias positivas de cada vector fueron expandidas y el ADN plasmídico extraído por lisis alcalina para ser probado mediante digestión paralela con las enzimas de restricción NotI y SacI. Las construcciones presentan uno y dos sitios de restricción para cada enzima respectivamente. Posteriormente, un mutante por cada construcción fue seleccionado, expandido en cultivo a una escala adecuada para ensayos de transfección (1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y la inserción de la secuencia corroborada mediante secuenciación Sanger (Figura 11B/C).

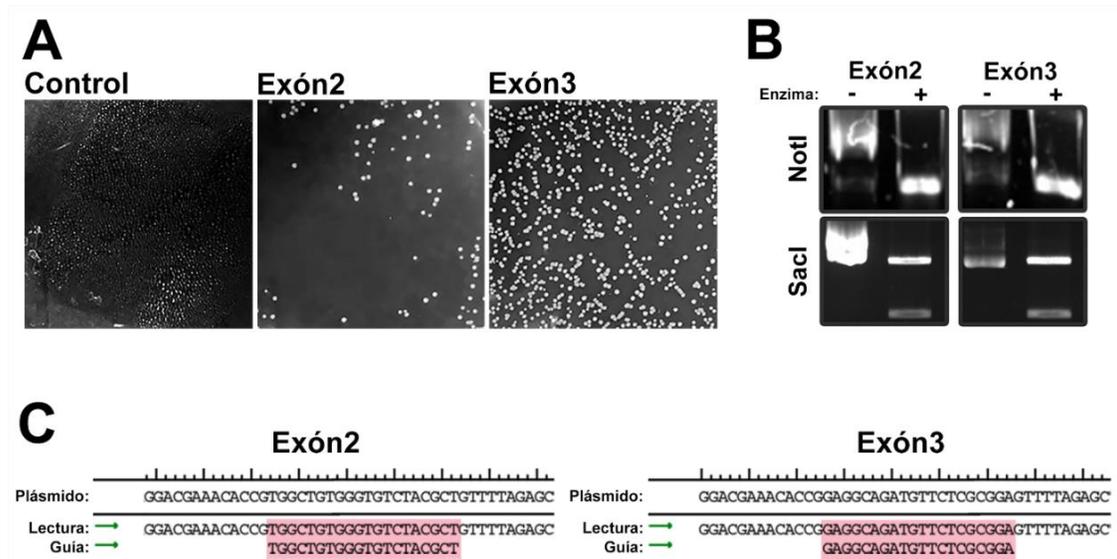


Figura 11. Construcción de vectores pSpCas9(BB)-2A-GFP dirigidos al locus de TSPAN33. A) Sección macroscópica del cultivo de transformantes en placas con agar LB-kanamicina. Control, células transformadas con los productos de digestión del vector pSpCas9(BB)-2A-GFP tratado con la enzima NotI; Exón2, mutantes transformados con la construcción T33EX2; Exón 3, mutantes transformados con la construcción T33EX3. B) Digestión enzimática de las construcciones con las enzimas NotI y SacI. Columna (+), vectores tratados con la enzima correspondiente; columna (-), vectores sin tratar. C) Secuenciación Sanger de las construcciones. Plásmido, secuencia esperada según diseño *in-silico*; lectura, secuencia obtenida; guía, secuencia del sgRNA deseado. Únicamente se muestran las secuencias de la hebra 5'-3'.

4.1.3 Microporación celular

Para la introducción de las construcciones en la línea celular Raji fue elegido un método de electroporación optimizado para la obtención altas eficiencias de transfección en volúmenes pequeños y con bajos niveles de citotoxicidad (Figura 12A; Brees y Fransen, 2014). El procedimiento de microporación fue estandarizado probando las condiciones recomendadas por el fabricante para esta línea celular y dos variantes de la misma. Al evaluar la eficiencia de transfección detectando la fluorescencia de GFP por citometría de flujo, se encontró que, una disminución directa del voltaje no promueve la adquisición y/o expresión del vector (Figura 12B). Sin embargo, un aumento en el número de pulsos (2), acompañado de una disminución del tiempo, puede aumentar la eficiencia de transfección de forma significativa respecto a las condiciones recomendadas por el fabricante para esta línea celular (Figura 12C).

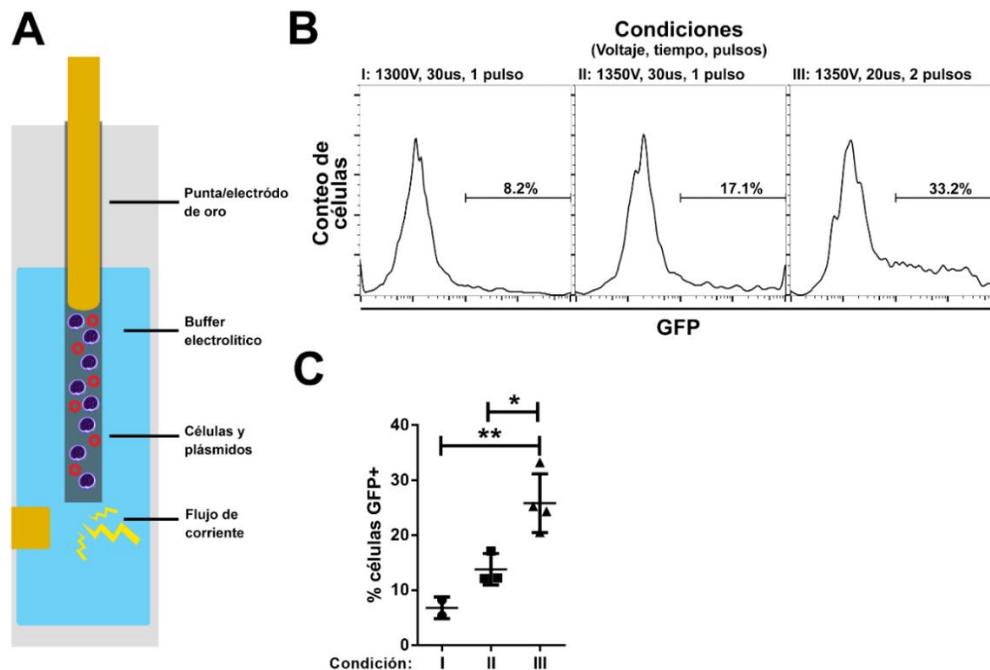


Figura 12. Microporación de células Raji. A) Diagrama esquemático del proceso de electroporación modificada en el equipo Neon[®] (Thermo Scientific[®]). B) Eficiencia de transfección en células Raji transfectadas con una mezcla 1:1 de ambas construcciones pSpCas9(BB)-2A-GFP, evaluada mediante la fluorescencia de GFP por citometría de flujo. C) Comparación estadística de las eficiencias de transfección (media +/- s.d.) en las diferentes condiciones utilizadas. N=2 - 4 repeticiones por condición; *p < 0.05, **p < 0.01.

4.1.4 PCR genómico para detección de deleciones

Para corroborar la deleción del segmento deseado, la región de interés fue amplificada por PCR utilizando cebadores apropiados, el primero flanqueando la región eliminada ($\Delta T33(+)$, control positivo) y el segundo una sección al interior de la misma ($\Delta T33(-)$, control negativo) (Figura 13A). De esta forma, fue posible identificar aquellas clonas en las que efectivamente se eliminó la región deseada de forma hetero- u homocigótica. Primero, la técnica de extracción de ADN fue estandarizada analizando la integridad del material genómico mediante electroforesis en gel de agarosa, observando bandas de peso y densidad similares sin importar el tratamiento (Figura 13C). Enseguida, las condiciones de PCR fueron optimizadas a partir del ADN genómico extraído de células silvestres y aquellas tratadas con los vectores previo al aislamiento clonal. La PCR fue estandarizada aplicando un gradiente de temperatura, los cebadores indicados anteriormente y el ADN de ambos tratamientos como templado (Figura 13B).

En el caso de los cebadores $\Delta T33(+)$, fue posible detectar el producto esperado con un peso aproximado de 1500 pb en las células silvestres. De forma interesante, en las células tratadas con los vectores, fue posible observar bandas de aproximadamente 450 – 550pb, correspondientes al fragmento editado (446pb). Sin embargo, al utilizar una T_m de 58 o 59°C también fue posible detectar varios productos inespecíficos de 100 – 500pb en ambos tratamientos. Con la excepción de un producto de 100pb, la amplificación de los productos inespecíficos disminuyó al aumentar la temperatura (Figura 13D). En el caso de los cebadores $\Delta T33(-)$, fue posible detectar un producto de aproximadamente 300pb en todas las temperaturas y ambos tratamientos. En base a los resultados obtenidos, la T_m se fijó en 60.5°C para el resto de las amplificaciones de este tipo.

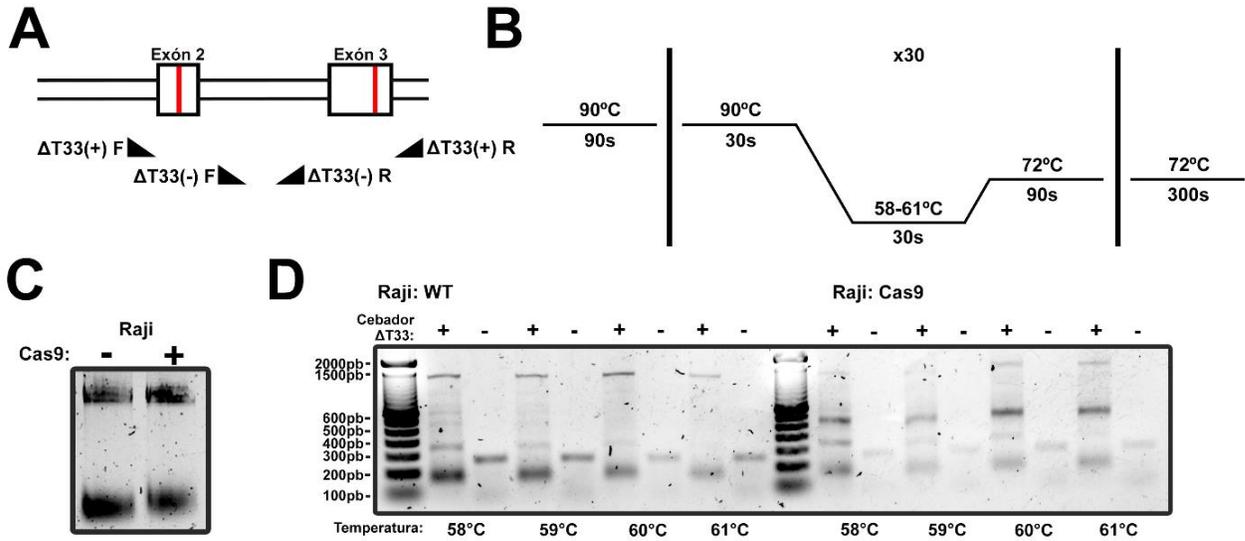


Figura 13. Estandarización del análisis molecular de la región genómica editada. A) Estrategia de amplificación de la región genómica por PCR. Las líneas rojas marcan los sitios de corte de los sgRNA diseñados y los triángulos indican las posiciones relativas de los cebadores utilizados en la amplificación. B) Condiciones utilizadas para la amplificación con gradiente de temperatura. C) Muestras de ADN genómico extraído de células tratadas y sin tratar con los vectores de edición genómica. D) Productos de PCR obtenidos utilizando los cebadores y condiciones descritas para amplificar la región genómica en células con (derecha) o sin el tratamiento (izquierda).

4.1.5 Estimación de deleciones y genotipos para el aislamiento de clonas

Según estudios realizados con una librería de sgRNA capaz de generar múltiples deleciones, existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño y la frecuencia de la misma (Canver et al. 2014). De acuerdo con estos datos y la ecuación descrita, las eficiencias esperadas para deleciones de 100 – 2000bp fueron evaluadas, encontrando que la eficiencia esperada para una deleción de 815bp en el locus de TSPAN33 es de 42.03% (Figura 14A). De acuerdo a este escenario ideal y siguiendo el principio de distribuciones alélicas para una población en equilibrio Hardy-Weinberg, fue posible estimar el número mínimo de individuos (n=8) que deben aislarse para observar al menos 1 mutante con un genotipo homocigoto (TSPAN33^{-/-}) (Figura 14B/C).

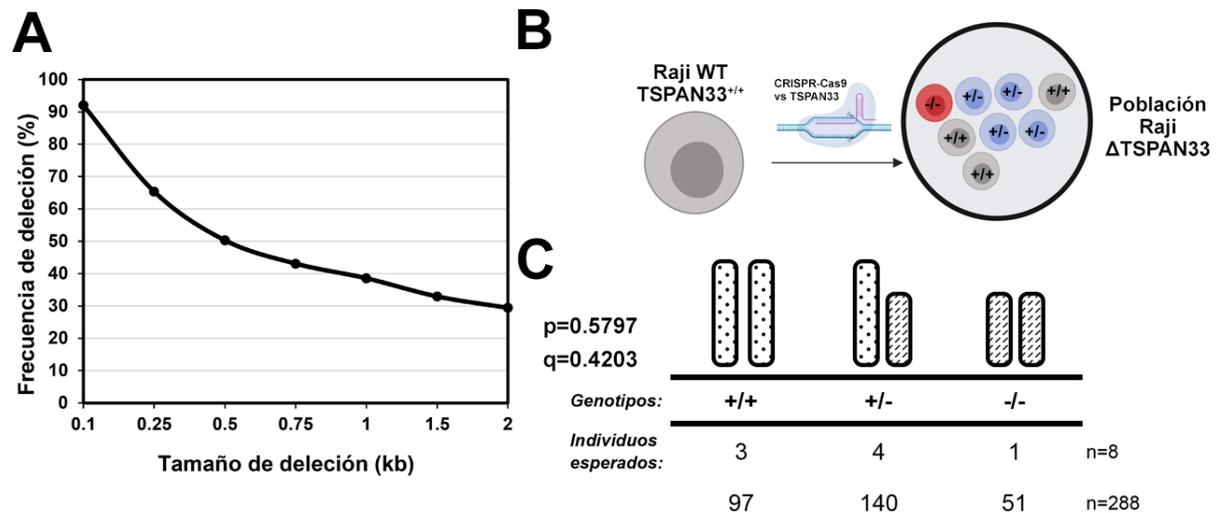


Figura 14. Frecuencia de deleciones y estimación de genotipos esperados. A, La frecuencia de las deleciones genómicas dependen inversamente del tamaño de la misma. Evaluación de la frecuencia de deleción esperada en deleciones 0.1 a 2.0kb de acuerdo a la función no lineal descrita en materiales y métodos. B, Diagrama representativo sobre la generación de genotipos por deleciones genómicas en células Raji. C, Estimación de individuos con diferentes genotipos de acuerdo al equilibrio Hardy-Weinberg. Asumiendo que la frecuencia de deleción estimada es igual a la frecuencia alélica de ΔTSPAN33 (q=0.4203 en deleciones de 0.8kb), se estimó el número aproximado de genotipos observables en poblaciones de 8 y 288 individuos según la ecuación cuadrática descrita en materiales y métodos.

4.1.6 Aislamiento de clones individuales y genotipificación por PCR

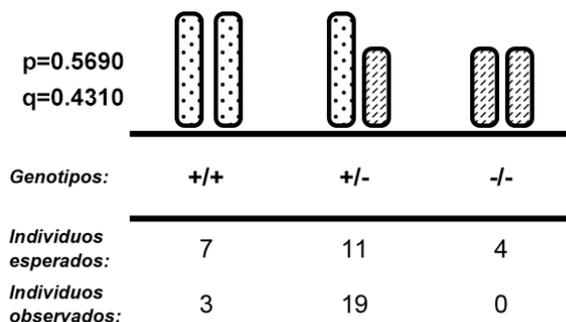
El aislamiento de clones individuales fue realizado de forma automatizada con un FACS y partiendo de un cultivo celular previamente transfectado. Fueron realizados 3 aislamientos de 96 clones cada uno (285 total), de las cuales, 20 días después fueron recuperadas 22 clones viables, es decir, un 8% de supervivencia promedio (Tabla 4). Las clones aisladas fueron tipificadas mediante la PCR descrita, pudiendo identificar genotipos particulares en 19 de las 22 clones (Figura 15). En el caso de los cebadores $\Delta T33(+)$ fue posible observar patrones de bandeo diferentes según la clona analizada, mostrando deleciones de entre 100 – 800pb en al menos uno de los alelos, siendo $\Delta T33-005$ la clona con la deleción más grande (región, Deleción (+)). En todos los casos fue posible detectar la presencia del amplicon $\Delta T33(-)$, implicando la presencia de alelos sin deleciones completas (región, Deleción (-)). Según los genotipos observados, se obtuvieron: 3 clones sin deleciones detectables, 19 con deleciones monoalélicas y 0 con deleciones bialélicas. De acuerdo con esto, fueron generados cambios en 19 de los 44 alelos disponibles en las 22 clones aisladas, es decir una frecuencia de deleción de 0.4310 o eficiencia del 43.10%. En base a esta frecuencia de deleción, también fueron calculadas las frecuencias genotípicas estimadas para una población en equilibrio y mediante una prueba de bondad de ajuste a χ^2 , fue determinada una desviación significativa del equilibrio hacia la formación de mutantes heterocigotos $TSPAN33^{+/-}$ ($\chi^2=12.71$; Tabla 5).

Tabla 4. Aislamiento clonal de células tratadas con los vectores de edición.

<i>Transfección</i>	<i>Clonas aisladas</i>	<i>Clonas viables / Mutantes aislados</i>	<i>Supervivencia</i>	<i>Frecuencia deleción</i>
1	96	9 / 7	10%	0.3805
2	94	7 / 7	8%	0.5000
3	95	6 / 5	6%	0.4105
<i>Promedio</i>	285	22 / 19	8%	0.4310

Clonas aisladas, número de células vivas depositadas individualmente por el FACS; *Clonas viables*, número de clonas capaces de mantenerse en cultivo a los 20 días de aislamiento; *Mutantes aislados*, número de clonas con ediciones genómicas según análisis por PCR; *Supervivencia*, % de clonas viables respecto a clonas aisladas; *Frecuencia deleción*, frecuencia de deleción según los genotipos observados en las clonas con edición positiva

Tabla 5. Estimación de genotipos de acuerdo a la frecuencia de deleción calculada con respecto al número de mutantes observados.



Genotipos, combinaciones alélicas posibles; *Individuos esperados*, número de individuos estimado para una población de 22 individuos en equilibrio Hardy-Weinberg y con una frecuencia alélica para Δ TSPAN33 igual a la frecuencia de deleción calculada a partir de la genotipificación de las clonas viables aisladas ($q = 0.4310$); *Individuos observados*, número de individuos observados para cada genotipo según la genotipificación por PCR y después del tratamiento con los vectores de edición.

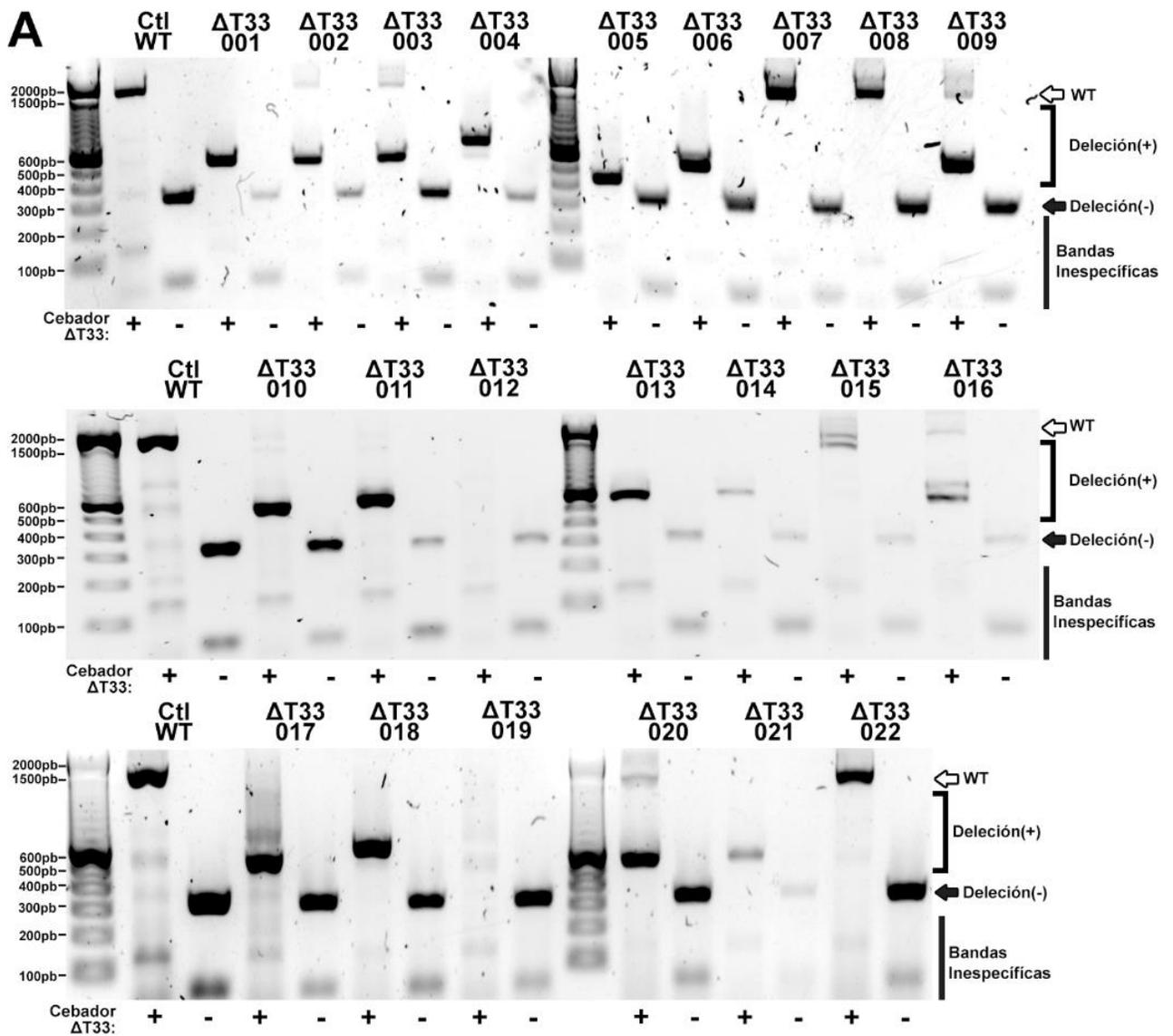


Figura 15. Detección de clones con deleciones en el locus genómico de TSPAN33. Electroforésis de la PCR realizada en clones individuales. Los tres aislamientos se muestran siguiendo un orden descendente. En la parte de arriba de las imágenes se muestran los nombres asignados a las clones; en la inferior, se indica el grupo de cebadores $\Delta T33$ utilizado. La flecha blanca señala al amplicon $\Delta T33(+)$ de un alelo silvestre; la región en corchete, muestra los amplicones en aquellos alelos con deleciones. La flecha negra, indica el amplicon $\Delta T33(-)$ en los alelos sin editar o con alteraciones parciales. Las bandas inespecíficas se indican en la región enmarcada con una línea recta.

4.1.7 Fenotipificación de la clona Δ T33-005

En base a los resultados anteriores, la clona Δ T33-005 fue seleccionada para fenotipificación mediante la evaluación de la expresión proteica de TSPAN33 por western blot y citometría de flujo. En este sentido, fueron utilizados dos anticuerpos comerciales capaces de reconocer epítomos diferentes en TSPAN33 y que son aplicables según el estudio a realizar. En el caso del análisis por western blot, fue posible detectar una disminución en la expresión de aproximadamente 96% (Figura 16A). De forma interesante, al evaluar los niveles totales de TSPAN33 con un anticuerpo monoclonal y a nivel de células individuales por citometría de flujo, fue posible observar una disminución de aproximada al 40% (Figura 16B).

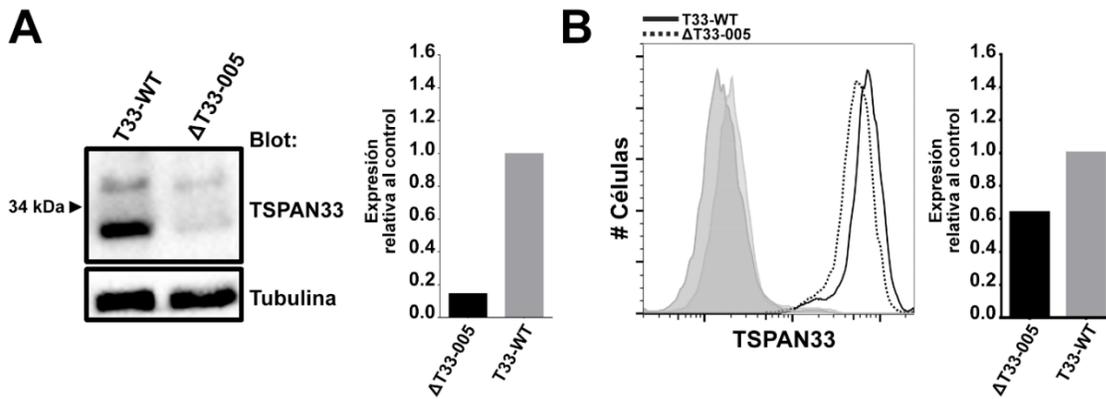


Figura 16. Fenotipificación de la delección del locus de TSPAN33 en la clona Δ T33-005. A. Izquierda, análisis mediante Western blot de la expresión de TSPAN33 total en células Raji silvestres (T33-WT) y la clona Δ T33-005. Se reveló a la tubulina como control de carga. Derecha, cuantificación de la densidad óptica relativa al control silvestre y normalizada con el control de carga. B. Izquierda, histograma representativo de la expresión de TSPAN33 total (histogramas color negro) evaluada por citometría de flujo, en las mismas células. Como control de especificidad, se evaluó la fluorescencia de células incubadas con anticuerpos del mismo isotipo (histogramas color gris). Derecha, cuantificación de la intensidad geométrica de fluorescencia relativa al control silvestre y normalizada al valor del control de isotipo.

4.2 DISCUSIÓN

Los avances en ingeniería genética ocurridos durante las últimas décadas han permitido el amplio desarrollo de tecnologías para la modificación de secuencias específicas en genomas de organismos vivos. A través de diferentes estrategias, estos acercamientos han sido utilizados para el estudio de la función de los genes y sus elementos reguladores. Dentro del amplio repertorio de herramientas descritas en el marco previo, la utilización de nucleasas modificadas para la introducción de escisiones bicatenarias en secuencias específicas, es la estrategia más utilizada para la edición genómica dirigida en organismos eucariontes (Figura 2). Pero hasta hace algunos años, estos acercamientos habían sido desplazados por la RNAi como “estándar de oro” para el estudio exclusivo de elementos transcritos en forma de RNA. Lo anterior, a pesar de presentar limitaciones como, heterogeneidad funcional entre secuencias utilizadas, así como efectos y fenotipos inespecíficos (Peretz et al. 2018; Krogan et al. 2009). Sin embargo, con la descripción del sistema inmune procariótico CRISPR-Cas9, y su posterior reingeniería para la modificación de secuencias específicas, se ha dado inicio a una nueva etapa en el estudio de los genes (Figura 3).

El objetivo principal de esta sección se centró en utilizar el sistema CRISPR-Cas9 para generar una línea celular humana de linfocitos B (Raji) sin la expresión de TSPAN33. Esta molécula es miembro de la superfamilia de las tetraspaninas, un grupo de proteínas implicadas en la organización de membranas celulares y asociadas con la manifestación, desarrollo, tratamiento y resolución de diferentes patologías, incluyendo cáncer y autoinmunidad (ver sección). Para llevar a cabo el abatimiento se utilizó una estrategia descrita previamente, en la que, al generar dos cortes bicatenarios paralelos se pretende la delección de la región flanqueada y por tanto, la supresión de sus funciones (Bauer, Canver y Orkin 2014).

Una de las principales inquietudes en el uso de esta y otras tecnologías de ingeniería genética, es el efecto de cambios inespecíficos inherentes a cada método. En este sentido, estudios han demostrado que el sistema CRISPR-Cas9 puede generar fenotipos inespecíficos por el uso de diferentes condiciones experimentales y la secuencia del sgRNA utilizado (Peng, Lin, y Li 2016). Respecto a lo anterior, se ha demostrado que el uso de guías dirigidas a secuencias exónicas favorece

significativamente la eficiencia durante la supresión de genes (Doench et al. 2014; Canver et al. 2014). Por otro lado, los algoritmos para el diseño de sgRNA han sido optimizados para que no solo cumplan los requerimientos bioquímicos del reconocimiento de nucleótidos, sino que también promuevan la actividad catalítica de Cas9 y así, aumentar la eficiencia del proceso global (Doench et al. 2016, 2014). En relación a esto, las secuencias de los sgRNA para TSPAN33 fueron seleccionadas con atención a los criterios más recientes para promover la actividad del sistema en mamíferos, incluyendo: expresión del sgRNA bajo el promotor U6, selección de sitios en los primeros tres exones del gen, utilizar regiones codificantes cercanas a la unión exón-intrón, selección de secuencias proto-espaciadoras distintas (-TGG, -GGG) y posicionamiento de nucleótidos en sitios preferentes para favorecer la actividad catalítica (Figura 8).

Las tetraspaninas tienen secuencias evolutivamente conservadas; específicamente TSPAN33 forma parte del subgrupo C8, caracterizado por tener mayor homología en el bucle extracelular grande, el principal dominio funcional de estas proteínas (Matthews, et al. 2017). Por lo tanto, para minimizar efectos inespecíficos en otros miembros del subgrupo C8, el abordaje utilizado fue el diseño de sgRNA's que flanquearan una región heterogénea de las proteínas. En este caso se eligió el bucle extracelular pequeño, un dominio variable (30% de homología) entre miembros de la familia, pero esencial para el plegamiento y expresión de las mismas (Masciopinto et al. 2001). Cabe señalar que, aunque los dominios intracelulares de estas proteínas presentan mayor variabilidad en su secuencia (25% de homología), estos han demostrado ser relativamente dispensables para sus funciones y en algunos casos, su ausencia no afecta la expresión de las mismas (Stipp, Kolesnikova y Hemler 2003).

Otro aspecto importante a tomar en cuenta durante la edición con CRISPR-Cas9, es el vehículo de transferencia para el material genético, ya que la ausencia o baja frecuencia de deleciones puede ser efecto de una transfección ineficiente (Bauer, Canver y Orkin 2014). Respecto a lo anterior, estudios previos han demostrado que la electroporación es el mejor método de baja inmunogenicidad para la transfección de células hematopoyéticas en suspensión (Weecharangsan, Opanasopit y Lee 2007). Particularmente, un estudio observo que la eficiencia del tratamiento con CRISPR-

Cas9 en la línea celular Raji es de aproximadamente 55% utilizando el mismo método de microporación aplicado en este trabajo y $\leq 1\%$ con una lipofectamina comercial modificada para este propósito (Yu et al. 2016).

En relación al tamaño de la deleción, se optó por realizar un corte menor a 1kb ya que estudios previos empleando la misma estrategia, describieron una relación inversamente proporcional entre el tamaño de una deleción genómica y la ocurrencia de la misma (Canver et al. 2014). Siguiendo este orden de ideas y asumiendo que ambos cortes ocurren de forma 100% precisa, fue calculada la distribución de frecuencias genotípicas esperada, para dos alelos dentro de una población en equilibrio Hardy-Weinberg (Meirmans 2019). En este caso particular, la distribución de los alelos TSPAN33 silvestres y los alelos Δ TSPAN33 después del tratamiento con CRISPR-Cas9. Bajo este escenario ideal, fue posible estimar probabilísticamente cual es el número mínimo de clonas que debían ser aisladas para observar mutantes con deleciones bialélicas de un tamaño específico, es decir, un genotipo homocigoto TSPAN33^{-/-} (Zheng et al. 2016; Canver et al. 2014). Para deleciones de hasta 800bp se estima una frecuencia de deleción alélica aproximada a 0.4, por tanto, el aislamiento de 8 a 15 clonas es suficiente para la observación de 1– 3 mutantes con deleciones en ambos alelos. De acuerdo a lo anterior, con el aislamiento de 285 clonas realizado en este trabajo, se esperaba la detección de al menos 50 mutantes con deleciones bialélicas. En contraste, los resultados aquí reportados muestran que el número de clonas viables después de la transfección fue bajo y por tanto, escapan a la tipificación de sus genotipos. Sin embargo, al analizar el genotipo de las clonas viables aisladas fue calculada una frecuencia de deleción de 0.4310, pero sin observar el número esperado de homocigotos TSPAN33^{-/-} y detectando una desviación significativa del equilibrio hacía la formación de heterocigotos TSPAN33^{+/-} con deleciones monoalélicas. En comparación con trabajos realizados en distintas líneas celulares de humano, al eliminar fragmentos de tamaños similares con esta técnica se han descrito frecuencias de: 47% para MIEN1 en 4 líneas celulares de cáncer de mama; 33 – 41% para CDC42, 38% para miR-21 y 39 – 52% para CCL2 en células HEK293T; 38 – 43% para varios tipos de loci codificantes y no codificantes en células MEL (Van Treuren y Vishwanatha 2018; Zheng et al. 2016; Canver et al. 2014). Finalmente, un estudio

reciente reportó un modelo celular knock-out para TSPAN33 generado en células haploides Hap1 con el sistema CRISPR-Cas9 y **utilizando un sgRNA con la misma secuencia dirigida al exón 3 reportada en este estudio** (Shah et al. 2018). Cabe mencionar que, la variabilidad en la eficiencia de corte es afectada por factores como: las secuencias de sgRNA utilizadas, las dosis transfectadas, el trasfondo epigenético de la región genómica en cuestión, el tipo celular utilizado y la ploidía del gen de interés (Doench et al. 2014; Canver et al. 2014). Por lo tanto, los datos aquí mostrados demuestran que el sistema CRISPR-Cas9 y los sgRNA seleccionados tuvieron la eficiencia de delección esperada. Sin embargo, de acuerdo a los postulados del principio Hardy-Weinberg, por distribución probabilística la ausencia de homocigotos TSPAN33^{-/-} sugiere la implicación de otros factores posiblemente asociados a la función de la proteína en esta línea celular.

Al evaluar el efecto de la delección monoalélica en una de las clonas heterocigotas se identificó una disminución parcial en la expresión de TSPAN33, corroborando la actividad y funcionalidad de los sgRNA diseñados. De acuerdo con esto, la clona caracterizada presentaba una reducción cercana al 40% respecto al control, un nivel esperado tomando en cuenta la presencia de dos alelos por célula diploide (Figura 16). La discrepancia en la disminución observada por diferentes metodologías puede ser explicada por diferencias en el reconocimiento de epítomos; ya que, el anticuerpo utilizado en los ensayos de citometría de flujo es de carácter monoclonal y reconoce un epítomo extracelular nativo en TSPAN33. En contraste, los anticuerpos utilizados en Western blot son de carácter policlonal y reconocen diferentes epítomos del extremo C terminal, una región susceptible a procesamiento enzimático durante la degradación y reciclamiento de las TSPAN33 (Seipold et al. 2018). Además, por el carácter transmembranal de estas proteínas, el reconocimiento por ciertos anticuerpos es susceptible a diferencias en la solubilización de las membranas en que se encuentran embebidas (Skaar et al. 2015). Por tanto, sería necesario realizar experimentos con detergentes de diferente naturaleza para determinar las condiciones óptimas para la extracción y detección de TSPAN33 para este y otros ensayos donde se estudie a la molécula en forma soluble (Saint-Pol et al. 2017).

Como se mencionó anteriormente, una explicación para la incapacidad de obtener células Raji sin expresión de TSPAN33, es una posible letalidad asociada a la ausencia de la proteína en esta línea celular. Siguiendo este orden de ideas, inicialmente TSPAN33 fue identificada como un factor regulador de la eritropoyesis utilizando ratones *knock-out* para esta molécula, el único modelo de este tipo publicado anteriormente (Heikens et al. 2007). Sin embargo, el fenotipo hematológico descrito fue observado únicamente en 30% de los ratones analizados y sus resultados no pudieron ser reproducidos posteriormente por otros grupos de investigación (Haining et al. 2012). Al evaluar los niveles del mRNA de TSPAN33 en órganos de ratones silvestres, detectaron una expresión preferencial en riñón, bazo y médula ósea. De forma interesante, la fenotipificación de poblaciones celulares en bazos de los ratones deficientes mostró una reducción significativa en las poblaciones linfocitarias, particularmente células IgM+/CD19+ (Heikens et al. 2007). Asimismo, estudios de secuenciación por microarreglos en ratón muestran que TSPAN33 es expresada particularmente por células inmaduras pro-B (Zou et al. 2018). De acuerdo con esto, estudios por PCR en humano la han identificado como biomarcador de linfocitos B vírgenes que han sido activados por un estímulo antigénico, así como de muestras biológicas y líneas celulares derivadas de distintos tipos de linfomas (Luu et al. 2013). En particular, estos estudios muestran que TSPAN33 es expresada de forma constitutiva por células Raji; además, datos de secuenciación masiva y PCR de varios grupos de investigación muestran que TSPAN33 es el miembro del subgrupo TSPAN8 más expresado en estas células (Pérez-Martínez et al. 2017; Cen y Pan, 2014). Paralelamente, otro estudio en pacientes con neoplasias mieloides (MDS, AML y MPD) identificó por hibridación *in-situ* una deleción en la región cromosómica donde se localiza el locus de TSPAN33. Sin embargo, en todos los casos fue detectada al menos una copia del gen, es decir, estos pacientes son heterocigotos TSPAN33^{+/-} (Chen et al. 2005). De acuerdo con lo anterior, podría ser de gran interés analizar si la emulación de este escenario cromosómico con el sistema CRISPR-Cas9 es capaz de inducir la formación de este tipo de neoplasias en células normales. Por otro lado, cabe señalar que actualmente existen tres patentes registradas en las que proponen a TSPAN33 como blanco terapéutico para el tratamiento de tumores (Flores-Gutiérrez,

Zlotnik y Yamanaka 2014; Sukhatme y Husain 2016). De acuerdo con la patente más reciente, el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra TSPAN33 permite el reconocimiento de todas las poblaciones CD19+ o CD20+ y la administración intravenosa de estos anticuerpos en ratones silvestres, induce un encogimiento significativo de los folículos linfoides del bazo (Tsai 2018). De igual forma, el patrón de expresión de TSPAN33 durante la activación por diferentes estímulos antigénicos (inespecíficos, virales, bacterianos y parasitarios), ha sido corroborada en vertebrados, incluyendo: humanos, ratones, cerdos y peces teleósteos, sugiriendo que sus funciones están conservadas a lo largo de la evolución (Cao y Tan 2018; Osvaldova et al. 2017; Priyathilaka et al. 2017; Lohman et al. 2017). En conjunto, las evidencias revisadas previamente sugieren que TSPAN33 juega un papel importante en la maduración y activación normal de células B, así como en la posible formación, mantenimiento y diseminación de neoplasias linfoides. Por lo tanto, no es trivial concluir que cambios en la expresión de TSPAN33 podrían estar estrechamente relacionados a cambios en la proliferación de la línea celular Raji, limitando la capacidad de obtener células sin la expresión de esta proteína. Es importante señalar que, para corroborar el efecto supresor sugerido para la delección reportada, es necesaria la realización de otros estudios como: la introducción de promotores inducibles para modular la actividad del sistema CRISPR-Cas9, uso de RNAi para corroborar la especificidad del tratamiento y la complementación con transgenes para restaurar el fenotipo silvestre (Peretz et al. 2018; Boettcher y McManus 2015; Kim 2016; Unniyampurath, Pilankatta y Krishnan 2016).

Respecto al mecanismo molecular mediante el cual TSPAN33 pudiera estar ejerciendo este efecto letal, existen evidencias claras sobre la modulación y asociación física entre el subgrupo TSPANC8 y la metaloproteasa ADAM10 (Matthews et al. 2018; Matthews, Szyroka, et al. 2017; Jouannet et al. 2016). La anterior, es una molécula esencial para la vida, con funciones en gran cantidad de procesos, incluyendo el sistema inmunológico y también ha sido asociada al desarrollo de múltiples patologías (Lambrecht, Vanderkerken y Hammad 2018; Endres y Deller 2017). En particular, ADAM10 es un factor crucial para la activación de Notch, una vía de transducción de señales primordial para el desarrollo morfogénico, que también ha sido descrita

recientemente como regulador durante la maduración y activación tanto normal como patológica de linfocitos B (Lambrecht, Vanderkerken y Hammad 2018; Ryan et al. 2017). De acuerdo con esto, otro estudio describió que la activación de Notch en células Raji promueve la proliferación y previene su apoptosis a través de la expresión de c-myc y Hes1 (He et al. 2009). Además, estudios en ratones y nematodos demostraron que TSPAN33 regula a Notch al modular la maduración de ADAM10 y posiblemente en la formación del complejo γ -secretasa (Ruiz-García et al. 2016; Dunn et al. 2010). Por lo tanto, la desregulación de ADAM10 por ausencia de TSPAN33 podría afectar indirectamente la viabilidad y proliferación de esta línea celular al modular vías de señalización esenciales como Notch y posiblemente otras.

SECCIÓN II

TSPAN33 EN LA REGULACIÓN DE LA VÍA NOTCH

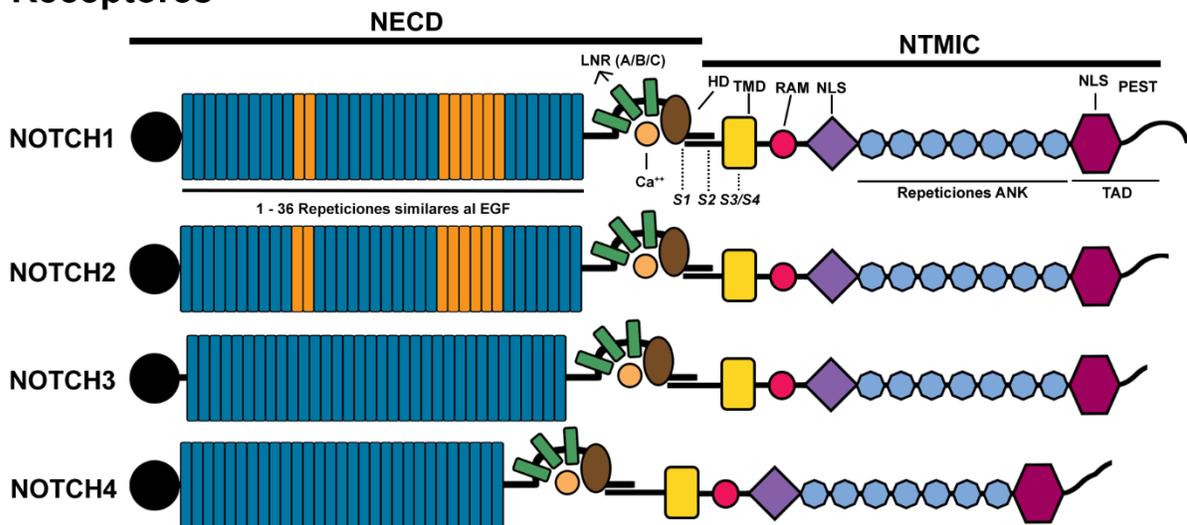
CAPITULO 4 – MARCO TEÓRICO: NOTCH EN LA BIOLOGÍA DE LOS LINFOCITOS B Y REGULACIÓN POR ADAM10

5.1 Marco teórico

5.1.1 La vía Notch

La transducción de señales a través de los receptores Notch, conforma una vía evolutivamente conservada en todos los eucariontes multicelulares, participando en la regulación del: compromiso, diferenciación, proliferación, homeostasis y apoptosis celular de varios tejidos (Kopan e Ilagan, 2009). Los mamíferos codifican en su genoma cuatro receptores Notch (NOTCH1-4) y cinco ligandos canónicos (Delta-like1,3,4 y Jagged1,2) (Figura 17).

Receptores



Ligandos

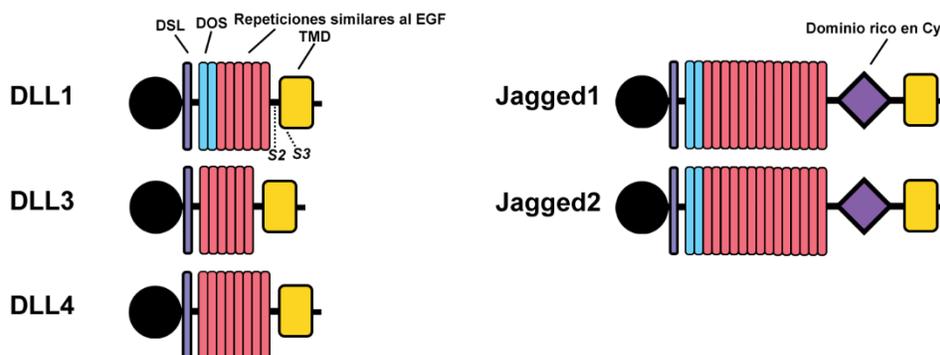


Figura 17. Estructura general de los receptores y ligandos canónicos de la vía de Notch.

Inicialmente, los receptores y ligandos son procesados en el aparato de Golgi, para luego ser transportados a la membrana plasmática en forma heterodimérica y con múltiples glicosilaciones en el dominio extracelular. La vía de señalización canónica inicia con la unión de los receptores en la superficie de una célula (célula receptora) y los ligandos anclados a la membrana de otra (célula transmisora) (Figura 18). Esta interacción induce la endocitosis del complejo por parte de la célula transmisora y la posterior escisión proteolítica del receptor por la célula receptora (van Tetering y Vooijs, 2011). Al final del proceso, el fragmento intracelular del receptor (NICD) será liberado al citosol de la célula receptora y el fragmento extracelular (NECD) endocitado por la célula transmisora. Posteriormente, el NICD será translocado al núcleo donde se unirá al factor RBPJ- κ y a un coactivador Mastermind (MAML). Este complejo NICD/RBPJ/MAML a su vez, reclutará al complejo mediador (MED8) y otros coactivadores (CoA) para favorecer la transcripción de genes específicos. El NICD presenta una vida media corta debido a la degradación proteosomal regulada por una secuencia específica en el extremo c-terminal (PEST). De forma interesante, evidencia reciente en vertebrados e invertebrados también ha demostrado la existencia de mecanismos no-canónicos para la señalización a través de Notch incluyendo: (i) activación independiente de ligando, (ii) actividad del NICD independiente de RBPJ- κ y (iii) señalización independiente de proteólisis (Ayaz and Osborne 2014).

5.1.1.1 Notch en el desarrollo normal y tumoral de los linfocitos B

En el sistema inmune, Notch regula el desarrollo y diferenciación de varios tipos celulares relacionados a la respuesta inmune innata (macrófagos, células dendríticas, etc.) y adaptativa (linfocitos T y B) (Guidos et al., 2010). Inicialmente, la vía fue estudiada durante el desarrollo normal de las diferentes clases de linfocitos T, así como su relación en la manifestación de varias patologías incluyendo cáncer y autoinmunidad (Gu et al., 2016). Sin embargo, la implicación de esta vía en la formación de subtipos normales y malignos de linfocitos B sigue siendo controversial (Rosenquist et al., 2017; Seda y Mraz, 2014; Kaminski et al., 2012). Inicialmente, la adquisición del linaje tipo B en la médula ósea requiere la inhibición de Notch por varias

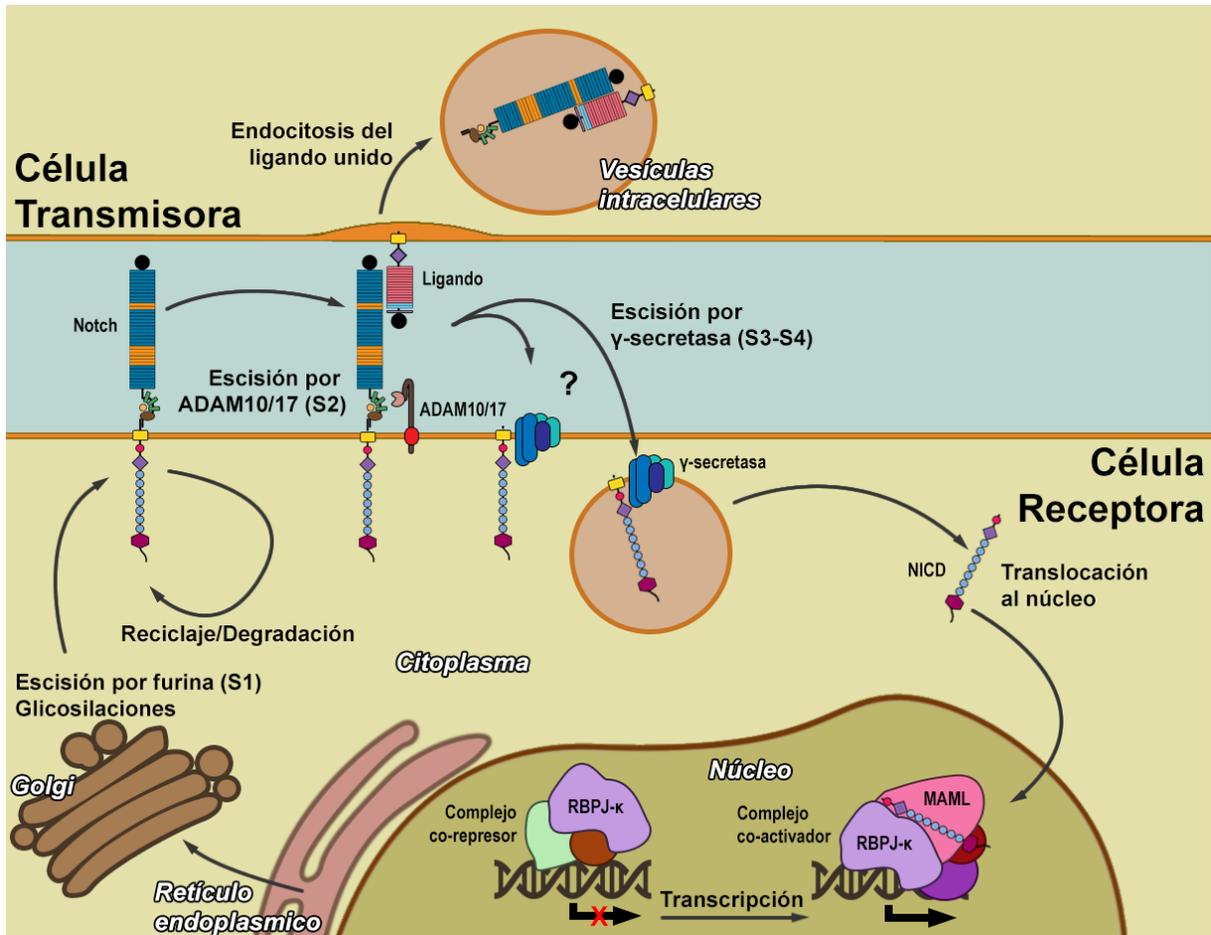


Figura 18. Mecanismo canónico de transducción de señales a través de la unión de receptores NOTCH y los ligandos canónicos correspondientes.

moléculas, incluyendo Pax5 e Ikaros, ambos factores de transcripción necesarios para la maduración de precursores de células B con la capacidad de inhibir la expresión y actividad del receptor Notch1 (Schwickert et al., 2014; Pridans et al., 2008; Kleinmann et al., 2008). La falta de inhibición mediada por estas moléculas y la persistencia de señales a través de Notch (entre otras vías), han sido identificados como factores asociados al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda (B- y T-ALL) (Liu et al., 2014; Zandi et al., 2012; Merckenschlager, 2010). Asimismo, existe un nicho específico de células B en la médula ósea, compuesto por células estromales CXCL12+ y IL-7+ que no expresan ningún ligando de Notch (Nagasawa, 2006).

Aparte de la inhibición de Notch en la maduración de precursores tipo B en la médula ósea, otros estudios han descrito implicaciones para la vía durante la diferenciación y activación de linfocitos B en órganos linfoides secundarios (Kaminski et al., 2012;

Cruickshank y Ulgiati, 2010). En este sentido, estudios realizados en ratones con células CD19+ deficientes para RBPJ- κ (factor esencial en la vía Notch canónica), presentan un defecto en la formación de células B de zona marginal (MZB), acompañado de un mayor índice de mortalidad por infecciones sanguíneas (Tanigaki et al., 2002). Diferentes grupos han demostrado que las moléculas necesarias para la diferenciación de este subtipo de linfocitos B son: el receptor NOTCH2, la proteasa ADAM10 y el ligando DLL1 (Gibb et al. 2010; Tan et al., 2009). De forma interesante, las poblaciones de células B en un ratón específicamente deficiente para Notch2 no emula del todo al generado por la ausencia de RBPJ- κ ; además de los defectos en MZB, también presentan deficiencias en la maduración de precursores transicionales T2. Lo anterior, sugiere la existencia de mecanismos independientes de RBPJ- κ regulados por Notch, necesarios para la maduración de este subtipo de linfocitos (Saito et al., 2003). Trabajos en ratón enfocados al papel de Notch durante la activación de linfocitos B maduros, han identificado que la vía promueve la diferenciación de células B foliculares (FoB) a células productoras de anticuerpos (ASC). Adicionalmente, según las condiciones de cultivo *in vitro*, la estimulación de Notch puede potenciar la recombinación hacia isotipos de inmunoglobulinas específicos. Al mismo tiempo, la vía contribuye a la generación de células IgG1+ *in vivo* durante respuestas T-dependientes (Thomas et al., 2007). De forma interesante, estos efectos también pueden ser estimulados o inhibidos según el ligando de Notch utilizado (Kang et al., 2014; Santos et al., 2007). Por lo tanto, los resultados producidos por Notch en linfocitos B normales varía ampliamente según el contexto gracias a la presencia de otras señales fisicoquímicas en los microambientes de los tejidos (LaFoya et al. 2016).

Estudios en ratón y humano han identificado la existencia de mutaciones en elementos de la vía de Notch que se asocian al desarrollo y un mal pronóstico en neoplasias linfoides, actuando como genes supresores u oncogenes. Sin embargo, la distribución de estas mutaciones cambia según el subtipo de célula B del cual se origina la patología en cuestión. Las mutaciones de los receptores Notch en estas neoplasias se concentran mayormente alrededor de la región intracelular "PEST", implicada en la degradación del receptor. Por lo tanto, la señalización oncogénica de Notch en linfomas tipo B no es constitutiva, sino por una degradación desregulada del receptor.

En este sentido, se han identificado diversas mutaciones en pacientes diagnosticados con: leucemia crónica linfocítica (B-CLL; N1 = 10-15%, N2 = ≤1%), linfoma de células B grandes difuso (DLCLB; N1 = 6-8%, N2 = 6-8%, Myc = 6%, DTX1 = 6-13%), linfoma folicular simple (FL; N1 = 6%, N2 = 6%), linfoma de células del manto (MCL; N1 = 10-15%, N2 = 5%), así como los linfomas de zona marginal esplénica (SMZL; N1 = 5-6%, N2 = 20-25%, DTX1 = 2%, MAML1 = 2%), nodal (NMZL; N2 = 20%, DTX1 = 3%, MAML2 = 3%) y de mucosas (MALT; N2 = 5%) (Rosenquist et al., 2017; Gu et al., 2016; Chiang et al., 2015; Rossi et al., 2013). A pesar de esto, **la baja correlación entre la actividad transcripcional de Notch, respecto a los bajos porcentajes de mutación en estas y otras neoplasias linfoides donde no se ha detectado la prevalencia de mutaciones (e.g.: linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple), demuestra la contribución de otros mecanismos moleculares implicados en la regulación de Notch** (Shanmugam et al., 2017; Cao et al., 2014; Kluk et al., 2013). Un ejemplo de lo anterior, es el aumento en la expresión del proto-oncogén “c-Myc” en células Raji (línea derivada de un linfoma de Burkitt) por la activación simultánea de Notch y BCR, acompañado de un aumento en la capacidad proliferativa y apoptosis disminuida (He et al., 2009). Por último, un trabajo reciente ha descrito una serie de genes expresados diferencialmente durante la activación de la vía NOTCH en procesos tumorales, incluyendo: elementos de señalización por citocinas (IL6R, IL10RA e IL21R) y elementos asociados a la activación del BCR (FYN, LYN, BLK, BLNK, PIK3AP1, entre otros) (Ryan et al., 2017). En conjunto, los reportes aquí mencionados resaltan la participación de Notch en la supervivencia, activación, proliferación y diferenciación normal de células B. Además, cambios en la regulación de la vía pueden promover o suprimir el desarrollo de varios tipos de neoplasias asociadas a estos linfocitos.

5.1.1.2 Proteólisis-Intramembranosa-Regulada y la modulación proteolítica de Notch

La proteólisis-intramembranosa-regulada (RIP), es el proceso de escisión de proteínas en el plano de las membranas y la posterior liberación de fragmentos solubles. El término fue acuñado en los años 90's gracias a la integración de conocimientos sobre la homeostasis del colesterol y la enfermedad de Alzheimer. Las observaciones sobre

el procesamiento fisiológico y amiloidogénico del precursor, para formar el péptido amiloide (APP), establecieron un modelo “universal” conformado por: α -secretasas (ADAM10 y ADAM17), β -secretasas (BACE-1) y γ -secretasas (PSEN1/NCSTN/APH-1/PEN2), entre otras. Debido a esto, dichas proteasas han sido objeto de múltiples estudios, así como ensayos clínicos para el tratamiento de esta y otras enfermedades, incluyendo una gran variedad de neoplasias (Lambrecht, Vanderkerken y Hammad 2018). Sin embargo, al estar implicadas en el procesamiento de otros sustratos con funciones diversas en ambientes fisiológicos y patológicos, se han producido diversas complicaciones. Aunque originalmente se creía que la proteólisis por las diferentes secretasas ocurría de forma espacio-temporalmente paralela, estudios más recientes han mostrado que estas moléculas se asocian en complejos supramoleculares, conformados principalmente por $\alpha + \gamma$, o en menor proporción $\beta + \gamma$ secretasas (Wakabayashi et al. 2009; Chen et al. 2015). Además, otras moléculas como las **tetraspaninas**, GPCR, integrinas y/o componentes del citoesqueleto, son elementos estructurales de estos complejos y son esenciales en la regulación de la RIP (Seipold y Saftig 2016).

La vía Notch es regulada en varios niveles, pero, de forma esencial por la RIP necesaria para iniciar la señalización por estos receptores. Inicialmente, sufren un primer corte que ocurre de forma constitutiva en un sitio denominado S1, durante la maduración del receptor en el Golgi y es mediado principalmente por la pro-proteína convertasa furina. Sin embargo, la ausencia de esta enzima no parece tener efectos significativos en la señalización de Notch leucocitaria, ya que su ausencia no altera la diferenciación de linfocitos T en ratón. Enseguida, la escisión del sitio S2 adyacente a la cara exterior de la membrana, presenta una regulación más compleja, ya que la unión receptor-ligando y los procesos endocíticos posteriores son factores que inducen cambios conformacionales en el receptor, que a su vez exponen el sitio de corte para las α -secretasas y que libera el dominio extracelular de Notch (Seegar et al. 2017). Además, también las fluctuaciones fisicoquímicas del microambiente tisular, son capaces de inducir los cambios necesarios para el procesamiento del receptor. Sin embargo, no está claro durante que eventos fisiológicos ocurre este fenómeno; un ejemplo de lo anterior, es la inducción de señalización Notch por quelación de Ca^{+2}

(EDTA/EGTA) in-vitro (Rand et al. 2000). Por último, la escisión en el sitio S3 ocurre en el dominio transmembrana del receptor y el procesamiento es realizado por el complejo γ -secretasa resultando en la liberación del NICD (Chen et al. 2015).

5.1.2 ADAM10

Las ADAM son una superfamilia de metaloproteasas, con un tamaño que ronda los 750aa y con funciones asociadas a la adhesión celular, así como el procesamiento proteolítico de una gran variedad de receptores y moléculas de señalización. El genoma humano codifica para 22 ADAM y la mayoría (incluyendo ADAM10) son traducidas como pro-enzimas inactivas, que requieren la escisión de un pro-dominio por parte de una furina para la exposición y activación del sitio catalítico (Giebeler y Zigrino, 2016; Bode y Maskos, 2003).

Por su conservación evolutiva, la expresión ubicua en mamíferos, el fenotipo letal de ratones deficientes y su asociación a una amplia variedad de procesos biológicos, ADAM10 destaca como uno de los miembros más importantes entre el resto de la familia. Las funciones de esta proteasa han sido asociadas a: desarrollo morfogénético, espermatogénesis, fertilización, angiogénesis, así como la función y desarrollo del sistema nervioso, gastrointestinal e inmune. De igual forma, también ha sido implicada en diversas manifestaciones patológicas, incluyendo: hipersensibilidad alérgica, Alzheimer, autoinmunidad y cáncer, entre otros. Esta proteasa se encuentra principalmente anclada a membranas (incluyendo vesículas extracelulares), con un tamaño que ronda los 85 y 55 kDa. Sin embargo, también puede presentarse en forma soluble catalíticamente activa y auto escindir. Su expresión es abundante en todos los estadios del desarrollo y se han identificado al menos 40 sustratos distintos, entre los que destacan por su relación a procesos fisiopatológicos: ligandos del receptor EGFR, moléculas de adhesión (E, N, VE-cadherinas, L-selectina, VCAM-1 y CD44), ligandos celulares (CD40L), receptores de interleucinas (IL-6R y 15R), quimiocinas (CXCL16, CX3CL1), los receptores y ligandos del factor de necrosis tumoral (BAFF/BAFF-R, TNF- α), el receptor de baja afinidad por IgE (CD23), receptores Notch y sus ligandos, entre otros (Pruessmeyer y Ludwig, 2009). Sin embargo, a pesar de la importancia de esta proteasa por la gran cantidad de sustratos que puede escindir y

los procesos en que están implicados cada uno de ellos, existe poca evidencia respecto a la regulación sobre su actividad y/o especificidad (Gibb et al., 2011). En cuanto a esto, ADAM10 es traducida como una pro-enzima que es procesada de forma constitutiva a su paso por el aparato de Golgi (Bode y Maskos, 2003). Por otro lado, también se ha descrito que diversos elementos de señalización pueden promover la actividad proteolítica de ADAM10, tales como: receptores de la familia GPCR (e.g. receptor de acetilcolina), proteína cinasa C (PKC), abatimiento de colesterol (M β CD), flujo de Ca⁺² (ionomicina) y N-glicosilaciones, entre otras (Gibb et al., 2011). Además, moléculas como las deacetilasas sirtuina (SIRT1) y los inhibidores de metaloproteasas de tejidos (TIMP), han mostrado papeles regulatorios durante el procesamiento de diferentes sustratos. Finalmente, diversos estudios han identificado a la superfamilia de tetraspaninas como proteínas capaces de regular la actividad, especificidad, maduración y tránsito de ADAM10, a través de la asociación física con la proteasa. Sin embargo, este es un enfoque que apenas ha empezado a ser evaluado a profundidad y que ha tomado importancia en los últimos años (Matthews et al., 2018; Matthews et al., 2016).

5.1.3 Tetraspaninas y microdominios de membrana

Las tetraspaninas son otra superfamilia de proteínas expresadas en una amplia gama de linajes celulares y tejidos de varios organismos, incluyendo: plantas, hongos y animales. Con un tamaño de 200 – 300aa, la estructura general de estas proteínas consiste en cuatro dominios transmembranales (TM) conservados entre miembros, particularmente algunos aminoácidos polares. Entre los dominios TM 1 - 2 existe un asa extracelular pequeña (SEL) y los dominios TM 3 - 4 flanquean un asa extracelular más grande (LEL). Además, al interior de la célula se encuentran ambos extremos terminales y una pequeña asa localizada entre los dominios 2 - 3.

Estas proteínas son capaces de asociarse lateralmente a través del LEL con moléculas de diferente naturaleza y, a la vez asociarse entre sí para formar un tipo específico de microdominio funcional en las membranas. En general, los microdominios de membrana se caracterizan por tener una relación proteína: lípido alto, con una composición enriquecida en esfingolípidos y colesterol. El ejemplo más conocido de

estos microdominios son las balsas lipídicas, las cuales proveen un área limitada donde proteínas que realizan distintas funciones pueden ser reclutadas. Durante un tiempo, se reconoció que los diferentes tipos de balsas lipídicas eran los únicos compartimientos de la membrana. Sin embargo, a la fecha se han aislado otros tipos de microdominios que difieren de estas balsas por su resistencia a los detergentes, así como su composición lipídica y proteica, un ejemplo de esto son los TEM's (microdominios enriquecidos con tetraspaninas).

5.1.4 Tetraspanina 33 (TSPAN33)

La tetraspanina 33 (TSPAN33) es el más reciente de la familia identificado en mamíferos y la información sobre las proteínas a las que puede asociarse y sus funciones es muy escasa. El gen que codifica para esta proteína fue aislado por expresión diferencial en eritroblastos y se ubica en una región del cromosoma 7 cuya eliminación ha sido asociada a la ocurrencia de síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda (Heikens *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2005). En un modelo murino deficiente de la proteína (knock-out) se observó una serie de defectos como: esplenomegalia marcada, glóbulos rojos macrocíticos basofílicos en sangre y otros tejidos, tumoraciones hepáticas con eritropoyesis extra medular y desarrollo de anemia severa durante el crecimiento (Heikens *et al.*, 2007). De forma particularmente interesante y sin dar mayor explicación al hecho, los autores de dicho trabajo reportan una disminución en las poblaciones leucocitarias del bazo de estos ratones, especialmente las células IgM+/CD19+ (células B). Respecto a lo anterior, Van Luu y colaboradores (2013) caracterizaron la expresión de TSPAN33 en células B y encontraron que únicamente es posible apreciar la expresión de la proteína tras la activación celular con estímulos como LPS. Adicionalmente, realizaron análisis que muestran la presencia de esta molécula en muestras de pacientes con diferentes tipos de linfomas y modelos de enfermedades autoinmunes asociadas con disfunciones de células B. El hecho de que la TSPAN33 se encuentre sobre expresada en linfomas no es sorprendente, ya que las tetraspaninas pueden ser reguladoras de procesos asociados a metástasis o la oncogénesis misma (Lazo, 2007). En este mismo orden de ideas, existen datos que asocian de forma indirecta a un ortólogo de TSPAN33 en *Caenorhabditis elegans* como factor de activación de la vía de Notch.

5.2 Hipótesis

TSPAN33 es expresada durante la maduración, así como la estimulación de linfocitos B y regula el procesamiento/activación de la vía NOTCH.

5.3 Objetivos

5.3.1 Objetivo general

Describir el papel regulador de TSPAN33 en la vía NOTCH de linfocitos B.

5.3.2 Objetivos específicos

- Análisis de la expresión de TSPAN33 en humanos mediante un abordaje bioinformático enfocado a distintas subpoblaciones de linfocitos B normales, así como en líneas celulares y biopsias derivadas de linfomas.
- Determinación de efectos durante el desarrollo y/o proliferación celular de células Raji con expresión transgénica o deficiente de TSPAN33.
- Caracterización de la participación de NOTCH en linfomagénesis mediante una revisión bibliográfica, acompañada de un abordaje bioinformático y experimental dirigido a describir la influencia de TSPAN33 durante el procesamiento de los receptores.

CAPÍTULO 5 – MATERIALES Y METODOS

6.1 Análisis en bases de datos públicas: Gtex, FANTOM5, CCLE, TCGA

Los datos de expresión por RNAseq de la versión V7 (dbGaP Accession phs000424.v7.p2) del Gtex (<https://www.gtexportal.org/>) fueron obtenidos y analizados directamente en el servidor del consorcio. Para esto, los datos lineales (TPM) del transcrito ENSG00000158457.4 del ENCODE correspondiente al transcrito funcional de TSPAN33 en humanos, fueron obtenidos y ordenados de forma descendente respecto a la mediana correspondiente a cada órgano y/o tejido. Los datos de expresión por CAGE del FANTOM5 (<http://fantom.gsc.riken.jp/5/>) en su versión V5, fueron consultados a través de la interfaz del HPA y organizados de la misma manera. Por otro lado, los datos de expresión de la CCLE fueron obtenidos directamente del servidor (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>). La información fue analizada y organizada mediante la extensión Plotly (<https://plot.ly/>), las gráficas fueron elaboradas con la herramienta GraphPad. Los datos del TCGA fueron obtenidos del servidor del NIH (<https://tcga-data.nci.nih.gov>) y los perfiles de expresión, comparación estadística, así como los análisis de supervivencia fueron realizados con el paquete de programas en lenguaje R GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

6.2 Análisis de expresión en microarreglos y sc-RNAseq

Los perfiles de expresión de diferentes subpoblaciones de linfocitos B y biopsias de riñones obtenidos por microarreglos en estudios independientes, fueron obtenidos directamente del servidor NCBI-GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Todos los microarreglos utilizados en este estudio fueron realizados con la plataforma GPL570 del chip Hg-U133 (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array).

En cuanto a los datos, el set GSE17186 incluye dos muestras homogenizadas de sangre periférica de dos donadores adultos y de sangre homogenizada de cordón umbilical de tres donadores. Los datos del set GSE45113 incluyen 18 muestras de células B aisladas de sangre periférica de seis donadores y caracterizadas por citometría de flujo. Por otro lado, datos del set GSE38697 incluye centroblastos y centrocitos aislados de cuatro muestras de amígdalas pediátricas mediante FACS.

Finalmente, los datos del set GSE49853 incluyen dos muestras de células B activadas por dos días y separadas por FACS según la producción de IL10. Para la normalización y análisis de los datos de expresión fue utilizado el paquete informático BART (<http://igc1.salk.edu:3838/bart/>). Las representaciones gráficas, correlaciones y comparaciones estadísticas fueron realizadas con el software GraphPad.

Los datos de biopsias de riñón analizadas con microarreglos del set GSE95425, incluye dos muestras de biopsias de médula renal, una de la interfaz corteza/médula y una más de la corteza. Por otro lado, los datos del set GSE114530 sobre la expresión de genes en células vivas aisladas de riñones fetales y evaluadas por sc-RNAseq, fueron analizados directamente con los algoritmos utilizados por los autores y disponibles al público en un servidor privado (<http://www.semraulab.com/kidney>).

6.3 Expresión de TSPAN33 en inmunohistoquímicas del HPA

Para el análisis de inmunohistoquímicas registradas en el HPA (<https://www.proteinatlas.org/>), las imágenes fueron obtenidas directamente de los servidores del consorcio. Posteriormente, las imágenes fueron segmentadas y procesadas con el paquete informático ImageJ (NIH). Para analizar la expresión de TSPAN33, la señal del canal fue aislada con la herramienta "IHC Toolbox" y los valores de intensidad recíproca fueron calculados de acuerdo a un protocolo publicado previamente (Nguyen et al. 2013).

6.1 Anticuerpos, medios de cultivo y células

Todos los cultivos celulares fueron mantenidos en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (HyClone®) inactivado, 100U/mL de penicilina G, 100µg/mL de sulfato de estreptomina, 0.3mg/mL de L-Glutamina y 1mM de piruvato de sodio (todos de Gibco®). Los anticuerpos anti ADAM10 (SHM14), anti-NOTCH1 (HMN1-12), anti-NOTCH2 (MHN2-25) y anti-NOTCH4 (MHN4-2) fueron obtenidos de BioLegend®. Asimismo, también fue utilizado un anticuerpo anti-ADAM10 (B-3) obtenido de Santa Cruz®.

6.1 Cinética de expresión de TSPAN33 durante la activación

Para analizar la distribución de TSPAN33 durante la estimulación de Raji, fue seguido un protocolo publicado previamente (Vancurova 2014). Para esto, las células fueron colectadas a partir de un cultivo fresco (no menos de 48h), lavadas y resuspendidas en PBS, para conteo celular, así como evaluación de viabilidad con el colorante azul tripano. Para evaluar la expresión en diferentes concentraciones de los estímulos, 2.5×10^5 células Raji fueron cultivadas en pozos distintos con 0.5-1.0mL de medio de cultivo y recolectadas a las 24h de cultivo. Por otro lado, para la cinética de expresión de TSPAN33 en distintos tiempos, 1.5×10^5 células fueron colocadas en un mismo pozo y con 1.0-2.0mL de medio cultivo adicionado con una concentración fija de estímulos. Posteriormente, fueron recolectadas alícuotas de 0.5mL en los tiempos indicados. Al final de ambos experimentos, las células estimuladas fueron teñidas para análisis por citometría de flujo de acuerdo al protocolo descrito en la sección anterior.

6.2 Microscopia confocal de TSPAN33 por inmunofluorescencia

Fueron realizadas tinciones con anticuerpos y lectinas específicas contra distintas moléculas. En general, las células Raji en suspensión ($\text{min. } 1 \times 10^6$) fueron colectadas por centrifugación, resuspendidas en PBS y fijadas con paraformaldehído al 4%. En el caso de moléculas intracelulares las membranas fueron permeabilizadas incubando a las células por 5m en 1mL de Triton X-100 al 0.1% en PBS y un lavado posterior. Para tinciones con anticuerpos conjugados con distintos fluorocromos, las células fueron incubadas en hielo y ausencia de luz por 20 min con los anticuerpos anotados previamente, utilizando las cantidades recomendadas por el fabricante. En algunos casos, las células fueron incubadas por 30m a 37°C antes de ser colocadas en hielo. Cuando se aplicaron anticuerpos purificados fue seguido el protocolo anterior y adicionalmente fue realizada una segunda incubación con los anticuerpos secundarios anti-IgG biotinilados correspondientes y un lavado entre cada paso. Este tipo de muestras fueron reveladas añadiendo $5\mu\text{L}$ de una dilución 1:10 de estreptavidina-Cy3 (Zymed[®]) e incubando por 10m a 37°C para inducir el entrecruzamiento. Para la observación de preparaciones fijas teñidas o sin teñir, fue realizado un lavado con PBS y las células se dejaron adherir en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma[®]).

Para esto, fueron añadidas células con una micropipeta hasta cubrir completamente los cubreobjetos y se incubaron a 37°C por una hora. Posteriormente, las células no adheridas fueron removidas mediante lavados con PBS y los cubreobjetos se montaron con Vecta-Shield DAPI (Vector Labs®) en portaobjetos de vidrio.

La captura y análisis de imágenes fue realizada con el microscopio IX71 (Olympus®) a 37 °C utilizando el objetivo de 60X y los programas FluoView (Olympus®) e ImageJ (NIH).

6.3 Análisis de la proliferación celular: WST-1, eFluor670, RTCA

La evaluación de la proliferación mediante la degradación de la sal de tetrazolio WST-1 durante la expresión transgénica de TSPAN33-EGFP, fue realizada de acuerdo a un protocolo publicado previamente (Kogoshi et al. 2007). Para esto, 1×10^4 células fueron cultivadas en medio RPMI1640 suplementado como se describió previamente y en presencia de 10% de suero fetal bovino. El compuesto WST-1 y el acoplador de electrones 1-metoxi PMS fueron utilizados en las concentraciones indicadas por el fabricante y agregados en los tiempos indicados. Posteriormente, las fueron incubadas a 37°C por 40m y la densidad óptica en los 450nm fue evaluada por espectrofotometría con el lector de microplacas xMark (Bio-Rad®). Como blanco de lectura, fue utilizado un pozo con medio de cultivo y los compuestos mencionados previamente.

Para el análisis de proliferación por dilución de colorante, también fue seguido un protocolo publicado previamente (Kang, Kim y Park 2014). Para esto, 1×10^6 células vivas fueron teñidas en frío por una hora con eFluor 670 (eBioscience®). Este colorante fluorescente tiene una baja actividad citotóxica y se une a cualquier proteína con aminos primarios. Por tanto, durante la división celular el colorante empieza a ser diluido por la distribución entre las células hijas de aquella que fue teñida inicialmente. La capacidad proliferativa fue analizada por citometría de flujo, al evaluar el decremento en la intensidad de fluorescencia del colorante después de 48h de cultivo en RPMI1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Finalmente, para monitorear la proliferación de las células adheridas en tiempo real, fue seleccionado un método libre de etiquetas basado en la determinación de la resistencia al flujo eléctrico en una celda especializada. Para esto, 1×10^4 células fueron

cultivadas a 37°C durante 72h en las placas E-16 de RTCA, que fueron recubiertas previamente con fibronectina, laminina y gelatina (todos de Sigma®). Las señales de impedancia de referencia y tratamiento fueron registradas cada 10m con el software RTCA Software Package 1.2 de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

6.4 Análisis de ciclo celular

Para analizar el ciclo celular fue seguido un protocolo publicado previamente y fueron atendidas todas las especificaciones descritas para la línea celular Raji (Tavecchio et al. 2008). Para esto, células viables en crecimiento exponencial fueron fijadas de acuerdo a los protocolos descritos con paraformaldehído al 4% y fueron teñidas con el intercalante TO-PRO3 (Molecular Probes®) utilizando las concentraciones, así como tiempos de incubación recomendados por el fabricante. Posteriormente, las células fueron analizadas por citometría de flujo como se describió en la sección anterior.

CAPÍTULO 6 – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 RESULTADOS

7.1.1 Expresión de TSPAN33 en órganos y tejidos sanos

El proyecto del Gtex es una plataforma pública, donde se depositan un conjunto de datos entre los que se encuentran datos de secuenciación masiva por RNA-seq (entre otros) de varios tejidos de humano obtenidos post-mortem de forma sistemática (n=>900 individuos) (Ardlie et al. 2015). Asimismo, el consorcio FANTOM5 recoge los perfiles transcripcionales evaluados por CAGE de cientos de muestras de humano, incluyendo: líneas celulares, células primarias y tejidos (n=>975 individuos) (Yu et al. 2015). Para identificar de forma general los sitios anatómicos donde se expresa TSPAN33, los niveles fueron evaluados en las dos bases de datos. En el caso del GTex, los seis principales sitios donde se expresa TSPAN33 son: glándula salivar, testículos, bazo (órgano linfoide), glándula pituitaria, riñón y linfocitos transformados con EBV (Figura 19). En el FANTOM5, los 6 tejidos con mayor expresión son: bazo (órgano linfoide), glándula pituitaria, apéndice (órgano linfoide), glándula salivar, amígdalas (órgano linfoide) y riñón (Figura 19). De forma correspondiente, varios estudios experimentales de nuestro y otros grupos de investigación han identificado a TSPAN33 como un posible marcador de subpoblaciones celulares de: linfocitos B, células renales y células espermatogénicas humanas (J. Guo et al. 2018; Pérez-Martínez et al. 2017; Luu et al. 2013). Para corroborar y profundizar las observaciones sobre el potencial de TSPAN33 como marcador en células normales, su expresión fue evaluada en varios sets de datos genómicos generados en estudios independientes y que fueron obtenidos de los repositorios: ArrayExpress, GEO, entre otros.

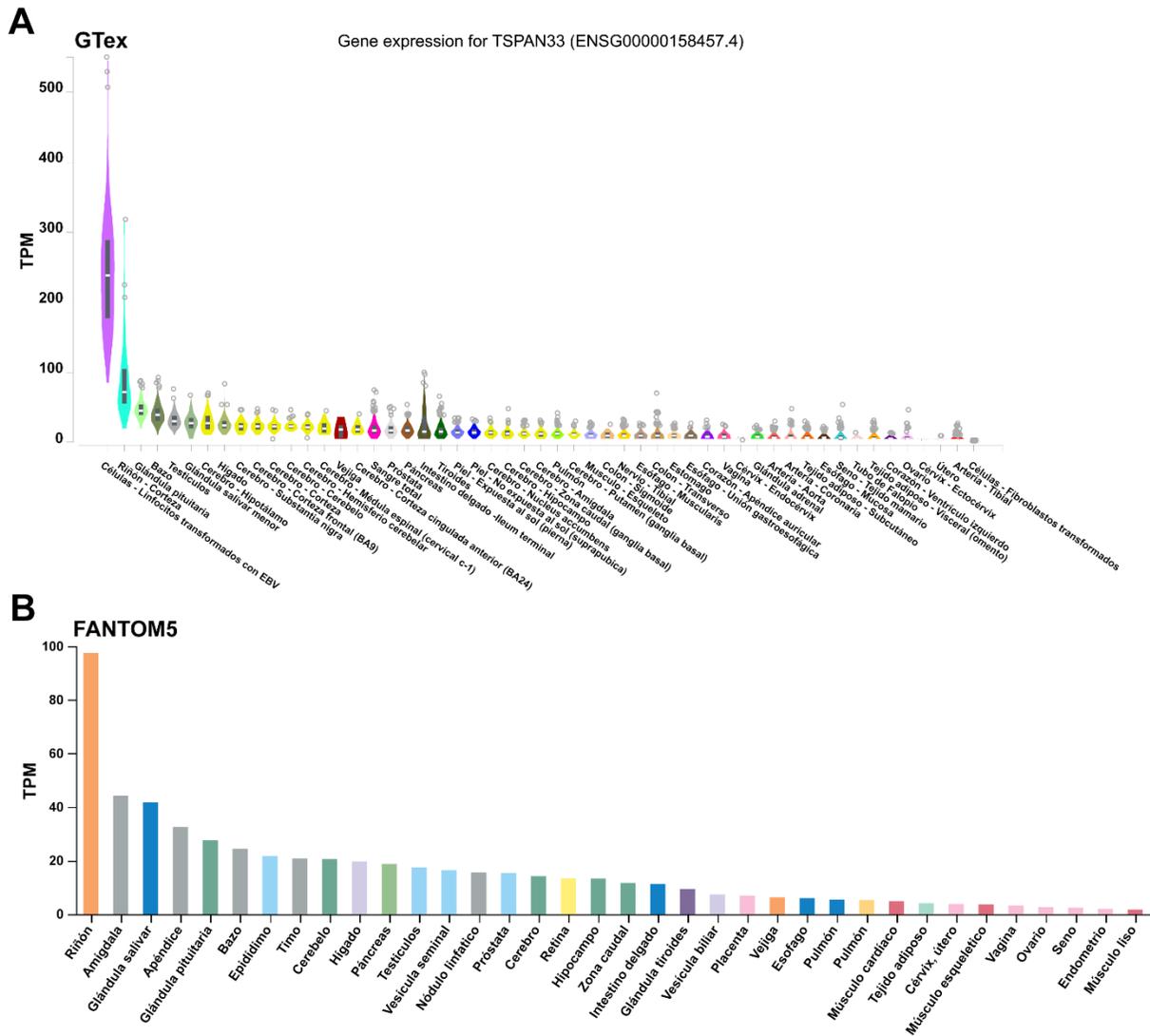


Figura 19. Expresión de TSPAN33 en tejidos normales de humano. A. Análisis de enriquecimiento en tejidos sanos de humano de acuerdo a los datos de RNAseq del consorcio GTex (31 tejidos). En el eje vertical se muestran los niveles de expresión en TPM. Los diagramas de violín muestran la distribución de los datos, las cajas al interior representan el rango de la mediana entre los primeros percentiles y los puntos a los datos por encima del rango intercuartil. B. Perfil de expresión en tejidos sanos según datos de CAGE recopilados por el grupo FANTOM5 (35 tejidos). Los niveles de expresión se muestran al igual que el caso anterior y las barras representan el valor de la mediana de los datos para cada tejido.

7.1.1.1 Desarrollo de linfocitos B

Dos estudios de nuestro grupo de trabajo identificaron a TSPAN33 como un marcador durante el desarrollo y la estimulación de linfocitos B en humanos (Pérez-Martínez et al. 2017; Luu et al. 2013). Para profundizar en estas observaciones, la expresión de TSPAN33 fue analizada en cuatro grupos de microarreglos registrados en estudios enfocados al análisis de subpoblaciones de linfocitos B, incluyendo: transicionales, centros germinales, maduras vírgenes, maduras de memoria, maduras activadas y reguladoras. Al evaluar los niveles de expresión en linfocitos circulantes de dos fuentes distintas, fue detectado un perfil diferencial entre las poblaciones celulares. En linfocitos de sangre periférica (adulto), hay una mayor expresión en células transicionales 1 y de memoria. Por otro lado, en linfocitos de cordón umbilical (neonato) la mayor expresión fue observada en células vírgenes y transicionales 2 (Figura 20A). Al evaluar los niveles de TSPAN33 en células de memoria estimuladas con un agonista de TLR3 (CpG), fue detectada una mayor expresión en células estimuladas, respecto a los controles sin activar (Figura 20B). Adicionalmente, los niveles de TSPAN33 también fueron evaluados en linfocitos aislados de muestras de tejido esplénico normal, detectando una mayor expresión en linfocitos de la zona clara en los centros germinales (Figura 20C). Finalmente, al evaluar la expresión de TSPAN33 en células estimuladas y productoras de IL-10 (B reguladoras), fue detectada una disminución en la expresión comparada con células activadas, no productoras (Figura 20D). Por tanto, los datos anteriores muestran que TSPAN33 no es expresada de forma homogénea por linfocitos B durante el desarrollo a partir de células inmaduras y/o durante la activación con diferentes estímulos (PMA, ionomicina, CpG, IL-4, α CD40) (Figura 20E).

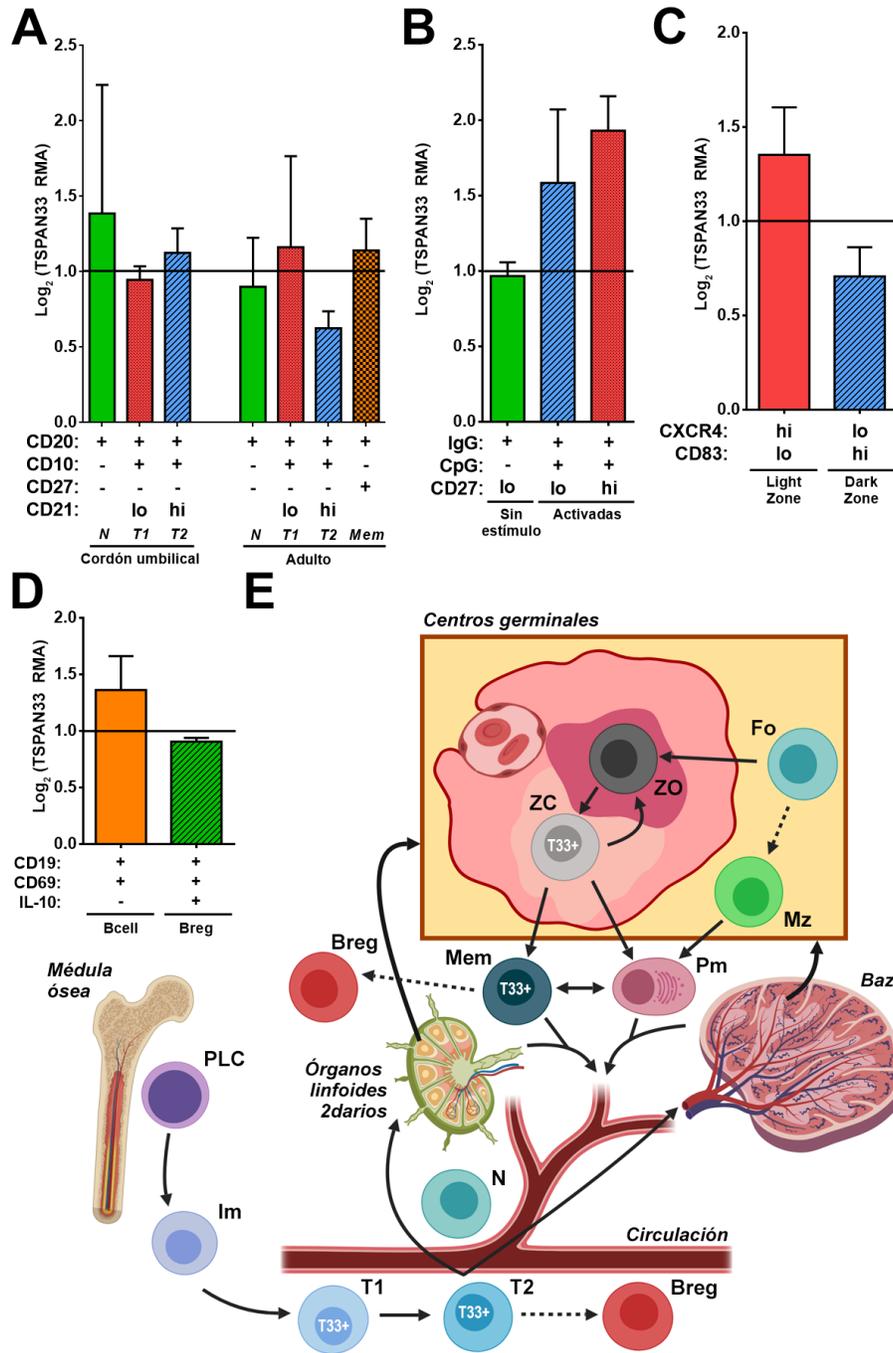


Figura 20. Expresión diferencial de TSPAN33 en diferentes subpoblaciones de linfocitos B. Niveles de expresión por microarreglos en diferentes subpoblaciones de linfocitos B aisladas por FACS de acuerdo a los marcadores descritos en cada gráfica. En el eje vertical se muestran los niveles de expresión para TSPAN33 como la tasa de cambio (+/- desviación estándar) entre los valores del Log_2 de la intensidad RMA normalizados a la mediana global. Las muestras analizadas incluyen linfocitos B de sangre periférica y cordón umbilical (A, GSE17186); células de memoria estimuladas durante 72h (B, GSE45113); linfocitos en centros germinales de amígdalas pediátricas (C, GSE38697); células B activadas por 48h y productoras IL10 (D, GSE49853). D. Esquema representativo sobre la expresión de TSPAN33 durante el desarrollo de linfocitos B: Bact, activado; Breg, regulador; Fo, folicular; Im, inmaduro; T1/T2, transicionales 1 y 2; Mem, de memoria; Mz, de zona marginal; N, "naïve"; Pm, célula plasmática; PLC, progenitor linfoide común; ZC/ZO, zona clara y oscura.

Para corroborar y brindar más información sobre las observaciones realizadas previamente, la presencia de TSPAN33 como proteína fue evaluada mediante el reanálisis de inmunohistoquímicas registradas de forma sistemática en la base de datos pública del HPA. Las tinciones fueron realizadas de forma sistemática con un anticuerpo monoclonal en biopsias de diversos tejidos normales (Uhlmann et al. 2013). Al evaluar la distribución en médula ósea, es posible observar a TSPAN33 en algunas células hematopoyéticas, principalmente megacariocitos y algunos leucocitos (Figura 21A/B). Por otro lado, en el bazo es posible observar mayores niveles de TSPAN33 en la pulpa roja, particularmente las regiones apicales de los senos esplénicos (Figura 22A/B). Sin embargo, al analizar regiones de la pulpa blanca donde se localizan los centros germinales, es posible observar a TSPAN33 en linfocitos de la zona clara del centro germinal y la zona marginal, no así en los linfocitos del manto. A la vez, es posible observar un patrón de distribución similar en centros germinales de otros órganos linfoides secundarios, incluyendo nódulos linfáticos y amígdalas palatinas (Figura 22C/D/E/F). De forma particularmente interesante, los linfocitos que expresan TSPAN33 presentan una morfología elongada y una distribución subcelular localizada en la membrana plasmática. Por otro lado, el epitelio pulmonar es otro tejido periférico donde se pueden observar células inmunes con altos niveles de TSPAN33 (Figura 23A/B). Los macrófagos alveolares que expresan TSPAN33 presentan una distribución subcelular localizada en la periferia y en menor proporción, el citoplasma.

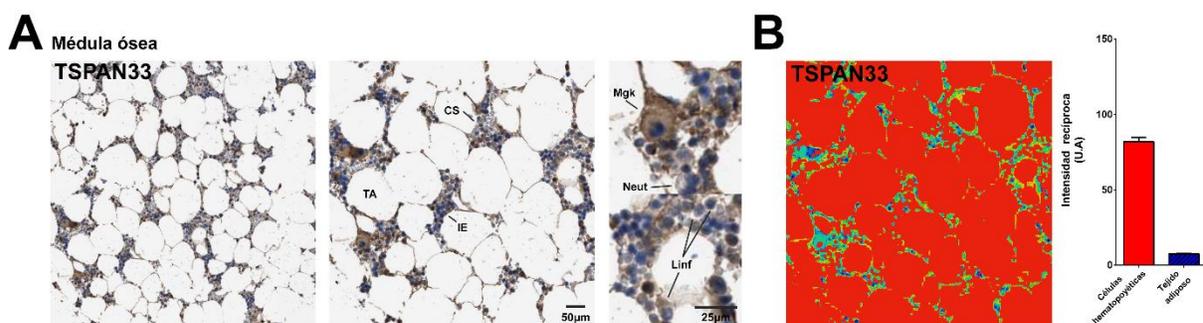


Figura 21. Distribución de TSPAN33 en médula ósea. A. Expresión de la proteína TSPAN33 en médula ósea humana (n=1) revelada con una tinción por inmunohistoquímica y disponible al público en el HPA (<https://www.proteinatlas.org/>). B. Imagen representativa del análisis de intensidad de la señal en distintas regiones anatómicas realizado con el software libre ImageJ (NIH). Panel derecho, comparación de los valores de intensidad recíproca (+/- desviación estándar) de tres o más campos aleatorios adquiridos en las regiones anatómicas mencionadas. CS, cuerpos sinusoidales; IE, islas eritroides; TA, tejido adiposo; Mgk, megacariocito; Neut, neutrófilo/granulocito; Linf, linfocito.

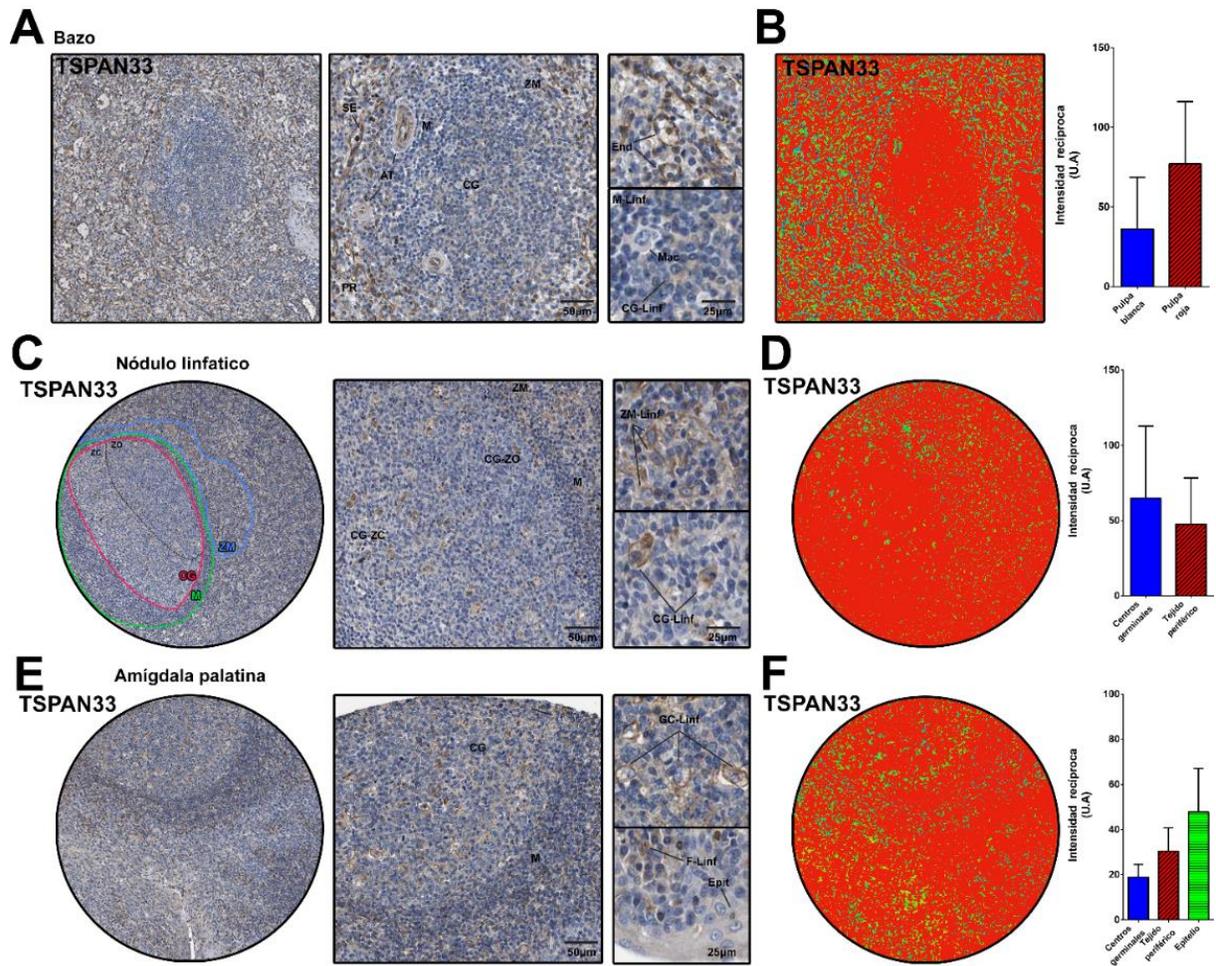


Figura 22. Distribución de TSPAN33 en órganos linfoides secundarios. Expresión de la proteína TSPAN33 en bazo (A, n=3), nódulo linfático (C, n=2) y amígdala palatina (E, n=3) de humano, revelada con tinciones por inmunohistoquímica y disponibles al público en el HPA (<https://www.proteinatlas.org/>). En el caso del nódulo linfático (C) se muestran delimitaciones a las regiones de los centros germinales. En los paneles derechos (B, D, F) se muestran imágenes representativas del análisis de intensidad de la señal realizados con el software libre ImageJ (NIH). Asimismo, se muestran las comparaciones de la intensidad recíproca (+/- desviación estándar) de tres o más campos aleatorios adquiridos en las regiones anatómicas mencionadas.

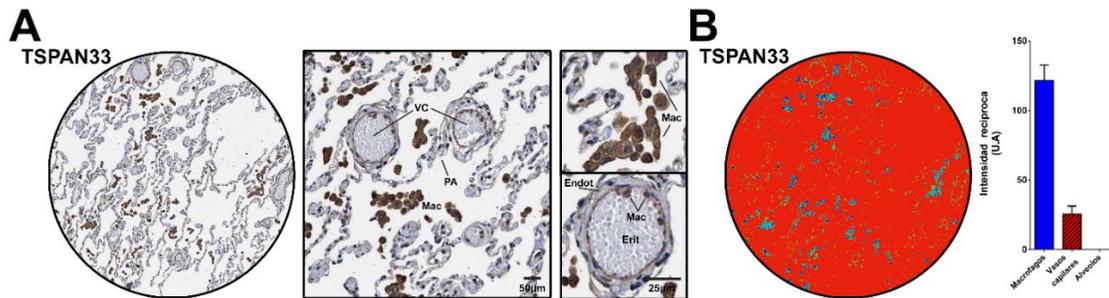


Figura 23. Distribución de TSPAN33 en pulmón. A. Expresión de la proteína TSPAN33 en pulmón de humano (n=3), revelada con tinciones por inmunohistoquímica y disponibles al público en el HPA (<https://www.proteinatlas.org/>). B. Imagen representativa del análisis de intensidad de la señal en distintas regiones anatómicas realizado con el software libre ImageJ (NIH). Panel derecho, comparación de los valores de intensidad recíproca (+/- desviación estándar) de tres o más campos aleatorios adquiridos en las regiones anatómicas mencionadas. VC, vasos capilares; PA, parénquima alveolar; Mac, macrófagos; Endot, endotelio; Erit, eritrocitos.

7.1.1.2 Desarrollo renal

El riñón es otro de los sitios anatómicos con mayor expresión de TSPAN33 que ha sido reportado previamente (Luu et al. 2013). Sin embargo, a la fecha no existe información detallada sobre las regiones y subtipos celulares que la expresan, particularmente durante el desarrollo renal embrionario. En principio, la expresión de TSPAN33 y NSUN2 (marcador general de riñones) fueron evaluadas en datos de secuenciación por RNAseq de biopsias obtenidas de riñones sanos (Figura 24A). En todos los casos fue detectada la expresión de ambas proteínas, pero sin observar una región preferente para TSPAN33. En este sentido, hasta hace poco los estudios sobre el desarrollo de los tipos celulares que componen órganos y tejidos se encontraban limitados por la falta de marcadores que permitieran la separación física de células para su caracterización (e.g. separación por FACS de poblaciones linfocitarias). Sin embargo, con el desarrollo de tecnologías como sc-RNAseq, es posible empezar a elucidar a fondo la heterogeneidad de subtipos celulares que componen un tejido. Mediante este abordaje, tres estudios paralelos han descrito a más de una docena de tipos celulares durante el desarrollo renal embrionario y riñones maduros (Hochane et al. 2019; Collord et al. 2018; P. Wang et al. 2018). Al obtener y re analizar los datos de secuenciación más recientes, la expresión de TSPAN33 fue evaluada en los 22 subtipos celulares identificados en el estudio y que abarcan desde el brote ureteral embrionario, hasta los podocitos y células de tubos colectores maduras (Figura 24B, panel inferior izquierdo).

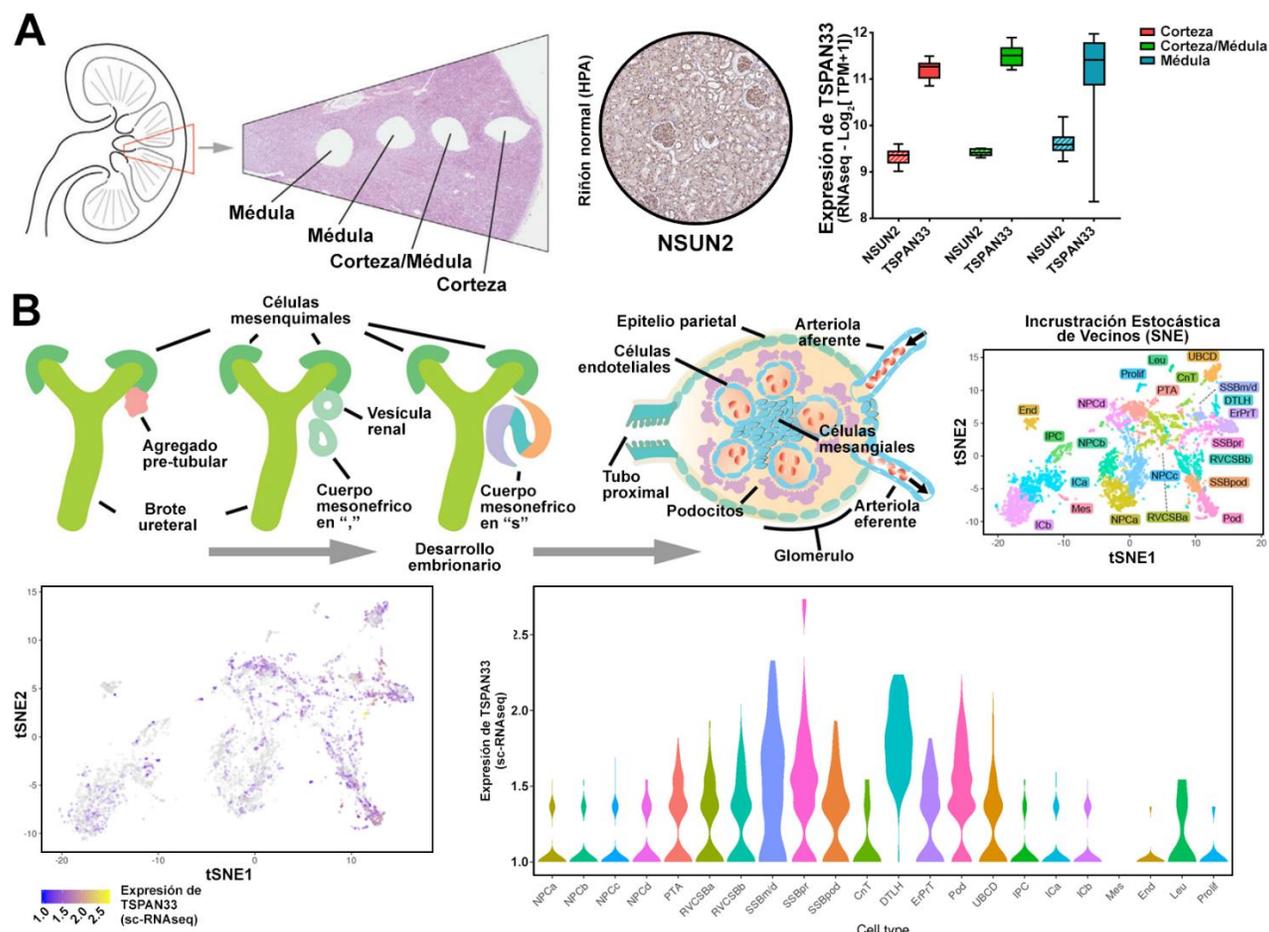


Figura 24. A. Niveles de expresión por microarreglos (GSE95425) en diferentes regiones anatómicas de riñones sanos, aisladas por biopsia de acuerdo al esquema representativo del panel izquierdo. En el panel central se muestra una tinción por inmunohistoquímica del marcador general de riñones NSUN2. Los niveles de expresión de TSPAN33 y NSUN2 se muestran en el eje vertical como el logaritmo cuadrado de los TPM obtenidos para cada gen. B. Niveles de expresión por sc-RNAseq (GSE114530) en células vivas aisladas por FACS de riñones fetales. Panel Superior, diagrama del desarrollo embrionario de nefronas. En la gráfica de la derecha se muestra el análisis por SNE de componentes principales, para la posterior segregación e identificación de poblaciones renales. Paneles inferiores, expresión de TSPAN33 de acuerdo al análisis anterior (izquierda) y niveles lineales (derecha) en subpoblaciones individuales. CnT, tubos conectores; DTLH, tubo distal/asa de Henle; End, células endoteliales; ErPrT, tubo proximal temprano; ICa/b, células intersticiales a/b; IPC, células intersticiales progenitoras; Leu, leucocitos; Mes, células mesangiales; NPCa/b/c/d, células progenitoras de las nefronas a/b/c/d; Pod, podocitos; Prolif, células en proliferación; PTA, agregado pre-tubular; RVCSBa/b; cuerpos en "s"; SSBm/d, cuerpos en "s" medial/distal; SSBpod, células precursoras de podocitos del cuerpo en "s"; SSBpr, cuerpos en "s" proximal; UBCD, brote ureteral/conducto colector.

Después de transformar los datos obtenidos, es posible observar que TSPAN33 se expresa en la mitad de los subtipos celulares, incluyendo: leucocitos adyacentes (Leu: 1.168), células del agregado pre-tubular embrionario (PTA: 1.365), células de la vesícula renal (RVSCa/b: 1.252/1.277), células de los cuerpos mesonéfricos en “,” y “s” medial/distal/proximal (SSBm/d/pr: 1.467/1.515), precursores y formas maduras de podocitos (SSBpod/Pod: 1.320/1.463), células maduras de los tubos colectores distales/proximales y las células del asa de Henle (DTLH: 1.806). La mayor expresión es detectable en precursores y formas maduras de podocitos, así como en los tubos colectores (Figura 24B, panel inferior derecho).

Para corroborar los datos de expresión anteriores, los niveles proteicos de TSPAN33 fueron evaluados en las inmunohistoquímicas de riñones normales, disponibles al público en el HPA (Yu et al. 2015). Los mayores niveles de TSPAN33 se localizan en los glomérulos y en menor proporción, células de los tubos colectores tanto distales como proximales (Figura 25B). Al analizar los glomérulos, es posible detectar una expresión marcada de TSPAN33 en los podocitos, localizada en la membrana de estas células (Figura 25A, panel medio superior). En contraste, en células de tubos colectores, se localiza mayormente en el citoplasma (Figura 25A; panel medio inferior).

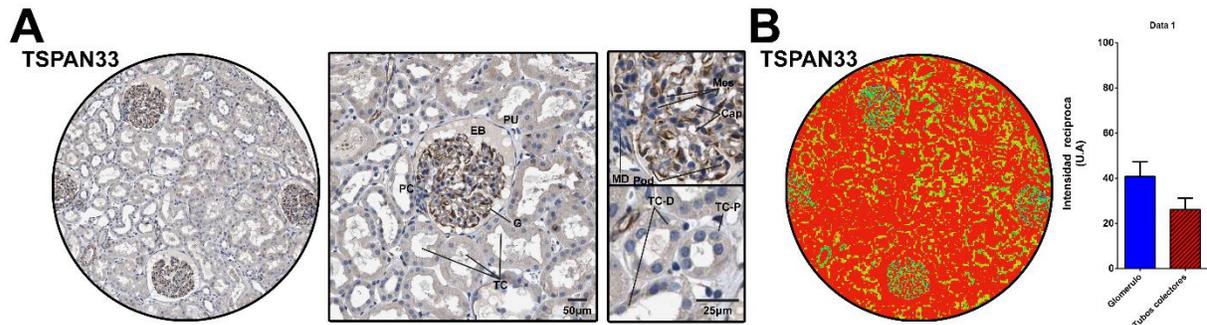


Figura 25. Distribución de TSPAN33 en riñones. A. Expresión de la proteína TSPAN33 en riñones de humano (n=3), revelada con tinciones por inmunohistoquímica y disponibles al público en el HPA (<https://www.proteinatlas.org/>). B. Imagen representativa del análisis de intensidad de la señal en distintas regiones anatómicas realizado con el software libre ImageJ (NIH). Panel derecho, comparación de los valores de intensidad recíproca de tres o más campos aleatorios adquiridos en las regiones anatómicas mencionadas. PC, polo capilar; PU, polo ureteral; EB, espacio de Bowmann; G, glomérulo; TC, tubos colectores; TC-D, tubo colector distal; TC-P, tubo colector proximal; MD, macula densa; Pod, podocitos; Cap, capilares; Mes, células mesangiales.

7.1.1.3 Espermatogénesis

Al igual que el caso anterior, dos estudios recientes han realizado el trazado de perfiles transcripcionales durante el desarrollo espermatogénico (Guo et al. 2018; Sohni et al. 2019). De forma interesante, ambos trabajos han identificado a TSPAN33 como un marcador temprano durante la maduración de las espermatogonias, lo anterior mediante análisis por sc-RNAseq y citometría de flujo. De forma correspondiente, al re evaluar las inmunohistoquímicas disponibles en el HPA, es posible observar a TSPAN33 localizada en los tubos seminíferos y las regiones apicales de los vasos capilares (Figura 26A/B). Al analizar la distribución en estos conductos, TSPAN33 se localiza en la región de espermatogénesis adyacente a la base capsular del conducto (Figura 26A). De forma interesante, la distribución subcelular de TSPAN33 en las espermatogonias se localiza mayormente en la membrana plasmática y en menor proporción el citoplasma (Figura 26A, panel superior derecho).

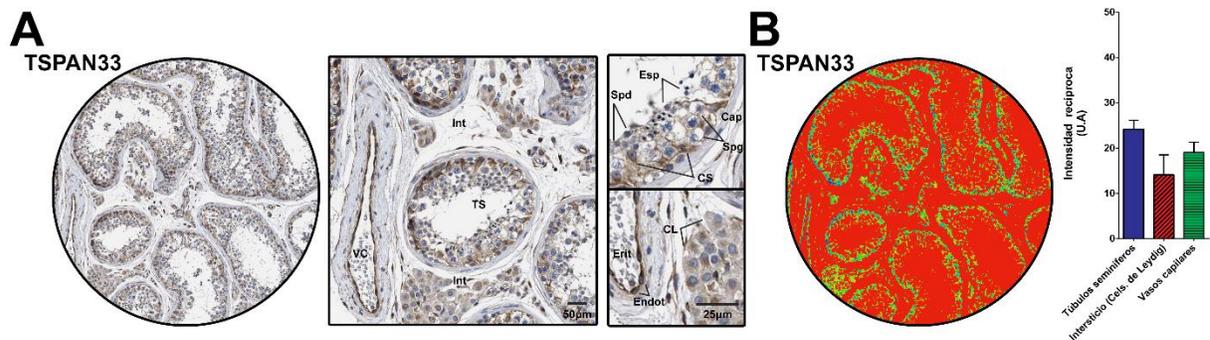


Figura 26. Distribución de TSPAN33 en testículos. A. Expresión de la proteína TSPAN33 en testículos de humano (n=3), revelada con tinciones por inmunohistoquímica y disponibles al público en el HPA (<https://www.proteinatlas.org/>). B. Imagen representativa del análisis de intensidad de la señal en distintas regiones anatómicas realizado con el software libre ImageJ (NIH). Panel derecho, comparación de los valores de intensidad recíproca de tres o más campos aleatorios adquiridos en las regiones anatómicas mencionadas. VC, vasos capilares; Int, espacio intersticial; TS, tubo seminífero; Spd, espermátidas; Esp, espermatozoides; Spg, espermatogonias; CS, células de Sertoli; Cap, capsula; CL, células de Leydig; Endot, células endoteliales; Erit, eritrocitos.

7.1.2 Expresión de TSPAN33 en líneas celulares y muestras de biopsias primarias de tumores

La CCLE, es otra base de datos publicada recientemente y en la que se deposita una compilación de datos sobre secuenciación masiva en más de 1400 líneas celulares derivadas de 40 subtipos de tumores (Barretina et al. 2012). Al evaluar la expresión de TSPAN33 mediante microarreglos Affymetrix®, la mayor expresión es detectada en líneas derivadas de los siguientes tumores: leucemia linfocítica aguda (B-ALL), carcinoma renal, linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma de células B grandes (LDCBG) y otros linfomas de células B (folicular, zona marginal, manto, etc.) (Figura 27A). Por otro lado, al evaluar la expresión de TSPAN33 en el mismo set de datos mediante RNAseq, es posible detectar la mayor expresión en: carcinoma renal, cáncer de cérvix, B-ALL, linfoma de Burkitt, otros linfomas de células B y LDCBG (Figura 27B/D). Al analizar la relación entre los datos obtenidos por los dos abordajes experimentales, existe una correlación positiva entre ambos grupos (Spearman $r=0.96$, $p \Rightarrow 0.001$; Figura 27C). Como información de referencia, los niveles de expresión de TSPAN33 también fueron evaluados en todas las líneas individuales asociadas a carcinomas renales; así como, leucemias y linfomas derivados de linfocitos B (Figura 28).

Por otro lado, la cohorte del TCGA integra y cataloga de forma sistemática datos genómicos obtenidos por análisis multi dimensional (RNAseq, CHIPseq, etc.) de biopsias de 31 tipos de tumores, así como tejido normal de donadores sanos ($n=33,549$ individuos y pacientes) (Tang et al. 2017). En esta serie de muestras, la mayor expresión de TSPAN33 se concentra en: glioma de baja peligrosidad (LGG), carcinoma hepático (LIHC), carcinoma renal de células claras (KIRC), carcinoma renal de células cromóforas (KICH), linfoma de células B grandes (DLBC) y carcinoma renal de células papilares (KIRP) (Figura 29A). Al evaluar la diferencia en el cambio de expresión entre los seis tipos de tumores con mayor expresión de TSPAN33 y los tejidos normales correspondientes, fue posible detectar diferencias significativas entre tejidos normales y tumorales tanto de DLBC, como de KIRC (Figura 29B).

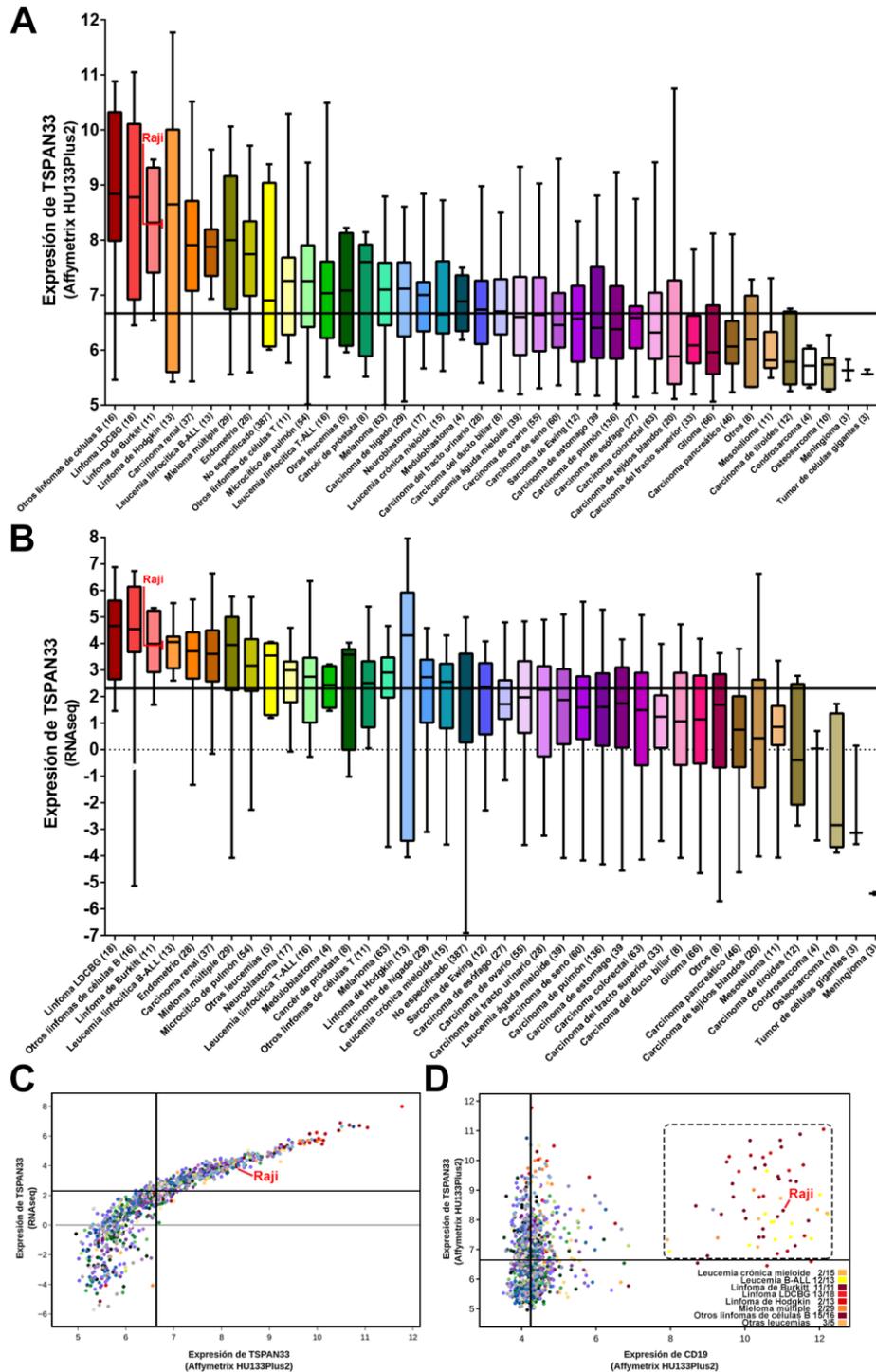


Figura 27. Expresión de TSPAN33 en líneas celulares derivadas de tumores. A/B. Análisis de expresión mediante microarreglos y RNAseq de líneas celulares registradas en la CCLE (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>). En el eje vertical se muestran los niveles de expresión de acuerdo a la plataforma de análisis utilizada; los diagramas de caja representan el rango de la mediana entre los primeros dos percentiles y los bigotes a el rango intercuartil. C. Correlación de la expresión de TSPAN33 entre los datos de ambas plataformas de análisis. D. Correlación entre la expresión de TSPAN33 y CD19 a partir de los datos de microarreglos. Las líneas en los ejes indican la mediana global; el recuadro señala a las líneas positivas para ambos marcadores y en rojo a la línea celular Raji.

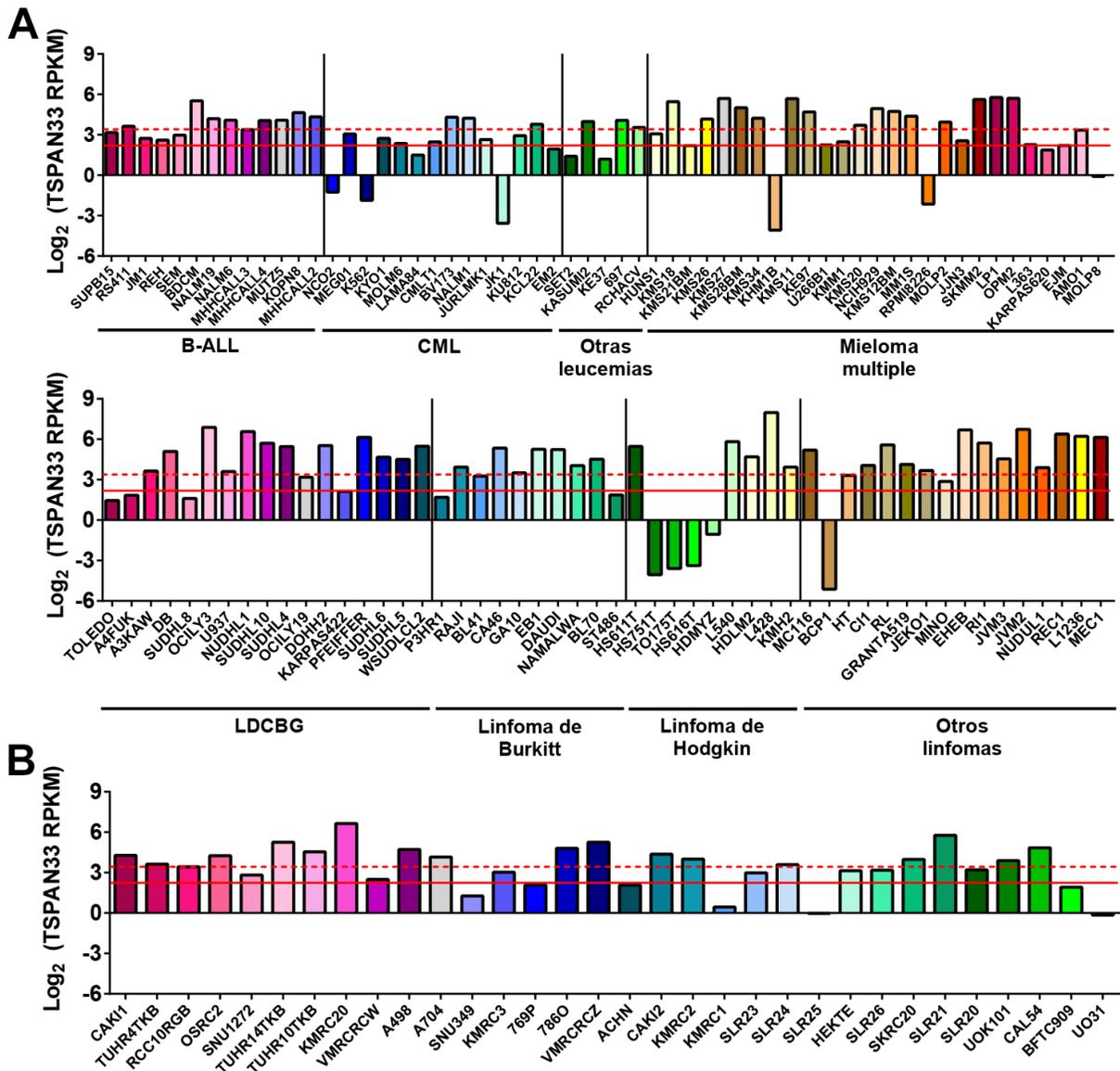


Figura 28. Expresión de TSPAN33 en líneas celulares individuales de neoplasias derivadas de linfocitos B y carcinomas renales. Análisis de expresión mediante RNAseq en las líneas celulares individuales registradas en la CCLE (<https://portals.broadinstitute.org/ccle>) y que son derivadas de distintos tipos de neoplasias asociadas a linfocitos B (A) y carcinomas renales (B). En el eje vertical se muestran los niveles de expresión de acuerdo al Log_2 del RPKM; la línea recta indica la mediana global de todos los datos y la línea punteada señala el tercer cuartil.

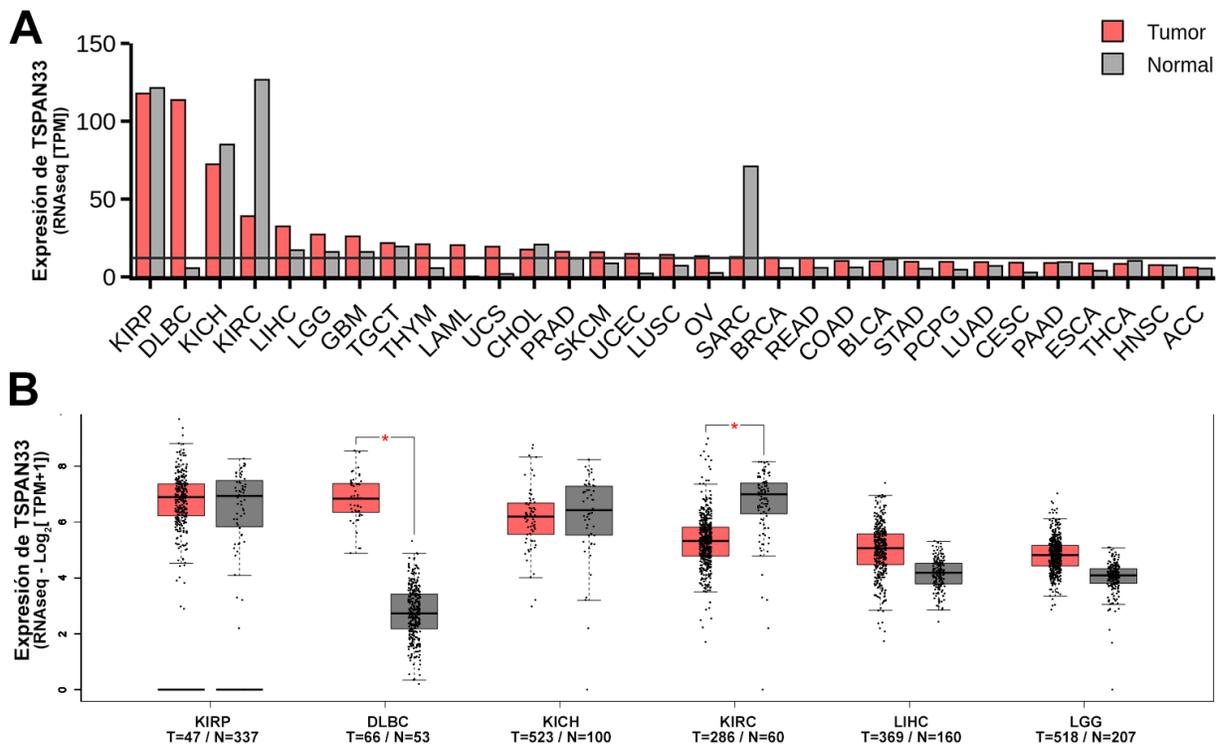


Figura 29. Expresión de TSPAN33 en biopsias de tumores primarios. A. Distribución de la expresión de TSPAN33 en biopsias de tumores primarios registradas en el TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/>). En el eje vertical se muestran los niveles de expresión de acuerdo al TPM; la línea recta indica la mediana global de todos los datos. B. Comparación estadística entre tejido normal y canceroso de los seis tipos de tumores con mayor expresión de TSPAN33. En el eje vertical se muestran los niveles de expresión de acuerdo al Log₂ de la TPM, los diagramas de caja muestran la mediana junto a el rango de los primeros cuartiles y los bigotes el rango intercuartil. *p≤0.05 KIRP, carcinoma renal papilar; DLBC, linfoma de células B grande; KICH, carcinoma renal cromóforo; KIRC, carcinoma renal de células claras; LIHC, carcinoma hepatocelular; LGG, glioma de bajo grado; GBM, glioblastoma multiforme; TGCT, tumores de células germinales testiculares; THYM, carcinoma del timo; LAML, leucemia aguda mieloide; UCS, carcinosarcoma uterino; CHOL, colangiosarcoma; PRAD, adenocarcinoma prostático; SKCM, melanoma cutáneo; UCEC, carcinoma de endometrio; LUSC, carcinoma escamoso de pulmón; OV, adenocarcinoma cístico seroso de ovario; SARC, sarcoma; BRCA, carcinoma invasivo de seno; READ, adenocarcinoma del recto; COAD, adenocarcinoma colónico; BLCA, carcinoma urotelial de vejiga; STAD, adenocarcinoma estomacal; PCPG, feocromocitoma y paraganglioma; LUAD, adenocarcinoma pulmón; CESC, adenocarcinoma y carcinoma escamoso cervical; PAAD, adenocarcinoma pancreático; ESCA, carcinoma esofágico; THCA, carcinoma de tiroides; HNSC, carcinoma escamoso de cabeza y cuello; ACC, carcinoma adrenocortical.

7.1.2.1 TSPAN33 como biomarcador de tumores primarios derivados de carcinomas renales y linfomas de células B

Según las observaciones anteriores y las de un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, los niveles de expresión de TSPAN33 cambian durante la formación de procesos tumorales (Luu et al. 2013). Para evaluar la capacidad predictiva durante la formación de carcinomas renales y linfomas de células B, la expresión de TSPAN33 fue evaluada en los diferentes estadios de progresión tumoral en muestras primarias de linfoma (DLBC) y carcinomas renales (KIRC/KIRP/KICH). En el caso de DLBC, es posible observar una tendencia no significativa a la baja durante la progresión de la enfermedad (Figura 30A). En cambio, en el conjunto de carcinomas renales, es posible observar una disminución significativa en la expresión de TSPAN33 en los estadios más avanzados (III y IV) (Figura 30C). La observación anterior sugiere que la pérdida de expresión podría asociarse a un mal pronóstico durante la enfermedad. Para evaluar este fenómeno, fueron realizados análisis de supervivencia global y libre de enfermedad en las cohortes ya mencionadas. En el caso de linfoma, no existe una relación significativa entre la expresión y la supervivencia global de los pacientes (HR=0.57; p=0.44) (Figura 30B). En contraste, al analizar la relación en el conjunto de carcinomas renales fue posible detectar una asociación significativa entre la supervivencia global y la pérdida de expresión de TSPAN33 en estos pacientes (HR=0.63; p=0.001) (Figura 30D).

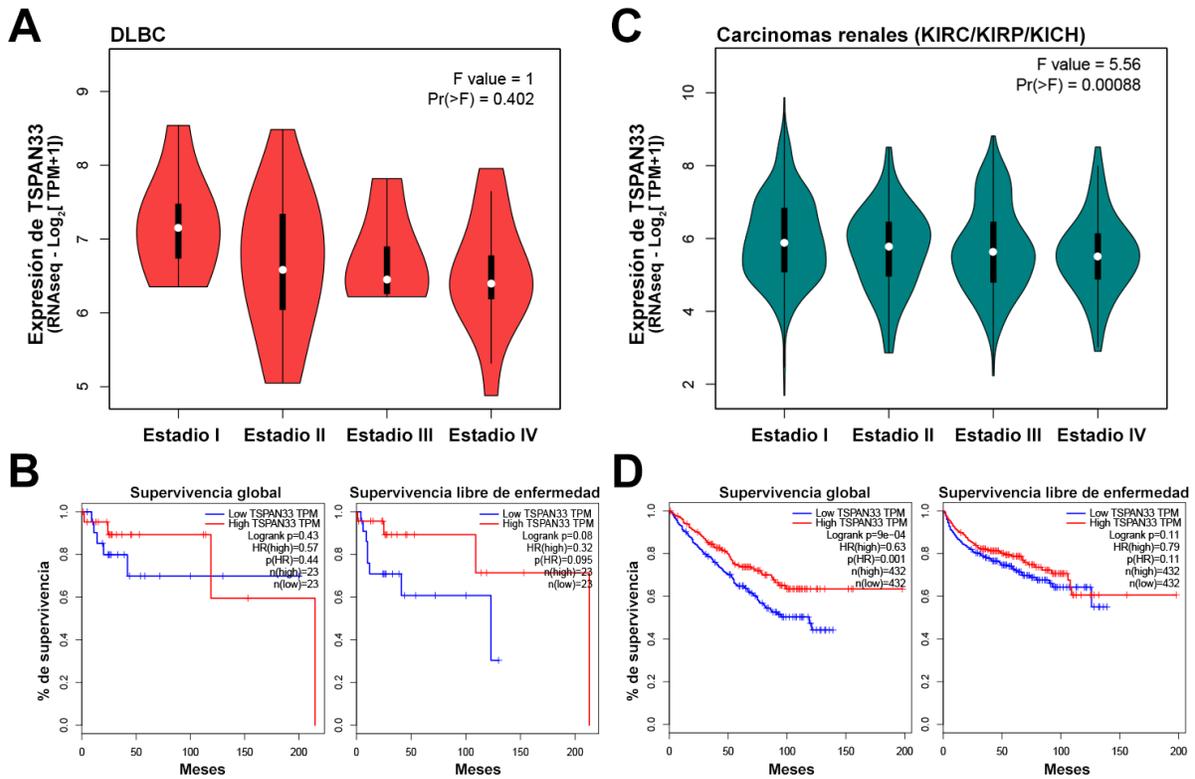


Figura 30. TSPAN33 como biomarcador en la prognosis de linfomas y carcinomas renales. Expresión de TSPAN33 según los estadios de progresión histológica de linfomas (A) y carcinomas renales (C). B/D. Análisis de supervivencia global y libre de enfermedad según el estimador Kaplan-Meier para las cohortes de ambos tipos de tumores. Las líneas azules representan a las muestras por abajo del cuartil 50 de la mediana global las rojas aquellas muestras por encima del mismo. HR(high), tasa de riesgo para la población con alta expresión de TSPAN33; p(HR), valor del estadístico p para la tasa de riesgo calculada; n(high)/(low), número de muestras por arriba o abajo del cuartil 50.

7.1.3 Caracterización de TSPAN33 en un modelo celular de linfoma de Hodgkin

7.1.3.1 Expresión de tetraspaninas

La línea celular Raji fue seleccionada como modelo para estudiar la función de TSPAN33 en linfocitos B y su posible implicación durante la formación de procesos tumorales a través de la vía NOTCH. En primera instancia, la expresión de las 33 tetraspaninas fue evaluada en dos grupos de datos de secuenciación por microarreglos, generados de forma independiente. Al realizar una correlación de ambos grupos, fue detectada una relación positiva ($r=0.77$, $p \geq 0.001$) entre los datos y un grupo de siete miembros principales: TSPAN3, TSPAN14, CD53, CD37, CD82, CD81, CD63 y TSPAN33 (Figura 31).

7.1.3.2 Distribución subcelular y cinética de expresión durante la estimulación

Para analizar la distribución subcelular de TSPAN33, los niveles fueron evaluados mediante citometría de flujo en células activadas con diferentes estímulos policlonales y en reposo. En células sin estimular, es posible detectar bajos niveles superficiales de TSPAN33, por otra parte, la mayor señal es detectada al interior de células permeabilizadas (Figura 32A/B). Sin embargo, la estimulación de células con IL4/ α CD40 induce la expresión superficial de TSPAN33 desde las 24h y hasta las 72h de activación, en forma dosis-independiente (Figura 32D). A su vez, la estimulación con ionomicina no es capaz de inducir cambios significativos en los niveles superficiales de TSPAN33 (Figura 32C). Por otro lado, la localización de TSPAN33 también fue observada por microscopia en células Raji transgénicas para TSPAN33; así como, en preparaciones registradas en el HPA de células A431 y U2OS teñidas con un anticuerpo. En células Raji, la quimera TSPAN33-EGFP se localiza en la periferia de las células, colocalizando con el citoesqueleto de actina cortical y con un patrón de distribución puntillado en las microvellosidades; además, existe un enriquecimiento citoplásmico de la proteína (Figura 33A). Paralelamente, en células epiteliales TSPAN33 tiene un patrón similar en la superficie de las células y microvellosidades (Figura 33B). Por otro lado, en el citoplasma tiene una distribución localizada en los microtúbulos, con un patrón puntillado a lo largo de las fibras de tubulina (Figura 33B).

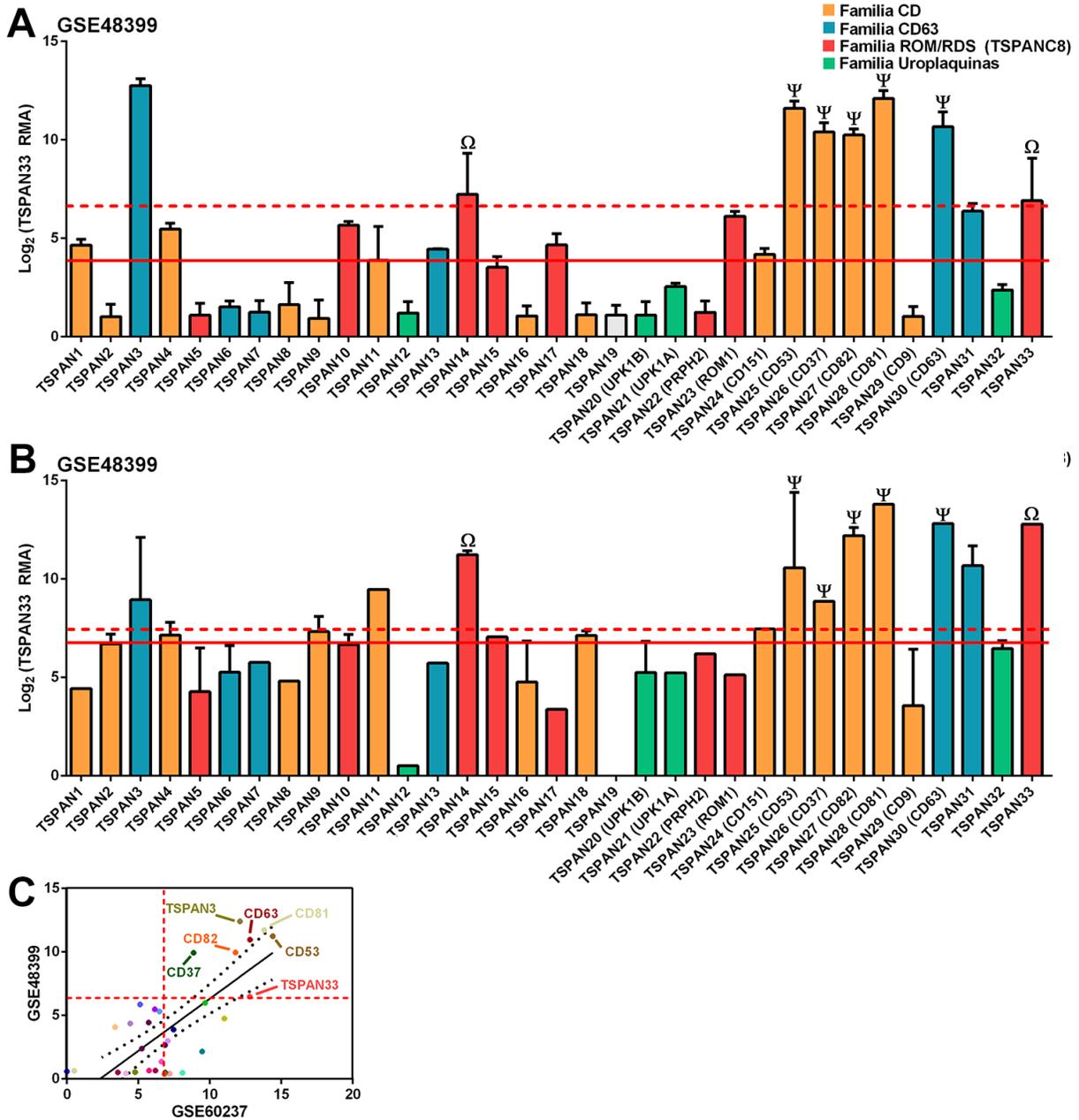


Figura 31. Expresión de tetraspaninas en la línea celular Raji. A/B. Niveles de expresión por microarreglos (GSE60327, n=2 y GSE48399, n=3) en la línea celular Raji. En el eje vertical se muestran los niveles de expresión según el Log₂ de la intensidad RMA; la línea recta marca la mediana de expresión global y la línea punteada al tercer cuartil. C. Correlación entre los datos de expresión de ambos estudios, cada punto representa a una tetraspanina. La línea punteada color rojo marca la mediana global de cada estudio; la línea recta color negro muestra la tendencia lineal de la correlación y las líneas punteadas adyacentes muestran el intervalo de confianza de la misma. Expresión mediante PCR de tetraspaninas en Pérez-Martínez et al. 2017 (Ω) y Ferrer et al. 1998 (Ψ).

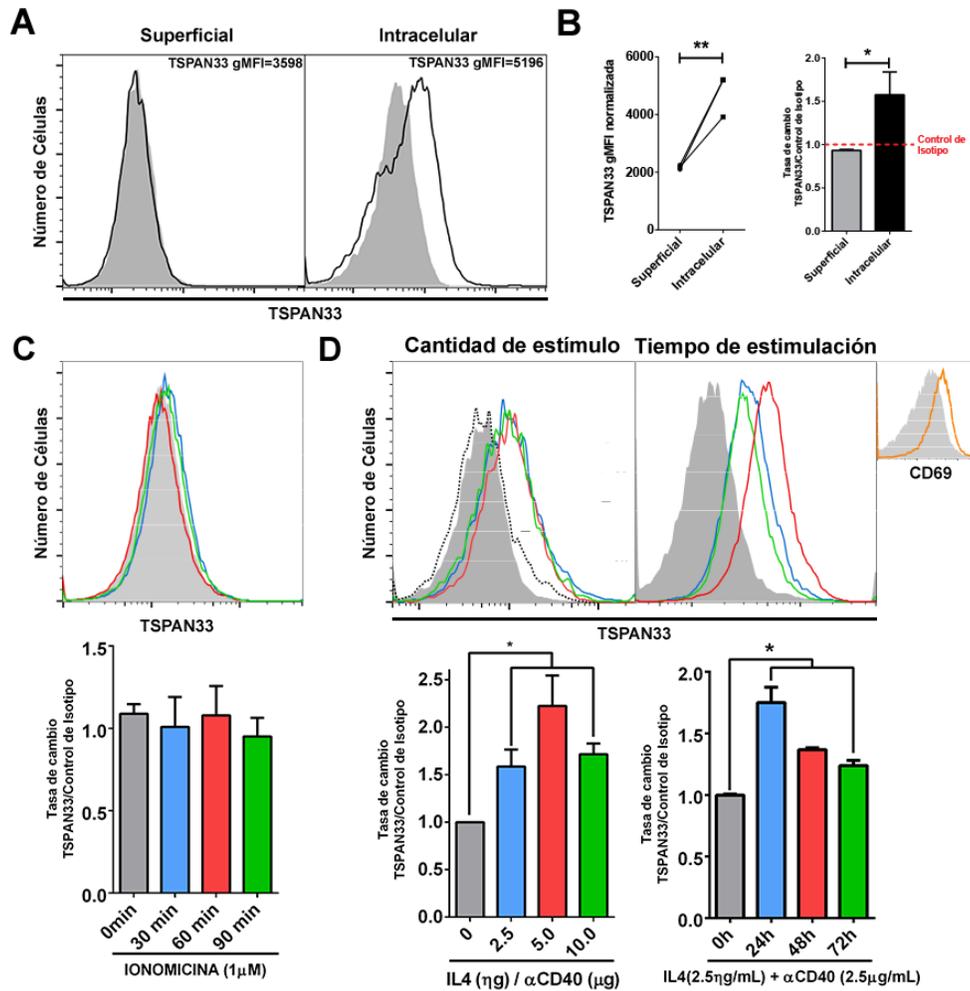


Figura 32. Distribución y cinética de expresión de TSPAN33 en células Raji. A. Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo de la distribución de TSPAN33 en células Raji, permeabilizadas o no con el detergente Tritón X100 y que posteriormente fueron teñidas con un anticuerpo monoclonal. Los histogramas grises corresponden al control de isotipo, el histograma negro a la tinción con anticuerpo y en la parte superior del recuadro se indica la gMFI. B. Comparación estadística de la gMFI normalizada a los controles de isotipo de los dos tratamientos (panel izquierdo) y de la tasa de cambio respecto al control de isotipo de ambos tratamientos (panel derecho). C. Cinética de expresión para TSPAN33 durante la estimulación de células Raji con ionomicina (1 μ M) durante 30 (azul), 50 (rojo) y 90 (verde) minutos y la comparación estadística respecto al control sin estimular (gris). D. Cinética de expresión para TSPAN33 durante la estimulación de células Raji con concentraciones (paneles izquierdos) de 2.5 (azul), 5.0 (rojo) y 10.0 (verde) ng/ μ g de IL4/ α CD40; así como en tiempos (paneles derechos) de 24 (azul), 48 (rojo) y 72 (verde) horas. En los paneles inferiores se muestran las comparaciones estadísticas respecto al control sin estimular (gris) y en el recuadro pequeño se muestra la expresión del control de activación CD69. * $p \leq 0.05$

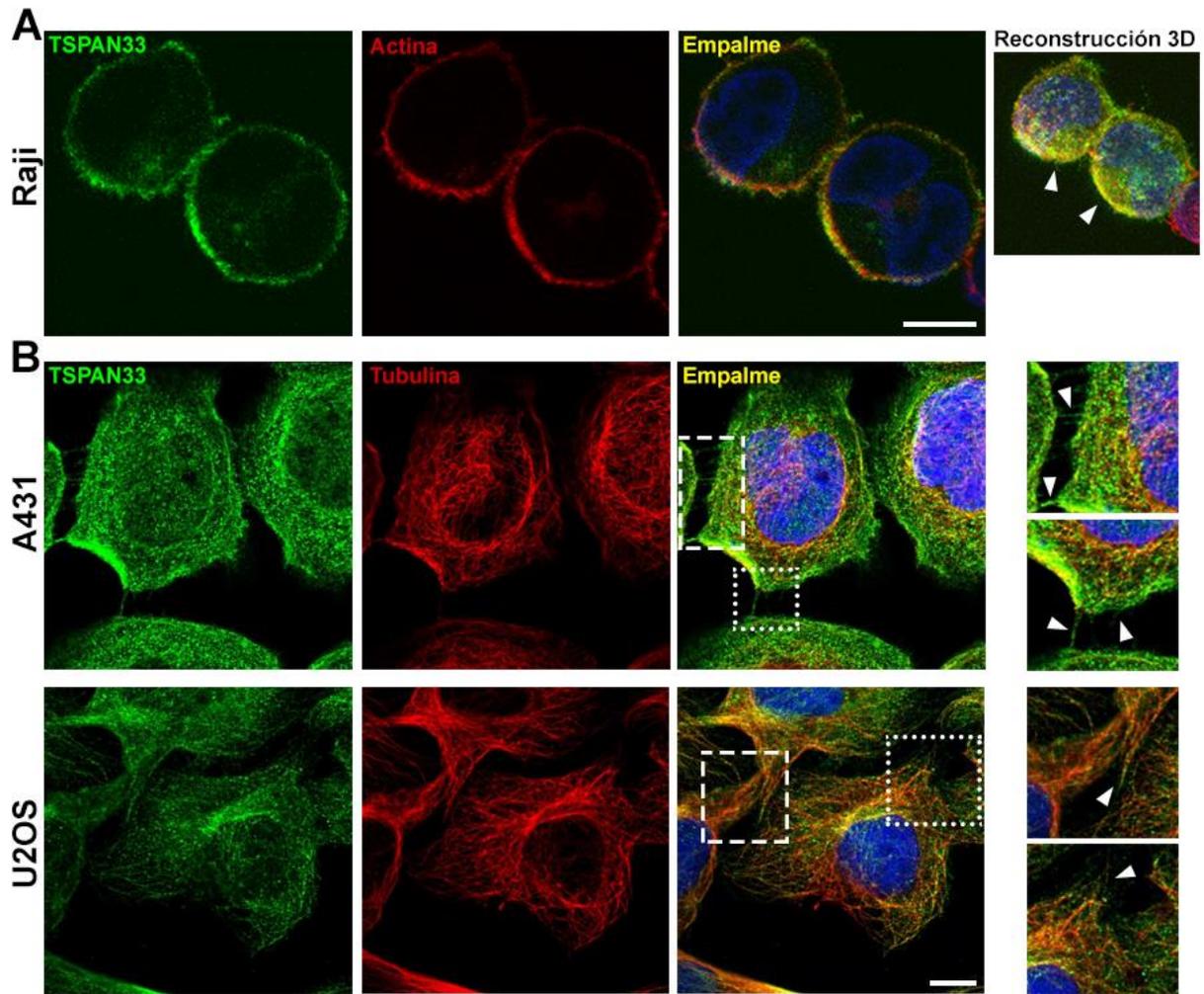


Figura 33. Distribución subcelular de TSPAN33 en linfocitos y células epiteliales. A. Imágenes representativas de células Raji transgénicas TSPAN33-EGFP (verde) teñidas con faloidina-rodamina (rojo) para detectar el citoesqueleto de actina y observadas mediante microscopia confocal. Los recuadros a la izquierda representan cortes individuales y los recuadros a la derecha muestran una reconstrucción tridimensional con múltiples cortes de las mismas células. B. Imágenes representativas obtenidas del HPA, de células epiteliales U2OS y A431 teñidas con un anticuerpo para TSPAN33 (verde) y tubulina (rojo). Los recuadros a la izquierda muestran los canales individuales y los recuadros a la derecha muestran acercamientos correspondientes a las áreas delimitadas con líneas punteadas.

7.1.3.3 TSPAN33 se asocia con los receptores NOTCH y la proteasa ADAM10 en la membrana plasmática

Para corroborar si existe una correlación a nivel transcripcional entre la expresión de TSPAN33 y NOTCH, los niveles de las moléculas fueron evaluados en las muestras líneas células del linfoma de Burkitt del CCLE y células primarias transformadas con EBV del GTex (Barretina et al. 2012; Ardlie et al. 2015). De forma correspondiente, en ambos casos fue posible detectar una correlación positiva entre la expresión de TSPAN33, con la de ADAM10, NOTCH1 y NOTCH4 (Figura 34D/E). Para confirmar la correlación entre la expresión de TSPAN33 y elementos NOTCH descrita previamente, los niveles de los receptores fueron evaluados en células Raji deficientes y transgénicas. De forma correspondiente, las células transgénicas mostraron mayores niveles de TSPAN33 en la superficie y también fue posible detectar una intensidad de TSPAN33 inferior a la del isotipo en células deficientes (Figura 34A/C). Asimismo, fueron detectados mayores niveles superficiales de ADAM10 en células transgénicas, pero sin una disminución detectable en células deficientes. Sin embargo, al evaluar los niveles totales de ADAM10 en células knock-down por western blot, fue observada una disminución en la forma madura de la enzima (Figura 34B). Por otro lado, al evaluar los niveles superficiales del receptor NOTCH1 fue posible detectar un aumento mínimo en los niveles del receptor en células transgénicas, así como una disminución en células deficientes. Respecto a NOTCH2, fue detectado un aumento en ambos modelos celulares, particularmente, en células deficientes para TSPAN33. Además, los niveles superficiales de NOTCH4 se encuentran aumentados en células transgénicas. La asociación física de TSPAN33 con los receptores NOTCH, fue evaluada por inmunofluorescencia en células transgénicas teñidas con anticuerpos contra los receptores NOTCH1 y NOTCH2. En células incubadas con los anticuerpos en frío, es posible detectar un patrón puntillado similar al de TSPAN33 para ambos receptores NOTCH, pero sin observar colocalización significativa en ambos casos (Figura 35A/B). Sin embargo, al inducir la aglutinación de moléculas mediante la incubación de los anticuerpos a mayor temperatura, fue posible inducir la polarización de NOTCH a un extremo de las células, junto a una porción de TSPAN33-EGFP que colocaliza con la señal de los receptores (Figura 35A/B).

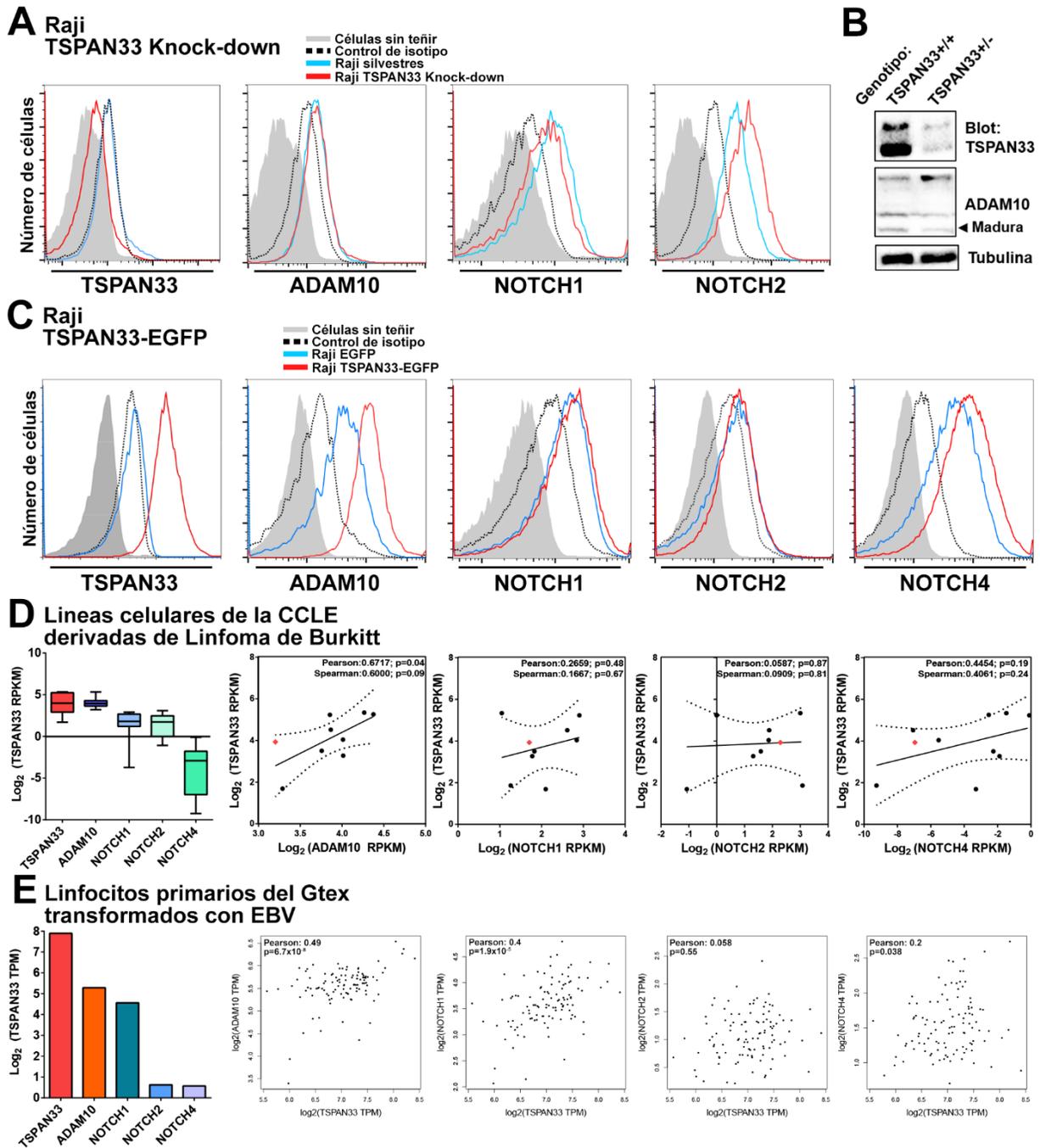


Figura 34. TSPAN33 regula los niveles de expresión de los receptores NOTCH en células Raji. Evaluación de la expresión de TSPAN33, ADAM10, NOTCH1, NOTCH2 y NOTCH4 mediante citometría de flujo en células Raji deficientes (A) y transgénicas (C) para TSPAN33. B. Evaluación de la expresión de TSPAN33 y ADAM10 mediante Western-blot en células silvestres o deficientes para TSPAN33. La expresión de tubulina fue utilizada como control de carga. D/E. Expresión de las moléculas mencionadas anteriormente, analizada por RNAseq en líneas celulares de linfoma de Burkitt de la CCLE (D) y en linfocitos transformados con EBV del Gtex (E). En los recuadros se muestran las correlaciones entre TSPAN33 y las moléculas analizadas, al interior se indican los valores del índice de correlación de Pearson o Spearman según corresponda, así como el valor estadístico de cada uno. Cada punto representa una línea celular o muestra primaria en cada base de datos, la línea recta representa la tendencia lineal de la correlación y las líneas punteadas el intervalo de confianza de la misma.

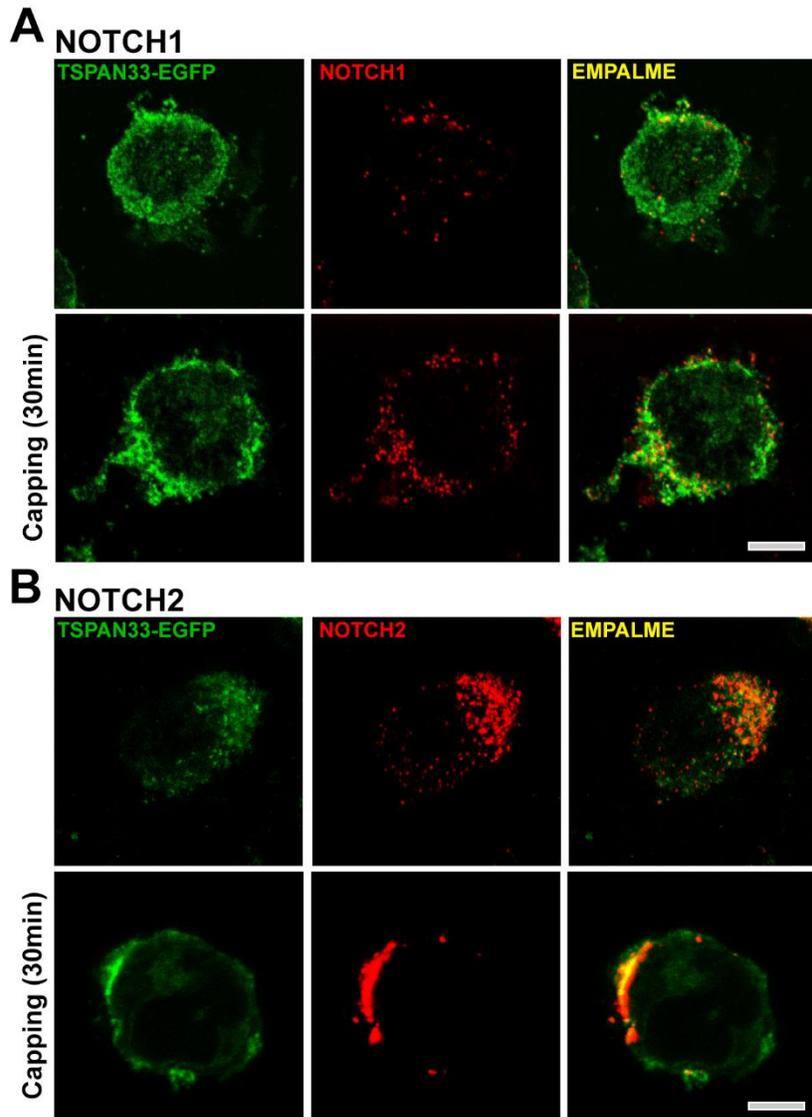


Figura 35. TSPAN33 interactúa con los receptores NOTCH en la membrana plasmática. Imágenes representativas de cortes individuales de células Raji transgénicas TSPAN33-EGFP (verde) teñidas con anticuerpos contra los receptores NOTCH1 (A, rojo) y NOTCH2 (B, rojo). Las tinciones fueron realizadas con células incubadas en frío (paneles superiores) durante todo el proceso o 37°C durante 30min para inducir la aglutinación de las moléculas y fueron observadas mediante microscopia confocal.

7.1.3.4 TSPAN33 inhibe parcialmente la proliferación, induce un arresto de ciclo celular y la formación de células gigantes multinucleadas.

NOTCH se encuentra estrechamente asociado a procesos de proliferación y diferenciación en una gran variedad de tejidos, incluyendo poblaciones linfocitarias tipo B y T (Radtke et al. 2004). La capacidad proliferativa de células transgénicas para TSPAN33 fue evaluada durante 24 y 48h mediante tres técnicas distintas incluyendo: degradación de sales de tetrazolio (WST-1), dilución de colorante (eFluor670) y análisis de impedancia celular en tiempo real (RTCA). En todos los casos, fue detectada una deficiencia significativa en la proliferación de células transgénicas para TSPAN33, respecto al control. En primer lugar, al evaluar la capacidad proliferativa de estas células en suspensión, hay una disminución significativa en la degradación del sustrato WST-1 desde las 24h y hasta las 48h en cultivo (Figura 36A). Asimismo, es posible detectar una mayor intensidad de señal del colorante de proliferación eFluor670 en células transgénicas tras 48h de cultivo, es decir, una menor dilución respecto al control (Figura 36B). Del mismo modo, al evaluar la capacidad proliferativa en tiempo real y en presencia de componentes de la matriz extracelular, fue detectado un defecto en la proliferación y adhesión de células transgénicas para TSPAN33 en los tres sustratos aplicados (gelatina, fibronectina, laminina) (Figura 36C). Para profundizar sobre el defecto proliferativo generado por la expresión estable de TSPAN33, el ciclo celular de estas células fue evaluado mediante el análisis de ADN total utilizando el intercalante lineal TO-PRO3. De forma interesante, las células transgénicas para TSPAN33 presentan una acumulación en las fases G₂M respecto al control de expresión (Figura 37).

Finalmente, otra observación realizada en células transgénicas para TSPAN33, es la presencia de células gigantes multinucleadas. En este sentido, al observar las células transgénicas mediante microscopía confocal, es posible observar núcleos multi lobulados en células con tamaño $\geq 25\mu\text{m}$, comparados con otros núcleos en células adyacentes y morfología regular (Figura 38A). De forma correspondiente, al comparar el tamaño mediante análisis de campos aleatorios, fue detectado un aumento en el área ocupada por las células transgénicas ($187.3\text{-}230.8\mu\text{m}^2$) con respecto a las células control ($159.3\text{-}170.2\mu\text{m}^2$) (Figura 38B).

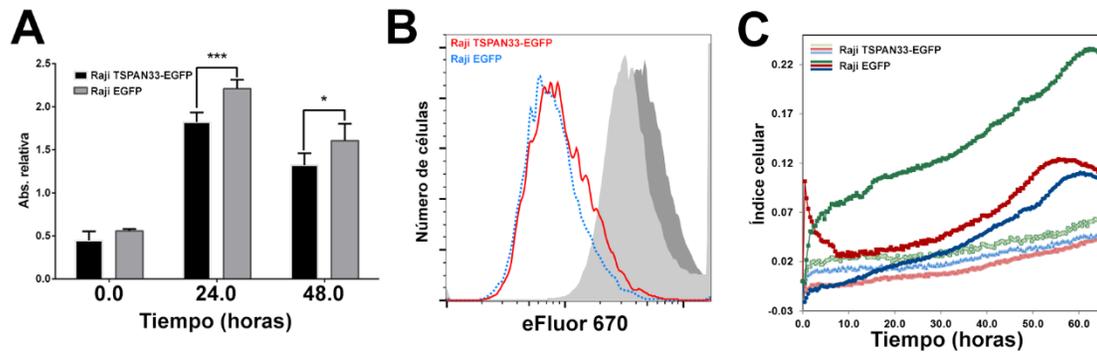


Figura 36. La presencia de TSPAN33 en la membrana inhibe la proliferación celular. La capacidad proliferativa de células Raji transgénicas TSPAN33-EGFP fue evaluada la degradación de WST-1 analizada por espectrofotometría (A), la dilución de colorante eFluor670 después de 72h analizada por citometría de flujo (B) y análisis cambios de impedancia analizados por RTCA (C). La proliferación fue evaluada en células en suspensión (A/B); así como adheridas sobre laminina (azul), fibronectina (rojo) o laminina (C). En los ejes verticales se muestran los valores de proliferación relativos a cada método, en el caso de la citometría de flujo, la intensidad de fluorescencia del colorante se muestra en el eje horizontal.

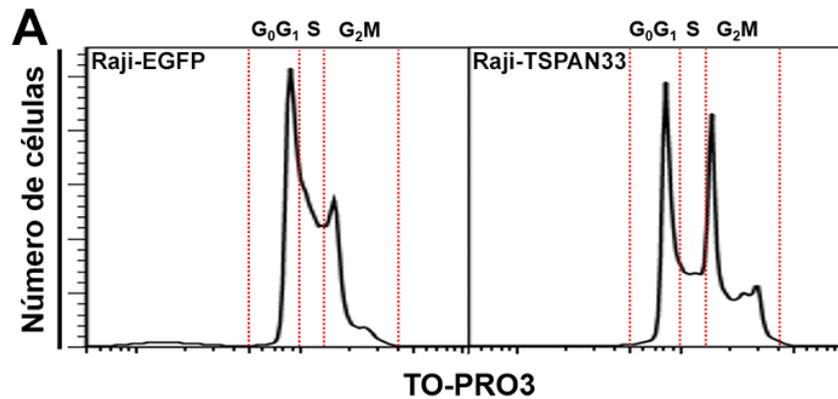


Figura 37. La expresión transgénica de TSPAN33 induce un arresto en la fase G2M del ciclo celular. La cantidad de material genético fue analizada por citometría de flujo mediante la tinción con el intercalante TO-PRO3, en células transgénicas de TSPAN33-EGFP (panel derecho) o en controles de expresión EGFP (panel izquierdo). En el eje horizontal se muestran los niveles de intensidad de fluorescencia del colorante y las líneas punteadas de color rojo delimitan las fases G₀G₁ (2n), S (2n+) y G₂M (4n+).

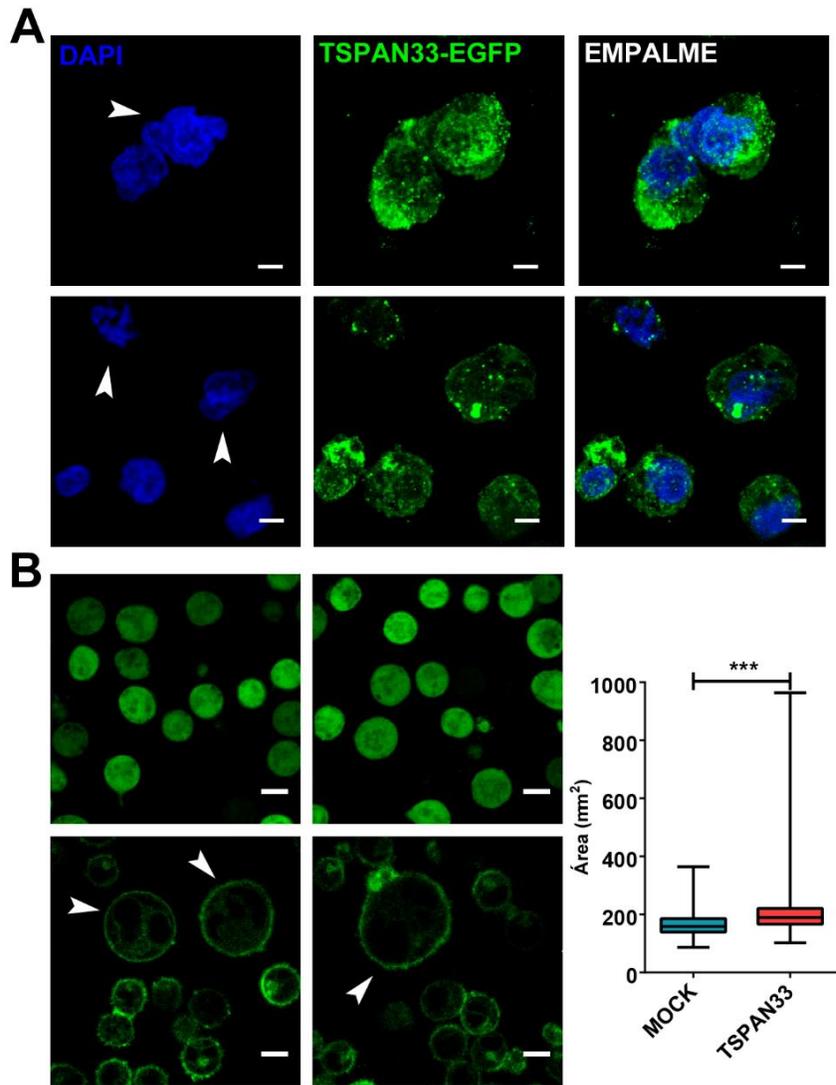


Figura 38. La expresión transgénica de TSPAN33 induce la formación de células gigantes multinucleadas. A. Morfología nuclear alterada de células Raji transgénicas para TSPAN33-EGFP, las imágenes muestran reconstrucciones tridimensionales realizadas por microscopía confocal. Las flechas indican la presencia de núcleos fragmentados o multilobulados de $>25\mu\text{m}$ de tamaño. B. Comparación estadística ($n=1000$ células) del tamaño mediante la medición del área en μm^2 en campos aleatorios observados por microscopía confocal. *** $p \leq 0.001$

7.1.4 Expresión de TSPAN33 en biopsias registradas en el HPA

7.1.4.1 Linfomas

Para corroborar y brindar más información sobre las observaciones realizadas previamente, la presencia de TSPAN33 como proteína fue evaluada mediante el re análisis de inmunohistoquímicas de linfomas registrados en el HPA. Es importante señalar que, los linfomas únicamente son clasificados en dos categorías: linfoma de Hodgkin o no Hodgkin. Lo anterior debido a que, para realizar una categorización más detallada, se requiere la evaluación de otros marcadores celulares que permiten la discriminación de subtipos (e.g. translocación de Myc en linfoma de Burkitt). Sin embargo, al analizar la distribución de TSPAN33 en estas muestras, es posible observarla en todas las muestras analizadas. En el caso de linfomas no Hodgkin, TSPAN33 se localiza en focos donde se observan linfocitos con morfología elongada e irregular, particularmente algunas células gigantes multinucleadas (Figura 39A). De forma interesante, los núcleos de estos linfocitos presentan la predominancia de núcleos con eucromatina en comparación con células neoplásicas adyacentes (Figura 39B). En biopsias de linfoma de Hodgkin, TSPAN33 se localiza en linfocitos adyacentes a las células de Reed-Sternberg (Figura 39A). La distribución subcelular en estos linfocitos es similar a la anterior, incluyendo el citoplasma y la membrana plasmática, pero sin detectar la presencia de células gigantes multinucleadas (Figura 39B).

7.1.4.2 Carcinoma renal

Las muestras primarias de carcinoma renal registradas en el HPA también fueron re analizadas, detectando un patrón particular en las células neoplásicas. Además de ser expresada por prácticamente todas las células tumorales, TSPAN33 presenta una distribución basolateral en la periferia celular, particularmente en las uniones intercelulares (Figura 40A/B). Además, en algunos casos fueron detectadas células con presencia citoplásmica de la proteína (Figura 40B). Las células tumorales presentan una morfología irregular típica, sin identificar alteraciones particulares en células que expresan TSPAN33.

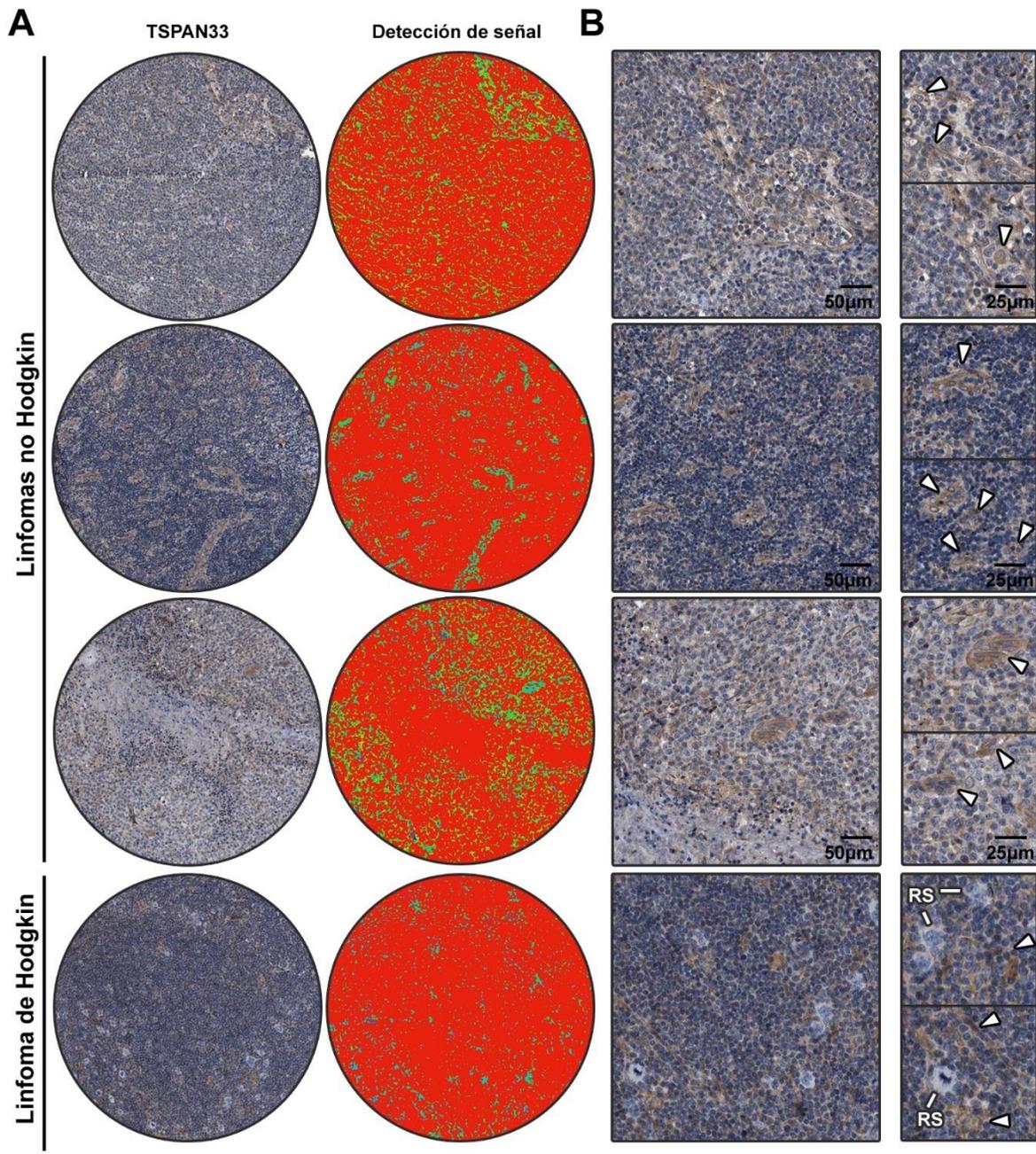


Figura 39. Distribución de TSPAN33 en linfomas de células B. Expresión de la proteína TSPAN33 en biopsias primarias de linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, revelada con tinciones por inmunohistoquímica y disponibles al público en el HPA (<https://www.proteinatlas.org/>). En los paneles de la izquierda (A) se muestra un campo panorámico y a la derecha la detección de señal correspondiente, realizada con el software ImageJ (NIH). En los paneles de la derecha (B) se muestran acercamientos en diferentes regiones de la biopsia. Las cabezas de flecha indican células positivas para TSPAN33. RS, células de Reed-Sternberg.

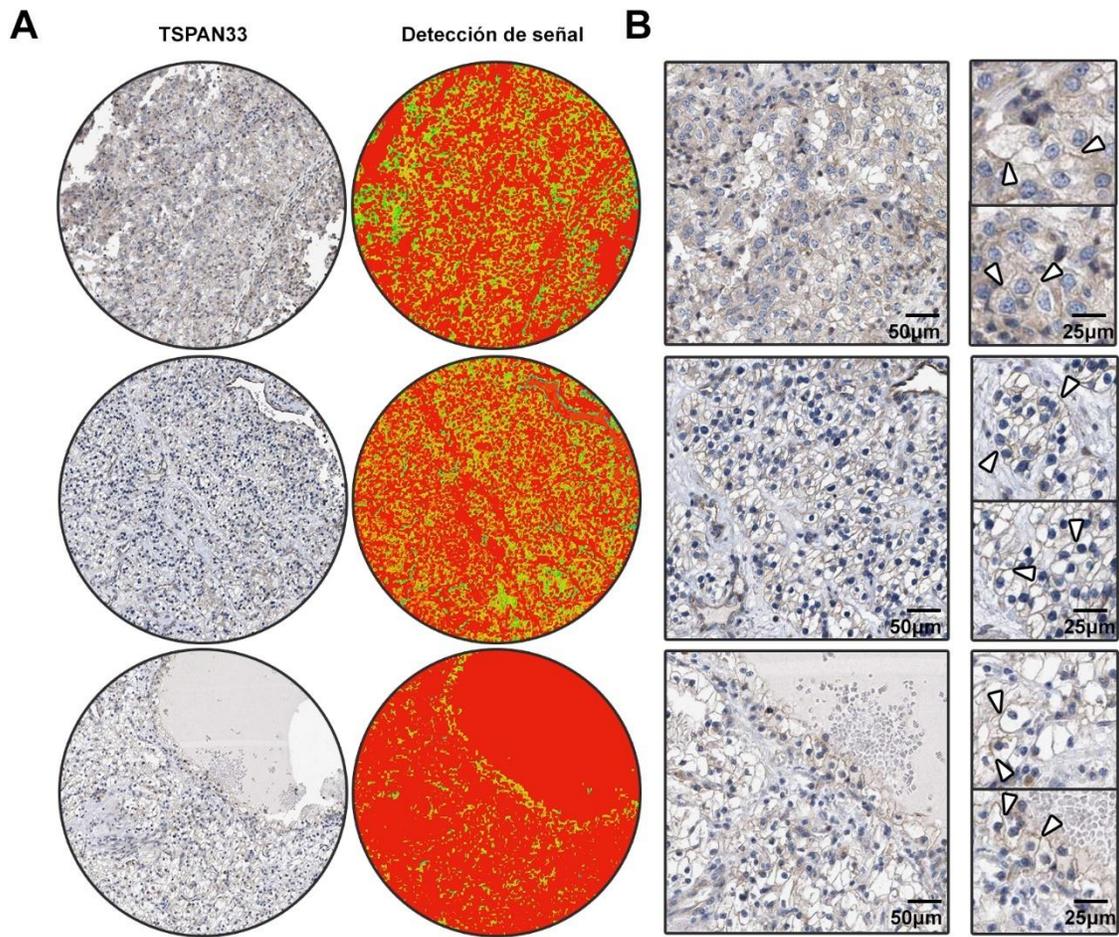


Figura 40. Distribución de TSPAN33 en carcinomas renales. Expresión de la proteína TSPAN33 en biopsias primarias de carcinomas renales sin clasificar, revelada con tinciones por inmunohistoquímica y disponibles al público en el HPA (<https://www.proteinatlas.org/>). En los paneles de la izquierda (A) se muestra un campo panorámico y a la derecha la detección de señal correspondiente, realizada con el software ImageJ (NIH). En los paneles de la derecha (B) se muestran acercamientos en diferentes regiones de la biopsia. Las cabezas de flecha indican células positivas para TSPAN33.

7.2 DISCUSIÓN

7.2.1 TSPAN33 en tejidos normales

Las primeras tetraspaninas fueron descubiertas en los años 90 y descritas originalmente como antígenos tumorales y leucocitarios, con la función de “facilitadores moleculares” capaces de agrupar proteínas específicas dentro de microdominios en las membranas. Todas las células inmunes expresan tetraspaninas, sin embargo, algunos miembros de la familia presentan patrones restringidos a linajes específicos (Barrena et al. 2005; Zuidsherwoude et al. 2017). De acuerdo a los resultados reportados en este trabajo, la expresión de TSPAN33 es detectada principalmente en glándulas endocrinas, tejidos linfoides, riñones y testículos. De forma correspondiente, el primer estudio que describe a TSPAN33 en ratones, detectó la expresión en: testículos, riñón, cerebro, hígado, bazo y la fracción Ter119+ en médula ósea (Heikens et al. 2007). Como se mencionó anteriormente, existen evidencias de varios grupos de investigación que muestran a TSPAN33, como un marcador de activación en células hematopoyéticas de varios mamíferos y peces teleósteos (Priyathilaka et al. 2017; Osvaldova et al. 2017; Ruiz-García et al. 2016). De la misma forma, otros estudios paralelos también han detectado la expresión de TSPAN33 en riñones y testículos de humano (Sohni et al. 2019; Guo et al. 2018; Luu et al. 2013). Por lo tanto, la información de las bases de datos analizadas concuerda con las evidencias publicadas anteriormente, validando su uso en los análisis posteriores.

Mediante la evaluación de datos de microarreglos generados en distintos trabajos enfocados al estudio de linfocitos B, fue posible detectar un perfil particular durante diferentes estadios de maduración. De acuerdo con esto, TSPAN33 es expresada de forma progresiva durante la maduración de linfocitos circulantes (transicionales > memoria). En contraste con la información publicada sobre linfocitos B de humano en sangre periférica, los datos en este estudio muestran que las células vírgenes (naive) expresan niveles abundantes de TSPAN33. De acuerdo con esta observación, datos por microarreglos del “Atlas de Células Primarias” (Mabbott et al. 2013) y RNA-seq de la “Base de datos de Expresión Epigénómica y QTLs en Células Inmunes” (Schmiedel et al. 2018), muestran que TSPAN33 se expresa en este subtipo de linfocitos B. La

discrepancia observada entre los datos analizados en este estudio y los publicados previamente, podría ser atribuida a los marcadores utilizados durante la separación celular en ambos estudios (Clavarino et al. 2016; Palanichamy et al. 2009). Por otro lado, también fue posible confirmar el patrón ya reportado en linfocitos de memoria; así como la observación de que la activación promueve la expresión de TSPAN33 (Luu et al. 2013; Pérez-Martínez et al. 2017). Siguiendo lo mencionado en la sección anterior, respecto a la posible función de TSPAN33 en linfocitos B a través de su asociación con ADAM10, hay evidencias que involucran a la proteasa con la activación, producción de anticuerpos, así como la diferenciación de linfocitos B maduros y células plasmáticas (Chaimowitz et al. 2011, 2012). De forma particularmente interesante, los ratones con deficiencia condicional de ADAM10, a los 3 meses de edad recapitulan el fenotipo de ratones sin la expresión de TSPAN33, incluyendo: hepatoesplenomegalia, eritropoyesis extramedular, presencia de megacariocitos y supresión de linfocitos B maduros en el bazo, entre otras poblaciones leucocitarias (Heikens et al. 2007; Weber et al. 2013). Además, la expresión transgénica de ADAM10 también inhibe el desarrollo de linfocitos B y promueve linajes mieloides (Gibb et al. 2011). En conjunto, estas evidencias sugieren que ADAM10 ejerce algunas de sus funciones a través de un balance en la modulación de su actividad y/o afinidad por diferentes sustratos, lo que a su vez regula otras vías de señalización. En cuanto a esto, también se ha identificado un papel regulatorio para la vía NOTCH en respuestas humorales (Thomas et al. 2007; Santos et al. 2007; Kang, Kim y Park 2014). Además, un reporte reciente describió que TSPAN33 activa la vía NOTCH y NFκB a través de ADAM10, en macrófagos estimulados con LPS/IFNγ (Ruiz-García et al. 2016). De acuerdo con esto, los datos en este trabajo también muestran a TSPAN33 en macrófagos alveolares. La producción de anticuerpos durante las respuestas inmunes, depende principalmente de la formación de centros germinales en órganos linfoides secundarios (Basso y Dalla-favera 2015). El mantenimiento de estas estructuras es regulado por ADAM10 en linfocitos B, a través del procesamiento de varios sustratos, incluyendo: TNFα, ICOSL, TACI, BAFFR y NOTCH (Arduise et al. 2008; Yoon et al. 2009; Lownik et al. 2017; Smulski et al. 2017; Lownik et al. 2019). En relación a NOTCH, la reacción de centro germinal es promovida indirectamente por esta vía, mediante células

dendríticas foliculares que expresan ligandos como DLL1 en los centros germinales y Jag1 en la zona marginal; que a su vez, inhiben la apoptosis y modulan la diferenciación a células plasmáticas (Santos et al. 2007; Yoon et al. 2009; Chaimowitz et al. 2011; Fasnacht et al. 2014). De forma correspondiente, los datos de secuenciación e inmunohistoquímica aquí descritos, muestran a TSPAN33 en algunos linfocitos de la zona clara en centros germinales del bazo, nódulos linfáticos y amígdalas. Simultáneamente, también es posible detectar a la proteína con el mismo patrón en centros germinales del apéndice y placas de Peyer en el colón (datos no mostrados). Al igual que TSPAN33, otras tetraspaninas también son expresadas en centros germinales y regulan diferentes eventos bioquímicos relacionados a la función de esta subestructura anatómica. En este sentido, CD81 ha sido descrito como un marcador general de linfocitos B, con mayor expresión en centros germinales y un patrón de distribución similar al observado para TSPAN33 en órganos linfoides (Luo et al. 2010). Por otro lado, la expresión transitoria de CD9 ha sido identificada como marcador de centrocitos y análisis funcionales sugieren que cumple la función de promover las interacciones con células dendríticas foliculares en la zona clara, mediante la regulación de integrinas $\beta 1$ (Yoon et al. 2014). Asimismo, CD63 en sinergia con IL21 inhibe la migración hacia la zona oscura mediante la endocitosis de CXCR4 en linfocitos B activados (Yoshida et al. 2011). Finalmente, CD37 está implicada en la vías de señalización de Akt y PI3K dependientes de la integrina $\alpha 4\beta 1$, al asociarse físicamente y modular la fosforilación de estas moléculas en linfocitos B (Beckwith, Byrd y Muthusamy 2015). Acorde con esto, datos no publicados de nuestro grupo de investigación muestran que, a través de un mecanismo no descrito, la expresión transgénica de TSPAN33 inhibe la expresión superficial de esta integrina e induce la de CD9, CD63 y CD81. Aparte de los centros germinales, también es posible observar a TSPAN33 en algunas células de la zona marginal adyacente. En relación a esto, existen evidencias claras de que la diferenciación de este subtipo de linfocitos B depende del procesamiento proteolítico de NOTCH2 y CD23 mediado por ADAM10 (Saito et al. 2003; Gibb et al. 2010; Descatoire et al. 2014). A la vez, estos receptores señalizan junto con el GPCR Gqi, así como, los factores de transcripción Fos y Taok3 (Iwahashi et al. 2012; Hammad et al. 2017; Hwang et al. 2018). Aunado a esto, análisis

bioinformáticos recientes de dos grupos independientes, identificaron la expresión de TSPAN15 (miembro C8) en esta subpoblación y bajo el programa transcripcional de la proteína de unión a RNA ZFP36L1 (Mabbott y Gray 2014; Newman et al. 2017). Simultáneamente, CD9 también ha sido descrito como un marcador expresado en este subtipo de linfocitos (Won y Kearney 2002; Kin et al. 2008). Por otro lado, los datos de microarreglos analizados en este trabajo también muestran que independientemente de la estimulación, los linfocitos B productores de IL10 en sangre periférica expresan niveles bajos de TSPAN33. En cuanto a esto, datos no publicados de nuestro grupo también han demostrado que la expresión transgénica de TSPAN33 en Raji (línea productora de IL10), disminuye significativamente los niveles en sobrenadantes de cultivo (Benjamin, Knobloch y Dayton 1992; Mansour et al. 2004). Asimismo, existen varios reportes que identifican la expresión diferencial de otras tetraspaninas en poblaciones reguladoras, incluyendo a CD9 como marcador positivo y CD37 como marcador negativo (Van De Veen et al. 2013; Sun et al. 2015; Brosseau et al. 2018). En el presente trabajo, las poblaciones de células productoras de IL10 analizada cumplen con ambos criterios, confirmando la firma de tetraspaninas e incluyendo a TSPAN33 como un marcador negativo de la misma. De forma interesante, la producción de IL10 es regulada por vías no-canónicas de NOTCH, durante la activación de células inmunes. En células dendríticas y macrófagos, la producción de la interleucina es promovida mediante un mecanismo NOTCH no canónico, dependiente de señales por TLR, PI3K y NFκB (p50) (Q. Zhang et al. 2012; Gentle et al. 2012; Wongchana et al. 2018). Mientras que, en linfocitos Th1 la producción mediada por NOTCH, depende del factor de transcripción STAT4 (Rutz et al. 2008). En conclusión, los datos reportados en este trabajo muestran que TSPAN33 no es expresada de forma homogénea y abundante por linfocitos B; por el contrario, el patrón de expresión al igual que el de otras tetraspaninas, parece atender a eventos específicos de activación y diferenciación en estas células. Asimismo, las observaciones realizadas representan las primeras evidencias registradas de esta proteína en células embebidas en tejidos linfoides, así como en células B de centros germinales, aportando más información sobre su posible función en estos linfocitos y

las implicaciones de su utilización como blanco terapéutico para el tratamiento tanto de linfomas como leucemias.

La expresión de TSPAN33 en tejido renal fue reportada simultáneamente con la de linfocitos B activados; pero a la fecha no existe información detallada sobre su expresión durante el desarrollo y homeostasis de este tejido (Luu et al. 2013). Según el estudio anterior, los análisis por inmunohistoquímica en riñones de humano, muestran a TSPAN33 restringida a los tubos contorneados (distales y proximales) y los conductos colectores. Sin embargo, los datos en este trabajo muestran que además de encontrarse en estas estructuras, TSPAN33 también se localiza en podocitos glomerulares. En este sentido, es posible detectar la expresión homogénea de TSPAN33 al secuenciar el transcriptoma de biopsias de regiones anatómicas provenientes de riñones de adulto. Por otro lado, al evaluar la expresión en datos de scRNA-seq en células derivadas de riñones fetales de humano, fue posible confirmar la expresión de TSPAN33 en los conductos colectores, tubos contorneados y podocitos glomerulares; con expresión particular en los precursores de estas células. En relación a la embriogénesis renal, NOTCH junto con la activación coordinada de PI3K y Wnt4, juegan un papel esencial durante el establecimiento de la mesénquima metanéfrica, epitelio de donde se derivan los tubos contorneados y podocitos glomerulares (Cheng et al. 2007; Fujimura et al. 2010; Wang et al. 2018). Por otro lado, NOTCH también juega un papel importante en la segmentación de los conductos colectores. Particularmente, NOTCH2 participa en la diferenciación y mantenimiento de células principales (AQP2+), a través de interacciones con el ligando JAG1 presente en la superficie de las células intercaladas (ATPasa-H⁺) (Jeong et al. 2009; Chen et al. 2017; Mukherjee et al. 2018). En concordancia, ADAM10 también juega un papel importante en la diferenciación de estas estructuras a través de NOTCH y otros sustratos aún pendientes de identificar (Guo et al. 2015). De acuerdo con lo anterior, un estudio reciente describió que TSPAN33 forma un complejo supramolecular, para anclar a ADAM10 en las regiones apicales de uniones adherentes (zona occludens), formadas por células de conducto colector de riñón y otros tipos de células epiteliales (Shah et al. 2018). La esencialidad de ADAM10 para el mantenimiento y función de uniones adherentes es evidente desde la gastrulación durante el desarrollo embrionario de

mamíferos y nemátodos (Kwon et al. 2016; L. Wang et al. 2017). Además, esta proteasa es expresada en las microvellosidades del borde en cepillo de las células de los tubos proximales y a través de un mecanismo desconocido, regula la expresión de moléculas como NHE3 una bomba Na^+/H^+ y el receptor de nutrientes LRP2 (Cong, Li y Biemesderfer 2011). De igual modo, esta proteasa es expresada y secretada abundantemente por los podocitos glomerulares durante su maduración y regula el procesamiento de la molécula de adhesión L1 (Gutwein et al. 2010). Asimismo, un estudio de transcriptómica y proteómica hecho en podocitos aislados por FACS, identificó a las tetraspaninas como elementos integrales evolutivamente conservado en este tipo celular. En particular, describen la implicación de la tetraspanina TSP86d (ortólogo de las TSPAN8 en vertebrados), para la formación de procesos podocitarios en nefrocitos de *D. melanogaster* (Rinschen et al. 2018). En conjunto, los resultados y evidencias revisadas muestran que TSPAN33 es expresada de forma abundante en los riñones y por su patrón de expresión, podría estar implicada en la regulación de la diferenciación y mantenimiento de este tejido. Lo anterior, igual mediante su asociación con ADAM10 y la modulación del procesamiento de distintos sustratos en las membranas; así como las vías de señalización reguladas por este fenómeno.

Otro sitio anatómico donde es posible observar una expresión marcada de TSPAN33, es en los conductos seminíferos de los testículos. En relación a esto, dos estudios enfocados a describir los genes y vías de señalización asociadas a la espermatogénesis en humanos, describieron a TSPAN33 como un marcador en espermatogonias troncales (Guo et al. 2018; Sohni et al. 2019). Además, el desarrollo de las espermatogonias depende de la formación de complejos entre integrinas $\beta 1$ y diferentes miembros de las proteasas ADAM (Tres y Kierszenbaum 2005). En particular, ADAM10 es expresada de forma homogénea en los conductos seminíferos de rata y es un marcador de apoptosis en espermatogonias de ratón (Ryser et al. 2011; Lizama, Ludwig y Moreno 2011; Lizama et al. 2012; Urriola-Muñoz et al. 2014). Asimismo, los receptores y ligandos de la vía NOTCH son expresados diferencialmente durante la espermatogénesis en todos los tipos celulares, incluyendo: células de Sertoli, células de Leydig, espermatogonias y espermatocitos (Dirami et al. 2001; Murta et al. 2013). En este sentido, el balance en la activación de NOTCH regula la

diferenciación de las espermatogonias en la membrana basal de los conductos seminíferos y su ausencia está asociada a infertilidad en pacientes por un arresto en la maduración (Hayashi et al. 2001). Asimismo, la inhibición de NOTCH mediante moléculas sintéticas o anticuerpos, altera la diferenciación de las espermatogonias (Dirami et al. 2001; Murta et al. 2014). Simultáneamente, diferentes estudios han identificado un circuito de retroalimentación positiva dada por NOTCH entre las espermatogonias en desarrollo y las células de Sertoli, las cuales emiten señales que promueven la diferenciación o mantenimiento de las células germinales en el conducto seminífero (Garcia y Hofmann 2013; Sohni et al. 2019). En conjunto, las afirmaciones anteriores muestran que la presencia de TSPAN33 en este tejido también podría estar asociada a la regulación de NOTCH mediante la modulación de la actividad de ADAM10 en estas células. Sin embargo, es importante señalar que los ratones deficientes para TSPAN33 reportados previamente, eran viables y fértiles, lo que sugiere que esta molécula no es esencial para el desarrollo espermatogénico (Heikens et al. 2007).

Por último, todas las observaciones realizadas en tejidos normales mediante diferentes análisis bioinformáticos, son de gran relevancia, ya que podrían representar una fuente de efectos secundarios no deseados (e.g. glomerulonefritis, infertilidad inmunológica), durante aplicaciones terapéuticas basadas en anticuerpos contra TSPAN33, como lo proponen las tres patentes publicadas anteriormente (Flores-Gutiérrez, Zlotnik y Yamanaka 2014; Sukhatme y Husain 2016; Tsai 2018).

7.2.2 TSPAN33 en tumores

El cáncer es considerado una patología que resulta de una serie de interacciones complejas entre factores genéticos y ambientales. A la vez, estos eventos pueden desencadenar una serie de cambios fisiológicos y moleculares que pueden resultar en la muerte o transformación maligna de una o varias células. La caracterización de estos cambios a través de la genotipificación de alteraciones genéticas y la fenotipificación de marcadores moleculares, ha permitido la identificación del origen celular de los tumores, y algunas de estas alteraciones son explotadas para el diseño de tratamientos específicos para estas patologías. En este sentido, desde hace más de

tres décadas la descripción cualitativa y cuantitativa de proteínas de membrana, ha sido uno de los principales abordajes para la clasificación molecular de subtipos de linfoma más allá de sus características histológicas y su posterior asociación con estadios de maduración en células B normales (Anderson, Pinkus y Nadler 1984). Por esta razón, las tetraspaninas han sido blancos atractivos para la caracterización de tumores en general. También sus niveles de expresión han sido relacionados con la prognosis de la enfermedad y son investigadas ampliamente como blancos terapéuticos (Lazo 2007). En cuanto a esto, desde 1998 a la fecha se han registrado más de 1000 patentes relacionadas al término “tetraspanina”, con aplicaciones para diagnóstico patológico, tratamientos terapéuticos y estéticos, así como de aplicación industrial y agropecuaria.

En leucemias y linfomas derivados de células B, ha sido establecida una firma molecular basada en tetraspaninas (CD9, CD37, CD53, CD63 y CD81) para la identificación de subtipos de neoplasias, así como la asociación con estadios de maduración normales (Ferrer, Yunta y Lazo 1998; Barrena et al. 2005). En esta tesis se describe la expresión de TSPAN33 mediante un abordaje integral (transcriptómico y proteómico), en cohortes de tumores primarios, así como de líneas celulares registradas en bases de datos públicas y que abarcan a los 36 tipos principales de tumores en humanos (Pontén et al. 2011; Barretina et al. 2012; Domcke et al. 2013; Ardlie et al. 2015; Tang et al. 2017; Bray et al. 2018). De acuerdo con los datos de tejidos normales revisados previamente y en comparación con otros tipos de tumores, TSPAN33 presenta mayor expresión en carcinomas renales y de linfocitos B. En relación a esto, un estudio previo de nuestro grupo de investigación reportó que, la expresión de TSPAN33 en linfomas era comparable a la de CD20 (MS4A1), un marcador general de linfocitos B (Luu et al. 2013). De igual forma, los datos en este trabajo muestran que la expresión combinada de TSPAN33 y CD19 (B4) permiten la discriminación específica de linfomas y leucemias de linfocitos B entre otros tipos de neoplasias. Además, según datos de RNA-seq de biopsias de linfoma (DLBC), es posible observar un aumento significativo en la expresión de TSPAN33 (20 veces más), respecto a tejido de donadores sanos.

Como se mencionó anteriormente, la estimulación antigénica de leucocitos está asociada a un aumento en la expresión y transporte a la membrana de esta tetraspanina. Asimismo, la mayoría de las neoplasias de células B son originadas por errores durante el proceso de activación y diferenciación, resultando en la transformación tumoral. En referencia a esto, la recombinación V(D)J dependiente de RAG, puede generar translocaciones cromosómicas estrechamente asociadas a la linfomagénesis, incluyendo: t(14;18) que coloca a BCL-2 y t(8;14) que coloca a c-myc, bajo el control del locus de inmunoglobulinas IgH (Hecht y Aster 2000; Ghazzoui et al. 2016). Además, la deaminasa AID puede tener actividad inespecífica durante las reacciones de centro germinal y ser un factor en la formación y/o mantenimiento de linfomas a través de la acumulación de mutaciones, así como la ocurrencia de translocaciones cromosómicas (Pettersen et al. 2015; Álvarez-Prado et al. 2018). En este trabajo, la mayor expresión de TSPAN33 fue detectada en linfoma de Burkitt y LDCBG, dos neoplasias particularmente agresivas y derivadas de linfocitos B activados o centros germinales. Particularmente, la identidad celular asociada al centro germinal de los linfomas de Burkitt (modelo celular analizado en este trabajo), ha sido objeto de debate por varios años debido a la expresión constitutiva de c-myc, dada por la translocación t(8;14) presente en $\geq 80\%$ de los casos. Mientras que algunos estudios asocian a este linfoma (incluyendo a la línea celular Raji) con un fenotipo centroblastico, dado por la expresión de factores como Bcl-6, E2A, AID y CXCR4, bajo el control transcripcional del oncogén c-myc (Caron et al. 2009; Scheller et al. 2010). Otros estudios posteriores, identificaron una firma transcripcional de centrocitocitos asociada a la activación de la vía CD40 en biopsias; combinada con una firma de centroblastos asociada con procesos de proliferación y citocinesis, en líneas celulares cultivadas in-vitro (Victoria et al. 2012). En tejidos normales, la formación inicial del centro germinal es dependiente de la expresión del proto-oncogén c-myc (factor endógeno), un blanco directo de la vía NOTCH (Dominguez-sola et al. 2012; Fasnacht et al. 2014). Además, durante la maduración de la afinidad de anticuerpos, algunos linfocitos (5-10%) reingresan a la zona oscura para someterse a ciclos adicionales de hipermutación somática, proliferación y selección positiva, en un proceso iterativo conocido como “reingreso cíclico” (Basso y Dalla-favera 2015; Luo, Weisel y Shlomchik

2018). El proceso anterior también es regulado directamente por c-myc, a través de señalización por NOTCH, BAFF y la estimulación simultánea de CD40/BCR dependiente de Tfh's, adquiriendo un fenotipo intermedio entre centroblastos y centrocitos (Yoon et al. 2009; Luo, Weisel y Shlomchik 2018). Como ya se mencionó, el desbalance en las señales anteriores puede inducir alteraciones que conlleven a la transformación, mantenimiento y/o diseminación del linfoma (Sander et al. 2012; Ryan et al. 2017). Un ejemplo de esto son las actividades de las proteínas virales LMP2A, EBNA2 y EBNA3 de EBV, que proveen señales de PI3K que sustituyen al BCR y a través de RBPJ- κ activan constitutivamente un programa transcripcional similar a NOTCH que promueve la latencia (Mancao y Hammerschmidt 2007; Anderson y Longnecker 2009; Wang et al. 2016). De forma interesante, los datos en este trabajo muestran a TSPAN33 con una distribución análoga a la de c-myc en centros germinales de todos los órganos linfoides secundarios y un aumento significativo en biopsias de linfomas derivados de aberraciones en estas estructuras. Adicionalmente, los análisis realizados muestran que los cambios en la expresión de TSPAN33 no se asocian con la prognosis y/o progresión de la enfermedad. Lo anterior, confirma que al igual que el oncogén c-myc, la expresión de TSPAN33 es constitutiva en linfomas de células B y que el balance en su expresión podría ser esencial para la formación o mantenimiento de las neoplasias (Luu et al. 2013). Por último, las evidencias descritas en secciones anteriores sobre la regulación de ADAM10 dependiente de TSPAN33, sugieren que podría regular la expresión del proto-oncogén c-myc dependiente de NOTCH en células normales y linfomas.

Para obtener más información sobre TSPAN33 y la regulación de ADAM10 en linfomas, fue seleccionada la línea celular Raji derivada de un linfoma de Burkitt, para la generación de células con expresión transgénica y deficiente para esta tetraspanina (Epstein et al. 1966; Savelyeva y Mamaeva 1988; Karpova et al. 2005). Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada para el estudio de otras tetraspaninas y la expresión constitutiva de miembros como CD37, CD53, CD63 y CD81 ha sido identificada por diferentes grupos de investigación (Rubinstein et al. 1996; Ferrer, Yunta y Lazo 1998; Manie et al. 2002; Arduise et al. 2008). De acuerdo con esto, los análisis realizados en datos de expresión de estudios independientes y bases públicas,

muestran que estas células expresan un número limitado de tetraspaninas, incluyendo los miembros mencionados previamente y además identifican a TSPAN3, TSPAN14 y TSPAN33. En acuerdo con esto, otro estudio de nuestro grupo de investigación también identificó mediante PCR la expresión de TSPAN14 y TSPAN33 en esta línea celular (Pérez-Martínez et al. 2017). Particularmente, estas tetraspaninas han sido implicadas en la regulación específica tanto del tránsito, como la maduración de ADAM10 y el procesamiento de NOTCH en distintos tipos celulares (Seipold et al. 2017; Matthews, et al. 2017; Matthews et al. 2018).

Previamente se revisó la expresión constitutiva del transcrito de TSPAN33 en cohortes públicas de linfomas tipo B y en especial, en la línea celular utilizada en este estudio. A pesar del fenotipo “activado” de algunos linfomas, la proteína TSPAN33 en células Raji sin estimular se encuentra mayormente en el citoplasma de las células. Según información publicada de nuestro y otros grupos de trabajo, al igual que en células epiteliales que no han alcanzado la confluencia en cultivo, TSPAN33 se encuentra almacenada junto con ADAM10 en cisternas del trans-Golgi (WGA+, GS1+) y en una proporción menor en el retículo endoplásmico (PDI+) (Dornier et al. 2012; Jouannet et al. 2016; Shah et al. 2018). Sin embargo, al igual que la confluencia en células epiteliales, la estimulación con rIL4 y α CD40 en Raji induce el transporte del complejo TSPAN33-ADAM10 a la membrana plasmática a través de una vía independiente de calcio. Lo anterior, ya que la incubación con ionomicina es incapaz de inducir el mismo fenómeno; por el contrario, varios estudios han identificado que este tratamiento promueve la endocitosis de ADAM10 y su reclutamiento a vesículas exosomales junto con CD44 y L1 (Stoeck et al. 2006; Ebsen et al. 2013). Al mismo tiempo, datos no publicados de nuestro grupo de trabajo muestran que el entrecruzamiento directo de TSPAN33 con anticuerpo, no induce el flujo de calcio en esta línea celular. De forma correspondiente, este fenómeno también ha sido observado en células B primarias cultivadas in-vitro con los mismos estímulos (Pérez-Martínez et al. 2017). Adicionalmente, al igual que en linfocitos B normales, la estimulación de células Raji con CD40 e IL4 promueven un cambio de isotipo IgE (Jeppson et al. 1998; Vancurova 2014). En cuanto a esto, la ligación de CD40 en Raji induce la formación de un complejo CD40/5-LO/PI3K, con esto induce la producción de ROS por la vía de Rac-

cPLA₂ y también activa a NFκB (p50)/p38-MAPK (Ha, Seul y Lee 2011). De acuerdo con esto, la inhibición de p38-MAPK en Raji genera citotoxicidad aguda por una disminución en la fosforilación y actividad de NFκB; con esto, también disminuye la producción de IL10 y la fosforilación de STAT3 (Jiang et al. 2011). Por otro lado, el entrecruzamiento de CD40 en Raji también estimula la fosforilación y expresión de varias tirosina-quinasas asociadas al BCR y que activan la vía de PI3K, incluyendo: Src, Lyn, Fyn y Syk (Faris 1994; Néron et al. 2006). En conjunto, la información revisada previamente sugiere que la expresión y transporte de TSPAN33 a la superficie de células Raji (posiblemente otros linfocitos B), es regulado por alguno de estos factores. Siguiendo esta hipótesis, en el genoma humano TSPAN33 se encuentra adyacente a los genes de ATP6V1F, TNPO3 e IRF5, en un loci que evolutivamente ha cambiado de cromosoma en pez cebra, rana, perro, ratones y humanos (Huang et al. 2010). De forma interesante, ATP6V1F codifica para la subunidad F de la ATPasa vacuolar renal y que como se mencionó previamente, se localiza en los conductos colectores de los riñones (Chen et al. 2017). Asimismo, en humanos la transcripción del loci completo es regulada por varios elementos, incluyendo dos promotores de IRF5 (GH07J128936 y GH07J128932) con sitios de unión para c-Myc y RelA (Fishilevich et al. 2017). La expresión de IRF5 mediada por el promotor GH07J128932 también está asociada con la manifestación de lupus eritematoso generalizado y artritis reumatoide (Corradin et al. 2014). Por otro lado, la transcripción de TSPAN33 puede ser potenciada por un “enhancer” (GH07J129099), con sitios de unión para RelA y RBPJ-κ. En leucocitos en general, la expresión del factor IRF5 está controlada por la activación de TRAF6 y NFκB, especialmente durante la estimulación antigénica de TLR's y/o interferones (Almuttaqi y Udalova 2019). Específicamente en linfocitos B normales y Raji, la fosforilación de TRAF6-NFκB es dependiente al mismo tiempo de la fosforilación de Syk (blanco de CD40 en Raji) (Iwata et al. 2012). Lo anterior puede explicar porque en mamíferos la pan-estimulación antigénica de leucocitos (particularmente linfocitos B y células Raji), induce la expresión robusta de TSPAN33 en poco tiempo (Luu et al. 2013; Pérez-Martínez et al. 2017). Esta hipótesis se ve confirmada en estudios donde describen que la expresión de TSPAN33 se ve potenciada con la adición de IFNγ durante la co-estimulación de macrófagos con LPS (Ruiz-García et al. 2016). Además,

los niveles de TSPAN33 e IRF5 se relacionan directamente con el desarrollo y proliferación de células B normales, autoinmunidad y linfomas. La proteína IRF5 es un factor de transcripción que forma parte de una familia moléculas implicadas en la producción de interferones durante procesos inflamatorios. En células B normales participa tanto en la activación, como en el proceso de cambio de isotipo y posterior diferenciación a células plasmáticas (Lien et al. 2010; Li et al. 2016). En linfomas, la expresión de IRF5 es asociada con actividad antitumoral, pero la infección por EBV inhibe esto induciendo una isoforma por splicing alternativo y con actividad dominante negativa (Martin et al. 2007). Como se mencionó anteriormente, los niveles y actividad de este factor están estrechamente relacionados con la manifestación de lupus, una enfermedad autoinmune asociada a la activación aberrante de linfocitos B (Ban, Sato y Tamura 2018). De acuerdo con esto, también los niveles de TSPAN33 han sido relacionados con el desarrollo de esta enfermedad en ratón y humano (Luu et al. 2013). Por lo tanto, la evidencia revisada sugiere que la expresión y transporte de TSPAN33 durante la estimulación antigénica de linfocitos B está ligada a la expresión del loci IRF5 dependiente de NOTCH, NFκB y/o posiblemente otros factores. Adicionalmente, estos datos permiten empezar a hipotetizar como además de linfomas, la expresión de TSPAN33 también está asociada a la manifestación y desarrollo de autoinmunidad.

En linfocitos B normales, el balance en la señalización paralela de PI3K/NFκB a través del BCR y factores de la familia TNF (e.g. BAFF, CD40L) en centros germinales, es un requisito esencial para la selección clonal de linfocitos B con alta afinidad por un antígeno específico (Smulski et al. 2017; Luo, Weisel y Shlomchik 2018). Recientemente, se ha comprobado que la necesidad conjunta de estas señales se debe a la inhibición en la señalización del BCR, específica para células B de centro germinal. Lo anterior, mediante un mecanismo bioquímico dependiente de fosfatasas y otro biofísico dependiente de fuerzas mecánicas; que en conjunto, promueven la selección para la producción de anticuerpos con alta afinidad (Natkanski et al. 2013; Nowosad, Spillane y Tolar 2016; Luo, Weisel y Shlomchik 2018; Luo et al. 2019). En este mismo sentido, a nivel de membranas las tetraspaninas en general juegan un papel esencial en la modulación de estas vías mediante la asociación y posterior organización espacio-temporal de las moléculas implicadas en estos fenómenos.

Como pruebas de este concepto se encuentran las funciones regulatorias de CD37 y CD81 en linfocitos B. En primera instancia, CD37 se asocia físicamente con la integrina $\alpha\beta 1$ y regula la fosforilación de las cinasas PI3K, Lyn, Syk y la fosfatasa SHP1 (Lapalombella et al. 2012; Beckwith, Byrd y Muthusamy 2015). Por otro lado, CD81 se asocia físicamente con CD19 y mediante sus interacciones con el BCR durante la estimulación antigénica modifica la actividad de PI3K/PLC γ 2, que a su vez regulan la fosforilación de: Syk, Akt y Erk (Mattila et al. 2013; Zimmerman et al. 2016). Además de lo mencionado, también es necesaria la presencia y equilibrio de otros factores bioquímicos capaces de modular las señales en los centros germinales. Lo anterior, se ve reflejado en la dificultad para reproducir y manipular fielmente tanto la formación, como los productos solubles y celulares de un centro germinal in-vitro (Nojima et al. 2011; Calado 2017). En relación a esto, la regulación de ADAM10 por tetraspaninas es uno de los principales candidatos en ese aspecto, debido a la implicación directa de la proteasa en una gran cantidad de vías de señalización (Matthews et al. 2018). En el caso de NOTCH, ya que el co-cultivo de linfocitos B primarios en presencia del ligando DLL1 y co-estimulación con α CD40/ α IgM aumenta la proliferación celular. Además, induce cambios a diferentes isotipos en centros germinales, con la correspondiente diferenciación a células plasmáticas (Santos et al. 2007; Thomas et al. 2007). Por otro lado, un estudio reportó que la estimulación de macrófagos con LPS puede inducir la activación no-canónica de NOTCH dependiente de PI3K y NF κ B (p50) (Wongchana et al. 2018). Asimismo, esta activación no canónica de NOTCH debido a la estimulación antigénica, regula la expresión de genes asociados a migración leucocitaria, producción de citocinas y ciclo celular. Como se mencionó anteriormente, c-myc es un blanco directo de la activación de NOTCH en distintos tipos celulares, incluyendo formas normales y neoplásicas de linfocitos B/T (Jundt, Schwarzer y Dörken 2008; Ryan et al. 2017; Arruga, Vaisitti y Deaglio 2018). Siguiendo lo anterior, un modelo murino con expresión constitutiva de c-myc/PI3K en células B muestra un mayor número de centros germinales durante respuestas inmunes. Con el tiempo, estos ratones también desarrollan espontáneamente linfomas de Burkitt análogos a los de humano, incluyendo características: histoquímicas, fenotípicas, transcripcionales y de lesiones genómicas (Sander et al. 2012). De forma interesante, los niveles de c-myc

en células Raji son similares a los de líneas celulares generadas a partir de estos ratones. A su vez, la inhibición de PI3K en Raji disminuye los niveles de c-myc e induce un arresto de ciclo celular G2M similar al observado en este trabajo (Dos Santos et al. 2014). Paralelamente, otro estudio describió que la pan-estimulación parcial de NOTCH con ligandos DLL1 solubles genera sinergia con el entrecruzamiento del BCR en esta línea celular, promoviendo la proliferación e inhibiendo la apoptosis al inducir la expresión de c-myc y Hes1 (He et al. 2009). Asimismo, la expresión transgénica de NOTCH2 en estas células promueve la proliferación y la inducción de las moléculas anteriores; sin embargo, también observan una dependencia a la activación de NFκB, ya que la inhibición de esta vía restaura el fenotipo proliferativo causado por NOTCH2 (Zhang et al. 2014). La intercomunicación de NOTCH y NFκB es una función conservada en distintos tipos celulares y que ha sido estudiada por más de una década por diversos grupos de investigación (Osipo et al. 2008). De acuerdo con esto, NOTCH1 activa a NFκB (p50) a través de promover la degradación de IκBα (Li et al. 2014). Por otro lado, NOTCH4 genera el mismo efecto a través de la asociación física de un dominio del NICD con los elementos IKK (Raafat et al. 2017). Para estudiar la implicación de TSPAN33 durante el procesamiento de NOTCH en linfoma de Burkitt, las células Raji también fueron manipuladas para generar modelos transgénicos y deficientes de la proteína. Según los datos en este trabajo, los cambios en TSPAN33, así como la maduración de ADAM10, se asocian a una expresión diferencial de diferentes receptores en la superficie de las células, incluyendo NOTCH1, NOTCH2 y NOTCH4. Adicionalmente, la información registrada en esta tesis también muestra que TSPAN33 y NOTCH pueden interactuar físicamente en la membrana plasmática. En relación a esto, las α y γ-secretasas conforman un complejo supramolecular en las membranas, cuya actividad y localización espacio-temporal es regulada directamente por tetraspaninas (Wakabayashi et al. 2009; Chen et al. 2015). Adicionalmente, un estudio reciente observó que la unión del receptor NOTCH1 con el ligando DLL1, induce la formación de conglomerados en la membrana que posteriormente reclutan a ADAM10 y son endocitados para su procesamiento de forma similar al BCR (Natkanski et al. 2013; Chastagner, Rubinstein y Brou 2017). Por tanto, las evidencias sugieren que en células Raji la expresión transgénica de TSPAN33 y el transporte

correspondiente de ADAM10 a la membrana plasmática, regulan la activación diferencial de la vía NOTCH. De acuerdo con esto, estudios en células RAW246.7 describieron que la expresión transgénica de TSPAN33 activa a NOTCH en ausencia de ligando y también induce un aumento en la actividad de NFκB (Ruiz-García et al. 2016). De forma interesante, el efecto anterior se ve amplificado durante la estimulación con LPS/IFNγ. Consistentemente, otro estudio reciente también identificó que la expresión transgénica de TSPAN15 (miembro C8) en carcinoma esofágico, induce la tumorigénesis y metástasis a través de la activación de NFκB (p50) mediada por el complejo IKK (Zhang et al. 2018). En conclusión, la información revisada sugiere que TSPAN33 podría actuar como un amplificador de las señales NOTCH/c-myc/NFκB (p50) durante la activación de leucocitos. Siguiendo esta hipótesis, la estimulación de células (e.g. CD40, TLR's) puede activar la transcripción de TSPAN33 junto con el loci IRF5, pero en especial la maduración y transporte a la membrana plasmática de ADAM10. Al mismo tiempo, los sucesos anteriores pueden activar el procesamiento de NOTCH en la membrana e inducir blancos como c-myc/NFκB (p50), promoviendo un posible ciclo de retroalimentación capaz de modular el balance de señales durante la activación de linfocitos B.

De forma particularmente interesante, la expresión transgénica de TSPAN33 induce un defecto en la capacidad proliferativa de células Raji, acompañada de una adhesión disminuida. Además, también fue posible observar un arresto de ciclo celular en las fases G2M, junto con un aumento en la frecuencia de células gigantes multinucleadas. De forma correspondiente, al analizar inmunohistoquímicas públicas de pacientes con linfomas no-Hodgkin, es posible observar la expresión marcada de TSPAN33 en lo que parecen conglomerados de células, con una membrana fusionada, núcleos de varios tamaños y distinta condensación de la cromatina en cada uno. En conjunto, las evidencias muestran que TSPAN33 es expresada en linfomas in-vitro e in-vivo, sugiriendo que a través de ADAM10 regula vías de señalización asociadas a la proliferación celular, incluyendo posibles procesos de endoreplicación y citocinesis fallida durante la transición G2M. De acuerdo con esta hipótesis, un estudio previo identificó que la supresión de TSPAN5 y TSPAN10 (miembros C8) durante la activación de macrófagos con RANKL, inhibe tanto la maduración de ADAM10, como

la señalización NOTCH/NFκB (p50) y con esto, reduce la formación de polykariones osteoclasticos (Zhou et al. 2014). Por otro lado, múltiples reportes han demostrado una relación entre la expresión/actividad de NOTCH/c-myc/NFκB (p50), con la transcripción, replicación y estabilidad de los genomas en vertebrados. Por un lado, aunque NOTCH en ciertos escenarios puede promover la proliferación de leucocitos, estudios previos han demostrado que la activación constitutiva de cualquiera de los cuatro receptores induce la apoptosis y arresto de ciclo celular específicamente en neoplasias linfoides tipo B, a través de un mecanismo dependiente de Hes1/PARP1 (Zweidler-McKay et al. 2005; Kannan et al. 2011). Asimismo, la activación constitutiva del receptor NOTCH4 inhibe la diferenciación de progenitores mieloides leucémicos (HL60) durante la activación, incluyendo una disminución en la expresión de integrinas y arresto de ciclo celular (Ye et al. 2004). Respecto a c-myc, otro trabajo reciente describió que en células Raji por si solo este factor es capaz de inducir arresto del ciclo celular en la fase G2M, análogo al descrito en este trabajo (Yang et al. 2018). El fenómeno anterior también ha sido observado fibroblastos y células de cáncer cervical (Felsher et al. 2000; Cui et al. 2017). Asimismo, la expresión de c-myc inhibe directamente la expresión de integrinas en leucocitos, al interferir con la activación de sus promotores (López-Rodríguez et al. 2000). Además, el primer modelo murino transgénico para c-myc en linfocitos B, mostró un aumento en el tamaño celular, que correlacionaba con una mayor producción de proteínas independiente del estadio de desarrollo (Iritani y Eisenman 1999). Por otro lado, en macrófagos normales la hiperactivación de c-myc durante la estimulación de TLR2, provoca daños genéticos y estrés replicativo que a su vez, induce la formación de células poliploides en granulomas (Herrtwich et al. 2016). Adicionalmente, la expresión de c-myc junto con otros factores de transcripción puede inducir la reprogramación de fibroblastos para su diferenciación a progenitores de megacariocitos (Pulecio et al. 2016). De acuerdo con lo anterior, el primer estudio sobre TSPAN33 en ratones deficientes para la proteína, describió un defecto eritropoyético por una reducción en la diferenciación de los mismos progenitores (Heikens et al. 2007). De forma correspondiente, los datos en este trabajo también muestran a megacariocitos con TSPAN33 en la médula ósea de humano. Finalmente, c-myc es un factor capaz de inducir la replicación del genoma

independiente del ciclo celular y con esto, permite llevar a cabo procesos de endoreplicación genética tanto en humanos como invertebrados (Johnston et al. 1999; Dominguez-Sola et al. 2007). En conclusión, la expresión transgénica de TSPAN33 puede promover el procesamiento de NOTCH por ADAM10 en la membrana plasmática de linfocitos B y con esto, la activación de blancos como c-myc/Hes1/NFκB (p50), cuya actividad constitutiva genera estrés replicativo e inestabilidad genómica que deriva en procesos de endoreplicación y citocinesis fallida, reflejada en la acumulación de células gigantes multinucleadas.

Por otro lado, la señalización dependiente de factores de la familia TNF durante la activación de linfocitos B, también es regulada directamente por ADAM10 al tener la capacidad de procesar a TNFα, TACI, BAFFR y ICOSL (Hoffmann et al. 2015; Lownik et al. 2017; Smulski et al. 2017). De acuerdo con esto, el procesamiento de TNFα dependiente de ADAM10 o ADAM17 es regulado por algunas tetraspaninas en células Raji (Arduise et al. 2008). En contraste, según datos de nuestro grupo de investigación, el entrecruzamiento o expresión transgénica de TSPAN33 no afecta el proceso anterior. Sin embargo, durante el análisis de producción de citocinas fue posible detectar, una disminución drástica en la producción de IL10 y datos públicos de expresión muestran que, células productoras de esta citocina no expresan TSPAN33. Lo anterior, podría configurar un mecanismo alternativo y/o conjunto para la inhibición proliferativa y el arresto G2M, ya que el tratamiento con el inhibidor de tirosina-cinasas “Genistéina” también suprime a IL10 e induce los mismos efectos mencionados mediante la producción de IFNγ (Mansour et al. 2004). De forma correspondiente, la inhibición de Jak2/STAT3 en Raji induce la apoptosis y el arresto en ciclo celular (Xu et al. 2018). Paralelamente, en secciones previas se describió que la estimulación con LPS induce la activación no-canónica de NOTCH/PI3K/NFκB (p50) y con esto, también la inhibición en la producción de IL10 (Wongchana et al. 2018). En linfocitos B, uno de los principales mecanismos para la producción de esta interleucina es modulado directamente por la vía alternativa de NFκB (p52), inducida a su vez por los receptores de BAFF (BAFFR, TACI, BCMA). Específicamente en Raji, la estimulación con BAFF promueve la proliferación de las células y la activación alternativa de NFκB (p52) (Liu et al. 2016). En cuanto a su actividad biológica, se ha observado que en condiciones

homeostáticas BAFF promueve la formación de células B reguladoras a partir de la zona marginal y en condiciones inflamatorias ejerce el efecto inverso (Yang et al. 2010; Ma et al. 2017). Asimismo, la producción de IL10 en células B reguladoras y leucémicas es controlada específicamente por BAFF mediante su receptor TACI (Saulep-easton et al. 2016). Sin embargo, el procesamiento de TACI tanto en células B activadas como en Raji, es mediado directamente por ADAM10 e inhibe la proliferación celular al limitar la unión de BAFF (Hoffmann et al. 2015). Además, el fragmento restante del receptor es procesado por el complejo γ -secretasa, inhibiendo la activación de NF κ B (p52). En contraste, en linfocitos B de centro germinal el procesamiento del receptor BAFFR mediado ADAM10, requiere de estar unido previamente a BAFF y la co-expresión de TACI para así modular la proliferación celular (Smulski et al. 2017). De forma particularmente interesante, la inhibición conjunta de NOTCH y BAFFR genera sinergia para reducir la proliferación de linfocitos B en los centros germinales, resaltando la inter comunicación de las vías (Yoon et al. 2009). Por tanto, la presencia de TSPAN33-ADAM10 en la membrana plasmática también podría regular el balance en el procesamiento de estos receptores junto con NOTCH, y así, modular varias vías de señalización implicadas en la proliferación linfocitos B. En conclusión, los datos registrados en este estudio y la información revisada sugieren que TSPAN33 está involucrada en la formación o mantenimiento de linfomas asociados a los centros germinales, posiblemente a través de la desregulación en el procesamiento de sustratos dependiente de ADAM10, incluyendo NOTCH y posiblemente otros como BAFFR y TACI.

Paralelamente, la pérdida de TSPAN33 identificada en carcinomas renales está asociada significativamente con un mal pronóstico y la progresión de la enfermedad. De acuerdo con esto, la distribución subcelular de TSPAN33 en biopsias de pacientes, es análoga a la reportada en una línea celular derivada de conducto colector renal (Shah et al. 2018). En concreto, la cinética de expresión para TSPAN33 en estas células disminuía conforme se alcanzaba la confluencia en cultivo y al mismo tiempo, era transportada del citoplasma a la superficie. Además, en este trabajo asociaron la función de TSPAN33 con la integridad y mantenimiento de uniones adherentes. Lo anterior, a través del anclaje de ADAM10 a un complejo supramolecular en estas

estructuras. Por lo tanto, a diferencia de ser marcador de la activación de leucocitos, la pérdida de TSPAN33 en epitelio renal podría estar asociada con la desestabilización de uniones adherentes y una posterior transición epitelio-mesenquimal tumorigénica. Esto puede ocurrir, por una desregulación en el procesamiento de cadherinas y la posterior activación de la vía Wnt/ β -catenina, dependiente de ADAM10 (Heuberger y Birchmeier 2010). De acuerdo con esto, la inhibición de TSPAN5 y TSPAN17 (miembros C8) en células endoteliales durante la estimulación con TNF- α , promueve el procesamiento de VE-Cadherina dependiente de ADAM10 y a su vez, esto facilita la trans migración leucocitaria (Reyat et al. 2017). Al mismo tiempo, el procesamiento de cadherinas también induce la expresión de c-myc. Sin embargo, es necesario realizar más estudios en este tejido para comprobar las observaciones anteriores y de esta forma, empezar a elucidar con más detalle el mecanismo dependiente de TSPAN33 para la regulación de ADAM10 en riñones y su implicación en la formación, mantenimiento y/o progresión de carcinomas.

SECCIÓN III

SECCIÓN FINAL

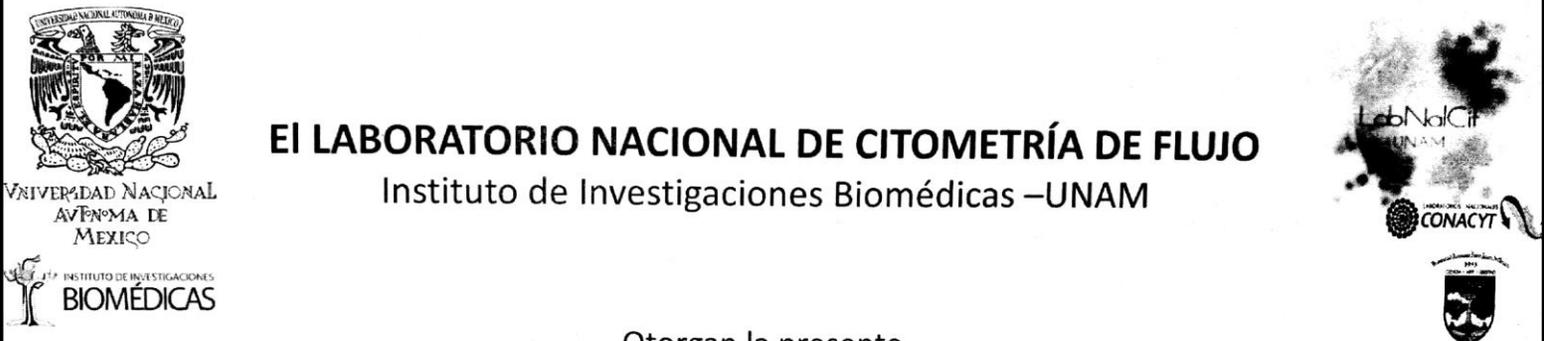
CONCLUSIONES GENERALES

De forma general, en la primera sección de este trabajo se describe el establecimiento, así como la estandarización del sistema CRISPR/Cas9 para la generación de modificaciones genéticas específicas en linfocitos B.

- I. Mediante un análisis sobre las características del loci genómico de TSPAN33; así como el uso de las herramientas bioinformáticas para la detección de sitios óptimos para el funcionamiento del sistema CRISPR/Cas9, fue diseñado un juego de sgRNA capaces de dirigir modificaciones específicas enfocadas a disminuir la expresión de la proteína en células Raji.
- II. A través del uso de diferentes metodologías experimentales, fue posible describir la estandarización de un procedimiento que permite realizar el tratamiento, recuperación, aislamiento y caracterización de células con modificaciones de línea germinal en el locus de TSPAN33.
- III. Durante la caracterización de clonas Raji con modificaciones genéticas en TSPAN33, no fueron detectadas clonas sin la expresión de la proteína; sin embargo, fue realizado el aislamiento de una clona estable con expresión deficiente de la proteína y que fue utilizada en estudios posteriores.

En la segunda sección de esta tesis se describe un análisis integral sobre la función de TSPAN33 en linfocitos B normales y de origen tumoral, enfocándose principalmente en la regulación de la vía NOTCH en estas células.

- I. Mediante el uso de diferentes herramientas bioinformáticas y bases de datos públicas, fue caracterizada la expresión de TSPAN33 en el ser humano. Particularmente, en este trabajo se describe un patrón de expresión diferencial en linfocitos B circulantes y embebidos en los diferentes órganos linfoides. Por otro lado, también fue realizado un análisis sobre los cambios en la expresión de TSPAN33 tanto en tumores sólidos, como en linfomas y leucemias tipo B.
- II. Los datos en este trabajo muestran un primer acercamiento que describe la función de TSPAN33 a través de su asociación con ADAM10 y como juega un papel importante en la regulación del procesamiento de NOTCH (y probablemente otros sustratos), para modular la supervivencia y proliferación de linfocitos B.
- III. La información revisada, junto con los datos experimentales anotados en esta tesis, sugieren que TSPAN33 y ADAM10 participan activamente en la regulación del balance de factores bioquímicos y vías de señalización desencadenadas durante las respuestas inmunológicas.



EL LABORATORIO NACIONAL DE CITOMETRÍA DE FLUJO
 Instituto de Investigaciones Biomédicas –UNAM

Otorgan la presente

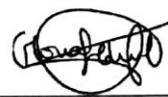
Constancia

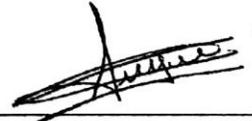
a:

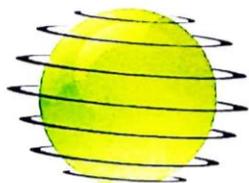
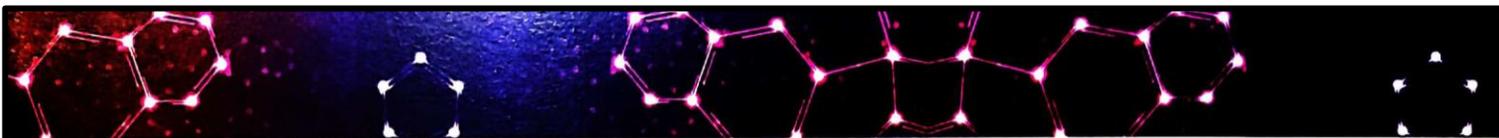
Ernesto Acevedo Ochoa

Por haber asistido al
“C5: Curso – Taller de técnicas analíticas y protocolos de tinción para apoptosis y ciclo celular por citometría de flujo”
 Realizado el 24 Y 25 de agosto de 2017, con una duración de 16 horas.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 25 de agosto de 2017.


Dra. Gloria Soldevila Melgarejo
 Director – Responsable Técnico
 LabNalCit


Dra. Andrea Bedoya López
 Coordinador general -RSGC
 LabNalCit



REGISTRO RENIECYT
No. 1701878

GlobalAgronomics S.A. de C.V.

Otorga la presente

Constancia

A Ernesto Acevedo Ochoa

Por haber ASISTIDO y APROBADO el

CURSO: INTRODUCCIÓN AL MODELAJE MOLECULAR *IN SILICO* DE PROTEINAS

Llevado a cabo del 20 al 23 de marzo de 2018 en Querétaro, Qro., México,
con una duración de 40 hrs.

MC. Jordan Ruíz Castelán
Profesor del Curso

· Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla, Mexico

Ph.D., Agr. Javier López Baltazar
Organizador General
Global Agronomics SA de CV

www.globalagronomics.com



XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI

XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI

Latin American Immunologists Fighting Disease

Certificate

This is to confirm that

Ernesto Acevedo-Ochoa

participated in the Pre-Congress Meeting

I Iberoamerican Flow Cytometry Meeting

May 13 -14, 2018

Cancún, Quintana Roo


Dr. Leopoldo Santos Argumedo
ALAI President


Dra. Rosana Peláyo
SMI President


Dra. Lourdes Arriaga
SMI Flow Cytometry Chapter Chair



La Sociedad Mexicana de Inmunología A. C.

a través de su

Sección Estudiantil

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Ernesto Acevedo Ochoa

Por su destacada participación como **PONENTE** y asistente del **IX FORO ESTUDIANTIL SMI 2017**, celebrado los días 09 y 10 de noviembre de 2017 en el Auditorio "Dr. Guillermo Carvajal Sandoval" de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas- IPN.

Dra. Rosana Pelayo
Presidente

Dr. Gustavo Pedraza
Secretario-Tesorero



Sección Estudiantil



XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI

XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI

Latin American Immunologists Fighting Disease
May 14 -18, 2018

Certificate

This is to confirm that

Ernesto Acevedo Ochoa

For the lecture at the Workshop

**New Insights into TSPAN33 function in B cells
Antibodies and B cells Biology Workshop**

XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI

XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI

May 14 -18, 2018

Cancún, Quintana Roo


Dr. Leopoldo Santos Argumedo
ALAI President


Dr. Humberto Lanz
ALAI Secretary


Dr. Rosana Pelayo
SMI President


Dr. Gustavo Pedraza
SMI Secretary

9.3 Reconocimientos



Sociedad Mexicana de Inmunología, A. C.

Sección Estudiantil



México, D.F.; a 10 de noviembre de 2017.

Ernesto Acevedo Ochoa

PRESENTE

Por medio de la presente tenemos el placer de hacer constar que, durante el marco del IX Foro Estudiantil organizado por la Sección Estudiantil de la Sociedad Mexicana de Inmunología, usted obtuvo una beca para la **Inscripción al Encuentro Iberoamericano de Citometría** a celebrarse en la ciudad de Cancún como evento pre-congreso del **XXIII Congreso Nacional de Inmunología/XII Congreso Internacional de la ALAI** durante el mes de mayo de 2018.

Dicha beca no incluye transporte ni hospedaje.

Para hacer efectiva esta beca, usted deberá inscribirse a la Sociedad Mexicana de Inmunología, o bien, estar al corriente en el pago de su membresía como estudiante. A su vez, le pido que se comunique con el Comité Organizador del evento a partir de la emisión de la convocatoria del Congreso.

Me despido de usted enviándole una sincera felicitación y un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Presidente

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva

Secretario-Tesorero



XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI

XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI

Latin American Immunologists Fighting Disease
May 14 -18, 2018

Certificate

This is to confirm that

Ernesto Acevedo-Ochoa

Was awarded first place of Oral Presentation

**At the XII Congress of the Latin American Association of Immunology - ALAI
XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology - SMI**

May 14 -18, 2018
Cancún, Quintana Roo


Dr. Leopoldo Santos Argumedo
ALAI President


Dr. Humberto Lanz
ALAI Secretary


Dr. Rosana Pelayo
SMI President


Dr. Gustavo Pedraza
SMI Secretary

9.4 Publicaciones

REVISTA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Contents available at PubMed
www.clinicalandtranslationalinvestigation.com



Rev Inves Clin. 2017;69:243-246

PERSPECTIVES

HUMAN B REGULATORY CELLS: THE NEW PLAYERS IN AUTOIMMUNE DISEASE

JOSÉ L. MARAVILLAS-MONTERO^{1*} AND ERNESTO ACEVEDO-OCHOA²

¹Red de Apoyo a la Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México and Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; ²Research Unit in Immunochemistry, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social. Mexico City, Mexico

ABSTRACT

Although the production of antigen-specific antibodies has been the originally accepted function of B-cells during immune responses, specific subsets that can negatively regulate inflammation, designated regulatory B-cells (Bregs), have been identified recently. These immunosuppressive cells support tolerance, mainly through the production of interleukin 10 and other unconventional factors. There have been emerging data suggesting their importance in diverse normal and pathologic processes. Novel and in development B-cell targeted therapies seem to be ideal treatments for different types of diseases such as cancer and allergy. Here, we discuss the current knowledge on the implication of Bregs in autoimmunity-related diseases, highlighting the importance of these cells for the development of novel strategies in the treatment of these pathologies.

Key words: B-cell. B regulatory cells. Autoimmunity.

INTRODUCTION

The immune system has evolved to deal with invading pathogens while at the same time sparing host tissues. It is not confined to a single organ or tissue but rather composed of specific cells and soluble compounds, such as the complement system, cytokines, chemokines, and antibodies.

Immune response-associated inflammation is essential for protecting the host against foreign pathogens; however, if left uncontrolled, it can cause deleterious and often irreversible tissue damage. Although initiation of any inflammatory response is mainly caused by injury or infection, a diversity of

autoimmune diseases and cancer subtypes can promote chronic inflammation. Continuous exposure to pro-inflammatory stimuli contributes to the pathogenesis of numerous inflammatory and autoimmune disorders, including rheumatoid arthritis and lupus. To avoid irreversible damage, the prompt generation of an anti-inflammatory cellular response that minimizes injuries and promotes homeostasis is essential. Multiple inhibitory pathways that prevent cellular activation and restrain existing inflammatory signals promote these protective events. Accordingly, B lymphocytes represent a unique cell population that not only participates in pro-inflammatory reactions but also has roles in the regulation of immune-related processes.

Corresponding author:

*José L. Maravillas-Montero
Red de Apoyo a la Investigación
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán Vasco de Quiroga, 15
Col. Sección XVI, Del. Tlalpan
C.P. 14080, Ciudad de México, México
E-mail: maravillas@cic.unam.mx

Received for publication: 25-04-2017
Accepted for publication: 29-05-2017
doi: 10.24875/RIC.17002266

REVIEW

Innate-like B cell subsets during immune responses: Beyond antibody production

Sandra Romero-Ramírez^{1,2} | Itze C. Navarro-Hernandez^{1,3} | Rodrigo Cervantes-Díaz^{1,2} | Víctor A. Sosa-Hernández^{1,4} | Ernesto Acevedo-Ochoa^{1,5} | Ari Kleinberg-Bild¹ | Ricardo Valle-Rios⁶ | David E. Meza-Sánchez¹ | José M. Hernández-Hernández³ | José L. Maravillas-Montero¹

¹Red de Apoyo a la Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México e Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, México

²Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, México

³Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, México

⁴Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, México

⁵Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico

⁶División de Investigación de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México y Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, Mexico

Correspondence

José Luis Maravillas-Montero, PhD, Red de Apoyo a la Investigación, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Colonia Sección XVI, Tlalpan, C.P. 14000, Mexico City, Mexico. Email: maravillas@dc.unam.mx

Abstract

B lymphocytes are recognized for their crucial role in the adaptive immunity since they represent the only leukocyte lineage capable of differentiating into Ab-secreting cells. However, it has been demonstrated that these lymphocytes can exert several Ab-independent functions, including engulfing and processing Ags for presentation to T cells, secreting soluble mediators, providing co-stimulatory signals, and even participating in lymphoid tissues development. Beyond that, several reports claiming the existence of multiple B cell subsets contributing directly to innate immune responses have appeared. These "innate-like" B lymphocytes, whose phenotype, development pathways, tissue distribution, and functions are in most cases notoriously different from those of conventional B cells, are crucial to early protective responses against pathogens by exerting "crossover" defensive strategies that blur the established boundaries of innate and adaptive branches of immunity. Examples of these mechanisms include the rapid secretion of the polyspecific natural Abs, increased susceptibility to innate receptors-mediated activation, cytokine secretion, downstream priming of other innate cells, usage of specific variable immunoglobulin gene-segments, and other features. As these new insights emerge, it is becoming preponderant to redefine the functionality of B cells beyond their classical adaptive-immune tasks.

KEYWORDS

ABCs, B-1 cells, IRA B cells, MZ B cells, NKBs, V_H4-34

1 | INTRODUCTION

Historically, immunologists established a canonical division for the study and classification of the mechanisms of defense against

pathogens consisting of three levels: anatomical and physiological barriers, innate immunity, and adaptive immunity.¹

Anatomical and physiological barriers that include the skin and mucosal surfaces, mucociliary clearance function, low stomach pH and lysozyme activity in tears, saliva, and other secretions together provide the very first line of defense against pathogens.²

Innate immunity mechanisms represent the second line of defense and depend on both cells and molecules recognizing conserved patterns of pathogens that are not present in the host. The components of the innate immune system are rapidly activated upon encountering

Abbreviations: ABC, age-associated B cell; DC, dendritic cell; Dll1, delta-like 1 ligand; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; FDC, follicular dendritic cell; FO, follicular B cell; HSC, hematopoietic stem cells; ILC, innate lymphoid cell; ILF, isolated lymphoid follicle; IRA, innate response activator B cell; LT α 1 β 2, lymphotoxin α 1 β 2; MedLNs, mediastinal lymph nodes; MZ, marginal zone B cell; NKB, natural killer-like B cell; PALS, periaarteriolar lymphoid sheaths; SLE, systemic lupus erythematosus; Tfh, T follicular helper cell

Received: 15 August 2018 | Revised: 22 October 2018 | Accepted: 30 October 2018

J Leukoc Biol 2018;1–14.

www.jleukbio.org

©2018 Society for Leukocyte Biology | 1

LITERATURA CITADA

- Akhter, Zahid, and Moganty R Rajeswari. 2018. "Anticancer Activity of HMGA1 Promoter Targeting Triplex Forming Oligonucleotide in HeLa Cell Line" 56 (April): 219–29.
- Almuttaqi, Hannah, and Irina A. Udalova. 2019. "Advances and Challenges in Targeting IRF5, a Key Regulator of Inflammation." *FEBS Journal* 286 (9): 1624–37. <https://doi.org/10.1111/febs.14654>.
- Álvarez-Prado, Ángel F., Pablo Pérez-Durán, Arantxa Pérez-García, Alberto Benguria, Carlos Torroja, Virginia G. de Yébenes, and Almudena R. Ramiro. 2018. "A Broad Atlas of Somatic Hypermutation Allows Prediction of Activation-Induced Deaminase Targets." *The Journal of Experimental Medicine* 215 (3): 761–71. <https://doi.org/10.1084/jem.20171738>.
- Anderson, C, S Pinkus, and Lee M Nadler. 1984. "Antigens on Leukemias B Cell Differentiation." *Cell* 63 (6): 1424–33.
- Anderson, Leah J., and Richard Longnecker. 2009. "Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Exploits Notch1 to Alter B-Cell Identity in Vivo." *Blood* 113 (1): 108–16. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-160937>.
- Ardlie, K. G., D. S. Deluca, A. V. Segre, T. J. Sullivan, T. R. Young, E. T. Gelfand, C. A. Trowbridge, et al. 2015. "The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Pilot Analysis: Multitissue Gene Regulation in Humans." *Science* 348 (6235): 648–60. <https://doi.org/10.1126/science.1262110>.
- Arduise, C., T. Abache, L. Li, M. Billard, A. Chabanon, A. Ludwig, P. Mauduit, C. Boucheix, E. Rubinstein, and F. Le Naour. 2008. "Tetraspanins Regulate ADAM10-Mediated Cleavage of TNF- and Epidermal Growth Factor." *The Journal of Immunology* 181 (10): 7002–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7002>.
- Arruga, Francesca, Tiziana Vaisitti, and Silvia Deaglio. 2018. "The NOTCH Pathway and Its Mutations in Mature B Cell Malignancies." *Frontiers in Oncology* 8 (November): 1–18. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00550>.
- Ayaz, Furkan, and Barbara A. Osborne. 2014. "Non-Canonical Notch Signaling in Cancer and Immunity." *Frontiers in Oncology* 4 (December): 1–6. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00345>.
- Bae, Sangsu, Jiyeon Kweon, Heon Seok Kim, and Jin-Soo Kim. 2014. "Microhomology-Based Choice of Cas9 Nuclease Target Sites." *Nature Methods* 11 (7): 705–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3015>.
- Baliou, Stella, Maria Adamaki, Anthony M. Kyriakopoulos, Demetrios A. Spandidos, Mihalis Panayiotidis, Ioannis Christodoulou, and Vassilis Zoumpourlis. 2018. "CRISPR Therapeutic Tools for Complex Genetic Disorders and Cancer (Review)." *International Journal of Oncology* 53 (2): 443–68. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4434>.
- Ban, Tatsuma, Go R. Sato, and Tomohiko Tamura. 2018. "Regulation and Role of the Transcription Factor IRF5 in Innate Immune Responses and Systemic Lupus Erythematosus." *International Immunology* 30 (11): 529–36. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxy032>.
- Barrangou, Rodolphe, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, and Melissa Richards. 2007. "Against Viruses in Prokaryotes." *Science* 315 (March): 1709–12. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- Barrena, S., J. Almeida, M. Yunta, A. López, N. Fernández-Mosteir ın, M. Giral, M. Romero, et al. 2005. "Aberrant Expression of Tetraspanin Molecules in B-Cell Chronic Lymphoproliferative Disorders and Its Correlation with Normal B-Cell Maturation." *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403822>.
- Barretina, Jordi, Giordano Caponigro, Nicolas Stransky, Kavitha Venkatesan, Adam A Margolin, Sungjoon Kim, Gregory V Kryukov, et al. 2012. "The Cancer Cell Line Encyclopedia Enables Predictive Modelling of Anticancer Drug Sensitivity," 7–12. <https://doi.org/10.1038/nature11003>.
- Basso, Katia, and Riccardo Dalla-favera. 2015. "Germinal Centres and Bcell Lymphomagenesis." *Nature Immunology* 15: 172–84.
- Bauer, Daniel E, Matthew C Canver, and Stuart H Orkin. 2014. "Generation of Genomic Deletions in Mammalian Cell Lines via CRISPR / Cas9." *Journal of Visualized Experiments* 83 (January): 1–10. <https://doi.org/10.3791/52118>.
- Beckwith, Kyle A., John C. Byrd, and Natarajan Muthusamy. 2015. "Tetraspanins as Therapeutic Targets in Hematological Malignancy: A Concise Review." *Frontiers in Physiology* 6 (MAR): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00091>.
- Benjamin, David, Thomas J Knobloch, and Mark A Dayton. 1992. "Human B-Cell Interleukin-10: B-Cell Lines Derived From Patients With Acquired Immunodeficiency Syndrome and Burkitt's Lymphoma Constitutively Secrete Large Quantities of Interleukin-10." *Blood* 80 (5): 1289–98.
- Bibikova, Marina, Mary Golic, Kent G Golic, and Dana Carroll. 2002. "Targeted Chromosomal Cleavage and Mutagenesis in Drosophila Using Zinc-Finger Nucleases." *Genetics* 1175 (July): 1169–75.
- Boch, Jens, Heidi Scholze, Sebastian Schornack, Angelika Landgraf, Simone Hahn, Sabine Kay, Thomas Lahaye, Anja Nickstadt, and Ulla Bonas. 2009. "Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors." *Science* 326 (5959): 1509–12. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>.
- Boettcher, Michael, and Michael T. McManus. 2015. "Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR." *Molecular Cell* 58 (4): 575–85. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.028>.

- Bolotin, Alexander, Benoit Quinquis, Alexei Sorokin, and S. Dusko Ehrlich. 2005. "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs) Have Spacers of Extrachromosomal Origin." *Microbiology* 151 (8): 2551–61. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L Siegel, Lindsey A Torre, and Ahmedin Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68 (6): 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Brosseau, Carole, Maxim Durand, Luc Colas, Eugénie Durand, Aurore Foureau, Marie Aude Cheminant, Gregory Bouchaud, et al. 2018. "CD9+ Regulatory B Cells Induce T Cell Apoptosis via IL-10 and Are Reduced in Severe Asthmatic Patients." *Frontiers in Immunology* 9: 3034. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03034>.
- Calado, Dinis P. 2017. "Germinal Centers: Methods and Protocols." *Encyclopedia of Immunobiology* 3: 179–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.09011-1>.
- Canver, Matthew C., Daniel E. Bauer, Abhishek Dass, Yvette Y. Yien, Jacky Chung, Takeshi Masuda, Barry H. Paw, Takahiro Maeda, and Stuart H. Orkin. 2014. "Characterization of Genomic Deletion Efficiency Mediated by Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9 Nuclease System in Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry* 289 (31): 21312–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.564625>.
- Cao, Jun, and Xiaona Tan. 2018. "Comparative Analysis of the Tetraspanin Gene Family in Six Teleost Fishes." *Fish and Shellfish Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.048>.
- Capecchi, Mario R. 2005. "Gene Targeting in Mice: Functional Analysis of the Mammalian Genome for the Twenty-First Century." *Nature Reviews Genetics* 6 (6): 507–12. <https://doi.org/10.1038/nrg1619>.
- Caron, Gersende, Simon Le Gallou, Thierry Lamy, Karin Tarte, and Thierry Fest. 2009. "CXCR4 Expression Functionally Discriminates Centroblasts versus Centrocytes within Human Germinal Center B Cells." *Journal of Immunology* 182: 7595–7602. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804272>.
- Cen, H, and M Pan. n.d. "Expression Data from the Rituximab-Resistant Lymphoma Cell Lines and the Parental Cell Lines."
- Chaimowitz, Natalia S, Dae-Joong Kang, Lee M Dean, and Daniel H Conrad. 2012. "ADAM10 Regulates Transcription Factor Expression Required for Plasma Cell Function." *PloS One* 7 (8): e42694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042694>.
- Chaimowitz, Natalia S, Rebecca K Martin, Joanna Cichy, David R Gibb, Pooja Patil, Dae-Joong Kang, Julie Farnsworth, Eugene C Butcher, Brent Mccright, and Daniel H Conrad. 2011. "ADAM10 Regulates Antibody Production and Maintenance of Lymphoid Architecture 1." *J Immunol. November* 15 (18710): 5114–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102172>.
- Charrin, Stephanie, Serge Manie, Michael Oualid, Martine Billard, and Claude Boucheix. 2002. "Differential Stability of Tetraspanin / Tetraspanin Interactions : Role of Palmitoylation." *Proteins* 516: 139–44.
- Chastagner, Patricia, Eric Rubinstein, and Christel Brou. 2017. "Ligand-Activated Notch Undergoes DTX4-Mediated Ubiquitylation and Bilateral Endocytosis before ADAM10 Processing." *Science Signaling* 10 (483): 1–14. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aag2989>.
- Chen, Allen, Sumin Kim, Nina Shepardson, Sarvagna Patel, Soyon Hong, and Dennis J. Selkoe. 2015. "Physical and Functional Interaction between the α - and γ -Secretases: A New Model of Regulated Intramembrane Proteolysis." *Journal of Cell Biology* 211 (6): 1157–76. <https://doi.org/10.1083/jcb.201502001>.
- Chen, Lihe, Jae Wook Lee, Chung-Lin Chou, Anil V. Nair, Maria A. Battistone, Teodor G. Păunescu, Maria Merkulova, et al. 2017. "Transcriptomes of Major Renal Collecting Duct Cell Types in Mouse Identified by Single-Cell RNA-Seq." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (46): E9989–98. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710964114>.
- Chen, Zhong, Marcelo Pasquini, Bo Hong, Sarah DeHart, Marc Heikens, and Schickwann Tsai. 2005. "The Human Penumbra Gene Is Mapped to a Region on Chromosome 7 Frequently Deleted in Myeloid Malignancies." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 162 (2): 95–98. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2005.03.017>.
- Cheng, Albert W., Chikdu S. Shivalila, Haoyi Wang, Linyu Shi, Rudolf Jaenisch, and Hui Yang. 2013. "One-Step Generation of Mice Carrying Reporter and Conditional Alleles by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering." *Cell* 154 (6): 1370–79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.022>.
- Cheng, H.-T., M. Kim, M. T. Valerius, K. Surendran, K. Schuster-Gossler, A. Gossler, A. P. McMahon, and R. Kopan. 2007. "Notch2, but Not Notch1, Is Required for Proximal Fate Acquisition in the Mammalian Nephron." *Development* 134 (24): 4506–4506. <https://doi.org/10.1242/dev.02887>.
- Chylinski, Krzysztof, Anaïs Le Rhun, and Emmanuelle Charpentier. 2013. "The TracrRNA and Cas9 Families of Type II CRISPR-Cas Immunity Systems." *RNA Biology* 10 (5): 726–37.
- Clavarino, Giovanna, Noémie Delouche, Claire Vettier, David Laurin, Martine Pernollet, Tatiana Raskovalova, Jean Yves Cesbron, Chantal Dumestre-Pérard, and Marie Christine Jacob. 2016. "Novel Strategy for Phenotypic Characterization of Human B Lymphocytes from Precursors to Effector Cells by Flow Cytometry." *PLoS ONE* 11 (9): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162209>.
- Cohen, Stanley N, Annie C Y Chang, Herbert W Boyer, and Robert B Helling. 1973. "Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro (R Factor/Restriction Enzyme/Transformation/Endonuclease/Antibiotic Resistance)." *Pnas* 70 (11): 3240–44.
- Collord, Grace, Sarah J. Farndon, John R. Ferdinand, James Nicholson, Steven Lisgo, Antony C. P. Riddick, Rachel A. Botting, et al. 2018. "Single-Cell Transcriptomes from Human Kidneys Reveal the Cellular Identity of Renal Tumors." *Science* 361 (6402): 594–99. <https://doi.org/10.1126/science.aat1699>.
- Cong, Le, F Ann Ran, David Cox, Lin Shuailiang, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D. Hsu, et al. 2013. "Multiplex Genome

- Engineering Using CRISPR/Cas Systems." *Science* 339 (6121): 819–23. <https://doi.org/10.1126/science.1229223>.
- Cong, Rong, Yuanli Li, and Daniel Biemesderfer. 2011. "A Disintegrin and Metalloprotease 10 Activity Sheds the Ectodomain of the Amyloid Precursor-like Protein 2 and Regulates Protein Expression in Proximal Tubule Cells." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 300 (6): C1366–74. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00451.2010>.
- Cornu, Tatjana I., Stacey Thibodeau-Beganny, Eva Guhl, Stephen Alwin, Magdalena Eichinger, J. K. Joung, and Toni Cathomen. 2008. "DNA-Binding Specificity Is a Major Determinant of the Activity and Toxicity of Zinc-Finger Nucleases." *Molecular Therapy* 16 (2): 352–58. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300357>.
- Corradin, Olivia, Alina Saiakhova, Batool Akhtar-Zaidi, Lois Myeroff, Joseph Willis, Richard Cowper-Sallari, Mathieu Lupien, Sanford Markowitz, and Peter C. Scacheri. 2014. "Combinatorial Effects of Multiple Enhancer Variants in Linkage Disequilibrium Dictate Levels of Gene Expression to Confer Susceptibility to Common Traits." *Genome Research* 24 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1101/gr.164079.113>.
- Crick, Francis Harry. 1970. "Central Dogma of Molecular Biology." *Nature* 227 (6): 561–63.
- Crick, Francis Harry, Leslie Barnett, S. Brenner, and R. J. Watts-Tobin. 1961. "General Nature of the Genetic Code for Proteins." *Nature* 192 (4809): 1227–32. <https://doi.org/10.1038/1921227a0>.
- Cui, Fengmei, Jun Hou, Chengcheng Huang, Xiujin Sun, Yanan Zeng, Huiying Cheng, Hao Wang, and Chao Li. 2017. "C-Myc Regulates Radiation-Induced G2/M Cell Cycle Arrest and Cell Death in Human Cervical Cancer Cells." *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 43 (4): 729–35. <https://doi.org/10.1111/jog.13261>.
- Descatoire, Marc, Sandra Weller, Sabine Irtan, Sabine Sarnacki, Jean Feuillard, Sébastien Storck, Anne Guiochon-Mantel, et al. 2014. "Identification of a Human Splenic Marginal Zone B Cell Precursor with NOTCH2-Dependent Differentiation Properties." *The Journal of Experimental Medicine* 211 (5): 987–1000. <https://doi.org/10.1084/jem.20132203>.
- Dirami, G., N. Ravindranath, M. V. Achi, and M. Dym. 2001. "Expression of Notch Pathway Components in Spermatogonia and Sertoli Cells of Neonatal Mice." *Journal of Andrology* 22 (6): 944–52. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03434.x>.
- Doench, John G., Ella Hartenian, Daniel B. Graham, Zuzana Tothova, Mudra Hegde, Ian Smith, Meagan Sullender, Benjamin L. Ebert, Ramnik J. Xavier, and David E. Root. 2014. "Rational Design of Highly Active SgRNAs for CRISPR-Cas9-Mediated Gene Inactivation." *Nature Biotechnology* 32 (12): 1262–67. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>.
- Doench, John G, Nicolo Fusi, Meagan Sullender, Mudra Hegde, Emma W Vaimberg, Katherine F Donovan, Ian Smith, et al. 2016. "Optimized SgRNA Design to Maximize Activity and Minimize Off-Target Effects of CRISPR-Cas9." *Nature Biotechnology* 34 (2): 184–91. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>.
- Domcke, Silvia, Rileen Sinha, Douglas A. Levine, Chris Sander, and Nikolaus Schultz. 2013. "Evaluating Cell Lines as Tumour Models by Comparison of Genomic Profiles." *Nature Communications* 4: 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms3126>.
- Dominguez-sola, David, Gabriel D Victora, Carol Y Ying, Ryan T Phan, Masumichi Saito, Michel C Nussenzweig, and Riccardo Dalla-favera. 2012. "The Proto-Oncogene MYC Is Required for Selection in the Germinal Center and Cyclic Reentry" 13 (11): 4–7. <https://doi.org/10.1038/ni.2428>.
- Dominguez-Sola, David, Carol Y. Ying, Carla Grandori, Luca Ruggiero, Brenden Chen, Muyang Li, Denise A. Galloway, Wei Gu, Jean Gautier, and Riccardo Dalla-Favera. 2007. "Non-Transcriptional Control of DNA Replication by c-Myc." *Nature* 448 (7152): 445–51. <https://doi.org/10.1038/nature05953>.
- Dornier, Emmanuel, Franck Coumailleau, Jean François Ottavi, Julien Moretti, Claude Boucheix, Philippe Mauduit, François Schweisguth, and Eric Rubinstein. 2012. "Tspanc8 Tetraspanins Regulate ADAM10/Kuzbanian Trafficking and Promote Notch Activation in Flies and Mammals." *Journal of Cell Biology* 199 (3): 481–96. <https://doi.org/10.1083/jcb.201201133>.
- Doudna, Jennifer A., and Emmanuelle Charpentier. 2014. "The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9." *Science* 346 (6213). <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.
- Dunn, C. D., M. L. Sulis, A. A. Ferrando, and I. Greenwald. 2010. "A Conserved Tetraspanin Subfamily Promotes Notch Signaling in *Caenorhabditis Elegans* and in Human Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (13): 5907–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001647107>.
- Dyxhoorn, Derek M., Carl D. Novina, and Phillip A. Sharp. 2003. "Killing the Messenger: Short RNAs That Silence Gene Expression." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (6): 457–67. <https://doi.org/10.1038/nrm1129>.
- Ebsen, Henriette, Alexandra Schröder, Dieter Kabelitz, and Ottmar Janssen. 2013. "Differential Surface Expression of ADAM10 and ADAM17 on Human T Lymphocytes and Tumor Cells." *PLoS ONE* 8 (10): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076853>.
- Endres, Kristina, and Thomas Deller. 2017. "Regulation of Alpha-Secretase ADAM10 In Vitro and In Vivo: Genetic, Epigenetic, and Protein-Based Mechanisms." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (March): 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00056>.
- Epstein, M A, B G Achong, Y M Barr, B Zajac, G Henle, and W Henle. 1966. "Morphological and Virological Investigations on Cultured Burkitt Tumor Lymphoblasts (Strain Raji)." *Journal of National Cancer Institute* 37: 547–59.
- Fagard, M, and H Vaucheret. 2000. "(Trans)Gene Silencing in Plants: How Many Mechanisms?" *Annual Review of Plant Physiology* 51: 167–94.
- Faris, M. 1994. "CD40 Signaling Pathway: Anti-CD40 Monoclonal Antibody Induces Rapid Dephosphorylation and Phosphorylation of Tyrosine-Phosphorylated Proteins Including Protein Tyrosine Kinase Lyn, Fyn, and Syk and the Appearance of a 28-KD Tyrosine Phosphorylated Protein." *Journal of Experimental Medicine* 179 (6): 1923–31. <https://doi.org/10.1084/jem.179.6.1923>.
- Faruqi, A. F., H. J. Datta, D. Carroll, M. M. Seidman, and P. M. Glazer. 2000. "Triple-Helix Formation Induces Recombination in

- Mammalian Cells via a Nucleotide Excision Repair-Dependent Pathway." *Molecular and Cellular Biology* 20 (3): 990–1000. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.3.990-1000.2000>.
- Fasnacht, Nicolas, Hsin-Ying Huang, Ute Koch, Stéphanie Favre, Floriane Auderset, Qian Chai, Lucas Onder, et al. 2014. "Specific Fibroblastic Niches in Secondary Lymphoid Organs Orchestrate Distinct Notch-Regulated Immune Responses." *The Journal of Experimental Medicine* 211 (11): 2265–79. <https://doi.org/10.1084/jem.20132528>.
- Felsenfeld, Gary, and Alexander Rich. 1957. "Studies on the Formation of Two- and Three-Stranded Polyribonucleotides." *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 26 (3): 457–68. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90091-4).
- Felsher, D. W., A. Zetterberg, J. Zhu, T. Tlsty, and J. M. Bishop. 2000. "Overexpression of MYC Causes P53-Dependent G2 Arrest of Normal Fibroblasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (19): 10544–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.190327097>.
- Ferrer, M, M. Yunta, and Pedro A. Lazo. 1998. "Pattern of Expression of Tetraspanin Antigen Genes in Burkitt Lymphoma Cell Lines." 346–52.
- Fire, Andrew, SiQun Xu, Mary Montgomery, Steven Kostas, Samuel Driver, and Craig Mello. 1998. "Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature* 391 (February): 806–11. <https://doi.org/10.1038/35888>.
- Fishilevich, Simon, Ron Nudel, Noa Rappaport, Rotem Hadar, Inbar Plaschkes, Tsippi Iny Stein, Naomi Rosen, et al. 2017. "GeneHancer: Genome-Wide Integration of Enhancers and Target Genes in GeneCards." *Database: The Journal of Biological Databases and Curation* 2017: 1–17. <https://doi.org/10.1093/database/bax028>.
- Fleischmann, R., M. Adams, O White, R. Clayton, E. Kirkness, C. Bult, A. Kerlavage, et al. 1995. "Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of *Haemophilus Influenzae* Rd." *Science* 269 (5223): 496–512. <https://doi.org/10.1126/science.7542800>.
- Flores-Gutiérrez, Juan Pablo, Albert Zlotnik, and Miles Yamanaka. 2014. TSPAN 33 IS A CANDIDATE FOR ANTIBODY TARGETED THERAPY FOR THE TREATMENT OF B CELL HODGKIN LYMPHOMAS, issued 2014.
- Franceschini, A., R. Meier, A. Casanova, S. Kreibich, N. Daga, D. Andritschke, S. Dilling, et al. 2014. "Specific Inhibition of Diverse Pathogens in Human Cells by Synthetic MicroRNA-like Oligonucleotides Inferred from RNAi Screens." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (12): 4548–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402353111>.
- Fujimura, Sayoko, Qing Jiang, Chiyoko Kobayashi, and Ryuichi Nishinakamura. 2010. "Notch2 Activation in the Embryonic Kidney Depletes Nephron Progenitors." *Journal of the American Society of Nephrology* 21 (5): 803–10. <https://doi.org/10.1681/asn.2009040353>.
- Garcia, Thomas Xavier, and Marie Claude Hofmann. 2013. "NOTCH Signaling in Sertoli Cells Regulates Gonocyte Fate." *Cell Cycle* 12 (16): 2538–45. <https://doi.org/10.4161/cc.25627>.
- Gentle, M. E., A. Rose, L. Bugeon, and M. J. Dallman. 2012. "Noncanonical Notch Signaling Modulates Cytokine Responses of Dendritic Cells to Inflammatory Stimuli." *The Journal of Immunology* 189 (3): 1274–84. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103102>.
- Ghazzoui, Nour, Alexis Saintamand, Hussein Issaoui, Christelle Vincent-, and Yves Denizot. 2016. "The IgH 3' Regulatory Region and c-Myc-Induced B-Cell Lymphomagenesis" 8 (4): 7059–67.
- Gibb, David R., Sheinei J. Saleem, Dae-Joong Kang, Mark A. Subler, and Daniel H. Conrad. 2011. "ADAM10 Overexpression Shifts Lympho- and Myelopoiesis by Dysregulating Site 2/Site 3 Cleavage Products of Notch." *The Journal of Immunology* 186 (7): 4244–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003318>.
- Gibb, David R., Mohey El Shikh, Dae-Joong Kang, Warren R. Rowe, Rania El Sayed, Joanna Cichy, Hideo Yagita, et al. 2010. "ADAM10 Is Essential for Notch2-Dependent Marginal Zone B Cell Development and CD23 Cleavage in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (3): 623–35. <https://doi.org/10.1084/jem.20091990>.
- Guo, Jingtao, Edward J. Grow, Hana Mlcochova, Geoffrey J. Maher, Cecilia Lindskog, Xichen Nie, Yixuan Guo, et al. 2018. "The Adult Human Testis Transcriptional Cell Atlas." *Cell Research* 28 (12): 1141–57. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0099-2>.
- Guo, Qiusha, Yinqiu Wang, Piyush Tripathi, Kalyan R. Manda, Malini Mukherjee, Malay Chaklader, Paul F. Austin, Kameswaran Surendran, and Feng Chen. 2015. "Adam10 Mediates the Choice between Principal Cells and Intercalated Cells in the Kidney." *Journal of the American Society of Nephrology* 26 (1): 149–59. <https://doi.org/10.1681/asn.2013070764>.
- Guttmacher, Alan E., and Francis S. Collins. 2003. "Welcome to the Genomic Era." *New England Journal of Medicine* 349 (10): 996–98. <https://doi.org/10.1056/nejme038132>.
- Gutwein, Paul, Anja Schramme, Mohamed Sadek Abdel-Bakky, Kai Doberstein, Ingeborg A. Hauser, Andreas Ludwig, Peter Altevogt, et al. 2010. "ADAM10 Is Expressed in Human Podocytes and Found in Urinary Vesicles of Patients with Glomerular Kidney Diseases." *Journal of Biomedical Science* 17 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-3>.
- Ha, Yun Jung, Hee Jung Seoul, and Jong Ran Lee. 2011. "Ligation of CD40 Receptor in Human B Lymphocytes Triggers the 5-Lipoxygenase Pathway to Produce Reactive Oxygen Species and Activate P38 MAPK." *Experimental and Molecular Medicine* 43 (2): 101–10. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.2.012>.
- Haeussler, Maximilian, Kai Schönig, Hélène Eckert, Alexis Eschstruth, Joffrey Mianné, Jean-Baptiste Renaud, Sylvie Schneider-Maunoury, et al. 2016. "Evaluation of Off-Target and on-Target Scoring Algorithms and Integration into the Guide RNA Selection Tool CRISPOR." *Genome Biology* 17 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>.
- Haining, Elizabeth J., Jing Yang, Rebecca L. Bailey, Kabir Khan, Richard Collier, Schickwann Tsai, Steve P. Watson, Jon Frampton, Paloma Garcia, and Michael G. Tomlinson. 2012. "The TspanC8 Subgroup of Tetraspanins Interacts with a

- Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10) and Regulates Its Maturation and Cell Surface Expression." *Journal of Biological Chemistry* 287 (47): 39753–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.416503>.
- Hammad, Hamida, Matthias Vanderkerken, Philippe Pouliot, Kim Deswarte, Wendy Toussaint, Karl Vergote, Lana Vandersarren, et al. 2017. "Transitional B Cells Commit to Marginal Zone B Cell Fate by Taok3-Mediated Surface Expression of ADAM10." *Nature Immunology* 18 (3): 313–20. <https://doi.org/10.1038/ni.3657>.
- Hayashi, T., Y. Kageyama, K. Ishizaka, G. Xia, K. Kihara, and H. Oshima. 2001. "Requirement of Notch 1 and Its Ligand Jagged 2 Expressions for Spermatogenesis in Rat and Human Testes." *Journal of Andrology* 22 (6): 999–1011. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb03441.x>.
- He, Fei, Li Wang, Xing Bin Hu, Dan Dan Yin, Ping Zhang, Guo Hui Li, Yao Chun Wang, Si Yong Huang, Ying Min Liang, and Hua Han. 2009. "Notch and BCR Signaling Synergistically Promote the Proliferation of Raji B-Lymphoma Cells." *Leukemia Research* 33 (6): 798–802. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.09.016>.
- Hecht, Jonathan L., and Jon C. Aster. 2000. "Molecular Biology of Burkitt Lymphoma BT - (Null)." *Journal of Clinical Oncology* 18 (21): 3707–21. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4313-1>.
- Heikens, Marc J., Thai M. Cao, Chikako Morita, Sarah L. DeHart, and Schickwann Tsai. 2007. "Penumbra Encodes a Novel Tetraspanin That Is Highly Expressed in Erythroid Progenitors and Promotes Effective Erythropoiesis." *Blood* 109 (8): 3244–52. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-046672>.
- Herrtwich, Laura, Indrajit Nanda, Konstantinos Evangelou, Teodora Nikolova, Veronika Horn, Sagar, Daniel Erny, et al. 2016. "DNA Damage Signaling Instructs Polyploid Macrophage Fate in Granulomas." *Cell* 167 (5): 1264-1280.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.054>.
- Heuberger, Julian, and Walter Birchmeier. 2010. "Interplay of Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Canonical Wnt Signaling." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (2): 1–24.
- Hinnen, A., J. B. Hicks, and G. R. Fink. 2006. "Transformation of Yeast." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75 (4): 1929–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.4.1929>.
- Hochane, Mazène, Patrick R. van den Berg, Xueying Fan, Noémie Bérenger-Currias, Esmée Adegeest, Monika Bialecka, Maaïke Nieveen, Maarten Menschaart, Susana M. Chuva de Sousa Lopes, and Stefan Semrau. 2019. *Single-Cell Transcriptomics Reveals Gene Expression Dynamics of Human Fetal Kidney Development*. PLoS Biology. Vol. 17. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000152>.
- Hoffmann, Franziska S., Peer-Hendrik Kuhn, Sarah A. Laurent, Stefanie M. Hauck, Kerstin Berer, Simone A. Wendlinger, Markus Krumbholz, et al. 2015. "The Immunoregulator Soluble TACI Is Released by ADAM10 and Reflects B Cell Activation in Autoimmunity." *The Journal of Immunology* 194 (2): 542–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402070>.
- Holliday, Robin. 1964. "A Mechanism for Gene Conversion in Fungi." *Genetical Research* 5 (2): 282–304. <https://doi.org/10.1017/S0016672300001233>.
- Horvath, Philippe, and Rodolphe Barrangou. 2010. "CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea." *Science* 327 (5962): 167–70. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>.
- Housden, Benjamin E, and Norbert Perrimon. 2016. "Comparing CRISPR and RNAi-Based Screening Technologies." *Nature Biotechnology* 34 (6): 621–23. <https://doi.org/10.1038/nbt.3599>.
- Hsu, Patrick D, David A Scott, Joshua A Weinstein, F Ann Ran, Silvana Konermann, Vineeta Agarwala, Yingqing Li, et al. 2013. "DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases." *Nature Biotechnology* 31 (9): 827–32. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>.
- Huang, Bei, Zhi T. Qi, Zhen Xu, and Pin Nie. 2010. "Global Characterization of Interferon Regulatory Factor (IRF) Genes in Vertebrates: Glimpse of the Diversification in Evolution." *BMC Immunology* 11: 1–28. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-22>.
- Hwang, Il Young, Cedric Boularan, Kathleen Harrison, and John H Kehrl. 2018. "Goi Signaling Promotes Marginal Zone B Cell Development by Enabling Transitional B Cell ADAM10 Expression." *Frontiers in Immunology* 9 (APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00687>.
- Ipsaro, Jonathan J., and Leemor Joshua-Tor. 2015. "From Guide to Target: Molecular Insights into Eukaryotic RNA-Interference Machinery." *Nature Structural and Molecular Biology* 22 (1): 20–28. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2931>.
- Iritani, B M, and R N Eisenman. 1999. "C-Myc Enhances Protein Synthesis and Cell Size during B Lymphocyte Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23): 13180–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10557294><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC23921>.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakamura. 1987. "Nucleotide Sequence of the *lap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isoenzyme Conversion in *Escherichia Coli*, and Identification of the Gene Product." *Journal of Bacteriology* 169 (12): 5429–33. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>.
- Iwahashi, Shuichi, Yoichi Maekawa, Jun Nishida, Chieko Ishifune, Akiko Kitamura, Hideki Arimochi, Keiko Kataoka, Shigeru Chiba, Mitsuo Shimada, and Koji Yasutomo. 2012. "Notch2 Regulates the Development of Marginal Zone B Cells through Fos." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418 (4): 701–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.082>.
- Iwata, Shigeru, Kunihiko Yamaoka, Hiroaki Niuro, Kazuhisa Nakano, Sheau Pey Wang, Koichi Akashi, and Yoshiya Tanaka. 2012. "Amplification of Toll-like Receptor-Mediated Signaling through Spleen Tyrosine Kinase in Human B-Cell Activation." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (6): 1594-1601.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.03.014>.
- Jansen, Ruud, Jam van Embden, Wim Gaastra, and Leo M. Schouls. 2002. "Identification of a Novel Family of Sequence Repeats among Prokaryotes." *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 6 (1): 23–33. <https://doi.org/10.1089/15362310252780816>.

- Jansen, Ruud, Jan Van Embden, Wim Gastra, and Leo Schouls. 2002. "Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes." *Molecular Microbiology* 43 (6): 1565–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>.
- Jeong, Hyun-woo, Un Sil Jeon, Bon-kyoung Koo, Wan-young Kim, Sun-kyoung Im, Juhee Shin, Yunje Cho, Jin Kim, and Young-yun Kong. 2009. "NOTCH-DInephrogenic_JCI2009." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (11): 3290–3300. <https://doi.org/10.1172/JCI38416.3290>.
- Jeppson, J, P Hiren, S Naoki, D Joanne, N Terada, and E Gelfand. 1998. "Requirement for Dual Signals by Anti-CD40 and IL-4 for the Induction of Nuclear Factor-KB, IL-6, and IgE in Human B Lymphocytes." *J Immunol References The Journal of Immunology* 161: 1738–42. <http://www.jimmunol.org/content/161/4/1738>.
- Jiang, Lei, Kang Yu, Jimei Du, Wuhua Ni, Yixiang Han, Shenmeng Gao, Haiying Li, Jianbo Wu, Yihu Zheng, and Yingxia Tan. 2011. "Inhibition of P38 MAPK Activity in B-NHL Raji Cells by Treatment with Engineered CD20-Specific T Cells." *Oncology Letters* 2 (4): 753–58. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.308>.
- Jinek, M., S. H. Sternberg, E. Nogales, M. Kaplan, E. Ma, A. T. Iavarone, M. Hauer, et al. 2014. "Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation." *Science* 343 (6176): 1247997–1247997. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. "A Programmable Dual-RNA – Guided." *Science* 337 (August): 816–22. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Johnston, Laura A., David A. Prober, Bruce A. Edgar, Robert N. Eisenman, and Peter Gallant. 1999. "Drosophila Myc Regulates Cellular Growth during Development." *Cell* 98 (6): 779–90. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81512-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81512-3).
- Jouannet, Stéphanie, Julien Saint-Pol, Laurent Fernandez, Viet Nguyen, Stéphanie Charrin, Claude Boucheix, Christel Brou, Pierre Emmanuel Milhiet, and Eric Rubinstein. 2016. "TspanC8 Tetraspanins Differentially Regulate the Cleavage of ADAM10 Substrates, Notch Activation and ADAM10 Membrane Compartmentalization." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (9): 1895–1915. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2111-z>.
- Jundt, Franziska, Rolf Schwarzer, and Bernd Dörken. 2008. "Notch Signaling in Leukemias and Lymphomas," 51–59.
- Kang, Jung Ah, Woo Seok Kim, and Sung Gyoo Park. 2014. "Notch1 Is an Important Mediator for Enhancing of B-Cell Activation and Antibody Secretion by Notch Ligand." *Immunology* 143 (4): 550–59. <https://doi.org/10.1111/imm.12333>.
- Kannan, Sankaranarayanan, Wendy Fang, Guangchun Song, Charles G. Mullighan, Richard Hammitt, John McMurray, and Patrick A. Zweidler-McKay. 2011. "Notch/HES1-Mediated PARP1 Activation: A Cell Type-Specific Mechanism for Tumor Suppression." *Blood* 117 (10): 2891–2900. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-253419>.
- Karpova, M. B., J. Schoumans, J. Ernberg, J. I. Henter, M. Nordenskjöld, and Bengt Fadeel. 2005. "Raji Revisited: Cytogenetics of the Original Burkitt's Lymphoma Cell Line [12]." *Leukemia* 19 (1): 159–61. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403534>.
- Kim, Jin Soo. 2016. "Genome Editing Comes of Age." *Nature Protocols* 11 (9): 1573–78. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.104>.
- Kim, Yang-Gyun, Jooyeon Cha, and Srinivasan Chandrasegaran. 1996. "Hybrid Restriction Enzymes: Zinc Finger Fusions to Fok I Cleavage Domain." *Biochemistry* 93 (February): 1156–60. <https://doi.org/10.1128/AEM.03246-13>.
- Kim, Yang, Lin Li, and Srinivasan Chandrasegaran. 1994. "Insertion and Deletion Mutants of FokI Restriction Endonuclease." *Journal of Biological Chemistry* 269 (50): 31978–82.
- Kim, Yongsul, Jiyeon Kweon, Annie Kim, Jae Kyung Chon, Ji Yeon Yoo, Hye Joo Kim, Sojung Kim, et al. 2013. "A Library of TAL Effector Nucleases Spanning the Human Genome." *Nature Biotechnology* 31 (3): 251–58. <https://doi.org/10.1038/nbt.2517>.
- Kin, N. W., D. M. Crawford, J. Liu, T. W. Behrens, and J. F. Kearney. 2008. "DNA Microarray Gene Expression Profile of Marginal Zone versus Follicular B Cells and Idiotype Positive Marginal Zone B Cells before and after Immunization with Streptococcus Pneumoniae." *The Journal of Immunology* 180 (10): 6663–74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6663>.
- Kogoshi, Hanae, Taku Sato, Takatoshi Koyama, Nobuo Nara, and Shuji Tohda. 2007. "γ-Secretase Inhibitors Suppress the Growth of Leukemia and Lymphoma Cells," 77–80.
- Krogan, Nevan J., Alan D. Frankel, Jason Fernandes, Sourav Bandyopadhyay, Iván D'Orso, Trey Ideker, Tracy L. Diamond, et al. 2009. "Host Cell Factors in HIV Replication: Meta-Analysis of Genome-Wide Studies." *PLoS Pathogens* 5 (5): e1000437. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000437>.
- Kwon, Jeongwoo, Sung Min Jeong, Inchul Choi, and Nam Hyung Kim. 2016. "ADAM10 Is Involved in Cell Junction Assembly in Early Porcine Embryo Development." *PLoS ONE* 11 (4): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152921>.
- LaFoya, Bryce, Jordan A. Munroe, Masum M. Mia, Michael A. Detweiler, Jacob J. Crow, Travis Wood, Steven Roth, Bikram Sharma, and Allan R. Albig. 2016. "Notch: A Multi-Functional Integrating System of Microenvironmental Signals." *Developmental Biology* 418 (2): 227–41. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.08.023>.
- Lambrecht, Bart N., Matthias Vanderkerken, and Hamida Hammad. 2018. "The Emerging Role of ADAM Metalloproteinases in Immunity." *Nature Reviews Immunology* 18 (12): 745–58. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0068-5>.
- Lambrecht, Bart, Matthias Vanderkerken, and Hamida Hammad. 2018. "The Emerging Role of ADAM Metalloproteinases in Immunity." *Nature Reviews Immunology* 18: 745–758.
- Lapalombella, Rosa, Yuh Ying Yeh, Liwen Wang, Asha Ramanunni, Sarwish Rafiq, Shruti Jha, Justin Staubli, et al. 2012. "Tetraspanin CD37 Directly Mediates Transduction of Survival and Apoptotic Signals." *Cancer Cell* 21 (5): 694–708. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.040>.
- Lazo, Pedro A. 2007. "Functional Implications of Tetraspanin Proteins in Cancer Biology." *Cancer Science* 98 (11): 1666–77. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00584.x>.
- Li, Dan, Saurav De, Su Song, Bharati Matta, and Betsy J. Barnes. 2016. "Specific Detection of Interferon Regulatory Factor 5

- (IRF5): A Case of Antibody Inequality." *Scientific Reports* 6: 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep31002>.
- Li, Li, Fenglong Zhao, Juan Lu, Tingting Li, Hong Yang, Chunhui Wu, and Yiyao Liu. 2014. "Notch-1 Signaling Promotes the Malignant Features of Human Breast Cancer through NF- κ B Activation" 9 (4): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095912>.
- Li, Lin, Louisa P Wu, and Srinivasan Chandrasegaran. 1992. "Functional Domains in Fok I Restriction Endonuclease." *Biochemistry* 89 (May): 4275–79.
- Lien, C., C.-M. Fang, D. Huso, F. Livak, R. Lu, and P. M. Pitha. 2010. "Critical Role of IRF-5 in Regulation of B-Cell Differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (10): 4664–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911193107>.
- Liu, Jing, Na Lv, Xin Cai, Kaili Zhong, Lei Zhou, Sai Huang, Yan Li, Honghao Gao, Wei Guan, and Lan Yang. 2016. "Activation of Non-Classical NF-KB Signaling Pathway Is Associated with Drug Resistance of B Cell Non-Hodgkin ' s Lymphoma" 9 (10): 10242–49.
- Lizama, Carlos, Andreas Ludwig, and Ricardo D. Moreno. 2011. "Etoposide Induces Apoptosis and Upregulation of TACE/ADAM17 and ADAM10 in an in Vitro Male Germ Cell Line Model." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813 (1): 120–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.08.003>.
- Lizama, Carlos, Diego Rojas-benitez, Marcelo Antonelli, Andreas Ludwig, and Ricardo D. Moreno. 2012. "Involvement of TACE/ADAM17 and ADAM10 in Etoposide-Induced Apoptosis of Germ Cells in Rat Spermatogenesis." *Journal of Cellular Physiology* 227 (2): 829–38. <https://doi.org/10.1002/jcp.22795>.
- Lohman, Brian K., Natalie C. Steinel, Jesse N. Weber, and Daniel I. Bolnick. 2017. "Gene Expression Contributes to the Recent Evolution of Host Resistance in a Model Host Parasite System." *Frontiers in Immunology* 8 (SEP). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01071>.
- López-Rodríguez, Cristina, M. Dolores Delgado, Amaya Puig-Kröger, Arsenio Nueda, Eduardo Muñoz, Javier León, Carmelo Bernabéu, and Angel L. Corbí. 2000. "C-Myc Inhibits CD11a and CD11c Leukocyte Integrin Promoters." *European Journal of Immunology* 30 (9): 2465–71. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200009\)30:9<2465::AID-IMMU2465>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200009)30:9<2465::AID-IMMU2465>3.0.CO;2-0).
- Lownik, Joseph C., Andrea J. Luker, Sheela R. Damle, Lauren Folgosa Cooley, Riham El Sayed, Andreas Hutloff, Costantino Pitzalis, Rebecca K. Martin, Mohey Eldin M. El Shikh, and Daniel H. Conrad. 2017. "ADAM10-Mediated ICOS Ligand Shedding on B Cells Is Necessary for Proper T Cell ICOS Regulation and T Follicular Helper Responses." *The Journal of Immunology* 199 (7): 2305–15. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700833>.
- Lownik, Joseph C., Jessica L. Wimberly, Daniel H. Conrad, and Rebecca K. Martin. 2019. "B Cell ADAM10 Controls Murine Lupus Progression through Regulation of the ICOS:ICOS Ligand Axis." *The Journal of Immunology* 202 (3): 664–74. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801207>.
- Luo, Robert F., Shuchun Zhao, Robert Tibshirani, June H. Myklebust, Mrinmoy Sanyal, Rosemary Fernandez, Dita Gratzinger, et al. 2010. "CD81 Protein Is Expressed at High Levels in Normal Germinal Center B Cells and in Subtypes of Human Lymphomas." *Human Pathology* 41 (2): 271–80. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.07.022>.
- Luo, W., W. Hawse, L. Conter, N. Trivedi, F. Weisel, D. Wikenheiser, R. Cattley, and M. Shlomchik. 2019. "The AKT Kinase Signaling Network Is Rewired by PTEN to Control Proximal BCR Signaling in Germinal Center B Cells." *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0376-3>.
- Luo, W, F Weisel, and M Shlomchik. 2018. "B Cell Receptor and CD40 Signaling Are Rewired for Synergistic Induction of the C-Myc Transcription Factor in Germinal Center B Cells." *Immunity* 48 (2): 313-326.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.008>.
- Luu, Van Phi, Peter Hevezi, Felipe Vences-Catalan, José Luis Maravillas-Montero, Clayton Alexander White, Paolo Casali, Luis Lorente, et al. 2013. "TSPAN33 Is a Novel Marker of Activated and Malignant B Cells." *Clinical Immunology* 149 (PB): 388–99. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.08.005>.
- Ma, Ning, Yu Zhang, Qilin Liu, Zhiding Wang, Xiaoling Liu, Gaizhi Zhu, Dandan Yu, et al. 2017. "B Cell Activating Factor (BAFF) Selects IL-10 – B Cells over IL-10 + B Cells during Inflammatory Responses." *Molecular Immunology* 85: 18–26.
- Mabbott, Neil A., J. K. Baillie, Helen Brown, Tom C. Freeman, and David A. Hume. 2013. "An Expression Atlas of Human Primary Cells: Inference of Gene Function from Coexpression Networks." *BMC Genomics* 14 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-632>.
- Mabbott, Neil A., and David Gray. 2014. "Identification of Co-Expressed Gene Signatures in Mouse B1, Marginal Zone and B2 B-Cell Populations." *Immunology* 141 (1): 79–95. <https://doi.org/10.1111/imm.12171>.
- Majumdar, Alok, Alexander Khorlin, Natalia Dyatkina, F.-L. Michael Lin, James Powerl, Jilan Liu, Zhizhong Fei, et al. 1998. "Targeted Gene Knockout Mediated by Triple Helix Forming Oligonucleotides." *Nature Genetics* Volume, 212–14.
- Makarova, Kira S, Nick V Grishin, Svetlana A Shabalina, Yuri I Wolf, and Eugene V Koonin. 2006. "A Putative RNA-Interference-Based Immune System in Prokaryotes: Computational Analysis of the Predicted Enzymatic Machinery, Functional Analogies with Eukaryotic RNAi, and Hypothetical Mechanisms of Action." *BMC Biology* Direct 26: 1–26. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>.
- Makarova, Kira S, and Eugene V Koonin. 2015. "Crispr" 1311. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9>.
- Mancao, Christoph, and Wolfgang Hammerschmidt. 2007. "Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Is a B-Cell Receptor Mimic and Essential for B-Cell Survival Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Is a B-Cell Receptor Mimic and Essential for B-Cell Survival Christoph Mancao and Wolfgang Hammerschmidt." *Hematology* 110 (10): 3715–22. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-090142>.
- Mansour, Amal, Brian Mccarthy, Stephan K Schwander, Victor Chang, Sergei Kottenko, Sreekrishna Donepudi, Janet Lee, and

- Elizabeth Raveche. 2004. "Genistein Induces G₂ Arrest in Malignant B Cells by Decreasing IL-10 ND ES SC KEY WORDS INTRODUCTION RIB." *Cell Cycle*, no. December: 1597–1605.
- Martin, H. J., J. M. Lee, D. Walls, and S. D. Hayward. 2007. "Manipulation of the Toll-Like Receptor 7 Signaling Pathway by Epstein-Barr Virus." *Journal of Virology* 81 (18): 9748–58. <https://doi.org/10.1128/jvi.01122-07>.
- Masciopinto, Francesca, Susanna Campagnoli, Sergio Abrignani, Yasushi Uematsu, and Piero Pileri. 2001. "The Small Extracellular Loop of CD81 Is Necessary for Optimal Surface Expression of the Large Loop, a Putative HCV Receptor." *Virus Research* 80 (1–2): 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00245-3).
- Matthews, Alexandra L., Chek Z. Koo, J. Szyroka, N. Harrson, A. Kanhere, and Michael G. Tomlinson. 2018. "Regulation of Leukocytes by TspanC8 Tetraspanins and the 'Molecular Scissor' ADAM10." *Frontiers in Immunology* 9 (July): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01451>.
- Matthews, Alexandra L., Peter J. Noy, Jasmeet S. Reyat, and Michael G. Tomlinson. 2017. "Regulation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Family Sheddases ADAM10 and ADAM17: The Emerging Role of Tetraspanins and Rhomboids." *Platelets* 28 (4): 333–41. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1184751>.
- Matthews, Alexandra L., Justyna Szyroka, Richard Collier, Peter J. Noy, and Michael G. Tomlinson. 2017. "Scissor Sisters: Regulation of ADAM10 by the TspanC8 Tetraspanins." *Biochemical Society Transactions* 45 (3): 719–30. <https://doi.org/10.1042/BST20160290>.
- Mattila, Pieta K., Christoph Feest, David Depoil, Bebhinn Treanor, Beatriz Montaner, Kevin L. Otipoby, Robert Carter, Louis B. Justement, Andreas Bruckbauer, and Facundo D. Batista. 2013. "The Actin and Tetraspanin Networks Organize Receptor Nanoclusters to Regulate B Cell Receptor-Mediated Signaling." *Immunity* 38 (3): 461–74. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.019>.
- Meirmans, Patrick G. 2019. "Hardy–Weinberg Equilibrium." *Encyclopedia of Ecology* 3: 118–26. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10555-X>.
- Mertz, J. E., and R. W. Davis. 1972. "Cleavage of DNA by R1 Restriction Endonuclease Generates Cohesive Ends." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69 (11): 3370–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.11.3370>.
- Miller, Jeffrey C., Siyuan Tan, Guijuan Qiao, Kyle A Barlow, Jianbin Wang, Danny F Xia, Xiangdong Meng, et al. 2011. "A TALE Nuclease Architecture for Efficient Genome Editing." *Nature Biotechnology* 29 (2): 143–48. <https://doi.org/10.1038/nbt.1755>.
- Mojica, Francisco J.M., César Díez-Villaseñor, Jesús García-Martínez, and Elena Soria. 2005. "Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements." *Journal of Molecular Evolution* 60 (2): 174–82. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.
- Mojica, Francisco J.M., and Francisco Rodríguez-Valera. 2016. "The Discovery of CRISPR in Archaea and Bacteria." *FEBS Journal* 283: 3162–69. <https://doi.org/10.1111/febs.13766>.
- Moon, Su Bin, Jeong Mi Lee, Jeong Gu Kang, Nan Ee Lee, Dae In Ha, Do Yon Kim, Sun Hee Kim, et al. 2018. "Highly Efficient Genome Editing by CRISPR-Cpf1 Using CRISPR RNA with a Uridinylate-Rich 3'-Overhang." *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06129-w>.
- Morgens, David W., Richard M. Deans, Amy Li, and Michael C. Bassik. 2016. "Systematic Comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi Screens for Essential Genes." *Nature Biotechnology* 34 (6): 634–36. <https://doi.org/10.1038/nbt.3567>.
- Moscou, Matthew J, and Adam J Bogdanove. 2009. "Recognition by TAL Effectors." *Science* 326 (December): 1501.
- Moser, Heinz E., and Peter B. Dervan. 1987. "Sequence - Specific Cleavage of Double Helical DNA by Triple Helix Formation." *Science* 238 (4827): 645–50. <https://doi.org/10.1126/science.3118463>.
- Mukherjee, Malini, Jennifer deRiso, Karla Otterpohl, Ishara Ratnayake, Divya Kota, Phil Ahrenkiel, Indra Chandrasekar, and Kameswaran Surendran. 2018. "Endogenous Notch Signaling in Adult Kidneys Maintains Segment-Specific Epithelial Cell Types of the Distal Tubules and Collecting Ducts to Ensure Water Homeostasis." *Journal of the American Society of Nephrology* 30 (1): 110–26. <https://doi.org/10.1681/asn.2018040440>.
- Murta, Daniel, Marta Batista, Elisabete Silva, Alexandre Trindade, Domingos Henrique, António Duarte, and Luís Lopes-da-Costa. 2013. "Dynamics of Notch Pathway Expression during Mouse Testis Post-Natal Development and along the Spermatogenic Cycle." *PLoS ONE* 8 (8): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072767>.
- Murta, Daniel, Marta Batista, Alexre Trindade, Elisabete Silva, Domingos Henrique, António Duarte, and Luís Lopes-da-Costa. 2014. "In Vivo Notch Signaling Blockade Induces Abnormal Spermatogenesis in the Mouse." *PLoS ONE* 9 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113365>.
- Mussolino, Claudio, Jamal Alzubi, Eli J. Fine, Robert Morbitzer, Thomas J. Cradick, Thomas Lahaye, Gang Bao, and Toni Cathomen. 2014. "TALENs Facilitate Targeted Genome Editing in Human Cells with High Specificity and Low Cytotoxicity." *Nucleic Acids Research* 42 (10): 6762–73. <https://doi.org/10.1093/nar/gku305>.
- Naert, Thomas, and Kris Vleminckx. 2018. "Methods for CRISPR/Cas9 Xenopus Tropicalis Tissue-Specific Multiplex Genome Engineering" 1865: 33–54. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8784-9>.
- Natkanski, Elizabeth, Wing Yiu Lee, Bhakti Mistry, Antonio Casal, Justin E. Molloy, and Pavel Tolar. 2013. "B Cells Use Mechanical Energy to Discriminate Antigen Affinities." *Science* 340 (6140): 1587–90. <https://doi.org/10.1126/science.1237572>.
- Néron, Sonia, Garnet Suck, Xue Zhong Ma, Darinka Sakac, Annie Roy, Yulia Katsman, Nathalie Dussault, Claudia Racine, and Donald R. Branch. 2006. "B Cell Proliferation Following CD40 Stimulation Results in the Expression and Activation of Src Protein Tyrosine Kinase." *International Immunology* 18 (2): 375–87. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh377>.
- Newman, Rebecca, Helena Ahlfors, Alexander Saveliev, Alison Galloway, Daniel J. Hodson, Robert Williams, Gurdyal S. Besra, et al. 2017. "Maintenance of the Marginal-Zone B Cell Compartment Specifically Requires the RNA-Binding Protein

- ZFP36L1." *Nature Immunology* 18 (6): 683–93. <https://doi.org/10.1038/ni.3724>.
- Nguyen, David H, Tony Zhou, Jessica Shu, Jian-hua Mao, Life Sciences Division, and Lawrence Berkeley. 2013. "Cancer InCytes Cancer InCytes" 2 (1).
- Nirenberg, Marshall. 2004. "Historical Review: Deciphering the Genetic Code - A Personal Account." *Trends in Biochemical Sciences* 29 (1): 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.009>.
- Nirenberg, Marshall, and Heinrich Matthaei. 1961. "The Dependence of Cell-Free Protein Synthesis in *E. Coli* upon Naturally Occurring or Synthetic Polyribonucleotides." *Biological Chemistry*, 1588–1602. <https://doi.org/10.5194/bg-10-399-2013>.
- Nojima, Takuya, Kei Haniuda, Tatsuya Moutai, Moeko Matsudaira, Sho Mizokawa, Ikuo Shiratori, Takachika Azuma, and Daisuke Kitamura. 2011. "In-Vitro Derived Germinal Centre B Cells Differentially Generate Memory B or Plasma Cells in Vivo." *Nature Communications* 2 (1): 411–65. <https://doi.org/10.1038/ncomms1475>.
- Nowosad, Carla R., Katelyn M. Spillane, and Pavel Tolar. 2016. "Germinal Center B Cells Recognize Antigen through a Specialized Immune Synapse Architecture." *Nature Immunology* 17 (7): 870–77. <https://doi.org/10.1038/ni.3458>.
- Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak, and R. J. Rothstein. 1981. "Yeast Transformation: A Model System for the Study of Recombination." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (10): 6354–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6354>.
- Osipo, Clodia, Todd E. Golde, Barbara A. Osborne, and Lucio A. Miele. 2008. "Off the Beaten Pathway: The Complex Cross Talk between Notch and NF- κ B." *Laboratory Investigation* 88 (1): 11–17. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700700>.
- Osvaldova, Alena, Hana Stepanova, Martin Faldyna, and Jan Matiasovic. 2017. "Gene Expression Values of Pattern-Recognition Receptors in Porcine Leukocytes and Their Response to Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Infection." *Research in Veterinary Science* 114: 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.02.026>.
- Paddison, Patrick J, and Gregory J Hannon. 2002. "RNA-Interference-the-New-Somatic-Cell-Genetics-_2002_Cancer-Cell," 17–23.
- Palanichamy, Arumugam, Jennifer Barnard, Bo Zheng, Teresa Owen, Tam Quach, R John Looney, Iñaki Sanz, and Jennifer H Anolik. 2009. "Novel Human Transitional B Cell Populations Revealed by B Cell Depletion Therapy Arumugam." *New York* 182 (10): 5982–93. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801859>.Novel.
- Peng, Rongxue, Guigao Lin, and Jinming Li. 2016. "Potential Pitfalls of CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing." *FEBS Journal* 283 (7): 1218–31. <https://doi.org/10.1111/febs.13586>.
- Peretz, Liat, Elazar Besser, Renana Hajbi, Natania Casden, Dan Ziv, Nechama Kronenberg, Liat Ben Gigi, et al. 2018. "Combined ShRNA over CRISPR/Cas9 as a Methodology to Detect off-Target Effects and a Potential Compensatory Mechanism." *Scientific Reports* 8 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18551-z>.
- Pérez-Martínez, C. A., J. L. Maravillas-Montero, I. Meza-Herrera, F. Vences-Catalán, A. Zlotnik, and L. Santos-Argumedo. 2017. "Tspan33 Is Expressed in Transitional and Memory B Cells, but Is Not Responsible for High ADAM10 Expression." *Scandinavian Journal of Immunology* 86 (1): 23–30. <https://doi.org/10.1111/sji.12559>.
- Petersen, Christian P., Marie Eve Bordeleau, Jerry Pelletier, and Phillip A. Sharp. 2006. "Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells." *Molecular Cell* 21 (4): 533–42. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.031>.
- Petterson, Henrik Sahlin, Anastasia Galashevskaya, Berit Doseth, Mirta M.L. Sousa, Antonio Sarno, Torkild Visnes, Per Arne Aas, et al. 2015. "AID Expression in B-Cell Lymphomas Causes Accumulation of Genomic Uracil and a Distinct AID Mutational Signature." *DNA Repair* 25: 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.11.006>.
- Pontén, F. K., J. M. Schwenk, A. Asplund, and P. H D Edqvist. 2011. "The Human Protein Atlas as a Proteomic Resource for Biomarker Discovery." *Journal of Internal Medicine* 270 (5): 428–46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02427.x>.
- Pourcel, C., G. Salvignol, and Gilles Vergnaud. 2005. "CRISPR Elements in *Yersinia Pestis* Acquire New Repeats by Preferential Uptake of Bacteriophage DNA, and Provide Additional Tools for Evolutionary Studies." *Microbiology* 151 (3): 653–63. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>.
- Priyathilaka, Thanthrige Thiunuwan, S. D.N.K. Bathige, H. M.L.P.B. Herath, Sukkyoung Lee, and Jehee Lee. 2017. "Molecular Identification of Disk Abalone (*Haliotis Discus Discus*) Tetraspanin 33 and CD63: Insights into Potent Players in the Disk Abalone Host Defense System." *Fish and Shellfish Immunology* 69: 173–84. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.08.020>.
- Pulecio, Julian, Oriol Alejo-Valle, Sandra Capellera-Garcia, Marianna Vitaloni, Paula Rio, Eva Mejía-Ramírez, Ilaria Caserta, Juan A. Bueren, Johan Flygare, and Angel Raya. 2016. "Direct Conversion of Fibroblasts to Megakaryocyte Progenitors." *Cell Reports* 17 (3): 671–83. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.036>.
- Raafat, Ahmed, Sharon Bargo, David McCurdy, and Robert Callahan. 2017. "The ANK Repeats of Notch-4/Int3 Activate NF- κ B Canonical Pathway in the Absence of Rbpj and Causes Mammary Tumorigenesis." *Scientific Reports* 7 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13989-7>.
- Radtke, Freddy, Anne Wilson, Stephane J.C. Mancini, and H. Robson MacDonald. 2004. "Notch Regulation of Lymphocyte Development and Function." *Nature Immunology* 5 (3): 247–53. <https://doi.org/10.1038/ni1045>.
- Rakoczy, Piroška Elizabeth. 2001. "Antisense DNA Technology." *Vision Research Protocols* 47 (2): 89–104. <https://doi.org/10.1385/1-59259-085-3:89>.
- Ramalingam, Sivaprakash, Karthikeyan Kandavelou, Raja Rajenderan, and Srinivasan Chandrasegaran. 2011. "Creating Designed Zinc-Finger Nucleases with Minimal Cytotoxicity." *Journal of Molecular Biology* 405 (3): 630–41. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.043>.
- Ran, F Ann, Patrick D Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A Scott, and Feng Zhang. 2013. "Genome Engineering Using

- the CRISPR-Cas9 System" 8 (11): 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- Rand, M. D., L. M. Grimm, S. Artavanis-Tsakonas, V. Patriub, S. C. Blacklow, J. Sklar, and J. C. Aster. 2000. "Calcium Depletion Dissociates and Activates Heterodimeric Notch Receptors." *Molecular and Cellular Biology* 20 (5): 1825–35. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1825-1835.2000>.
- Resnick, Michael A. 1976. "The Repair of Double-Strand Breaks in DNA: A Model Involving Recombination." *Journal of Theoretical Biology* 59 (1): 97–106. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(76\)80025-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(76)80025-2).
- Reyat, Jasmeet S., Myriam Chimen, Peter J. Noy, Justyna Szyroka, G. Ed Rainger, and Michael G. Tomlinson. 2017. "ADAM10-Interacting Tetraspanins Tspan5 and Tspan17 Regulate VE-Cadherin Expression and Promote T Lymphocyte Transmigration." *The Journal of Immunology* 199 (2): 666–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600713>.
- Rich, Alexander. 1989. "On Looking Back at a Biochimica et Biophysica Acta Paper Published 32 Years Ago : A Commentary By" 1000: 82–86.
- Rinschen, Markus M, Markus Gödel, Florian Grahammer, Stefan Zschiedrich, Martin Helmstädter, Oliver Kretz, Mostafa Zarei, et al. 2018. "A Multi-Layered Quantitative In Vivo Expression Atlas of the Podocyte Unravels Kidney Disease Candidate Genes." *Cell Reports* 23 (8): 2495–2508. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.059>.
- Rouet, P, F Smih, and M Jasin. 1994. "Introduction of Double-Strand Breaks into the Genome of Mouse Cells by Expression of a Rare-Cutting Endonuclease." *Molecular and Cellular Biology* 14 (12): 8096–8106. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8096>.
- Rubinstein, Eric, François Le Naour, Cécile Lagaudrière-Gesbert, Martine Billard, Hélène Conjeaud, and Claude Boucheix. 1996. "CD9, CD63, CD81, and CD82 Are Components of a Surface Tetraspanin Network Connected to HLA-DR and VLA Integrins." *European Journal of Immunology* 26 (11): 2657–65. <https://doi.org/10.1002/eji.1830261117>.
- Rudin, N, and J E Haber. 1988. "Efficient Repair of HO-Induced Chromosomal Breaks in *Saccharomyces Cerevisiae* by Recombination between Flanking Homologous Sequences." *Molecular and Cellular Biology* 8 (9): 3918–28. <https://doi.org/10.1128/mcb.8.9.3918>.
- Ruiz-García, Almudena, Susana López-López, José Javier García-Ramírez, Victoriano Baladrón, María José Ruiz-Hidalgo, Laura López-Sanz, Ángela Ballesteros, Jorge Laborda, Eva María Monsalve, and María José M. Díaz-Guerra. 2016. "The Tetraspanin TSPAN33 Controls TLR-Triggered Macrophage Activation through Modulation of NOTCH Signaling." *The Journal of Immunology* 197 (8): 3371–81. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600421>.
- Rutz, S., M. Janke, N. Kassner, T. Hohnstein, M. Krueger, and A. Scheffold. 2008. "Notch Regulates IL-10 Production by T Helper 1 Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (9): 3497–3502. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712102105>.
- Ryan, Russell J.H., Jelena Petrovic, Dylan M. Rausch, Yeqiao Zhou, Caleb A. Lareau, Michael J. Kluk, Amanda L. Christie, et al. 2017. "A B Cell Regulome Links Notch to Downstream Oncogenic Pathways in Small B Cell Lymphomas." *Cell Reports* 21 (3): 784–97. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.066>.
- Ryser, Stephan, Dominique Glauser, Michelle Vigier, Yong Q. Zhang, Philippe Tachini, Werner Schlegel, Philippe Durand, and Irmgard Irminger-Finger. 2011. "Gene Expression Profiling of Rat Spermatogonia and Sertoli Cells Reveals Signaling Pathways from Stem Cells to Niche and Testicular Cancer Cells to Surrounding Stroma." *BMC Genomics* 12 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-29>.
- Saint-Pol, Julien, Martine Billard, Emmanuel Dornier, Etienne Eschenbrenner, Lydia Danglot, Claude Boucheix, Stéphanie Charrin, and Eric Rubinstein. 2017. "New Insights into the Tetraspanin Tspan5 Using Novel Monoclonal Antibodies." *Journal of Biological Chemistry* 292 (23): 9551–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.765669>.
- Saito, Toshiki, Shigeru Chiba, Motoshi Ichikawa, Atsushi Kunisato, Takashi Asai, Kiyoshi Shimizu, Tomoyuki Yamaguchi, et al. 2003. "Notch2 Is Preferentially Expressed in Mature B Cells and Indispensable for Marginal Zone B Lineage Development." *Immunity* 18 (5): 675–85. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00111-0).
- Sander, Jeffry D., and J. Keith Joung. 2014. "CRISPR-Cas Systems for Editing, Regulating and Targeting Genomes." *Nature Biotechnology* 32 (4): 347–50. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>.
- Sander, Sandrine, Dinis P. Calado, Lakshmi Srinivasan, Karl Köchert, Baochun Zhang, Maciej Rosolowski, Scott J. Rodig, et al. 2012. "Synergy between PI3K Signaling and MYC in Burkitt Lymphomagenesis." *Cancer Cell* 22 (2): 167–79. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.012>.
- Santos, Ana Carolina Dos, Marcela Cristina Robaina, Lídia Maria Magalhães De Rezende, Patricia Severino, and Claudete Esteves Klumb. 2014. "Histone Deacetylase Inhibitor Prevents Cell Growth in Burkitt's Lymphoma by Regulating PI3K/Akt Pathways and Leads to Upregulation of MiR-143, MiR-145, and MiR-101." *Annals of Hematology* 93 (6): 983–93. <https://doi.org/10.1007/s00277-014-2021-4>.
- Santos, M. A., L. M. Sarmento, M. Rebelo, A. A. Doce, I. Maillard, A. Dumortier, H. Neves, et al. 2007. "Notch1 Engagement by Delta-like-1 Promotes Differentiation of B Lymphocytes to Antibody-Secreting Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (39): 15454–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702891104>.
- Sauer, Noel J., Jerry Mozoruk, Ryan B. Miller, Zachary J. Warburg, Keith A. Walker, Peter R. Beetham, Christian R. Schöpke, and Greg F. W. Gocal. 2016. "Oligonucleotide-Directed Mutagenesis for Precision Gene Editing." *Plant Biotechnology Journal* 14 (2): 496–502. <https://doi.org/10.1111/pbi.12496>.
- Saupel-easton, Damien, Fabien B Vincent, Pin Shie Quah, A Wei, S Ting, Carlo M. Croce, Constantine Tam, and Fabienne Mackay. 2016. "The BAFF Receptor TACI Controls IL10 Production by Bregs and CLL B Cells." *Leukemia* 30: 163–72.
- Savelyeva, L, and S Mamaeva. 1988. "Population Analysis of Karyotypic Heterogeneity of the Raji Burkitt Lymphoma Cell Line. Analysis of 100 Karyotypes." *Cancer Genetics and Cytogenetics* 34 (1): 63–75.
- Scheller, H, S Tobollik, A Kutzera, M Eder, J Unterlehberg, I Pfeil, and B Jungnickel. 2010. "C-Myc Overexpression Promotes a

- Germinal Center-like Program in Burkitt's Lymphoma." *Oncogene* 29 (6): 888–97. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.377>.
- Schmid-Burgk, Jonathan L, Tobias Schmidt, Vera Kaiser, Klara Höning, and Veit Hornung. 2012. "A Ligation-Independent Cloning Technique for High-Throughput Assembly of Transcription Activator-like Effector Genes." *Nature Biotechnology* 31 (1): 76–81. <https://doi.org/10.1038/nbt.2460>.
- Schmidt, C., D. F. Voytas, A. Hummel, M. Christian, T. Cermak, F. Zhang, A. J. Bogdanove, and E. L. Doyle. 2010. "Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases." *Genetics* 186 (2): 757–61. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>.
- Schmiedel, Benjamin J., Divya Singh, Ariel Madrigal, Alan G. Valdovino-Gonzalez, Brandie M. White, Jose Zapardiel-Gonzalo, Brendan Ha, et al. 2018. "Impact of Genetic Polymorphisms on Human Immune Cell Gene Expression." *Cell* 175 (6): 1701–1715.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.022>.
- Seegar, Tom C.M., Lauren B. Killingsworth, Nayanendu Saha, Peter A. Meyer, Dhableswar Patra, Brandon Zimmerman, Peter W. Janes, et al. 2017. "Structural Basis for Regulated Proteolysis by the α -Secretase ADAM10." *Cell* 171 (7): 1638–1648.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.014>.
- Seidman, Michael M., and Peter M. Glazer. 2003. "The Potential for Gene Repair via Triple Helix Formation." *Journal of Clinical Investigation* 112 (4): 487–94. <https://doi.org/10.1172/JCI19552>.
- Seipold, Lisa, Hermann Altmepfen, Tomas Koudelka, Andreas Tholey, Petr Kaspárek, Radislav Sedláček, Michaela Schweizer, et al. 2018. "In Vivo Regulation of the A Disintegrin and Metalloproteinase 10 (ADAM10) by the Tetraspanin 15." *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (17): 3251–67. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2791-2>.
- Seipold, Lisa, Markus Damme, Johannes Prox, Björn Rabe, Petr Kaspárek, Radislav Sedláček, Hermann Altmepfen, et al. 2017. "Tetraspanin 3: A Central Endocytic Membrane Component Regulating the Expression of ADAM10, Presenilin and the Amyloid Precursor Protein." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1864 (1): 217–30. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.003>.
- Seipold, Lisa, and Paul Saftig. 2016. "The Emerging Role of Tetraspanins in the Proteolytic Processing of the Amyloid Precursor Protein." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9 (December): 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00149>.
- Sha, Jiahao, Shaohui Ji, Ye Bi, Xiuqiong Pu, Wei Li, Andy Peng Xiang, Zuomin Zhou, et al. 2014. "Generation of Gene-Modified Cynomolgus Monkey via Cas9/RNA-Mediated Gene Targeting in One-Cell Embryos." *Cell* 156 (4): 836–43. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.027>.
- Shah, Jimit, Florian Rouaud, Diego Guerrero, Ekaterina Vasileva, Lauren M. Popov, William L. Kelley, Eric Rubinstein, Jan E. Carette, Manuel R. Amieva, and Sandra Citi. 2018. "A Dock-and-Lock Mechanism Clusters ADAM10 at Cell-Cell Junctions to Promote α -Toxin Cytotoxicity." *Cell Reports* 25 (8): 2132–2147.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.088>.
- Sigoillot, Frederic D., and Randall W. King. 2011. "Vigilance and Validation: Keys to Success in RNAi Screening." *ACS Chemical Biology* 6 (1): 47–60. <https://doi.org/10.1021/cb100358f>.
- Skaar, Karin, Henryk J. Korza, Michael Tarry, Petra Sekyřová, and Martin Högbom. 2015. "Expression and Subcellular Distribution of GFP-Tagged Human Tetraspanin Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae*." *PLoS ONE* 10 (7): 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134041>.
- Smith, Ian, Peyton G. Greenside, Ted Natoli, David L. Lahr, David Wadden, Itay Tirosh, Rajiv Narayan, et al. 2017. "Evaluation of RNAi and CRISPR Technologies by Large-Scale Gene Expression Profiling in the Connectivity Map." *PLoS Biology* 15 (11): 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003213>.
- Smithies, Oliver, Ronald Gregg, Sallie Boggs, Michael Koralewski, and Raju Kucherlapati. 1985. "Insertion of DNA Sequences into the Human Chromosomal B-Globin Locus by Homologous Recombination." *Nature* 317 (19): 230–34. <https://doi.org/10.1038/316507a0>.
- Smulski, Cristian R., Patrick Kury, Lea M. Seidel, Hannah S. Staiger, Anna K. Edinger, Laure Willen, Maximilian Seidl, et al. 2017. "BAFF- and TACI-Dependent Processing of BAFFR by ADAM Proteases Regulates the Survival of B Cells." *Cell Reports* 18 (9): 2189–2202. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.005>.
- Sohni, Abhishek, Kun Tan, Hye Won Song, Dana Burow, Dirk G. de Rooij, Louise Laurent, Tung Chin Hsieh, et al. 2019. "The Neonatal and Adult Human Testis Defined at the Single-Cell Level." *Cell Reports* 26 (6): 1501–1517.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.045>.
- Stipp, Christopher S., Tatiana V. Kolesnikova, and Martin E. Hemler. 2003. "Functional Domains in Tetraspanin Proteins." *Trends in Biochemical Sciences* 28 (2): 106–12. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)00014-2).
- Stoek, Alexander, Sascha Keller, Svenja Riedle, Michael P. Sanderson, Steffen Runz, Francois Le Naour, Paul Gutwein, Andreas Ludwig, Eric Rubinstein, and Peter Altevogt. 2006. "A Role for Exosomes in the Constitutive and Stimulus-Induced Ectodomain Cleavage of L1 and CD44." *Biochemical Journal* 393 (3): 609–18. <https://doi.org/10.1042/BJ20051013>.
- Strobel, Scott, and Peter Dervan. 1990. "Site-Specific Cleavage of a Yeast Chromosome by Oligonucleotide-Directed Triple-Helix Formation." *Science* 249: 73–75.
- Sukhatme, Vikas, and Zaheed Husain. 2016. CANCER THERAPY TARGETING TETRASPANIN 33 (TSPAN33) IN MYELOID DERIVED SUPPRESSOR CELLS, issued 2016.
- Sun, Jianbo, Jiguang Wang, Evangelos Pefanis, Jaime Chao, Gerson Rothschild, Isao Tachibana, Jun Kui Chen, et al. 2015. "Transcriptomics Identify CD9 as a Marker of Murine IL-10-Competent Regulatory B Cells." *Cell Reports* 13 (6): 1110–17. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.070>.
- Szostak, Jack W., and Ray Wu. 1979. "Insertion of a Genetic Marker into the Ribosomal DNA of Yeast." *Plasmid* 2 (4): 536–54. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(79\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0147-619X(79)90053-2).

- Taiwo, Idowu A., Olufemi A. Oloyede, and Ade O. Dosumu. 2011. "Frequency of Sickle Cell Genotype among the Yorubas in Lagos: Implications for the Level of Awareness and Genetic Counseling for Sickle Cell Disease in Nigeria." *Journal of Community Genetics* 2 (1): 13–18. <https://doi.org/10.1007/s12687-010-0033-x>.
- Tang, Zefang, Chenwei Li, Boxi Kang, Ge Gao, Cheng Li, and Zemin Zhang. 2017. "GEPIA: A Web Server for Cancer and Normal Gene Expression Profiling and Interactive Analyses." *Nucleic Acids Research* 45 (W1): W98–102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>.
- Tavecchio, Michele, Matteo Simone, Sergio Bernasconi, Gianluca Tognon, Giuliano Mazzini, and Eugenio Erba. 2008. "Multi-Parametric Flow Cytometric Cell Cycle Analysis Using TO-PRO-3 Iodide (TP3): Detailed Protocols" 110: 232–44. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2007.10.007>.
- Thomas, Matthew, Marco Calamito, Bhaskar Srivastava, Ivan Maillard, Warren S. Pear, and David Allman. 2007. "Notch Activity Synergizes with B-Cell-Receptor and CD40 Signaling to Enhance B-Cell Activation." *Blood* 109 (8): 3342–50. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-09-046698>.
- Thuong, Nguyen, and Claude Hélène. 1993. "Sequence-Specific Recognition and Modification of Double-Helical DNA by Oligonucleotides." *Angewandte Chemie International Edition* 32: 666–90.
- Tres, Laura L., and Abraham L. Kierszenbaum. 2005. "The ADAM-Integrin-Tetraspanin Complex in Fetal and Postnatal Testicular Cords." *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* 75 (2): 130–41. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20041>.
- Treuren, Timothy Van, and Jamboor K. Vishwanatha. 2018. "CRISPR Deletion of MIEN1 in Breast Cancer Cells." *PLoS ONE* 13 (10): 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204976>.
- Tsai, Schickwann. 2018. ANTI - PENUMBRA MONOCLONAL ANTIBODIES FOR DETECTION AND THERAPY OF NORMAL AND ABNORMAL B LYMPHOCYTES, issued 2018.
- Uhlmann, Virginie, Caroline Kampf, Robin Strand, Andreas Kärnsnäs, Palanisamy Ponnusamy, IssacNiwas Swamidoss, Carolina Wählby, and Martin Simonsson. 2013. "Automated Classification of Immunostaining Patterns in Breast Tissue from the Human Protein Atlas." *Journal of Pathology Informatics* 4 (2): 14. <https://doi.org/10.4103/2153-3539.109881>.
- Unniyampurath, Unnikrishnan, Rajendra Pilankatta, and Manoj N. Krishnan. 2016. "RNA Interference in the Age of CRISPR: Will CRISPR Interfere with RNAI?" *International Journal of Molecular Sciences* 17 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms17030291>.
- Urnov, Fyodor D., Jeffrey C. Miller, Ya-Li Lee, Christian M. Beausejour, Jeremy M. Rock, Sheldon Augustus, Andrew C. Jamieson, Matthew H. Porteus, Philip D. Gregory, and Michael C. Holmes. 2005. "Highly Efficient Endogenous Human Gene Correction Using Designed Zinc-Finger Nucleases." *Nature* 435 (7042): 646–51. <https://doi.org/10.1038/nature03556>.
- Urriola-Muñoz, Paulina, Carlos Lizama, Raúl Lagos-Cabré, Juan G. Reyes, and Ricardo D. Moreno. 2014. "Differential Expression and Localization of ADAM10 and ADAM17 during Rat Spermatogenesis Suggest a Role in Germ Cell Differentiation." *Biological Research* 47 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-31>.
- Vancurova, I. 2014. *Cytokine Bioassays*. Vol. 1172. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0928-5>.
- Veen, Willem Van De, Barbara Stanic, Görkem Yaman, Marcin Wawrzyniak, Stefan Söllner, Deniz G. Akdis, Beate Rückert, Cezmi A. Akdis, and Mübeccel Akdis. 2013. "IgG4 Production Is Confined to Human IL-10-Producing Regulatory B Cells That Suppress Antigen-Specific Immune Responses." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (4): 1204–12. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.014>.
- Victora, Gabriel D, David Dominguez-sola, Antony B Holmes, Stephanie Deroubaix, Riccardo Dalla-favera, and Michel C Nussenzweig. 2012. "Identification of Human Germinal Center Light and Dark Zone Cells and Their Relationship to Human B-Cell Lymphomas" 120 (11): 2240–49. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415380>.
- Wakabayashi, Tomoko, Katleen Craessaerts, Leen Bammens, Mostafa Bentahir, Filip Borgions, Piet Herdewijn, An Staes, et al. 2009. "Analysis of the γ -Secretase Interactome and Validation of Its Association with Tetraspanin-Enriched Microdomains." *Nature Cell Biology* 11 (11): 1340–46. <https://doi.org/10.1038/ncb1978>.
- Wang, Anqi, Rene Welch, Bo Zhao, Tram Ta, Sündüz Keleş, and Eric Johannsen. 2016. "Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3 (EBNA3) Proteins Regulate EBNA2 Binding to Distinct RBPJ Genomic Sites." *Journal of Virology* 90 (6): 2906–19. <https://doi.org/10.1128/jvi.02737-15>.
- Wang, Lin, Zhiyu Liu, Herong Shi, and Jun Liu. 2017. "Two Paralogous Tetraspanins TSP-12 and TSP-14 Function with the ADAM10 Metalloprotease SUP-17 to Promote BMP Signaling in *Caenorhabditis Elegans*," no. January. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006568>.
- Wang, Ping, Yidong Chen, Jun Yong, Yueli Cui, Rui Wang, Lu Wen, Jie Qiao, and Fuchou Tang. 2018. "Dissecting the Global Dynamic Molecular Profiles of Human Fetal Kidney Development by Single-Cell RNA Sequencing." *Cell Reports* 24 (13): 3554–3567.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.056>.
- Watson, James Dewey, and Francis Harry Crick. 1953. "Molecular Structure of Nucleic Acids" 171 (4356): 737–38.
- Weber, Silvio, Sebastian Wetzell, Johannes Prox, Tobias Lehmann, Janna Schneppenheim, Marjo Donners, and Paul Saftig. 2013. "Regulation of Adult Hematopoiesis by the α Disintegrin and Metalloproteinase 10 (ADAM10)." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 442 (3–4): 234–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.020>.
- Weecharangsan, Wanlop, Praneet Opanasopit, and Robert J. Lee. 2007. "In Vitro Gene Transfer Using Cationic Vectors, Electroporation and Their Combination." *Anticancer Research* 27 (1 A): 309–14.
- Won, W.-J., and J. F. Kearney. 2002. "CD9 Is a Unique Marker for Marginal Zone B Cells, B1 Cells, and Plasma Cells in Mice." *The Journal of Immunology* 168 (11): 5605–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5605>.
- Wongchana, Wipawee, Pornrat Kongkaviton, Pattarin Tangtanatakul, Chutamath Sittplangkoon, Patcharavadee Butta, Supatta Chawalitpong, Thitiporn Pattarakankul, Barbara A. Osborne, and Tanapat Palaga. 2018. "Notch Signaling Regulates the

- Responses of Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages in the Presence of Immune Complexes." *PLoS ONE* 13 (6): 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198609>.
- Xie, Kabin, and Yinong Yang. 2013. "RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR-Cas System." *Molecular Plant* 6 (6): 1975–83. <https://doi.org/10.1093/mp/sst119>.
- Xu, Neng-Wen, Yu Chen, Wei'e Liu, Yan-Jie Chen, Zhi-Min Fan, Min Liu, and Lin-Jie Li. 2018. "Inhibition of JAK2/STAT3 Signaling Pathway Suppresses Proliferation of Burkitt's Lymphoma Raji Cells via Cell Cycle Progression, Apoptosis, and Oxidative Stress by Modulating HSP70." *Medical Science Monitor* 24: 6255–63. <https://doi.org/10.12659/msm.910170>.
- Yang, M., L. Sun, S. Wang, K.-H. Ko, H. Xu, B.-J. Zheng, X. Cao, and L. Lu. 2010. "Cutting Edge: Novel Function of B Cell-Activating Factor in the Induction of IL-10-Producing Regulatory B Cells." *The Journal of Immunology* 184 (7): 3321–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902551>.
- Yang, Yan, Kai Xue, Zhi Li, Wei Zheng, Weijie Dong, Jiazhe Song, Shijie Sun, Tonghui Ma, and Wenzhe Li. 2018. "C-Myc Regulates the CDK1/Cyclin B1 Dependent-G 2 /M Cell Cycle Progression by Histone H4 Acetylation in Raji Cells." *International Journal of Molecular Medicine* 41 (6): 3366–78. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3519>.
- Yanofsky, Charles. 2007. "Establishing the Triplet Nature of the Genetic Code." *Cell* 128 (5): 815–18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.029>.
- Ye, Q., J. H. Shieh, G. Morrone, and M. A.S. Moore. 2004. "Expression of Constitutively Active Notch4 (Int-3) Modulates Myeloid Proliferation and Differentiation and Promotes Expansion of Hematopoietic Progenitors." *Leukemia* 18 (4): 777–87. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403291>.
- Yoon, S.-O., X. Zhang, P. Berner, B. Blom, and Y. S. Choi. 2009. "Notch Ligands Expressed by Follicular Dendritic Cells Protect Germinal Center B Cells from Apoptosis." *The Journal of Immunology* 183 (1): 352–58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803183>.
- Yoon, Sun Ok, In Yong Lee, Xin Zhang, Mariana C. Zapata, and Yong Sung Choi. 2014. "CD9 May Contribute to the Survival of Human Germinal Center B Cells by Facilitating the Interaction with Follicular Dendritic Cells." *FEBS Open Bio* 4 (April): 370–76. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.04.001>.
- Yoshida, N., D. Kitayama, M. Arima, A. Sakamoto, A. Inamine, H. Watanabe-Takano, M. Hatano, T. Koike, and T. Tokuhsa. 2011. "CXCR4 Expression on Activated B Cells Is Downregulated by CD63 and IL-21." *The Journal of Immunology* 186 (5): 2800–2808. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003401>.
- Yu, Nancy Yiu Lin, Björn M. Hallström, Linn Fagerberg, Fredrik Ponten, Hideya Kawaji, Piero Carninci, Alistair R.R. Forrest, Yoshihide Hayashizaki, Mathias Uhlen, and Carsten O. Daub. 2015. "Complementing Tissue Characterization by Integrating Transcriptome Profiling from the Human Protein Atlas and from the FANTOM5 Consortium." *Nucleic Acids Research* 43 (14): 6787–98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv608>.
- Yu, Xin, Xiquan Liang, Huimin Xie, Shantanu Kumar, Namritha Ravinder, Jason Potter, Xavier de Mollerat du Jeu, and Jonathan D. Chesnut. 2016. "Improved Delivery of Cas9 Protein/GRNA Complexes Using Lipofectamine CRISPRMAX." *Biotechnology Letters* 38 (6): 919–29. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2064-9>.
- Zhang, Baozhu, Zhao Zhang, Lei Li, Yan Ru Qin, Haibo Liu, Chen Jiang, Ting Ting Zeng, et al. 2018. "TSPAN15 Interacts with BTRC to Promote Oesophageal Squamous Cell Carcinoma Metastasis via Activating NF-KB Signaling." *Nature Communications* 9 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03716-9>.
- Zhang, Qinghua, Chunmei Wang, Zhaolong Liu, Xingguang Liu, Chaofeng Han, Xuetao Cao, and Nan Li. 2012. "Notch Signal Suppresses Toll-like Receptor-Triggered Inflammatory Responses in Macrophages by Inhibiting Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2-Mediated Nuclear Factor KB Activation." *Journal of Biological Chemistry* 287 (9): 6208–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310375>.
- Zhang, Xinxia, Yaoyao Shi, Yuanyuan Weng, Qian Lai, Taobo Luo, Jing Zhao, Guoping Ren, et al. 2014. "The Truncate Mutation of Notch2 Enhances Cell Proliferation through Activating the NF-KB Signal Pathway in the Diffuse Large b-Cell Lymphomas." *PLoS ONE* 9 (10): 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108747>.
- Zheng, Qiupeng, Chang-Zheng Chen, Christopher P. Arnold, Xiaohong Cai, Shenglin Huang, Meng How Tan, Xue Gong, and Steven Schaffert. 2016. "Precise Gene Deletion and Replacement Using the CRISPR/Cas9 System in Human Cells." *BioTechniques* 57 (3). <https://doi.org/10.2144/000114196>.
- Zhou, Jian, Toshifumi Fujiwara, Shiqiao Ye, Xiaolin Li, and Haibo Zhao. 2014. "Downregulation of Notch Modulators, Tetraspanin 5 and 10, Inhibits Osteoclastogenesis in Vitro." *Calcified Tissue International* 95 (3): 209–17. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9883-2>.
- Zimmerman, Brandon, Brendan Kelly, Brian J. McMillan, Tom C.M. Seegar, Ron O. Dror, Andrew C. Kruse, and Stephen C. Blacklow. 2016. "Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket." *Cell* 167 (4): 1041-1051.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.056>.
- Zou, Fagui, Xu Wang, Xinxin Han, Gerson Rothschild, Song Guo Zheng, Uttiya Basu, and Jianbo Sun. 2018. "Expression and Function of Tetraspanins and Their Interacting Partners in B Cells." *Frontiers in Immunology* 9 (July): 1606. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01606>.
- Zuidscherwoude, Malou, Kuntal Worah, Alie Van Der Schaaf, Sonja I. Buschow, and Annemiek B. Van Spruiel. 2017. "Differential Expression of Tetraspanin Superfamily Members in Dendritic Cell Subsets." *PLoS ONE* 12 (9): 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184317>.
- Zweidler-McKay, P, Y He, L Zu, C Rodriguez, F Karnell, A Carpenter, J Aster, D Allman, and W Pear. 2005. "Notch Signaling Is a Potent Inducer of Growth Arrest and Apoptosis in a Wide Range of B-Cell Malignancies." *Hematology* 106 (12): 3898–3906. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0355>. Copyright.

