



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN DE UNA TETRASPANINA**  
**ENCONTRADA EN LINFOCITOS B ACTIVADOS**

TESIS DE DOCTORADO

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

CÉSAR AUGUSTO PÉREZ MARTÍNEZ

DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO  
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR, CINVESTAV-IPN  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DRA. GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO DE 2017



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.

*There was no simple way to approach the problem that Billy Beane was trying to solve. It read like an extra credit question on an algebra quiz: You have \$40 million to spend on twenty-five baseball players. Your opponent has already spent \$126 million on its own twenty-five players, and holds perhaps another \$100 million in reserve. What do you do with your forty million to avoid humiliating defeat? "What you don't do," said Billy, "is what the Yankees do. If we do what the Yankees do, we lose every time, because they're doing it with three times more money than we are."*

**MICHAEL LEWIS, "MONEYBALL"**

## **DEDICATORIA**

*A mi abuela María Amparo Veliz Flores (Q. E. P. D.)*

*A mi abuela Beatriz Matilde Ascolani González (Q. E. P. D.)*

*A mi abuelo José Encarnación Martínez Verdugo (Q. E. P. D.)*

*A mi tío José Alfredo Pérez Ascolani (Q. E. P. D.)*

*A mi tío Teófilo Pérez Ascolani (Q. E. P. D.)*

*A mis padres, que están en el corazón de mis acciones.*

## ***APOYOS***

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, bajo la tutoría del Dr. Leopoldo Santos Argumedo. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, a través de una beca de doctorado No. 233271.

Este trabajo fue realizado con apoyo económico del, CINVESTAV y fondos gubernamentales otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (proyectos 2011 UC MEXUS CONACYT CN-11-566, CONACYT 153733 y 240314).

## ***AGRADECIMIENTOS***

Mi primer agradecimiento es para el CONACYT por patrocinar mi trabajo. También quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi escuela, y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, mi casa.

A mi comité tutor, conformado por el Dr. Enrique Ortega Soto y la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo, así como al Dr. Albert Zlotnik, por su asesoría, consejos y correcciones en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros de los laboratorios de investigación de la Dra. Rebeca Manning Cela, Dra. Isaura Meza Gómez-Palacio, Dra. Rosaura Hernández Rivas, Dra. María Teresa Estrada García, Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, Dra. Leticia Cedillo Barrón, Dr. Vianney Ortiz Navarrete, Dr. Marco Antonio Meraz Rios, Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía, Dr. Michael Schnoor y Dr. José Manuel Hernández Hernández. La ciencia en México requiere mucha colaboración, y ellos me ayudaron de alguna u otra manera para avanzar a mi investigación. Muchas gracias.

Agradezco el apoyo para la obtención de muestras sanguíneas de la Dra. María Lourdes Gasca Leyva, Directora del Banco Central de Sangre en el Centro Médico La Raza; Dra. Leila Vera Ramírez, Coordinadora Clínica de Educación e Investigación; Dr. Eduardo Juárez Rangel, Jefe del Departamento Clínico en el Banco Central de Sangre en el Centro Médico La Raza; y, Dr. Ángel Guerra Márquez, Jefe del Banco de Sangre de Cordón Umbilical.

Agradezco a mis alumnos Rea Ochoa Nájera y Pedro Ricardo Rodríguez Farrera por el apoyo laboral y académico. Agradezco también al Dr. Felipe Vences Catalán, que me enseñó a trabajar con las herramientas de la biología molecular.

Agradezco de todo corazón el trabajo que hace Lenin Estudillo Díaz dentro y fuera del laboratorio. Las horas serían más largas y difíciles sin el apoyo técnico y anímico que ejerces. Y una disculpa por la ausencia de higiene que tuve durante mi trabajo, perdónanos.

Al M. en C. Víctor Rosales García por la asistencia técnica en muchos experimentos de citometría de flujo y clasificación celular, y también por la donación de anticuerpos que ayudaron en el presente trabajo.

También agradezco al Dr. Héctor Romero Ramírez por su asistencia técnica y administrativa durante mi larga estancia en el laboratorio de investigación. Es una labor titánica y muy noble.

A quienes fueron mis compañeros de laboratorio y me ayudaron con la carga de las largas horas de trabajo. Dr. Orestes López Ortega, Dr. Abel Trujillo Ocampo, Dr. Noé Ramírez Alejo, Dr. Julio César Alcántara Montiel, M. en C. Zayda Piedra Quintero, M. en C. Cristina Valenzuela Ponce, M. en C. Nidia Carolina Moreno Corona, Q. B. P. Iván Meza Herrera, M. en C. Gabriela Ramírez Suárez, Dra. Marisela Ramírez Saldaña y M. en C. Daniel Girón Pérez. Los considero mis amigos y espero nuestra amistad trascienda nuestro trabajo profesional.

*"If ever you are passing my way," said Bilbo, "don't wait to knock! Tea is at four; but any of you are welcome at any time!"*

**J. R. R. TOLKIEN, "THE HOBBIT"**

A mis amigos, por suerte muchos para nombrarlos, por su amistad incondicional y palabras de apoyo. Aunque no me podían ayudar con mi carga, me cargaron a mí, lo que es lo mismo.

*But you've left out one of the chief characters: Samwise the stouthearted. 'I want to hear more about Sam, dad. Why didn't they put in more of his talk, dad? That's what I like, it makes me laugh. And Frodo wouldn't have got far without Sam, would he, dad?'*

**J. R. R. TOLKIEN, "THE TWO TOWERS"**

Este trabajo fuera muy diferente de no haber sido por el Dr. Juan Moyrón Quiróz y en especial por el Dr. José Luis Maravillas Montero, a quien agradezco enormemente por la ayuda técnica, intelectual, cultural, tutorial, académica, bibliográfica y personal.

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo, sin el cual no existiría este proyecto. Le agradezco su disposición y atención hacia mi aprendizaje y a mi proyecto. Le agradezco también su paciencia y apoyo desinteresado. Y también, le agradezco el temple para enseñarme lo que pudiera aprender y espero no defraudar estas enseñanzas en mi vida profesional.

También quiero agradecer a mi familia, yo no sería quien soy de no ser por ellos. A mis cuñados, mis hermanos, mis sobrinos y mis padres. Muchas gracias por su presencia anímica y moral. Me mantienen de pie en circunstancias adversas.

Finalmente, quiero agradecer a mi esposa, Karen Domínguez Huguez, por aceptar compartir mi vida, que incluyen momentos llenos de frustración. Muchas gracias por la alegría de permitirme ser papá y ser tu familia. Muchas gracias por soportar momentos duros y cambiarlos por momentos felices y memorables. Te agradezco eso y mucho más. Jamás podré retribuírtelo. Aunque lo voy a intentar.



# ÍNDICE

ABSTRACT .....	1
RESUMEN .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
Células B .....	3
Desarrollo de Células B en Médula Ósea .....	3
Subpoblaciones de Células B presentes en Sangre Periférica.....	7
BIGE .....	11
Tetraspaninas .....	14
Estructura .....	14
Red de Tetraspaninas .....	22
Regulación de Proteínas Compañeras .....	26
Tetraspaninas en Microvellosidades .....	29
Tetraspaninas en Células B .....	30
Tetraspanina 33.....	34
HIPÓTESIS .....	40
OBJETIVO GENERAL .....	40

Objetivos particulares .....	40
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	41
Muestras.....	41
Cultivo Celular y Citometría de Flujo .....	41
Purificación de subpoblaciones de Células B y RT-PCR .....	42
Transfecciones y Construcciones.....	44
Obtención de microvellosidades .....	44
SDS-PAGE y Western Blot .....	45
Ensayos de proliferación.....	45
Análisis Estadístico.....	46
<b>RESULTADOS</b> .....	47
Anticuerpos anti-Tspan33.....	47
Expresión de Tetraspanina 33 en Células B .....	50
Expresión de Tspan33 en subpoblaciones de células B de sangre periférica .....	50
Correlación de la expresión de ADAM10 y Tspan33.....	54
Expresión de la Tspan33 durante la activación de las Células B.....	56
Expresión de Tspan33 en Monocitos.....	58

Expresión de Tspan33 en células B de bazo de ratón.....	60
Ensayos funcionales de Tetraspanina 33 .....	62
Células Raji expresan Tspan33 constitutivamente .....	62
Proliferación de Células Raji estimuladas con anti-Tspan33 .....	62
Construcción de plásmido pEGFP-Tspan33.....	66
Obtención de células con transfección estable de Tspan33-GFP .....	66
Proliferación de las células que sobreexpresan Tspan33.....	67
Tspan33-GFP se localiza en las microvellosidades de células Raji .....	72
ADAM10 no se encuentra en las microvellosidades de células Raji .....	72
DISCUSIÓN.....	75
Expresión de Tspan33 en células B .....	75
Expresión en Monocitos .....	78
Función de Tspan33 en células B .....	78
Presencia de la Tspan33 en microvellosidades.....	78
CONCLUSIONES.....	80
PERSPECTIVAS .....	81
BIBLIOGRAFÍA.....	82

## *ÍNDICE DE FIGURAS*

Figura 1. Subpoblaciones de la diferenciación de las células B en diferentes tejidos y moléculas que se expresan durante este desarrollo. ....	10
Figura 2. TSPAN33 se expresa de manera diferencial en diferentes tejidos.....	13
Figura 3. Esquema estructural de las tetraspaninas .....	16
Figura 4. Clasificación y topología de LEL de acuerdo a los residuos de cisteína .....	20
Figura 5. Estructura tridimensional de las tetraspaninas .....	21
Figura 6. Regulación del tránsito de proteínas por las tetraspaninas.....	28
Figura 7. Anticuerpos anti-Tspan33 reconocen a la proteína en su estado nativo .....	49
Figura 8. Tetraspanina 33 se expresa en Células B de Memoria y Dobles Negativas .....	52
Figura 9. Las células B transicionales expresan Tspan33 .....	53
Figura 10. La expresión de ADAM10 no correlaciona con la de la Tspan33 .....	55
Figura 11. Tspan33 es un marcador temprano de activación .....	57
Figura 13. Los monocitos CD14+ expresan la Tspan33 .....	59
Figura 11. Expresión de Tspan33 en células B de bazo de ratón .....	61
Figura 14. Células Raji expresan Tspan33 en la superficie de manera constitutiva .....	64
Figura 15. Proliferación de las células Raji estimuladas con anti-Tspan33 .....	64

Figura 16. Proliferación de células Raji estimuladas con anti-Tspan33 inmovilizado ....	65
Figura 17. Clonación de la Tspan33 en pEGFP-N1 .....	69
Figura 18. Obtención de las células Tspan33-GFP+ estables .....	70
Figura 19. La sobreexpresión de la Tspan33 no afecta la proliferación celular .....	71
Figura 20. La Tspan33 se localiza en las microvellosidades de las células Raji.....	74

## ***ÍNDICE DE TABLAS***

Tabla 1. Los 10 sitios con mayor expresión relativa de Tspan33 en tejidos analizados .....	13
Tabla 2. TspanC8 promueven el corte por ADAM10 de diferentes sustratos.....	36
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el estudio para citometría de flujo .....	43
Tabla 4. Lista de cebadores utilizados para las reacciones de PCR y RT-PCR .....	43

## ***ABSTRACT***

Tetraspanins are a family of transmembrane proteins that form membrane microdomains. They play important roles in migration, adhesion, and other cellular processes. TspanC8, a subfamily of tetraspanins, were found to associate and promote ADAM10 trafficking and cell surface localization. One of its members, Tspan33, is expressed in activated B cells. Using RT-PCR and flow cytometry, we analyzed the pattern of expression of Tspan33 in B cells from healthy donors. We found Tspan33 expression in early and late stages of B cell development. However, Tspan33 expression did not correlate with ADAM10 surface expression. We also found expression of Tspan33 early in the activation process. Nevertheless, we did not find Tspan33 participation in proliferation. Moreover, mice transitional B cells and human monocytes also express Tspan33. Given its predominant expression in activated B cells and in several lymphomas, but not in naive B cells, we hypothesize that Tspan33 could be a potential target for therapeutic purposes.

## ***RESUMEN***

Las tetraspaninas son una familia de proteínas transmembranales que forman microdominios en la membrana celular. Juegan un papel importante en la migración, adhesión y otros procesos celulares. Una subfamilia de tetraspaninas, TspanC8, se asocian y promueven el tráfico de ADAM10 hacia la superficie celular. Tspan33, una proteína de esta subfamilia, se expresa en células B activadas. Utilizando RT-PCR y citometría de flujo, se analizaron los patrones de expresión de Tspan33 en células B provenientes de donadores sanos. Se encontró expresión en etapas tempranas y tardías del desarrollo de las células B. Sin embargo, la expresión de Tspan33 no correlaciona con la expresión de ADAM10 en membrana plasmática. También encontramos expresión de Tspan33 a tiempos de activación tempranas. No obstante, no se encontró la participación de Tspan33 en la proliferación de las células. Además, células B transicionales de ratón y monocitos humanos expresan Tspan33. Dada su expresión predominante en células B activadas y en varios linfomas, pero no en células naive, especulamos que Tspan33 puede ser utilizada como blanco para propósitos terapéuticos.



## ***INTRODUCCIÓN***

El sistema inmunitario tiene la función principal de protegernos contra agentes con potencial patógeno. Para llevar a cabo esta protección el sistema inmunitario utiliza una gran cantidad de mecanismos distintos que, a su vez, requieren una gran cantidad de proteínas como receptores, ligandos, enzimas, factores de crecimiento, entre otros. Aunque se conocen muchas proteínas implicadas en estos procesos, también se desconoce la identidad y características de muchas otras. En el presente trabajo se estudia a una proteína de membrana, Tspan33, y su implicación en el sistema inmunitario.

### ***Células B***

Las células B contribuyen de manera muy importante al sistema inmunitario adaptativo, participan en la respuesta específica y de larga duración contra una casi ilimitada cantidad de posibles patógenos. Estas células son las encargadas de producir y secretar anticuerpos, que son moléculas que reconocen una vasta variedad de antígenos. Los linfocitos B, al momento de una infección, se activan y son capaces de diferenciarse. Por lo tanto, las células B tienen una variedad de funciones y capacidades que la hacen jugar un papel principal durante una respuesta inmunitaria.

### ***Desarrollo de Células B en Médula Ósea***

Las células B se originan en el hígado fetal y en la médula ósea a partir de un progenitor hematopoyético común. En este proceso, las células progenitoras cambian los genes que son expresados, por lo que cambian las proteínas en la superficie celular que interaccionan con las señales que inducirán el desarrollo de las células (Figura 1). Durante la diferenciación de las células B, se rearreglan los segmentos de genes de la cadena pesada (V, D y J) y aquéllos de la cadena ligera (V y J) para crear los diferentes receptores de

antígeno de la célula B (BCR) que compondrán la diversidad de las inmunoglobulinas [1-3].

El primer progenitor de células B es la célula pro-B, que expresa CD127, receptor de IL-7. Estas células migran a nichos que contienen células que expresan IL-7 [4]. Cuando recibe esta señal, CD127 promueve la expresión de Pax5 y otros factores de transcripción. Además, se induce la síntesis de TdT (Transferasa de deoxinucleotidil-terminal) y los productos del gen activador de recombinasa (RAG), *rag1* y *rag2*; estas proteínas se encargan de la recombinación somática entre los segmentos de gen D y J, del locus de la cadena pesada (IGH) (revisado en [5, 6]). Cuando Pax-5 se expresa, la célula pro-B se compromete al linaje de células B y se diferencia a células pre-BI [7].

Pax5 induce la expresión de CD19, un marcador de linaje de células B [7], mientras mantienen la expresión de TdT [8]. Estas células terminan la organización del locus GH al combinar un segmento V con la unión DJ previamente ensamblada, dando lugar a las células pre-BII [8]. Posteriormente, el rearreglo VDJ se empalmará con una cadena  $\mu$  y se exportará a la membrana plasmática con una cadena ligera sustituta ( $V_{preB}$  y  $\lambda 5$ ) [9, 10]. CD79a y CD79b también se expresan y, en conjunto con la cadena  $I_{\mu}$  y la cadena sustituta, forman el pre-receptor de células B (preBCR). Si este receptor no es capaz de señalizar, indicará que la recombinación VDJ no fue exitosa y la célula con este receptor se eliminará por apoptosis. Si, por el contrario, este receptor señaliza, la célula portadora de este receptor continuará su desarrollo [11, 12]. Esta señalización asegura que la cadena  $I_{\mu}$  es funcional y promueve la recombinación del locus de la cadena ligera (IGL)[13].

Las células B inmaduras expresan en su membrana una molécula IgM completa [14]. Las células que no rearreglaron sus cadenas ligeras y aquellas que reconocen antígenos propios son seleccionadas negativamente y se eliminan por apoptosis. Este proceso controla el repertorio del BCR y mantiene la tolerancia de las células B. Las células que pasen este proceso de selección se transforman en células maduras naive y salen de médula ósea a sangre periférica donde circulan a través de los vasos sanguíneos. Algunas células inmaduras son capaces de salir de médula ósea para terminar su desarrollo en la periferia, a estas células se les conoce como células transicionales (revisado en [15]).

Las células naive que están en circulación, viajan a los órganos linfoides secundarios en búsqueda del antígeno (Ag) que reconoce su BCR [8]. Cuando el antígeno se reconoce por un BCR, la célula B portadora de ese receptor se activa, una fracción de células activadas se diferencian a plasmablastos (que secretan principalmente anticuerpos tipo IgM), mientras la otra es capaz de migrar a un centro germinal (GC), donde entran en división celular acelerada [8, 16]. La formación del GC se produce cuando interactúan las células B y células T cooperadoras foliculares (Tfh), ambas específicas para el antígeno, con células dendríticas foliculares (FDC) que presentan el antígeno [16]. Además, las células mutan las regiones variables de su BCR y la cadena pesada cambia de isotipo, en procesos denominados hipermutación somática (SHM) y recombinación de cambio de isotipo (CSR), respectivamente. La SHM mejora la afinidad del BCR al antígeno, mientras que el cambio de isotipo dota a los anticuerpos secretados de distintas funciones efectoras. Las células con el BCR más afín al Ag sobrevivirán y proliferarán (revisado en [17]). En este momento las células B expresan el marcador de memoria CD27, una glicoproteína de membrana tipo I, que al unirse a su ligando (CD27L o CD70) es capaz de iniciar la diferenciación a células

plasmáticas [18]. Las células B de GC son capaces de diferenciarse a plasmablastos y células de memoria IgG-, IgA- e IgE-positivas [19].

Los plasmablastos migran a zonas especializadas en médula ósea donde se diferencian en células plasmáticas de larga vida, capaces de secretar anticuerpos de alta afinidad por un largo tiempo [19]. Las células B de memoria circulan por el cuerpo como células en reposo hasta que se vuelven a reactivar [2, 19]. Cuando las células de memoria se reactivan, proliferan, y se pueden diferenciar a células plasmáticas y secretar anticuerpos, o entran de nuevo a una reacción de GC, donde pueden mejorar la afinidad aún más por SHM o adaptar las condiciones efectoras al cambiar de isotipo [2]. Los microorganismos causantes de la reacción inmunitaria serán reconocidos por los diferentes anticuerpos secretados por las células plasmáticas, estos últimos activarán diversos mecanismos que actuarán para la eliminación del microorganismo.

En el grupo heterogéneo que son las células B, se han encontrado otros compartimientos de células que tienen un desarrollo diferente. El primero de estos subtipos celulares son las células B1, enriquecidas en cavidad peritoneal y autorrenovables. Estas células secretan anticuerpos “naturales” del tipo IgM, anticuerpos polirreactivos hacia componentes no proteicos de microorganismos [20]. Por otra parte, las células B de Zona Marginal (MZB) representan a un grupo de células B encontradas en el bazo [21]. Estas células están presentes en animales que carecen de respuesta T-dependiente, por lo que se consideran reactivos a antígenos T-independientes, de un tipo de inmunidad innata que responden diferenciándose a células plasmáticas de corta duración [22, 23]. Entre los marcadores de estas células se encuentra el CD9 [24], una alta expresión de IgM y baja expresión de IgD [21]. Su desarrollo es dependiente del receptor Notch2 [25]. Las células

MZB contribuyen en gran medida al conjunto de anticuerpos IgM encontrados en suero [21].

### ***Subpoblaciones de Células B presentes en Sangre Periférica***

La sangre periférica proporciona una muestra de fácil obtención que proporciona mucha información acerca de la situación inmunitaria de un individuo. En la sangre se encuentran muchos leucocitos, entre los cuales encontramos linfocitos B. Muchos investigadores se han dado a la tarea de reconocer a los diferentes tipos de células B que podemos encontrar en sangre con el fin de conocer un panorama general de la respuesta humoral. A través del uso de la citometría de flujo y marcadores específicos de población, se han encontrado subpoblaciones de células B inmaduras, maduras y terminalmente diferenciadas.

***Transicionales.*** Una pequeña proporción del total de células B (menos del 4%) corresponden a células inmaduras que salieron de médula ósea antes de completar su proceso de diferenciación [2]. Aunque son escasas en sangre periférica de adultos, en sangre de cordón umbilical se encuentran enriquecidas alcanzando hasta el 35% del total de células B [26]. Como todas las células B, son CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>, además son IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> y negativas para CD27 [27]. Otra característica que las distingue de células naive es la ausencia del transportador ABCB1 (MTG<sup>+</sup>) [28]. Recientemente se encontró que dentro de esta población existen al menos otras 4 subpoblaciones con características fenotípicas diferentes [29].

***Naive.*** Las células naive, son células B maduras que no han sido activadas por su antígeno. Corresponden a la mayoría de las células B en sangre (~60%) y circulan para llegar a los órganos linfoides secundarios en busca del Ag reconocido por su BCR [2, 8].

Su fenotipo es CD19<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>CD24<sup>lo</sup>CD38<sup>lo</sup>CD27<sup>-</sup>, pero también expresan CD23 y ABCB1 (MTG<sup>-</sup>) [2, 19, 23, 28].

**Memoria con cambio de isotipo.** Las células naive que encuentran al Ag en órganos linfoides secundarios entran a la reacción de centro germinal para madurar la afinidad de su BCR. Las células B de memoria que provienen de este proceso expresan CD27, una proteína de la familia de receptores TNF (Factor de Necrosis Tumoral) [18]. La mayoría de las células CD27<sup>+</sup> han cambiado de isotipo y son IgD-negativas [19]. Las células IgD<sup>-</sup> pueden expresar IgM, IgE, IgA o IgG en su superficie [19]. Estas células han pasado por la hipermutación somática y tienen mutaciones en su receptor [18]. También expresan CD24 y son negativas para CD38 [27].

**Memoria sin cambio de isotipo.** Una minoría de células CD27<sup>+</sup> mantiene la expresión de IgD e IgM, y, aunque se discute, también provienen de la reacción de GC [19]. Sin embargo, nueva evidencia apunta a que estas células son células B de zona marginal que tienen una activación extrafolicular y requieren de la señalización por el receptor Notch2 para desarrollarse [30].

**Células Dobles Negativas.** Con la tinción con anticuerpos contra CD27 e IgD se pueden discriminar 4 poblaciones diferentes, que corresponden a las células naive (y transicionales), dobles positivas, células B de memoria IgD<sup>-</sup> (pero positivas para otros isotipos) y las células dobles negativas (IgD<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) [31, 32]. La mayoría de estas células son IgG<sup>+</sup>, y aumentan en la población adulta mayor, lo que ha llevado a la idea de que son células B exhaustas de memoria [19].

*Células plasmáticas y plasmablastos.* Las células B terminalmente diferenciadas secretan anticuerpos, por lo que carecen de inmunoglobulina unida a la membrana. Los plasmablastos son células que viven poco tiempo y mantienen la expresión de CD19, también son CD24<sup>-</sup>CD38<sup>hi</sup>CD27<sup>hi</sup> [2]. Las células plasmáticas son de larga duración y se encuentran principalmente en médula ósea [19, 33]. Ya no tienen la expresión de CD19 y adquieren la expresión de CD138 [2, 34]. En conjunto equivalen al 2.1% de las células B en sangre periférica [2].

Aunque estas poblaciones son fenotípicamente diferentes muchas de estas son mezclas de poblaciones que no aún no han podido ser discriminadas por la expresión de alguna molécula de superficie. Debido a esto, continúa la búsqueda de marcadores fenotípicos que doten a las células de características específicas. Por lo que la ayuda de herramientas como los microarreglos que permiten manifestar los genes expresados en diferentes células, ha sido fundamental.

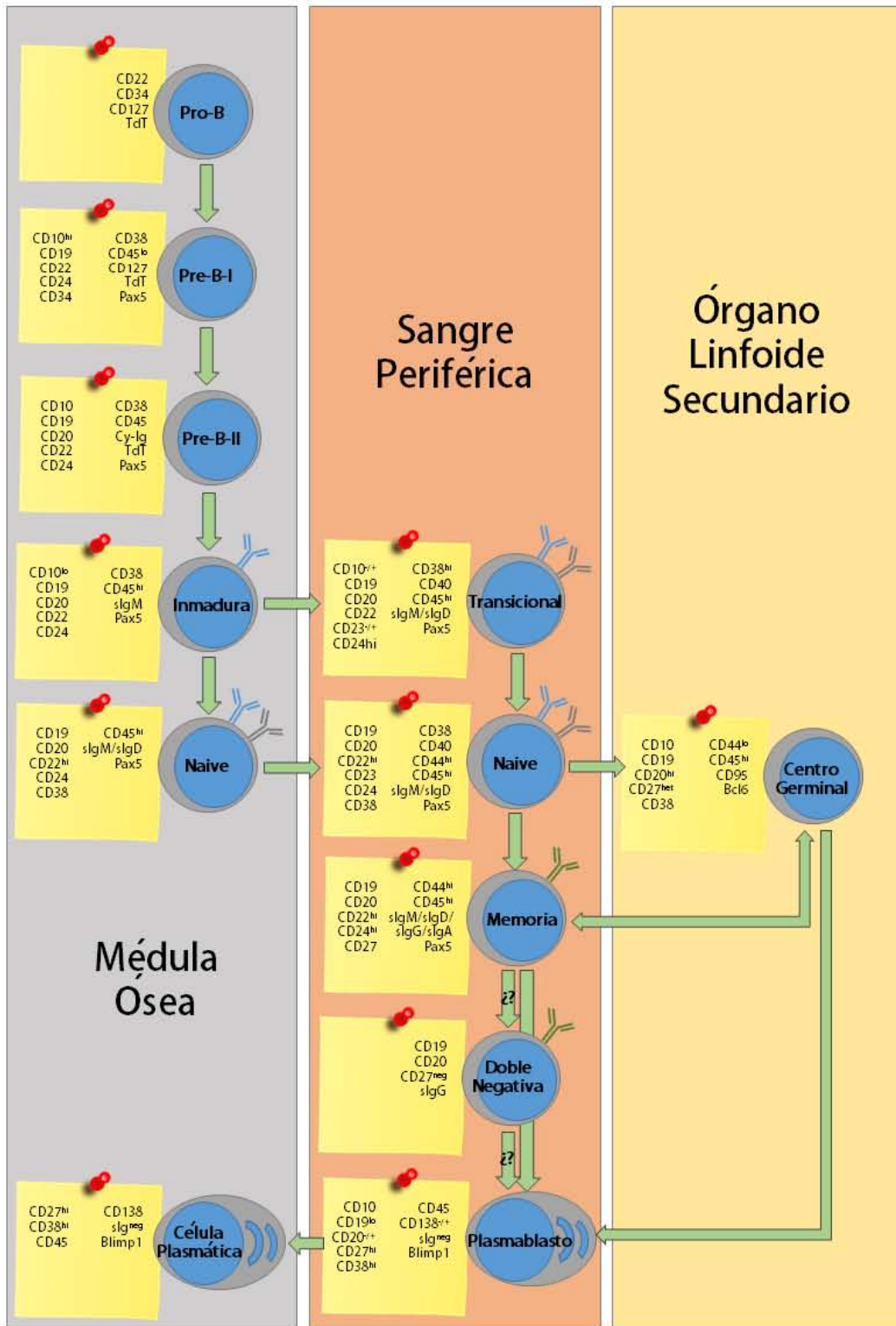


Figura 1. Subpoblaciones de la diferenciación de las células B en diferentes tejidos y moléculas que se expresan durante este desarrollo. Modificado de Pérez-Andres y cols. [2] con información complementaria de [8, 19].



## ***BIGE***

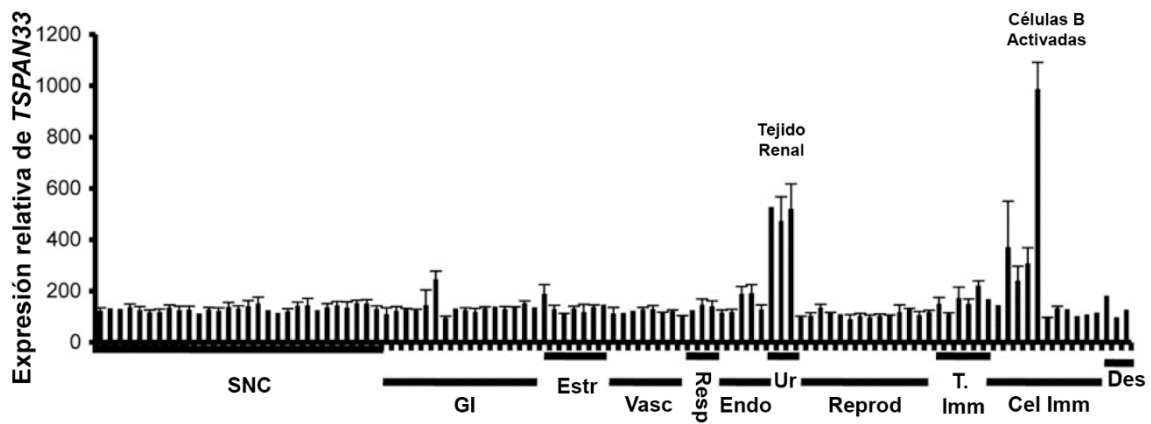
El estudio de los eventos moleculares ocurridos durante procesos biológicos ayuda al entendimiento de la funcionalidad de las células. En este sentido, muchos estudios se han enfocado en conocer los perfiles de expresión de distintas células con el fin de encontrar proteínas que no han sido estudiadas y que pueden tener un papel importante en la función de algún tejido específico. Bajo este esquema, se realizó una base de datos de expresión genética con la predicción de que esta misma sería una facilitadora para el entendimiento de las funciones de genes desconocidos o poco estudiados, basándonos en patrones de expresión distintivos de los tejidos o de células especializadas, por ejemplo, células del sistema inmunitario [35, 36].

Para esto, se utilizaron más de 90 tejidos del cuerpo humano, de muestras cadavéricas, que provenían de individuos masculinos y femeninos, con menos de 5 horas *postmortem* y se purificó RNA [35]. En todos los casos las muertes fueron súbitas [35]. Estas muestras se complementaron con RNA obtenido comercialmente de tejidos lábiles [35, 36]. Además, RNA total aislado de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y poblaciones de leucocitos específicas. Estas poblaciones fueron obtenidas por selección negativa, cultivadas en la ausencia o presencia de estímulos para generar muestras activadas y en reposo para cada población leucocitaria [35, 36]. Por lo que en realidad son 105 tejidos y células las que forman parte de esta genoteca.

Posteriormente, se utilizó el microarreglo Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 que genera datos de expresión de todo el genoma. Este chip, como sonda para cada gen, utiliza múltiples oligómeros de 25 nucleótidos de las últimas 500 bases de los extremos 3' de los transcritos para minimizar el ruido y maximizar la especificidad y

sensibilidad. Los conjuntos de sondas representan a más de 47 000 transcritos, por lo que algunos transcritos están representados por múltiples. Es, además, uno de los más utilizados en bases de datos de expresión de genes en humanos, lo que permite comparar muestras diferentes.

A esta base de datos se le llamó BIGE (*Body Index of Gene Expression*)[35, 36]. Analizando esta base de datos, ha sido posible extraer numerosos blancos de estudio [35-37]. En búsqueda de genes expresados diferencialmente en células del sistema inmunitario, se encontró un transcrito muy expresado en células B activadas [38]. Este gen se expresa además en otros tejidos como riñón y con menor intensidad en células B en reposo (Figura 2 y Tabla 1) [38]. El transcrito corresponde a Tetraspanina 33, un miembro de la familia de las tetraspaninas, proteínas que cruzan 4 veces la membrana.



**Figura 2.** *TSPAN33* se expresa de manera diferencial en diferentes tejidos. Datos del BIGE de la expresión relativa de *Tspan33* en diferentes tejidos y células inmunitarias. Tejidos agrupados: SNC (Sistema Nervioso Central), GI (Tracto Gastrointestinal), Estr (Estructural), Vasc (Vasculatura), Resp (Respiratorio), Endo (Endócrino), Ur (Urinario), Reprod (Reproductivo), T. Imm (Tejidos Inmunitarios), Cel. Imm (Células Inmunitarias) y Des (Desarrollo) [38].

**Tabla 1.** Los 10 sitios con mayor expresión relativa de *Tspan33* en los tejidos analizados.

Tejido	Intensidad promedio
Células B activadas	985.4
Riñón	526
Médula del riñón	519.1
Corteza del riñón	471.3
Monocitos en reposo	368.4
Células B en reposo	305.1
Glándula salivales	244.1
Monocitos activados	238.5
Tonsilas	218
Glándula pituitaria	189.3

## ***Tetraspaninas***

Encontradas hace más de 25 años [39], las tetraspaninas son una familia de proteínas con miembros en muchas especies (revisado en [40-43]). En humanos se encuentran 33 tetraspaninas. Se ha implicado a estas proteínas en numerosos procesos biológicos, como migración, proliferación, adhesión y activación. Estas proteínas tienen la habilidad de interaccionar con tetraspaninas y con otras proteínas membranales en *cis*. Debido a esto, son capaces de formar regiones membranales con alto contenido en proteínas específicas, segregando proteínas importantes en un espacio reducido. A estas regiones se les conoce como red de tetraspaninas o microdominios enriquecidos con tetraspaninas. La red de tetraspaninas es capaz de coordinar los procesos en los cuales se implican las distintas tetraspaninas. Aunque los primeros miembros de esta familia se identificaron como blancos de anticuerpos desarrollados contra células de leucemias y linfomas, no se han desarrollado anticuerpos para muchas de las tetraspaninas, por lo que permanecen poco estudiadas.

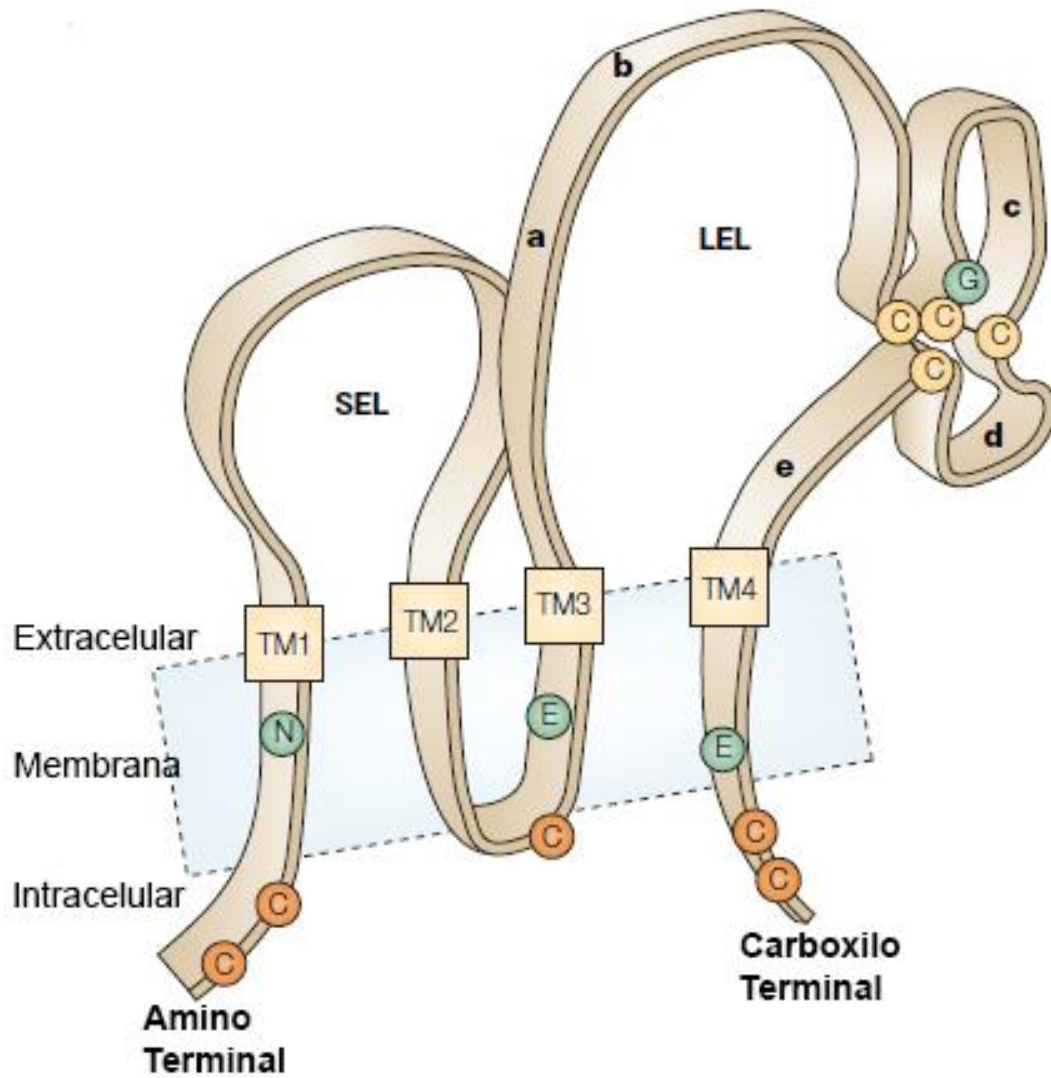
## ***Estructura***

A pesar de estar implicadas en numerosos procesos, las tetraspaninas no tienen dominios obvios de señalización o catalíticos. Como implica su nombre, poseen 4 dominios transmembranales (TM), además, tienen 2 dominios extracelulares de distinto tamaño (uno más corto, SEL; uno más largo, LEL) y 3 dominios pequeños intracelulares (Figura 3) [42]. La estructura de las tetraspaninas es compacta, con sus dominios TM estrechamente empaquetados y los lazos conectores entre dominios TM generalmente cortos (exceptuando LEL) [44]. La característica que define a esta familia es el motivo CCG (Cys-Cys-Gly) en la región LEL, presente en todas las tetraspaninas [42]. Aunque, en conjunto contribuyen

para formar la red de tetraspaninas, cada dominio estructural posee características particulares que aportan de manera significativa a la función de las tetraspaninas.

### ***Dominios intracelulares***

El dominio N-terminal (IC1), C-terminal (IC3) y aquél que se encuentra entre TM2 y TM3 (IC2) son los dominios encontrados en la cara interna de la membrana en todas las tetraspaninas y son habitualmente cortos, con algunas excepciones. En estos dominios se encuentran residuos de cisteína a quienes se les une covalentemente un grupo palmitoil ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^-$ ) en un proceso llamado palmitoilación. La palmitoilación confiere a los residuos de cisteína un anclaje a la membrana plasmática y favorece la interacción entre tetraspaninas, permitiendo la formación de las redes de tetraspaninas. En el caso de CD9 y CD151, la acil transferasa responsable de la palmitoilación es DHHC2, que también se encuentra en los microdominios de tetraspaninas. Una característica importante de la palmitoilación es que es un proceso reversible, permitiendo una regulación de la formación de la red de tetraspanina dependiente de la activación de las acil transferasas responsables de la palmitoilación.



**Figura 3. Esquema estructural de las tetraspaninas.** Las tetraspaninas tienen 4 dominios transmembranales, 2 dominios extracelulares y 3 dominios intracelulares. Las define un motivo CCG ubicado en uno de los dominios extracelulares y tienen otros aminoácidos conservados. Modificado de Levy y Shoham [42].

### ***Dominios Transmembranales***

Una teoría inicial proponía que las 4 regiones transmembranales formaban una estructura en *coiled coil* levógira, formando una estructura aún más compacta que una *coiled coil* dextrógira [44]. Esta teoría se basaba en modelos computacionales y en la conservación de residuos entre parálogos en posiciones importantes dentro de las heptadas que conforman a un *coiled coil* [44]. Sin embargo, la estructura obtenida por cristalografía de CD81 en un estudio reciente, mostró una estructura en forma de cono de gofre (*waffle*) con la región más estrecha hacia la cara intracelular y la región más ancha a la cara extracelular de la membrana [45]. Este cono se forma con la unión de dos pares de hélices antiparalelas, TM1-TM2 y TM3-TM4 [45]. Dentro del cono hay un sitio de unión específico para colesterol que es accesible por difusión lateral [45]. Exceptuando E219, presente sólo en CD81 y Tspan10, los aminoácidos importantes para este bolsillo están conservados en las tetraspaninas humanas [45]. Las otras tetraspaninas contienen residuos polares en lugares cercanos a E219 [45]. La unión al colesterol cambia la conformación de la tetraspanina, con la región LEL doblándose hacia cerrar la región ancha del gofre, revelando el papel del colesterol en la regulación de la actividad de transporte de las tetraspaninas [45]. Estudios que muestran que las regiones TM son importantes para que las tetraspaninas salgan del retículo endoplásmico durante su biosíntesis [46-49], agregan importancia a estas regiones en las funciones de las tetraspaninas.

### ***Dominios Extracelulares***

Los dominios extracelulares de las tetraspaninas son asas ubicadas entre las regiones transmembrana. El dominio extracelular más corto o SEL (*Short extracellular loop*), contienen no más de 30 residuos y se ubica entre las regiones TM1 y TM2. Se puede reconocer una estructura de hojas  $\beta$  conservada entre las tetraspaninas, misma que se pensó

interactuaba con la región LEL en una región hidrofóbica, ayudando a su estabilización [44]. Sin embargo, nueva evidencia mostró que, en CD81, esta región está desordenada y no interactúa con LEL [45].

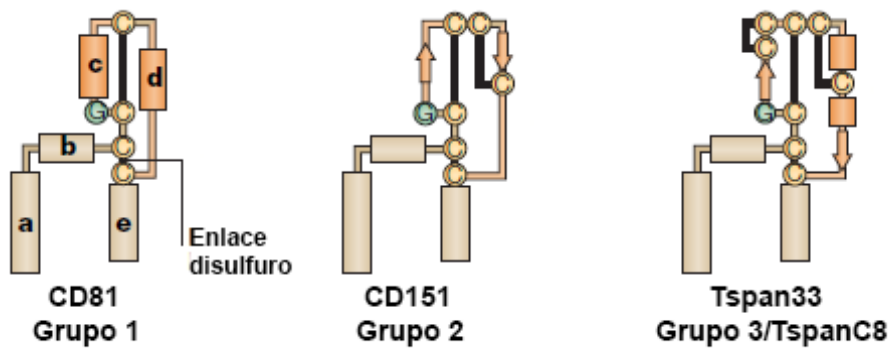
La región extracelular larga o LEL (*Long extracellular loop*) se encuentra entre las regiones TM3 y TM4. Es la región estructural con mayor funcionalidad, por lo que es la región más estudiada. La región LEL de CD81 se cristalizó en el 2001, siendo la primera región de cualquier tetraspanina en ser cristalizada, lo que reveló que contiene 5 hélices  $\alpha$ , llamadas A, B, C, D y E [50, 51]. Las hélices A, B y E, están conservadas entre las diferentes tetraspaninas y son las más próximas a la membrana [50, 51]. Las hélices A y E son una prolongación de las hélices transmembranales TM3 y TM4, estabilizadas por una interacción entre la hélice A y TM3, cuando el bolsillo de colesterol se encuentra vacío [44, 45]. Cuando el bolsillo está ocupado por colesterol, la hélice A interactúa con la región TM2 y la hélice E con TM4, para estabilizar la conformación cerrada de la proteína [45]. En las hélices C y D se encuentran el motivo determinante de las tetraspaninas, CCG [44]. Estas regiones son las más variables entre las tetraspaninas y se encargan de interactuar directamente con otras proteínas, por lo que provee de especificidad a la interacción tetraspanina-compañera [42]. La hélice D es un giro de  $\alpha$  hélice dinámico y es la región más expuesta de LEL y contiene la región más variable entre tetraspaninas [50].

Todas las tetraspaninas tienen al menos 4 residuos de cisteína en la región LEL, el motivo CCG, una cisteína próxima a TM4 y otra en un motivo PXXC [44]. Algunas tetraspaninas pueden tener 6 residuos de cisteína mientras otras, como Tspan33, tienen 8 cisteínas. Estos residuos de cisteína se han utilizado para clasificar a las tetraspaninas, de tal modo que cuando tiene 4 residuos de cisteínas, pueden formar 2 puentes disulfuro y se les

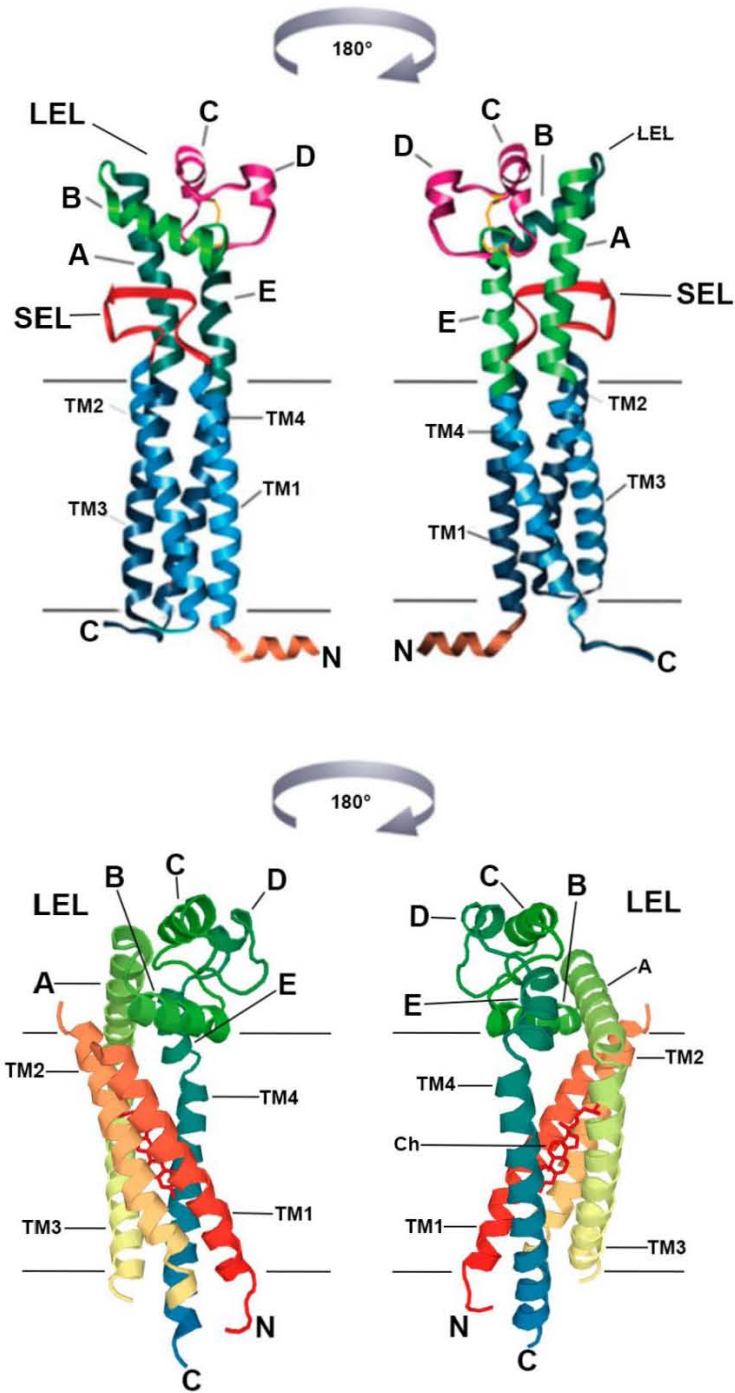


llama tetraspaninas del grupo 1. En el grupo 2 se encuentran aquellas que poseen 6 residuos de cisteína, con la posibilidad de formar 3 enlaces disulfuro. Al grupo 3 también se le conoce como TspanC8, capaces de formar 4 enlaces disulfuro con los 8 residuos de cisteína que poseen en su región LEL. No se han cristalizado las regiones LEL de ningún miembro del grupo 2 o 3, por lo que los puentes disulfuro permanecen teóricos (Figura 4).

***Glicosilaciones.*** En la región LEL de la mayoría de las tetraspaninas se encuentran sitios putativos de N-glicosilación. La posición y el número de sitios varían entre las tetraspaninas y se desconoce el aporte funcional de ellas. Es posible que sean necesarias para el plegamiento adecuado de las tetraspaninas y la progresión a través del retículo endoplásmico.



**Figura 4. Clasificación y topología de regiones LEL de acuerdo a los residuos de cisteína.** Las regiones LEL pueden tener de 2 a 4 pares de residuos de cisteína que pueden formar enlaces disulfuro. Tomado de Levy y Shoham [42].



**Figura 5. Estructura tridimensional de las tetraspaninas.** Arriba, Modelo de CD81 de Seigneuret et al. (2001) [44], que muestra una estructura compacta. Abajo, Estructura cristalográfica de CD81 obtenido por difracción de rayos X [45]. Entre las principales diferencias se encuentran el bolsillo de colesterol y la ausencia de SEL. Se señalan las hélices  $\alpha$  con las letras A-E y otras regiones importantes.

### ***Red de Tetraspaninas***

Los primeros estudios en los que se caracterizaron a las tetraspaninas eran descripciones de los efectos que tenían anticuerpos monoclonales anti-tspan en células que las expresaban [39, 52]. Para conocer más de su función, se hicieron estudios de co-inmunoprecipitación donde se mostró que las tetraspaninas interactuaban con proteínas como MHC-II y algunas integrinas [53, 54]. Además, se encontraron otras tetraspaninas, demostrando la existencia de complejos poliproteicos enriquecidos en tetraspaninas. Se notaron algunos patrones como la presencia de al menos 2 tetraspaninas, integrinas y MHC-II [53, 54]. Esto llevó a la idea de las redes de tetraspaninas, microdominios membranales enriquecidos en tetraspaninas.

Las tetraspaninas son reconocidas por la capacidad que poseen de asociarse a un gran número de proteínas que forman parte de la misma membrana (en *cis*), formando complejos tetraspanina-proteína, denominada proteína compañera [55]. Las proteínas compañeras no son tetraspaninas, por el contrario pueden ser moléculas de adhesión, receptores, moléculas de señalización, entre otras. Al mismo tiempo de asociarse a las proteínas compañeras, son capaces de asociarse a otras tetraspaninas formando cúmulos de proteínas que sitúan a moléculas especializadas en lugares importantes para su función y en un momento determinado [41, 42, 56]. A estos cúmulos de proteínas se le conoce como microdominios enriquecidos en tetraspaninas o Red de tetraspaninas y tienen un diámetro aproximado de 200nm [57]. Esta red permite la congregación de proteínas similares, lo cual reduce el umbral de activación de vías de señalización [42]. Virtualmente todas las células forman redes de tetraspaninas, compuesta de diferentes tetraspaninas y proteínas compañeras.

### ***Dinámica de la Red de Tetraspaninas***

Para la formación de la red de tetraspaninas son esenciales las cisteínas intracelulares adyacentes a la membrana plasmática [58-62]. En una primera instancia, estos residuos son palmitoilados por acil transferasas, DHHC2 en el caso de CD9 y CD151 [63]. Se desconoce si DHHC2 es responsable de la palmitoilación de otras proteínas, y si otras acil transferasas de la familia protein acil transferasas (PATs) tienen una función similar para las redes de tetraspaninas. Se cree que esta palmitoilación es respuesta a un estímulo externo. La palmitoilación de las tetraspaninas permite su relocalización reversible a microdominios ricos en ciertos lípidos como el colesterol y algunos gangliósidos ( $G_{M3}$  y  $G_{MD1}$ ) [64, 65], lo que reúne varios complejos tetraspanina-compañera en un mismo sitio, formando complejos tetraspanina-tetraspanina mucho más grandes [66, 67]. Prueba de esto es que las tetraspaninas que tienen a estas cisteínas yuxtamembranales mutadas reducen la capacidad de interacción con otras tetraspaninas [58-60, 62]. Posteriormente, debido a que la palmitoilación es un proceso que puede ser reversible, la red de tetraspanina es desorganizada a sus componentes iniciales, rompiéndose interacciones tetraspanina-tetraspanina [41]. Utilizando microscopia rastreadora de monopartículas (SPTM) para analizar el movimiento de las tetraspaninas, se demostró que estas proteínas son altamente móviles y experimentan diferentes interacciones transitorias sucesivas [68]. Por lo que la red de tetraspanina es organizada y dinámica.

### ***Jerarquía en la Red de Tetraspaninas***

En la red de tetraspaninas existen distintos niveles de interacción proteína-proteína. Estas se observaron debido a la acción de diferentes detergentes. Está definido que si la asociación de tetraspanina con la proteína compañera resiste la acción de detergentes fuertes (Triton X-100, Digitonina), es una asociación directa y estequiométrica [69, 70]; por

el contrario, si sólo resiste detergentes débiles (CHAPS, Brij) se considera una asociación indirecta, es decir, a través de otro componente de la red [56, 71, 72].

***Digitonina.*** La acción de la digitonina es en función del colesterol, ya que estos dos interaccionan y precipitan, por lo que se ha teorizado que la red de tetraspaninas (con alto contenido en colesterol) precipita también, dejando en el sobrenadante complejos tetraspanina-compañera [72]. El cristal de CD81 completa nos da una explicación alternativa a este fenómeno. Las tetraspaninas tienen un bolsillo para el colesterol, en el caso de CD81, el colesterol regula la asociación de CD81 con CD19 al modificar el plegamiento de CD81 a una conformación “cerrada” y sin CD19 cuando el colesterol ocupa este bolsillo [45]. En este contexto, la digitonina precipitaría las tetraspaninas en su conformación cerrada, quedando solubles los complejos de tetraspaninas en la conformación “abierta” asociados a su proteína compañera. La digitonina es el principal detergente que se utiliza para determinar si la interacción de la tetraspanina y una proteína es directa [69].

### ***Red de Tetraspaninas y Balsas de Lípidos***

Como los microdominios enriquecidos en tetraspaninas, las balsas de lípidos ubican proteínas especiales en regiones delimitadas de la membrana celular. Las balsas de lípidos tienen la característica de que resisten a la acción de detergentes y se reparten en las fracciones de baja densidad, similar a lo que ocurre con las tetraspaninas [58, 73]. Sin embargo, los microdominios de tetraspaninas no resisten la acción de 1% Triton X-100, pero resisten a la acción de los detergentes Brij a 37°C, en contraste con las balsas de lípidos, que resisten a la solubilización por Triton X-100, pero no a la de Brij a 37°C [58, 60, 72, 73]. También, las tetraspaninas no se asocian a componentes de las balsas de

lípidos, como las proteínas ancladas por GPI [68, 73]. La metil-betaciclodextrina (MBCD) es un compuesto que extrae al colesterol de las membranas celulares, cuando se utiliza, desorganiza las balsas de lípidos [74]. Si bien la MBCD provoca el fallo de muchas funciones de las tetraspaninas [68, 75], no altera la interacción tetraspanina-tetraspanina [71, 73]. En conjunto, los estudios demuestran que, aunque comparten características similares, las balsas de lípidos y la red de tetraspaninas son entidades diferentes.

*Otras interacciones en la Red de Tetraspaninas.* Además de interactuar con proteínas membranales y lípidos, algunas proteínas citosólicas interactúan con tetraspaninas. Generalmente a través de los extremos intracelulares, se han encontrado asociaciones a proteínas como cinasas PKC (PKC $\alpha$  y PKC $\beta$ ) [76]; proteínas de la familia ezrina-radixina-moesina (ERM) [77]; proteínas de señalización como PI4K (cinasa de fosfatidilinositol 4)[78], SHIP1 y PI3K [79]; y Rac GTPasas [80]. Por lo que la red de tetraspanina funcionaría tanto en la membrana como de forma intracelular, conectando moléculas transmembranales a proteínas citosólicas, teniendo consecuencia para vías de señalización.

#### ***Actualidad de las Redes de tetraspanina***

Mucha evidencia parece indicar la presencia de las redes de tetraspanina en las células. Sin embargo, evidencia reciente pone en duda algunos principios de éstas. Estudios realizados en los microdominios que forman las uroplaquinas Ia y Ib (tetraspaninas), demostraron que, si bien estas tetraspaninas y sus compañeras están en la membrana arregladas hexaméricamente, la interacción que estabiliza la red es a través de las proteínas que no son tetraspaninas [81]. Utilizando microscopia de alta resolución un grupo demostró que las redes de tetraspaninas son más pequeñas (nanogrupos confinados en un diámetro de

~120nm) y están formadas por sólo una tetraspanina, aunque otros nanogrupos se encuentren adyacentes [82]. Por último, el cristal de la secuencia completa de CD81 demuestra dos configuraciones de las tetraspaninas: una “abierta” que tiene la capacidad de interaccionar con la proteína compañera, y una “cerrada” que interactúa con colesterol, pero no con la proteína compañera [45]. Por lo que en lugares enriquecidos con colesterol predominaría la forma “cerrada”, forma que no interactúa con la proteína compañera. Esta evidencia sugiere que la red de tetraspanina a nanoescala es más complicada de lo pensado anteriormente.

### ***Regulación de Proteínas Compañeras***

Como se mencionó anteriormente, las tetraspaninas se asocian directamente a proteínas membranales, que se les llama compañeras. Además de regular la ubicación de estas proteínas en los microdominios, las tetraspaninas son importantes en otros procesos. Por lo tanto cuando la función de una tetraspanina está afectada, también se afectan la función de las proteínas compañeras. La ausencia de esta función, independiente de la red de tetraspaninas, nos deja ejemplos claros de funciones específicas de las tetraspaninas [40].

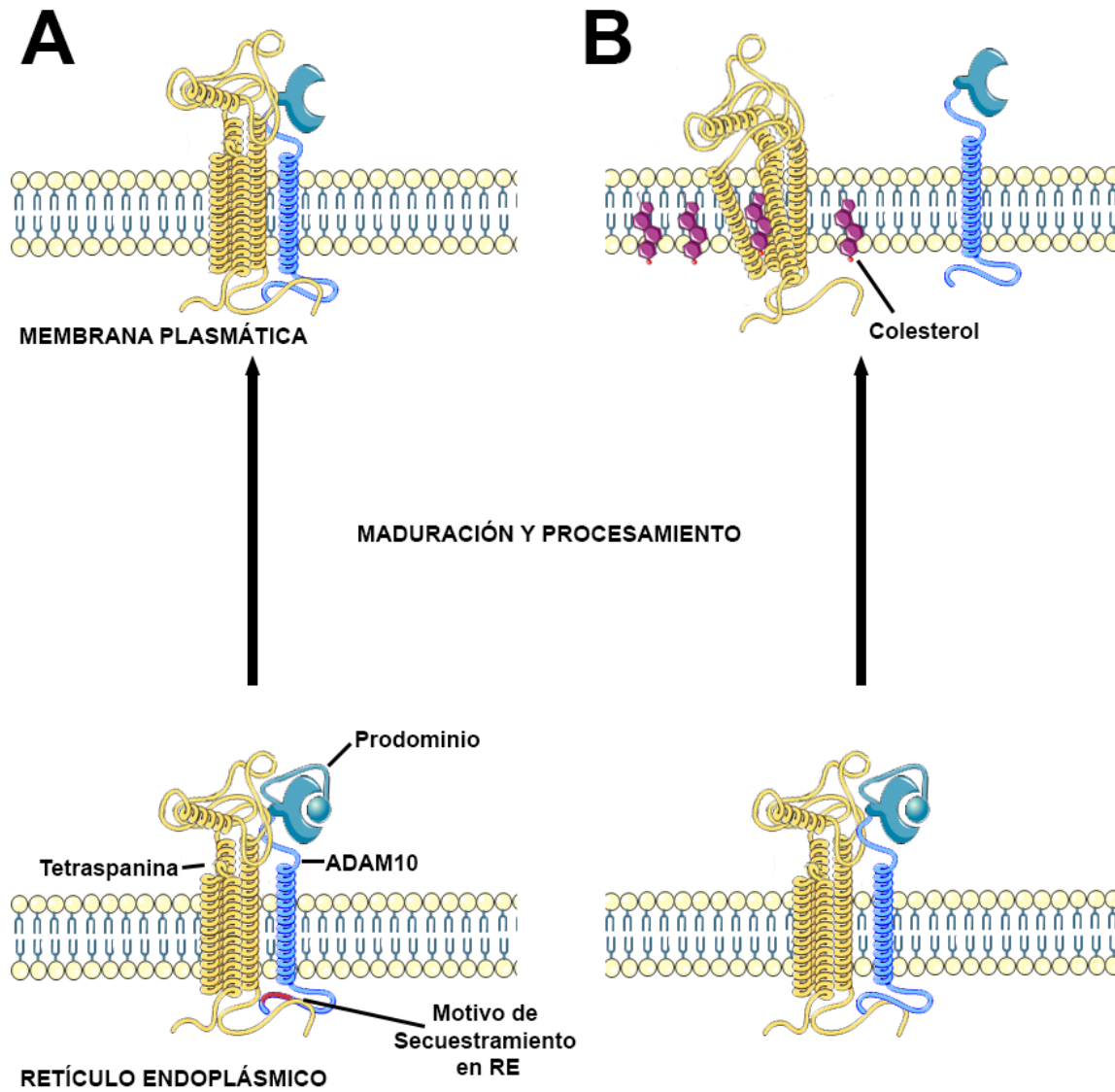
Las tetraspaninas promueven el paso a través de retículo endoplásmico de sus proteínas compañeras. En general, para que las proteínas membranales se expresen de manera adecuada es necesario que ésta pase a través de los compartimientos del retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi (AG) de manera ordenada y secuencial. Sin embargo, algunas proteínas no pueden salir del RE sin la presencia de una proteína “chaperona”. Las tetraspaninas como las uroplaquinas (UP) Ia y Ib, CD81 y las tetraspaninas TspanC8, cumplen esta función para sus compañeras [40].



En humanos, como en ratones, deficientes de CD81, CD19 es incapaz de abandonar el RE y su expresión en superficie es nula. Se propuso que CD81 enmascaraba un motivo rico en argininas y lisinas de CD19, pero al mutar este motivo CD19 no se expresó correctamente en células CD81<sup>null</sup> [83]. Utilizando tetraspaninas quiméricas CD81/CD9, se encontró que la región TM1 de CD81 es esencial y suficiente para la expresión correcta de CD19 [84]. Esta región tiene un motivo GXXXG, que promueve dimerización en proteínas transmembranales [85]. Otra propuesta refiere al bolsillo de colesterol mencionado anteriormente, donde la concentración de colesterol en las diferentes membranas de RE, AG y plasmática, cambian la conformación de CD81, interactuando con CD19 en RE y AG, pero por otro lado, liberando a CD19 en membrana plasmática [45].

De manera similar, la interacción de UPIA (Tspan21) y UPII resulta en la expresión adecuada de ambas proteínas [49]. UPIB (Tspan20) es capaz de expresarse en membrana por sí sola, sin embargo se requiere para que UPIII se exprese de manera adecuada [49, 86].

Recientemente, se encontró que todas las tetraspaninas del grupo TspanC8 (grupo 3) se asocian a ADAM10 [87, 88]. Además, se requiere de la co-expresión de alguna de estas tetraspaninas para que ADAM10 madure, salga del RE y se localice en membrana plasmática [87, 88]. ADAM10 tiene un motivo de secuestro en su región intracelular basado en argininas, motivo sin el cual ADAM10 se expresa en superficie celular [89]. Se sugiere que las proteínas TspanC8 enmascaran a este motivo, permitiendo la salida de ADAM10 del RE. Sin embargo, el bolsillo de colesterol podría estar actuando como interruptor molecular, al modificar la conformación con el aumento de colesterol en la membrana plasmática. Estas dos propuestas no son excluyentes entre sí y podrían estar actuando al mismo tiempo (Figura 6).



**Figura 6. Regulación del tránsito de proteínas por las tetraspaninas.** **A**, Las tetraspaninas TspanC8 enmascaran a un motivo basado en argininas de ADAM10 que la retiene en RE, permitiendo su salida. **B**, Las tetraspaninas liberan a ADAM10 en membrana plasmática al modificar su configuración por las concentraciones de colesterol.

### ***Tetraspaninas en Microvellosidades***

Los microvellos son protrusiones celulares presentes en células B y, en menor medida, en células T [90, 91]. Se cree que la principal función es la de segregar moléculas a diferentes espacios membranales [92], por lo que algunas proteínas están enriquecidas en estas estructuras [93]. Una de estas proteínas es la actina, de hecho la adición de latrunculina A (un inhibidor de la polimerización de actina) desaparece las protrusiones membranales [94], por lo que son estructuras dependientes de la polimerización de actina.

Además de actina, las tetraspaninas parecen tener un papel principal en la formación de estas microvellosidades. La sobreexpresión de CD81 promueve la aparición de microvellos en células U937 (que normalmente carecen de éstas) [95]. De manera similar, CD9 y CD151 son necesarias para la formación de estas estructuras en el ovocito y en células endoteliales, respectivamente [96, 97]. Contrariamente, la sobreexpresión de CD82 produce la desaparición de las microvellosidades en células PC3 [95]. En estos casos, la tetraspanina tiene una conexión al citoesqueleto de actina, ya sea por la asociación a otras proteínas (EWI-2 y EWI-F en el caso de CD9 [96]) o por la alteración de la regulación del citoesqueleto (como en el caso de CD82 y CD151 [97, 98]). Aunque no del todo comprendido, la participación de las tetraspaninas en la formación de protrusiones atrae la atención hacia el vínculo de las tetraspaninas con el citoesqueleto, donde es posible que tengan otras repercusiones en otras estructuras dependientes de actina.

### ***Tetraspaninas en Células B***

Se ha encontrado que las células B expresan una gran cantidad de tetraspaninas. Al igual que a otras células, los linfocitos B expresan tetraspaninas diferencialmente durante la maduración de la célula. En la membrana del linfocito B las tetraspaninas pueden asociarse a proteínas de señalización, MHC, integrinas, lectinas y al BCR.

***CD81 (Tspan28, TAPA-1)***. Fue identificado como el blanco de un anticuerpo monoclonal (mAb) con propiedades anti-proliferativas en múltiples líneas celulares de linfomas y leucemias de células B [39]. CD81 es expresado desde muy temprano en la ontogenia de las células B y es responsable de la adecuada expresión y glicosilación de CD19 gracias a su interacción directa [99]. CD81 en conjunto con CD19 y CD21 forman el correceptor de células B que baja el umbral de activación de éste [100]. También, CD81 regula la activación por el BCR de las células B gracias a la compartimentalización de CD19, permitiendo que exista una interacción entre el correceptor y el receptor sólo durante la activación por antígeno [101, 102]. Además, se asocia con Leu-13 y FcεRI en experimentos de inmunoprecipitación con detergentes fuertes [103, 104], y de manera indirecta (con el uso de detergentes débiles) a  $\gamma$ -glutamyltransferasa (GGT) [105], MHC clase II, MHC clase I, CD20 y antígeno muy tardío 4 (VLA4) [53-55]. CD81 refuerza la unión de VLA4 con su ligando VCAM1. La deficiencia de CD81 en humano produce Inmunodeficiencia Común Variable [106, 107].

***CD37 (Tspan26)***. Esta tetraspanina es característica de células B maduras, no está muy expresada en etapas tempranas ni en células plasmáticas [43, 108]. Se asocia a Dectina-1 de manera directa [109] e inhibe la producción de IgA [110]. La deficiencia de CD37 protege de la infección de *Candida albicans* en ratones, debido a la producción de IgA específico

para estas levaduras [110]. Sin embargo, la sobreproducción de IgA produce depósitos de esta proteína en riñón y el desarrollo de nefropatías [111].

**CD53 (Tspan25, MOX44).** Tetraspanina que protege de la apoptosis a células de linfoma de células B de rata [112]. Interacciona indirectamente con MHC-I, MHC-II y GGT [53, 54, 105], pero se desconocen interacciones directas en células B. Al entrecruzar CD53 con un anticuerpo monoclonal se producen varios efectos, principalmente relacionados con la prevención de la apoptosis [112, 113]; activación de células B con producción de anticuerpos [114]; influjo de Calcio y aumento de la expresión de CD69 [115]; y adhesión homotípica de células pre-B, independiente de LFA-1 [116]. La deficiencia de CD53, en humanos, produce infecciones recurrentes de virus, bacterias y hongos, debido a la importancia de esta proteína en el neutrófilo [117]. En células B se produce una disminución de inmunoglobulinas [117].

**CD9 (Tspan29, MRP-1).** Identificado por primera vez como la proteína reconocida por un mAb que inhibía a movilización de una línea de adenocarcinoma de pulmón y no expresada en linfoma de Burkitt [118]. Se expresa en células B1 (una subpoblación de células B que secretan anticuerpos naturales), células plasmáticas y células B de zona marginal [24]. CD9 interacciona con LFA-1 y FcεRI de manera directa [104, 119] y de manera indirecta con MHC-II y VLA [55] compitiendo con las otras tetraspaninas CD81 y CD82. Su deficiencia no altera la respuesta inmunitaria humoral [43].

**CD82 (Tspan27, KAII, IA4).** Reconocida por el anticuerpo monoclonal IA4 con propiedades antiproliferativas para células B activadas [120], CD82 es capaz de asociarse

de manera indirecta con MHC-II, MHC-I, CD20, VLA y GGT [53-55, 105], sin embargo una asociación directa no ha sido encontrada en células B.

Otras tetraspaninas encontradas en células B incluyen a CD63, CD151, SAS (Tspan31), TSSC6 (Tspan32), y las tetraspaninas 3, 5, 9, 12, 13, 14 y 16 [43]. Recientemente, se encontró a Tspan33 expresado en células B activadas [38]. Su función en el desarrollo y función de células B permanece desconocido. La contribución de tetraspaninas a la fisiología de las células B es, en algunos casos, muy importante. Sin embargo, la redundancia que existe entre la función de algunas de ellas esconde la participación específica de estas proteínas.

#### ***Tetraspaninas en Malignidades de Células B***

Comúnmente correlacionada con procesos malignos, la contribución de las tetraspaninas a estos procesos difiere de acuerdo al tipo de célula responsable del cáncer. De la misma forma, la expresión de una tetraspanina de buen pronóstico en un tipo de cáncer, puede predecir un mal resultado en otra malignidad. El ejemplo más claro es el de CD9 (Tspan29), donde la expresión sugiere metástasis, sin embargo, en otros tipos de cáncer puede no tener correlación alguna con el grado o agresividad y en otros incluso su expresión correlaciona con la sobrevivencia [121, 122]. Esta contradicción puede ser explicada por la contribución en conjunto de la red de tetraspaninas, distinta en cada tipo celular, y por las proteínas asociadas a ella que difieren entre las estirpes celulares, especialmente en tetraspaninas ampliamente distribuidas, por ejemplo CD81 [123].

Varios estudios analizan la expresión en conjunto de distintas tetraspaninas en linfomas y leucemias de células B, encontrando, indistintamente, la expresión aberrante de miembros

de esta familia. Por RT-PCR, Ferrer y colaboradores [124], encontraron que CD81, CD63 y CD53 están muy expresadas en 21 líneas celulares de linfoma de Burkitt; CD9, CD82, CD37, Tspan31 (SAS) tienen una tinción variable; CD231(Tspan7) es baja y sólo en algunas líneas celulares; y CO-029(Tspan8) es negativa. Comparando células normales con muestras de desórdenes linfoproliferativos de células B, se observaron diferencias en la expresión de CD9, CD37, CD53, CD63 y CD81, quizás la observación más importante fue la disminución de CD81 en el 90% de las muestras de Leucemia Linfocítica Crónica de Células B (B-CLL) [125]. Sin embargo, se encontraron tetraspaninas en todas las muestras probadas. Serru y colaboradores [126] describieron la expresión de 7 tetraspaninas encontrando Tspan9, Tspan12 y Tspan13 en Raji y Daudi (líneas celulares de linfoma de Burkitt) y Oci-Ly8 (Linfoma de No Hodgkin). Además los exosomas CD63<sup>+</sup>CD81<sup>+</sup> liberados por linfomas de células B (Ramos, SUDHL-4, SUDHL-6 y Ros-50) contienen CD37 y otras proteínas [127]. Sin embargo, un estudio más reciente encontró 16 tetraspaninas expresadas en leucemia linfoblástica aguda de células precursoras de B (BCP-ALL) [128], de las cuales Tspan3, Tspan4, CO-029, Tspan9, Tspan13, Tspan14, Tspan15, Tspan17 y Tspan31 han sido poco estudiadas. En conjunto, las tetraspaninas se encuentran presentes en una gran variedad de subtipos de linfomas y leucemias, incluso se presentan como nuevos blancos de estudio en este tipo de padecimientos.

### ***Tetraspanina 33***

Antes de ser encontrada en la base de datos BIGE como potencial blanco de estudio, la Tetraspanina 33 (Tspan33), se encontró en la membrana de proeritroblastos de ratón y se le llamó Penumbra (*Proerythroblast new membrane*), pero también se encontró en hígado y bazo de ratón [129]. El locus del gen es 7q31~q32, que se ha encontrado es una región crítica para anormalidades citogenéticas en malignidades mieloides [130]. Se generó, entonces, un ratón deficiente de Tspan33, que presentó anemia, esplenomegalia y un aumento de precursores eritroides en el bazo [129]. En el bazo, también se encontró una disminución en las células B y T, aparentemente debido a un desplazamiento por parte de los eritrocitos inmaduros [129]. Sin embargo, posteriormente, se reportó que se perdió este fenotipo encontrado en el 30% de los ratones TSPAN33<sup>-/-</sup> [88]. En un estudio más reciente se demostró que Tspan33 es un factor positivo en la vía de señalización por Notch [131]. Tspan33 facilita el proceso de corte por ADAM10 y  $\gamma$ -secretasa al receptor Notch1, una vez reconocido al ligando presente en otra célula [131]. En este mismo estudio [131] se dieron indicios de que la Tspan33 formaba parte de una subfamilia muy conservada entre especies y con capacidad de funciones redundantes.

### ***TspanC8 subfamilia de tetraspaninas con funciones específicas***

Tspan33 contiene 8 residuos de cisteína en su región LEL, al igual que las tetraspaninas tspan5, tspan10, tspan14, tspan15 y tspan17 en el humano. Estas proteínas forman la subfamilia TspanC8. Recientemente se encontró que este grupo interacciona con ADAM10 de manera directa [87, 88]. Similar al caso de CD81/CD19, estas tetraspaninas promueven la maduración de ADAM10 y su correcta expresión en la membrana, independiente de la síntesis de ésta [87, 88]. Adicionalmente, esta función no depende de la palmitoilación de



las cisteínas yuxtamembranales [87, 88], por lo que es independiente de las redes de tetraspaninas. Esto contrasta a lo encontrado previamente, donde se demostró que anticuerpos contra CD9 y CD81 aumentan la actividad de ADAM10 en el corte de TNF- $\alpha$  y EGF (Factor de crecimiento epidermal) [132], que sugería una participación de la red de tetraspaninas. ADAM10 es una metaloproteínasa membranal que corta a una gran variedad de proteínas transmembrana, incluyendo Notch1 y Notch2 [133], lo que explica la participación de Tspan33 en esta vía. Más estudios revelaron que la región LEL de las tetraspaninas es la responsable de la maduración y correcta expresión membranal de ADAM10 [134]. Además, la interacción de estas tetraspaninas con ADAM10 requiere de diferentes dominios de esta última [134], lo que conllevó al descubrimiento de que diferentes TspanC8 promueven el corte de distintos sustratos de ADAM10 [134, 135] . Particularmente, se encontró que Tspan33 no es el mayor facilitador de la vía de Notch, cuando se compara con otros miembros de TspanC8 [135] y previene el corte de N-cadherina [134]. Por el contrario, Tspan33 promueve el corte por ADAM10 de APP (Proteína precursora amiloide)[135] y al receptor de colágeno en plaquetas GPVI (Glicoproteína VI)[134]. Los diferentes cortes promovidos por TspanC8 se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2. TspanC8 promueven el corte por ADAM10 de diferentes sustratos. ND: No Determinado.**

	<b>APP [135]</b>	<b>CD44 [135]</b>	<b>GPVI [134]</b>	<b>N-Cadherina</b>	<b>Notch</b>	<b>VE-Cadherina</b>
<i>Tspan5</i>	++	++	++	- [134, 135]	++ [87, 135]	ND
<i>Tspan10</i>	ND	ND	++	- [134]	+ [136]	ND
<i>Tspan14</i>	+	ND	+	- [134]	++ [87]	+ [88]
<i>Tspan15</i>	-/+ [137]	+/-	++	++ [134, 135, 137]	- [135]	ND
<i>Tspan17</i>	ND	ND	++	- [134]	ND	ND
<i>Tspan33</i>	+	ND	++	- [134]	+ [131, 135]	ND

### ***ADAM10 es importante para el desarrollo de células B***

Se ha encontrado, utilizando un modelo de ratón con deficiencia de ADAM10 en células B (ADAM10<sup>B-/-</sup>), que esta proteína es importante para el desarrollo de células B de zona marginal [138], ya que corta a Notch2, que es indispensable para esta diferenciación [139, 140]. Es la principal enzima que corta a CD23, lo que promueve la producción de IgG1 e IgE [141]. ADAM10 se expresa en células B de centro germinal, su ausencia produce defectos en la formación de los centros germinales y en la producción de IgM e IgG, independiente de la vía de Notch [141]. En el ratón ADAM10<sup>B-/-</sup>, las células plasmáticas están disminuidas y secretan anticuerpos de baja afinidad [141]. De la misma forma, utilizando otro ratón condicional en los cuales las células B con cambio de isotipo deletan al gen de ADAM10, se encontró que ADAM10 mantiene la expresión de factores de transcripción importantes para la función de la célula plasmática como Prd1, Xbp1 e Irf4 [142], mientras regula negativamente la expresión de Bcl6 [142], regulación necesaria para la diferenciación de células B a células plasmáticas [143]. En conjunto, estos datos demuestran la participación de ADAM10 en el desarrollo de las células B en etapas intermedias y tardías.

### ***Notch en Células B***

La vía de Notch es una vía muy conservada entre las especies y es muy importante en la toma de decisiones de diferenciación celular [144]. De manera breve, la vía de Notch comprende 4 receptores (denominados Notch1-4) y 5 ligandos (Miembros de las familia Delta-like y Jagged). La interacción de los receptores con los ligandos en células diferentes promueve el corte proteolítico del receptor de Notch por ADAM10, seguido del corte por  $\gamma$ -secretasa. Estos cortes liberan a un dominio intracelular, NICD (*Notch Intracellular Domain*), que es capaz de viajar al núcleo y transcribir genes (revisado en [144]). Además

de la mencionada importancia en el desarrollo de células B de zona marginal [139, 140], la vía de Notch es importante para otras funciones de las células B. Las células dendríticas foliculares (FDC) expresan los ligandos de Notch DL1 (Delta-Like 1) y Jagged 1 mientras que la células B de centro germinal (GC) expresan Notch1 y Notch2 [145]. La señales de DL1 (Delta-Like 1) o Jagged 1, en conjunto con BAFF, aumenta la supervivencia de las células B de GC [145]. De la misma forma, células DL1<sup>+</sup>, en conjunto con anticuerpos que entrecruzan CD40 o BCR, favorece la activación de células B y la secreción de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG<sub>2b</sub> [146]. También, DL1 promueve la diferenciación de células B de bazo de ratón a células secretoras de anticuerpos en conjunto con LPS, en una etapa tardía [147]. En un estudio reciente, se demostró que las células B estimuladas con anti-IgM aumentan la expresión de Notch1 y la expresión de NICD en células B CD19<sup>+</sup> promueve mayor activación y proliferación de las mismas [148]. En otro estudio, se encontró mayor proliferación de células Raji cuando se cultivó en presencia de DL1 y anti-IgM [149]. En conjunto, la activación de Notch tiene un efecto aditivo a la acción de activadores modelo en las células B en las etapas finales de la diferenciación.

Tspan33, al ejercer una regulación directa en ADAM10 e indirecta en la vía de Notch, puede ser responsable de algunas propiedades de las células B. Datos de nuestro grupo de trabajo confirmaron lo visto por microarreglos, es decir, que la Tspan33 se expresa en los linfocitos B de manera inducida por anti-CD40 e IL-4 o con estimulación de lectina de la fitolaca americana (*Pokeweed*), *Staphylococcus aureus* cepa Cowan (Pansorbin) y CpG [38]. Además, varias líneas celulares malignas de linfocitos B, como Raji, Daudi, Nalm-6 y Ramos, expresan a la Tspan33 de forma constitutiva [38]. Además, en células B de artritis reumatoide y lupus, el mensajero de Tspan33 se encuentra en células CD19<sup>+</sup> y células

CD138<sup>+</sup> [38]. Colectivamente, el papel que desarrolla Tspan33 en el linfocito B puede ser de gran importancia y su estudio puede esclarecer procesos que ocurren durante la fisiología de la célula B.

## ***HIPÓTESIS***

La tetraspanina 33, se expresa de manera diferencial durante el desarrollo de las células B y participa en la proliferación y/o en la apoptosis de estas células.

## ***OBJETIVO GENERAL***

Caracterizar la función biológica de la tetraspanina 33 en los linfocitos B.

### ***Objetivos particulares***

- Determinar la expresión de esta molécula en las diferentes poblaciones de linfocitos B recién aisladas de sangre periférica de voluntarios sanos.
- Medir la proliferación de células de linfoma de Burkitt sobreexpresando a la Tspan33.
- Establecer los efectos de la sobreexpresión de Tspan33 en células de linfoma de Burkitt.
- Caracterizar el reconocimiento y funcionalidad de los anticuerpos contra Tspan33 disponibles.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### ***Muestras***

Se obtuvieron concentrados leucocitarios humanos en el Banco de Sangre Central del Centro Médico La Raza (Ciudad de México, México) a partir de donadores sanos. Las unidades de sangre de cordón umbilical (UCB) que no satisfacían los requerimientos volumétricos se obtuvieron del programa institucional de donación altruista, del Banco de Cordón Umbilical del Centro Médico La Raza. Las muestras se colectaron después de obtener un consentimiento informado de los donadores. Las muestras se aceptaron de acuerdo a los criterios descritos en la norma oficial NOM-253-SSA1-2012, y después de resultar negativas para *Treponema pallidum*, HBV, HCV, HIV-I, HIV-II, y *Trypanosoma cruzi*. El estudio se condujo en concordancia con los principios éticos de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por el Sub-Comité Local de Investigación del Banco de Sangre Central del Centro Médico La Raza.

### ***Cultivo Celular y Citometría de Flujo***

Todos los experimentos se realizaron en el citómetro de flujo BD Fortessa (BD Biosciences, San José, CA). Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron por gradiente de densidad usando Ficoll-Paque PREMIUM (GE Healthcare, Little Chalfont, UK, 17-5442-03) y cultivadas en medio RPMI 1640 completo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, #31800-089) con 10% de suero fetal bovino (FBS, Thermo Fisher Scientific, #16000-044), 1 mM de L-Glutamina (Thermo Fisher Scientific, #25030), 100 U/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomicina (Mezcla de penicilina-estreptomicina, Thermo Fisher Scientific, #15140-122). Las células se estimularon con IL-4 recombinante humana (rhIL-4) y un anticuerpo monoclonal anti-CD40 (Clona G28.5). Para

el análisis citométrico, las células se lavaron con PBS, se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS a 4°C por 30 min. Posteriormente, las células se incubaron con los anticuerpos monoclonales enlistados en la Tabla 3. Después de dos lavados, las células se fijaron con formaldehído al 1%. Los datos se analizaron con el programa FlowJo V7.6.5 (FlowJo LLC, Ashland, OR).

### ***Purificación de subpoblaciones de Células B y RT-PCR***

La línea celular de humano Raji y las células B purificadas se usaron para realizar RT-PCR. Para analizar las etapas de desarrollo temprano, se aislaron células B naive y transicionales de sangre de cordón umbilical (UCB) por gradiente de densidad, se tiñeron con anticuerpos anti-CD19-FITC, anti-CD24-PE, y anti-CD38-APC. Para observar las etapas de maduración tardía, se purificaron células mononucleares a partir de sangre periférica de adultos. Se tiñeron a los marcadores CD19, IgD, y CD27 con anticuerpos específicos, y, usando la convención de Freiburg [31, 32], se clasificaron en naive, memoria sin cambio de isotipo, memoria con cambio de isotipo y células dobles negativas. Las células mononucleares de UCB y PBMCs se separaron en MoFlo Cell Sorter (Beckman Coulter, Brea, CA). Cada población purificada se recolectó en 500 µL de FBS. Las células se lavaron y se extrajo el RNA total con el protocolo de Trizol (Thermo Fisher Scientific, 15596-026) [150]. Se sintetizó cDNA utilizando el kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, K1612). Para las reacciones de RT-PCR se utilizaron los primers enlistados en la Tabla 4. Se amplificó Tspan33 usando primers que reconocen la región LEL utilizados anteriormente [38]. Como controles, se amplificó actina y GAPDH.



**Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el estudio para citometría de flujo.**

<b>Anticuerpo/Fluorocromo</b>	<b>Compañía</b>	<b>No. Catálogo</b>	<b>Clona</b>	<b>Isotipo</b>
CD19-APC	BD Pharmigen	555415	HIB19	Ratón IgG <sub>1</sub> , κ
CD19-PerCP	BD Pharmigen	340721	SJ25C1	Ratón IgG <sub>1</sub> , κ
CD19-FITC	BioLegend	302206	HIB19	Ratón IgG <sub>1</sub> , κ
CD27-PE	BD Pharmigen	555441	M-T271	Ratón IgG <sub>1</sub> , κ
CD27-Alexa Fluor 700	BioLegend	302814	O323	Ratón IgG <sub>1</sub> , κ
IgD-FITC	BD Pharmigen	555778	IA6-2	Ratón IgG <sub>2a</sub> , κ
CD24-PE	BD Pharmigen	555428	ML5	Ratón IgG <sub>2a</sub> , κ
CD24-FITC	BD Pharmigen	555427	ML5	Ratón IgG <sub>2a</sub> , κ
CD38-PE-Cy7	BD Pharmigen	335808	HB7	Ratón IgG <sub>1</sub> , κ
CD38-APC	BioLegend	303510	HIT2	Ratón IgG <sub>1</sub> , κ
CD14-APC	BD Pharmigen	561383	M5E2	Ratón IgG <sub>2a</sub> , κ
CD16-PE-Cy7	BioLegend	302016	3G8	Ratón IgG <sub>1</sub> , κ
ADAM10-PE	BioLegend	352702	SHM14	Ratón IgG <sub>1</sub> , κ
Tspan33-PE	BioLegend	367503	SA171H2	Ratón IgG <sub>2b</sub> , κ
Tspan33-APC	R&D Systems	FAB8405A	545422	Ratón IgG <sub>2b</sub>
CD69-PE	R&D Systems	FAB23591P	298614	Ratón IgG <sub>2a</sub>
IgG2b-PE	BD FastImmune	340452	25723.11	Ratón IgG <sub>2b</sub> , κ

**Tabla 4. Lista de cebadores utilizados para las reacciones de PCR y RT-PCR.**

<b>Blanco</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>
Tspan5	5'-ACAGGCACATTTTTCGGTGC-3'	5'-GCTGTTTGGCCTTTCAGTGG-3'
Tspan10	5'-GAGCAGCTGCGTCAAGTATC-3'	5'-GCAGGTGTTCTCACAGAGGG-3'
Tspan14	5'-CCTTTTCAGCTACAACATCATC TTCTGG-3'	5'-AGACGCCAGCCACAATGTAA-3'
Tspan15	5'-CCTCCGTGACAACCTGTACC-3'	5'-GCACACTGAAACGCTCCTTG-3'
Tspan17	5'-GAAGGGCGTTCTCTCGAACA-3'	5'-AAAGGCCAGGATCCCTGTTG-3'
Tspan33	5'-CCGCTGAATTCTTTCGTCTTCTC AGACAAGGCT-3'	5'-GATACTAAGCGGCCGCAGGTTGCT GTGTATCCAGTT-3'
Tspan33-GFP	5'-TTGGTACCATTATGGCGCGGAG ACCCCG-3'	5'-TACCGGTAGGCAGTACCATGGGTCA GCCCCG-3'
GAPDH	5'-GACCCCTTCATTGACCTCAAC-3'	5'-GTGGCAGTGATGGCATGGAC-3'

### ***Transfecciones y Construcciones***

El cDNA total extraído de células Raji se utilizó para amplificar el mRNA de Tspan33. El marco de lectura abierto de Tspan33 se insertó en el plásmido pEGFP-N1 utilizando las enzimas *KpnI* y *AgeI* (New England Biolabs, Ipswich, MA) (Tabla 4). La construcción se confirmó con una digestión con *EcoRI* (Thermo Fischer Scientific). Después, se suspendieron  $1 \times 10^7$  células Raji en 500  $\mu$ L de buffer Cytomix [151] y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 4 mm. Las células se transfectaron por electroporación con 20  $\mu$ g de plásmido purificado con un pulso a 300 V y 1000  $\mu$ F (Gene Pulse Xcell System, Bio-Rad, Hércules, CA). Las células se lavaron y cultivaron en RPMI 1640 suplementado por 2 días antes del experimento.

### ***Obtención de microvellosidades***

Para la obtención de los microvellos se utilizó el método de Hao y cols. [93]. Brevemente,  $1 \times 10^9$  células se lavaron con PBS y se incubaron en FBS por 15 minutos a 37°C para estabilizar a las microvellosidades. Luego, las células se hicieron pasar suavemente por una aguja de un calibre 27½G por 5 veces, lo que “rasura” a las células. Las células se centrifugaron a 2500×g por 5 minutos. Las células intactas se concentraron en el fondo y se recuperaron para medir la viabilidad celular (mayor a 95% por tinción de azul tripán). Las células intactas se lavaron 4 veces para eliminar las proteínas del suero. El sobrenadante de la primera centrifugación contiene a las microvellosidades y para recuperarlas se centrifugaron por 40 minutos a 16000×g y 4°C. Utilizando las mismas condiciones de centrifugación, se lavaron dos veces por 15 minutos. Las células intactas y la fracción de las microvellosidades se lisaron para obtener y analizar las proteínas.

### ***SDS-PAGE y Western Blot***

Las células y otras partículas se lavaron con PBS antes de su preparación para la corrida electroforética. Las células se lisaron en buffer lisis (Tris Base 10 mM, NaCl 150 mM, NaF 20 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, PMSF 156 µg/mL, aprotinina 5 µg/mL y leupeptina 5 µg/mL, pH = 7.2) con 1% de detergente (Triton X-100 o NP-40), por 30 minutos a 4°C con agitación constante. Se centrifugaron por 10 minutos a 15000×g y se extrajo el sobrenadante al cual se le midió la concentración de proteínas por el método de Lowry. Se agregó buffer Laemmli (SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl 60 mM, azul de bromofenol 0.01%) con β-mercaptoetanol (0.15%) y se calentaron las muestras por 10 minutos a 95°C. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 10-15%. Las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF. Para el *Western blot*, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en PBS-Tween o solución bloqueadora (Odyssey Blocking Buffer, LI-COR) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron con diluciones de anticuerpos primarios por 16 horas a 4°C. Una vez terminada la incubación, se procedió a incubar a las membranas con anticuerpos secundarios respectivos por 45 minutos a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con PBS-Tween, las membranas se revelaron con el “kit” ImmunoCruz (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y se utilizó el aparato ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) para procesar la imagen. En el caso de las membranas con PVDF, a las membranas se les dio un último lavado en PBS para eliminar restos de detergente y se analizaron en Odyssey (LI-COR).

### ***Ensayos de proliferación***

Células Raji transfectadas con GFP y Tspan33-GFP se clonaron utilizando el método de dilución limitante. Brevemente, se cultivaron 0.5 células en placas de 96 pozos en

condiciones previamente mencionadas. Después de un par de semanas, las células se cosecharon y se cultivaron en mayor volumen de medio. Las clonas obtenidas se lavaron y  $5 \times 10^4$  fueron cultivadas en placas de 96 pozos por triplicado. Las placas fueron incubadas por varios días a  $37^\circ\text{C}$ . Ocho horas antes de la medición las células fueron pulsadas con  $1 \mu\text{Ci}$  de [ $^3\text{H}$ ]-timidina (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Posteriormente fueron cosechadas y la incorporación de la marca radioactiva al DNA fue cuantificada en un contador de centelleo (Beckman LS 6500, Fullerton, CA).

### ***Análisis Estadístico***

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Se utilizó la prueba de t de Student apareada para comparar los perfiles de expresión. Se utilizaron asteriscos para indicar significancia, \*  $p < 0.05$ .

## ***RESULTADOS***

### ***Anticuerpos anti-Tspan33***

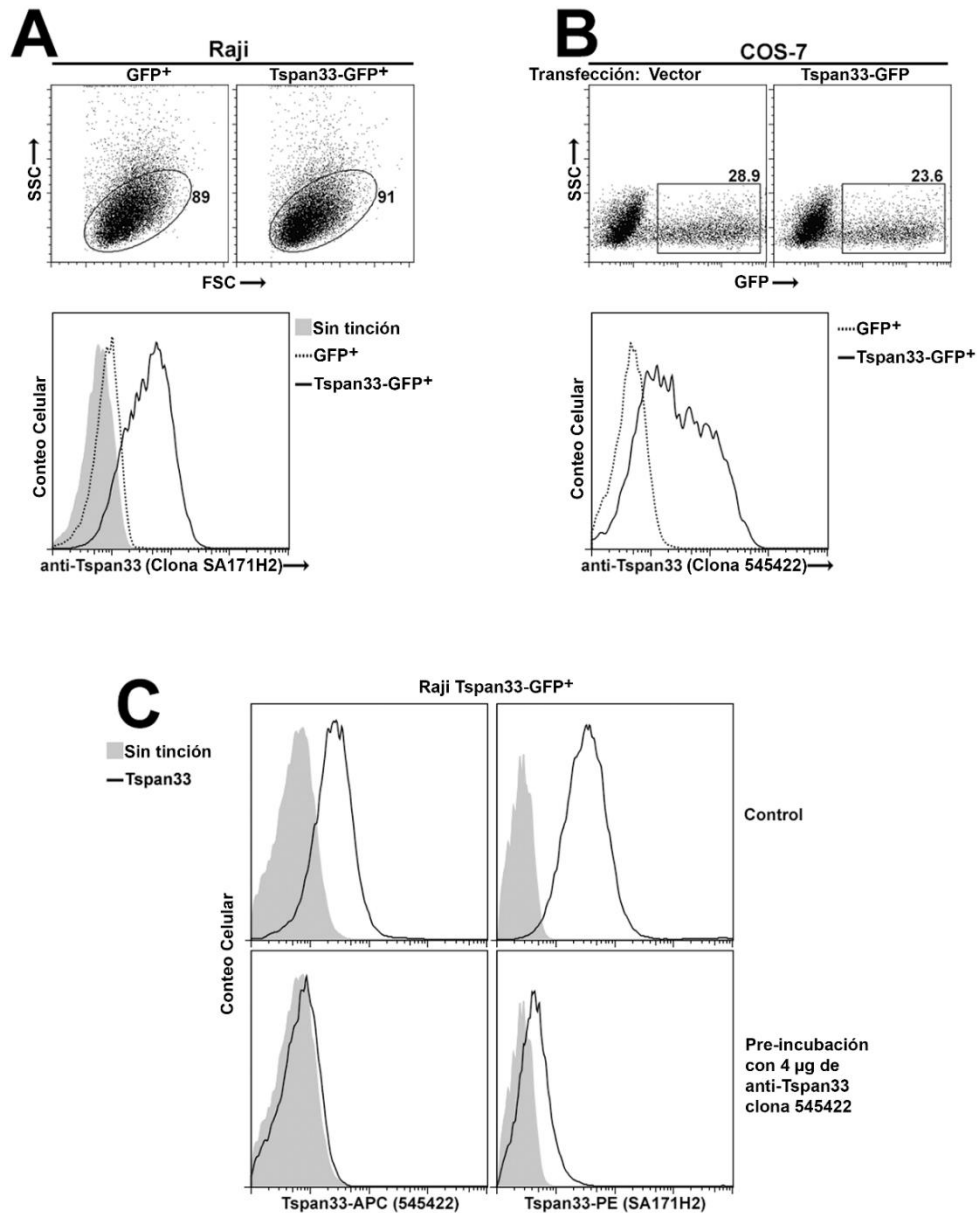
Aunque se ha demostrado la importancia de las tetraspaninas, aún existen muchas poco estudiadas, ya que se carece de anticuerpos que serían muy útiles para el estudio de la proteína nativa. Durante el trabajo, se realizaron muchos intentos para la obtención de anticuerpos contra la proteína, sin alcanzar el objetivo. Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo, dos compañías por separado (R&D y BioLegend), produjeron y comercializaron sendos anticuerpos monoclonales anti-Tspan33 que fueron probados para el reconocimiento de la proteína en su estado nativo.

Para probar el anticuerpo proveniente de la clona SA171H2 (BioLegend), se utilizaron clonas de células Raji transfectadas establemente con Tspan33-GFP, una proteína de fusión. Estas células se tiñeron con el anticuerpo marcado con R-ficoeritrina (PE) y se compararon contra células Raji no transfectadas y células sin teñir. Como se observa en la Figura 7A, las células Tspan33-GFP<sup>+</sup> son positivas para la tinción con este anticuerpo.

Para probar el anticuerpo de la clona 545422 (R&D), se utilizaron células COS-7 transfectadas con un vector que codifica para Tspan33-GFP transfectadas de manera transitoria. Después de 2 días de la transfección, las células se tiñeron con el anticuerpo marcado con alofocianina (APC). Las células positivas para Tspan33-GFP, discriminables por la fluorescencia de la proteína GFP, fueron positivas para la tinción con anti-Tspan33-APC, como se observa en la Figura 7B.

Con el fin de observar si los anticuerpos competían por el epítipo, se incubaron células Raji Tspan-GFP<sup>+</sup> con el anticuerpo purificado de la clona 545422. Posteriormente, se

tiñeron a las células con el anticuerpo marcado con APC (clona 545422), o con el anticuerpo marcado con PE (clona SA171H2). Como se esperaba, el anticuerpo conjugado con APC no logró teñir las células pre-incubadas. Importantemente, el anticuerpo marcado con PE disminuyó de manera considerable la tinción observada en el control positivo, lo que nos indica que los anticuerpos reconocen epítomos cercanos, por lo que compiten por el reconocimiento de los mismos y generan un impedimento estérico parcial (Figura 7C).



**Figura 7. Anticuerpos anti-Tspan33 reconocen a la proteína en su estado nativo.** **A**, Células Raji transfectadas establemente con GFP o Tspan33-GFP se tiñeron con anti-Tspan33-PE. Células Tspan33-GFP<sup>+</sup> sin teñir y células GFP<sup>+</sup> teñidas fueron utilizadas como controles negativos. **B**, Células COS-7 transfectadas de manera transitoria con Tspan33-GFP o sólo GFP se tiñeron con anti-Tspan33-APC. **C**, Los anticuerpos SA171H2 y 545422 compiten por Tspan33. Los anticuerpos 545422 y SA171H2 tiñen a células Raji transfectadas con Tspan33-GFP (histogramas superiores). Cuando las mismas células se incuban con anticuerpo de la clona 545422 sin marcaje fluorescente y se tiñen con anti-Tspan33-APC (histograma inferior izquierdo) y anti-Tspan33-PE (histograma inferior derecho), la tinción disminuye a niveles muy bajos.

## ***Expresión de Tetraspanina 33 en Células B***

### ***Expresión de Tspan33 en subpoblaciones de células B de sangre periférica***

Se ha encontrado la expresión de Tetraspanina 33 en células precursoras de eritrocitos [129], en células B en estado basal y activadas [38]. Para entender mejor la función de Tspan33 en la célula B, se decidió investigar la expresión en las células basales de sangre periférica de humano. Para esto, se realizaron dos abordajes experimentales para analizar la expresión del mRNA y proteína.

Se realizó RT-PCR de las diferentes poblaciones separadas por citometría a partir de PBMCs de donadores sanos para el análisis de mRNA de Tspan33. Con base en la expresión de IgD y CD27 se pueden observar 4 poblaciones de células CD19<sup>+</sup>, usando la convención de Freiburg [31, 32]. Células Naive (N, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>+</sup>), que aún no han encontrado a su antígeno, carecen de la expresión de Tspan33 (Figura 8A). Células B de Memoria Sin Cambio de Isotipo (MSC, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>), que conservan la expresión de IgD/IgM, expresan Tspan33. La mayor expresión de Tspan33 se encuentra en las poblaciones de células B de memoria con cambio de isotipo (MCC, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) y células Dobles Negativas (DN, CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>) (Figura 8A). Esto propone que la expresión de Tspan33 se da después del encuentro con el antígeno y concuerda con datos previos de que células B inducen la expresión de Tspan33 después de la activación [38].

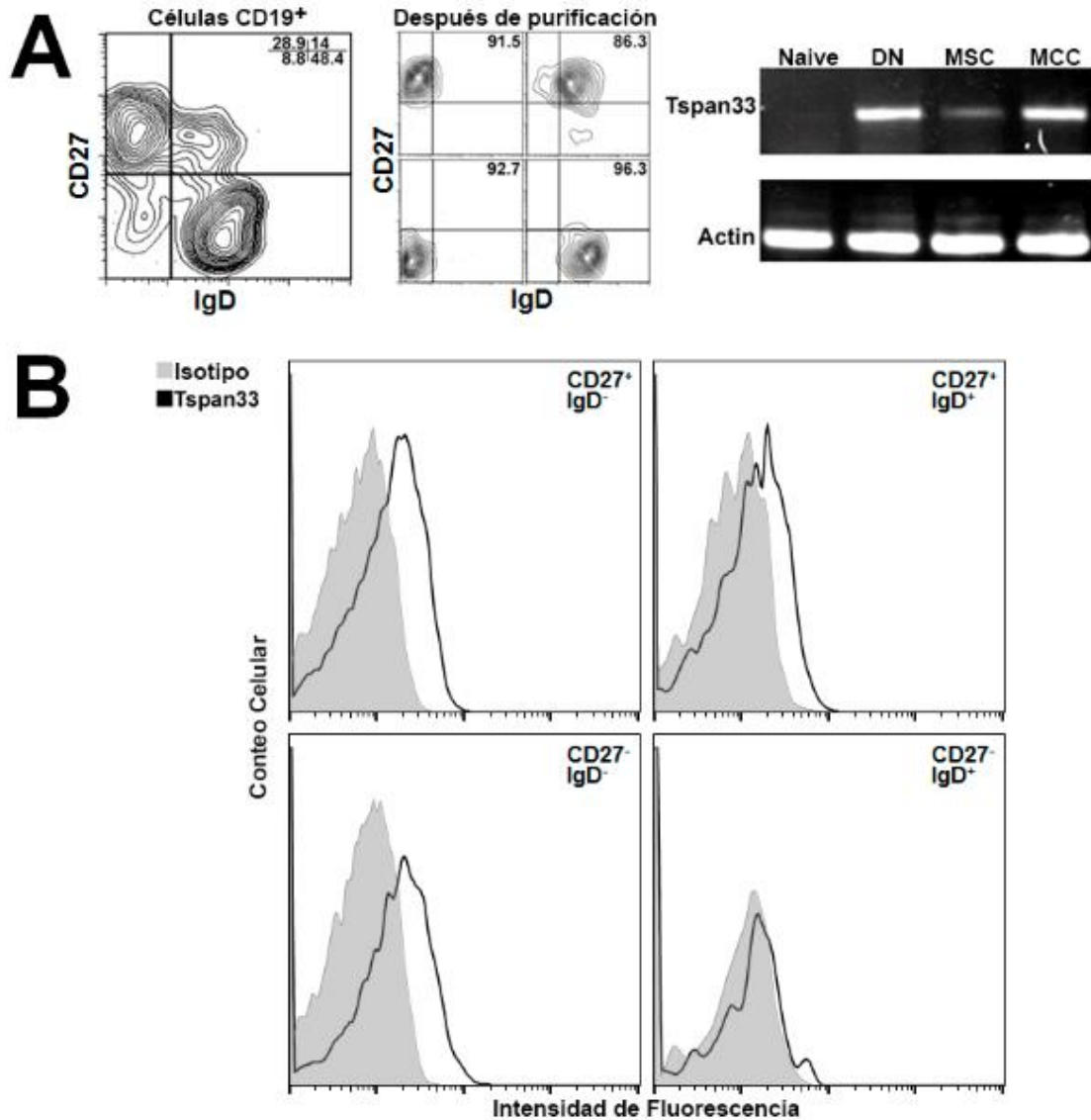
Posteriormente, se midió la expresión de Tspan33 por citometría de flujo en muestras de donadores sanos. PBMCs fueron teñidos con anticuerpos anti-CD19, anti-CD27, anti-IgD, y anti-Tspan33. Se observó la expresión de la Tspan33 en las poblaciones de células de MSC, MCC, y DN (Figura 8B). Las células naive fueron negativas para la tinción con



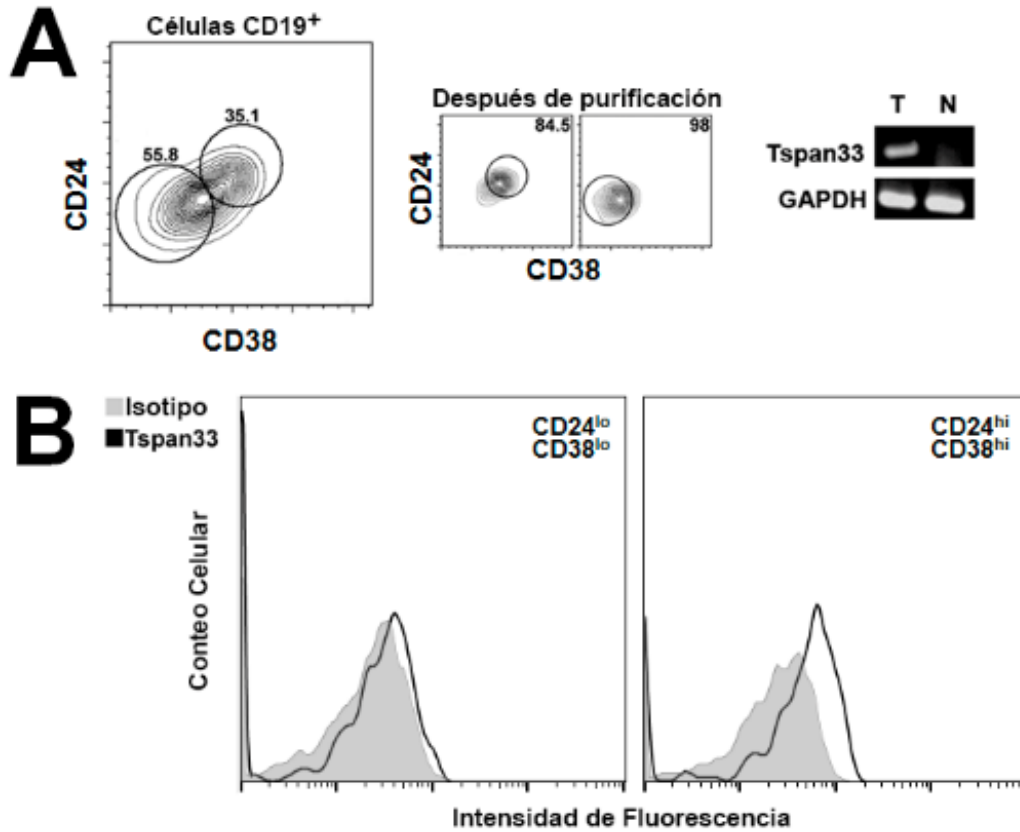
Tspan33, confirmando lo visto por mRNA, la Tspan33 no se encuentra en la población que no ha recibido la señal del antígeno.

Debido a que la población de células B transicionales se encuentra enriquecida en sangre de cordón umbilical (UCB) [26], se utilizó esta fuente para el aislamiento y separación de células B. Las células B Transicionales (Tr, CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) expresan Tspan33 en contraste con células naive (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>lo</sup>CD38<sup>lo</sup>), que carecen de esta expresión (Figura 9A). Esto sugiere un posible papel de la Tspan33 durante la ontogenia de las células B que ocurre en médula ósea.

Se midió también la expresión de Tspan33 en la población de células B transicionales por citometría de flujo. Se tiñeron células mononucleares de UCB de donadores sanos con anti-CD19, anti-CD24, anti-CD38 y anti-Tspan33. No fue posible observar expresión de Tspan33 en células B naive (Figura 9B). Sin embargo, las células transicionales expresan niveles bajos de la Tspan33 (Figura 9B). El resultado de la expresión proteica en las células transicionales coincide con la observación del mRNA. La ausencia de la Tspan33 en las células naive indica que las células B pierden la expresión antes de terminar su proceso de maduración.



**Figura 8. Tetraspanina 33 se expresa en Células B de Memoria y Dobles Negativas. A, Izquierda:** Separación de células B de memoria de sangre periférica después de la obtención de PBMC con los anticuerpos anti-CD19-APC, anti-CD27-PE y anti-IgD-FITC. **Derecha:** Expresión de Tspan33 en las diferentes subpoblaciones de células B de sangre periférica. Arriba: RT-PCR de la región LEL (350 bp) de la Tspan33. Abajo: RT-PCR de  $\beta$ -actina (300 bp). **B,** Histogramas de expresión de Tspan33 en las mismas subpoblaciones de células B. PBMCs proveniente de donadores sanos fueron marcadas para CD19, CD27, IgD, y Tspan33. Datos representativos de 3 experimentos independientes.

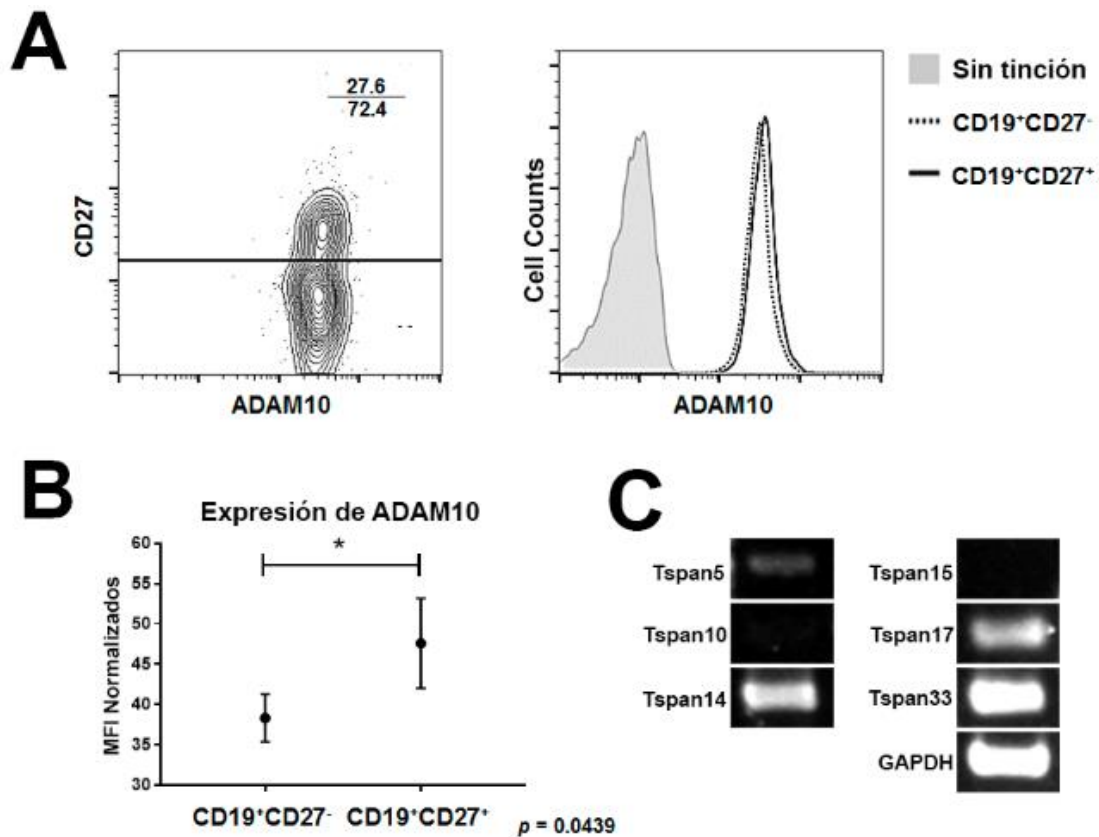


**Figura 9. Las células B transicionales expresan Tspan33. A, Izquierda:** Separación de células B transicionales y naive de UCB con los anticuerpos anti-CD19-FITC, anti-CD38-APC y anti-CD24-PE. **Derecha:** Expresión de Tspan33 en las diferentes subpoblaciones de células B de UCB. Arriba: RT-PCR de la región LEL (350 bp) de Tspan33. Abajo: RT-PCR de GAPDH (400 bp), n = 2. **B,** Histogramas de expresión de la Tspan33 en las células B Tr y naive. Las células mononucleares de UCB se marcaron para CD19, CD24, CD38, y Tspan33, n = 3.

### ***Correlación de la expresión de ADAM10 y Tspan33***

Debido a la participación de Tspan33 y otras tetraspaninas en la maduración y expresión membranal de ADAM10 [87, 88], se procedió a examinar la expresión de ADAM10 en las poblaciones de células B de memoria, con el fin de correlacionar la expresión entre la metaloproteínasa y la tetraspanina. Muestras de donadores sanos fueron sometidas a separación por gradiente de densidad y posteriormente fueron teñidas con anti-CD19, anti-CD27, y anti-ADAM10. ADAM10 es ubicua en las PBMCs, encontrándose en poblaciones CD19<sup>-</sup> [133, 152] y en todas las poblaciones de células B (Figura 10A). Sin embargo, encontramos una diferencia entre células B de memoria y células B naive (Figura 10B). Por lo tanto, las células de memoria expresan, en mayor medida, ADAM10, similar a lo que ocurre con la expresión de la Tspan33.

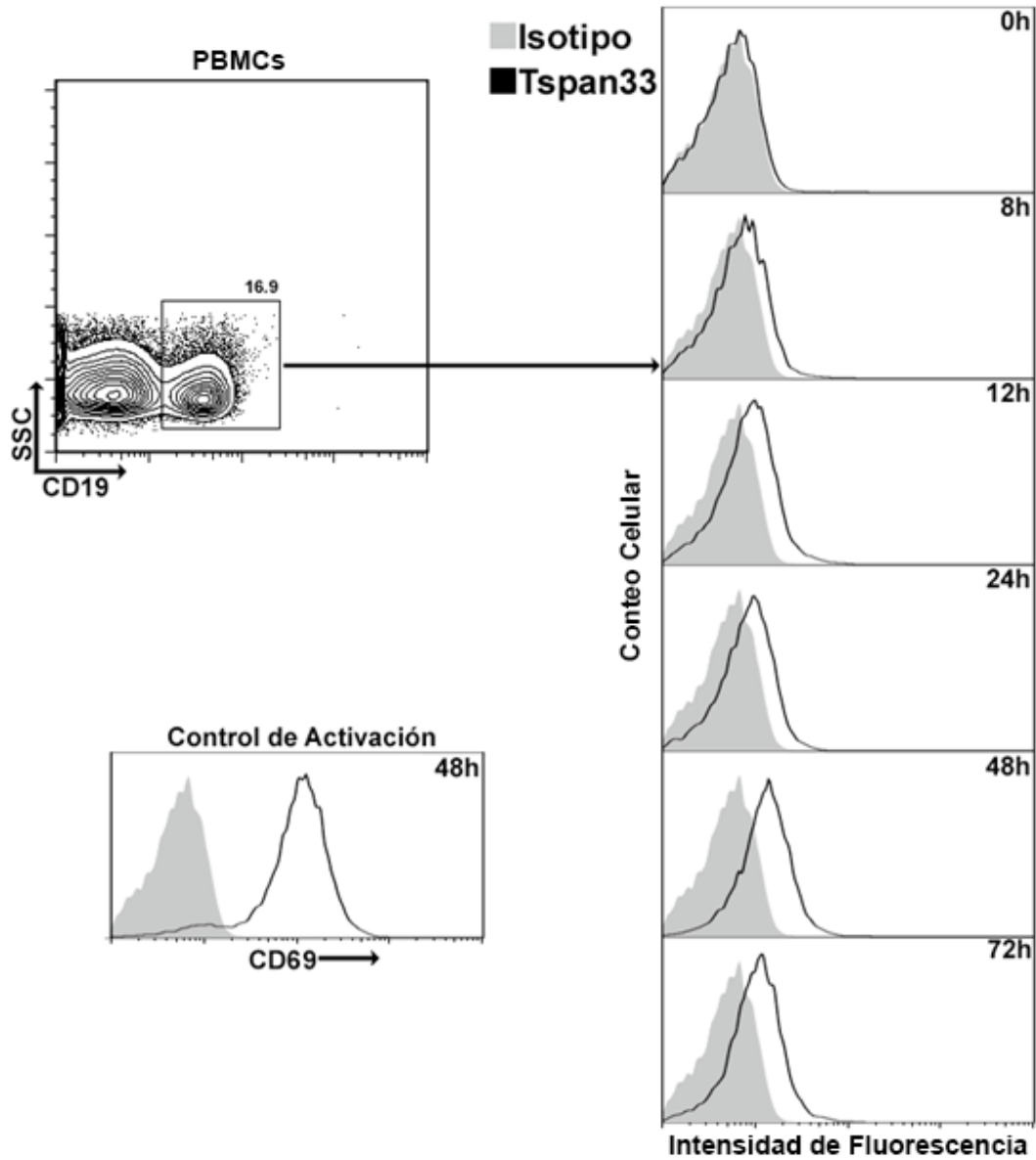
Sin embargo, los niveles de la Tspan33 son muy diferentes a los de ADAM10, probablemente debido a la redundancia de funciones que existe entre las tetraspaninas del mismo grupo. Por lo que analizamos los posibles miembros que, en conjunto con Tspan33, controlan la expresión de ADAM10 en la superficie celular. Para esto, se realizó RT-PCR para detectar a las 6 tetraspaninas del grupo TspanC8 en células Raji, una línea celular tipo B madura. Se descubrieron mRNA de Tspan5, Tspan14, y Tspan17 en tres experimentos independientes (Figura 10C), similar a lo encontrado anteriormente en células B [153]. En conjunto, los datos muestran que la Tspan33 no es la única tetraspanina responsable de la expresión de ADAM10 en las células B, pero el incremento en la expresión en células de memoria podría ser atribuido a la expresión de Tspan33.



**Figura 10. La expresión de ADAM10 no correlaciona con la de la Tspan33. A, Izquierda:** Citometría de flujo y estrategia de selección de PBMCs CD19<sup>+</sup> de un donador sano. **Derecha:** histogramas de la expresión de ADAM10 en las diferentes subpoblaciones (derecha). PBMCs se tiñeron con anti-CD19-APC, anti-CD27-FITC, y anti-ADAM10-PE. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. **B,** Comparación de la expresión de ADAM10 entre células CD27 positivas y CD27 negativas en las muestras de individuos sanos. Las intensidades medias de fluorescencias (MFI) se normalizaron con los valores del control y se graficaron, n = 3, \* $p = 0.0439$ . **C,** RT-PCR para Tspan5 (~470 bp), Tspan10 (~230 bp), Tspan14 (~665 bp), Tspan15 (~360 bp), Tspan17 (~210 bp) y Tspan33 (~350 bp) de células Raji; GAPDH se usó como control (400 bp), n = 3.

### ***Expresión de la Tspan33 durante la activación de las Células B***

A continuación, se midió la expresión de la Tspan33 durante el proceso de activación de las células B. PBMCs fueron aisladas y cultivadas en RPMI suplementado adicionado con anti-CD40 (Clona G28.5) y rhIL-4 durante 3 días. En los tiempos indicados se obtuvieron alícuotas que se tiñeron para CD19 y Tspan33. A las 48h se tomó una alícuota y se marcó con anti-CD69 como control del proceso de activación. Se observó la expresión de la Tspan33 a las 8 horas, dicha expresión fue en aumento hasta llegar a un pico a las 48h, para después disminuir a las 72h. Esto podría sugerir una función de la proteína durante el proceso de activación en la etapa temprana (Figura 11).

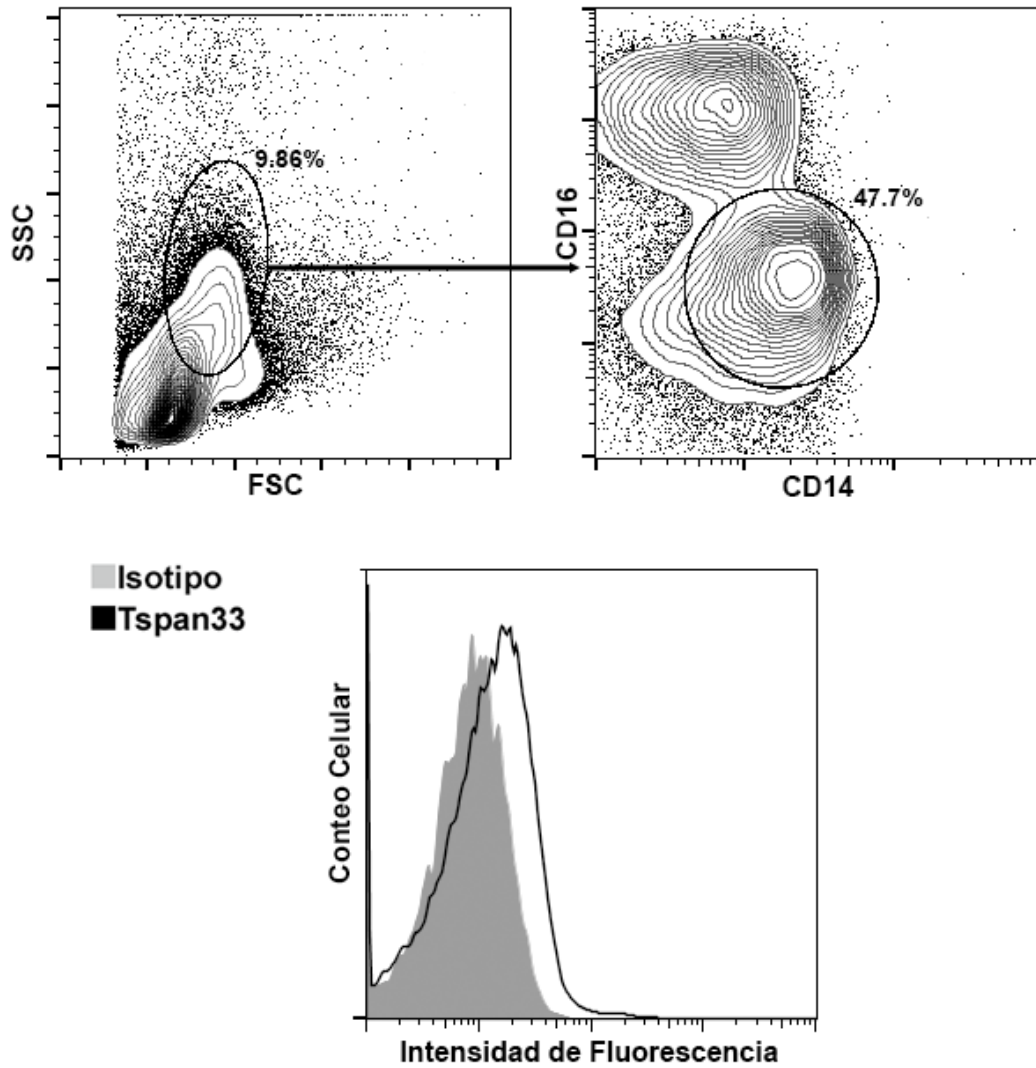


**Figura 11. Tspan33 es un marcador temprano de activación.** **Izquierda:** PBMCs fueron activadas con anti-CD40 y rhIL-4 por 3 días y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados. **Derecha y abajo:** Las muestras fueron teñidas para Tspan33 y CD19, luego fueron analizadas por citometría de flujo. Se utilizó una tinción de CD19 y CD69 como control de activación. Datos representativos de 2 experimentos.

### ***Expresión de Tspan33 en Monocitos***

Durante la investigación de la expresión de la Tspan33 en las células B de sangre periférica se observó otra población positiva para este marcador. Esta población de PBMCs, por su tamaño y complejidad, correspondían a la de los monocitos, por lo que se procedió a comprobarlo usando anti-CD14 y anti-Tspan33. Las células CD14<sup>+</sup> también resultaron ser Tspan33<sup>+</sup> como se observa en la Figura 12. Por lo que se concluye que los monocitos expresan la Tspan33 en condiciones normales. La importancia de esta expresión no fue investigada con mayor profundidad durante el curso de este proyecto y permanece desconocida.

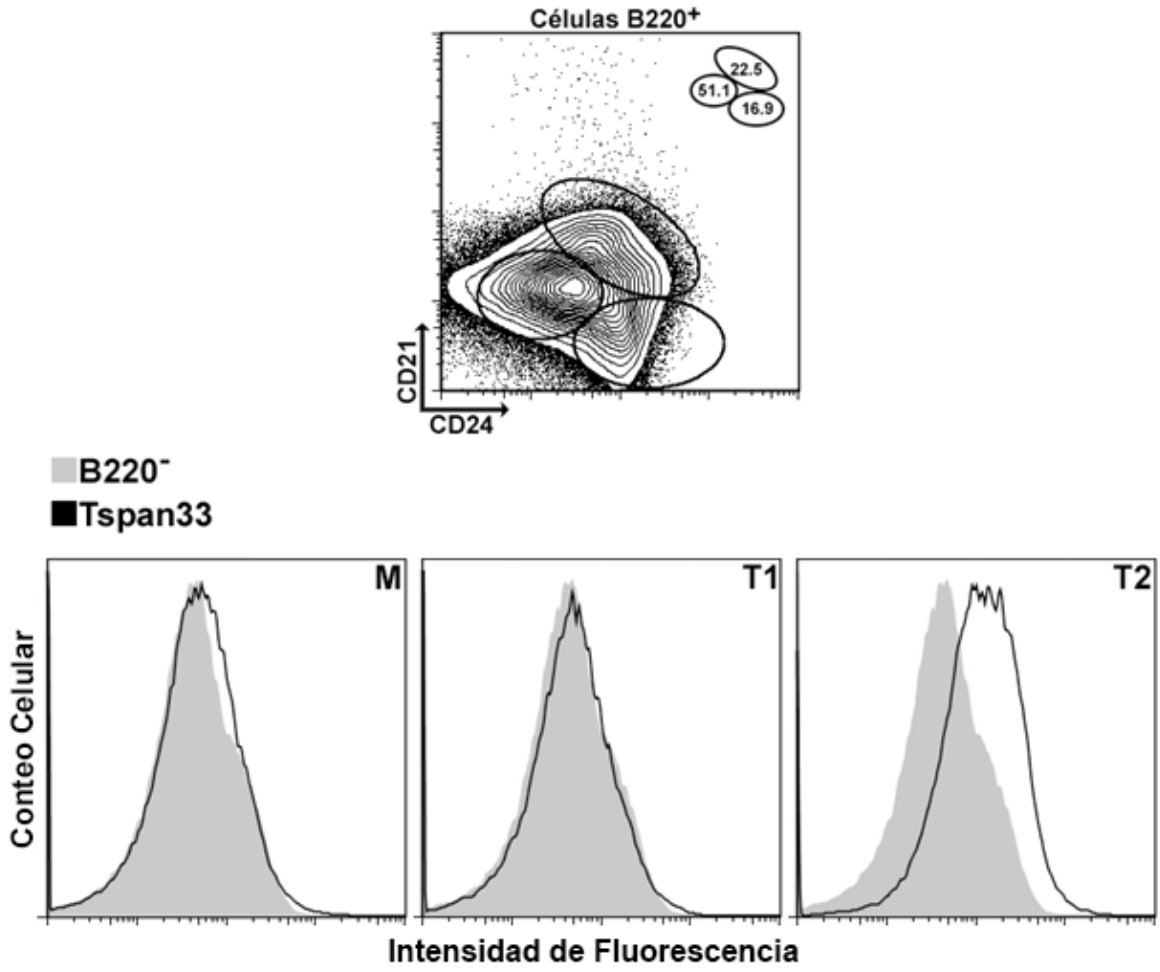




**Figura 12. Los monocitos CD14<sup>+</sup> expresan la Tspan33.** PBMCs se obtuvieron por gradiente de densidad a partir de muestras de donadores sanos y se tiñeron con los anticuerpos correspondientes. **Arriba:** Estrategia de selección de las poblaciones para monocitos CD14<sup>+</sup> en PBMCs. **Abajo:** Histogramas de la expresión de la Tspan33 en la población CD14<sup>+</sup>, n = 3.

### ***Expresión de Tspan33 en células B de bazo de ratón***

Para analizar más a fondo el papel de Tspan33 durante la ontogenia de las células B, se procedió a medir la expresión en subpoblaciones de células B en bazo de ratón. En este órgano se pueden encontrar subpoblaciones de células B inmaduras así como células B maduras [154]. Por lo tanto, se extrajeron bazos de ratones de la cepa C57/BL6, se disgregaron y se obtuvieron células mononucleares por gradiente de densidad. Estas células se tiñeron para los marcadores B220, CD24, CD21, y Tspan33. Se encontró la expresión de la Tspan33 en las células transicionales 2 ( $B220^+CD21^{hi}CD24^{hi}$ ) y la expresión fue negativa en otras subpoblaciones (Figura 13). Esto, aunado a la expresión en las células transicionales de humano, secunda la posible participación de la Tspan33 en los procesos de diferenciación tempranos, antes de la maduración de las células B.



**Figura 13. Expresión de Tspan33 en células B de bazo de ratón.** Se obtuvieron células mononucleares de bazo de ratón por gradiente de densidad, posteriormente se tiñeron con anticuerpos correspondientes. **Arriba:** Estrategia de selección de las poblaciones de células B220<sup>+</sup> en el bazo de ratón. **Abajo:** Histogramas de la expresión de la Tspan33 en las diferentes poblaciones: M (Maduras, B220<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>), T1 (Transicionales 1, B220<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>CD24<sup>hi</sup>) y T2 (Transicionales 2, B220<sup>+</sup>CD21<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup>).

## ***Ensayos funcionales de Tetrspanina 33***

### ***Células Raji expresan Tspan33 constitutivamente***

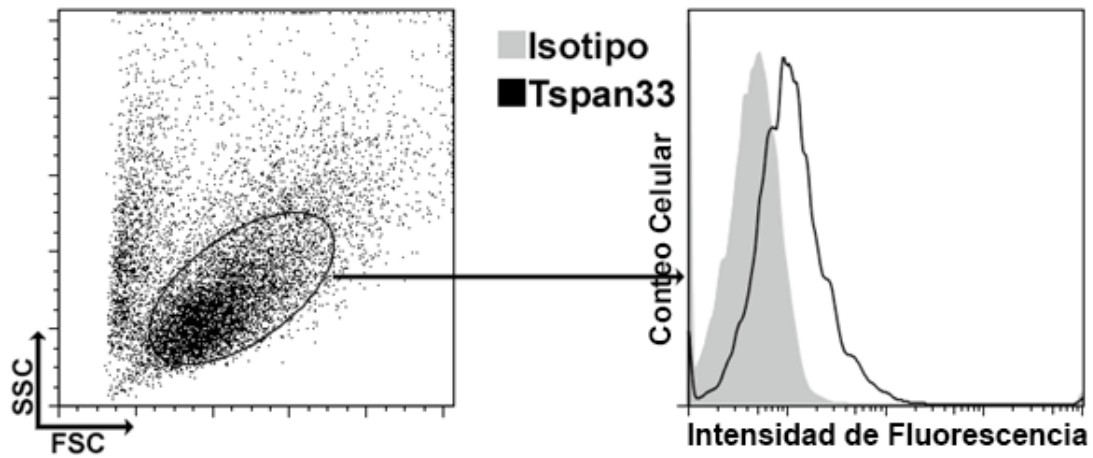
La línea celular Raji (nombrada por el donador) fue la primera línea celular humana continua con origen hematopoyético [155]. Derivada, por Pulvertaf en 1964, de un paciente con Linfoma de Burkitt [156]. Se describió que estas células eran positivas para el virus de Epstein-Barr [157] y para las inmunoglobulinas IgD [158] e IgM intracelular [158]. Recientemente se encontró, por RT-PCR, la expresión de la Tspan33 de manera constitutiva [38], por lo que se procedió a buscar la expresión de la Tspan33 en la superficie celular por citometría de flujo. Como se esperaba, las células Raji son positivas para la expresión de la Tspan33 (Figura 14). Por lo tanto, se decidió utilizar esta línea celular como modelo para buscar la función de la Tspan33.

### ***Proliferación de Células Raji estimuladas con anti-Tspan33***

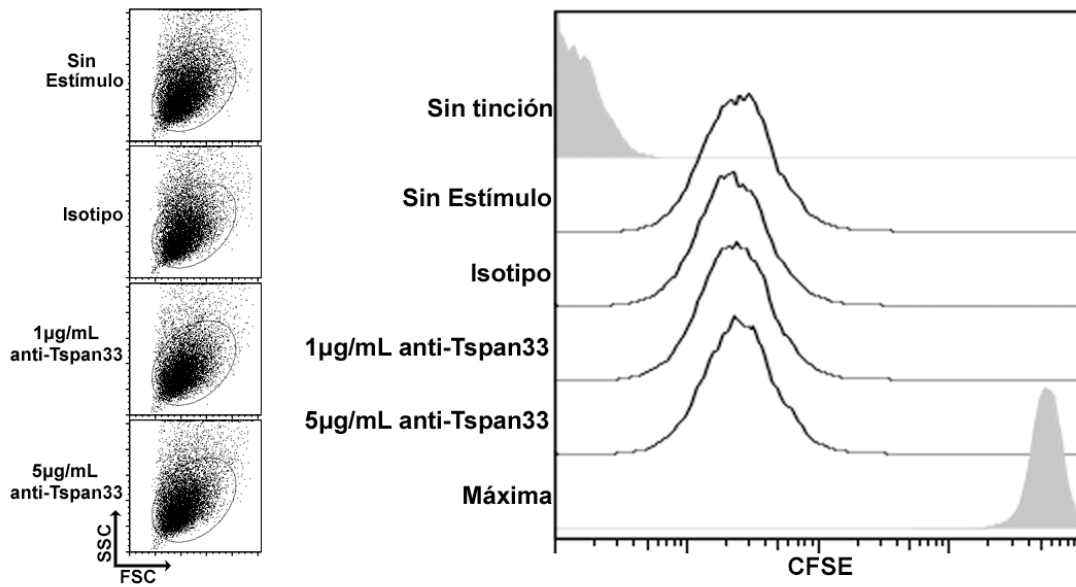
Muchos anticuerpos monoclonales dirigidos contra miembros de la familia tetraspaninas tienen efectos sobre las células [39, 79, 112, 118, 120]. Con esto en mente, se cultivaron células Raji en medio adicionando de anticuerpos anti-Tspan33. Se midió, con CFSE, la proliferación de estas células cultivadas por 3 días. No se observaron diferencias entre las células cultivadas con anticuerpo en comparación con aquellas cultivadas con un control de isotipo (Figura 15). Esto sugiere que el anticuerpo contra la Tspan33 no interfiere con la proliferación celular en la línea Raji.

Sin embargo, para mimetizar el encuentro de un ligando en otra célula o en una matriz, se inmovilizó al anticuerpo, incubándolo 16 horas a 37°C previo al cultivo de las células Raji. Después de 3 días se observó la proliferación celular con CFSE. Se observaron los

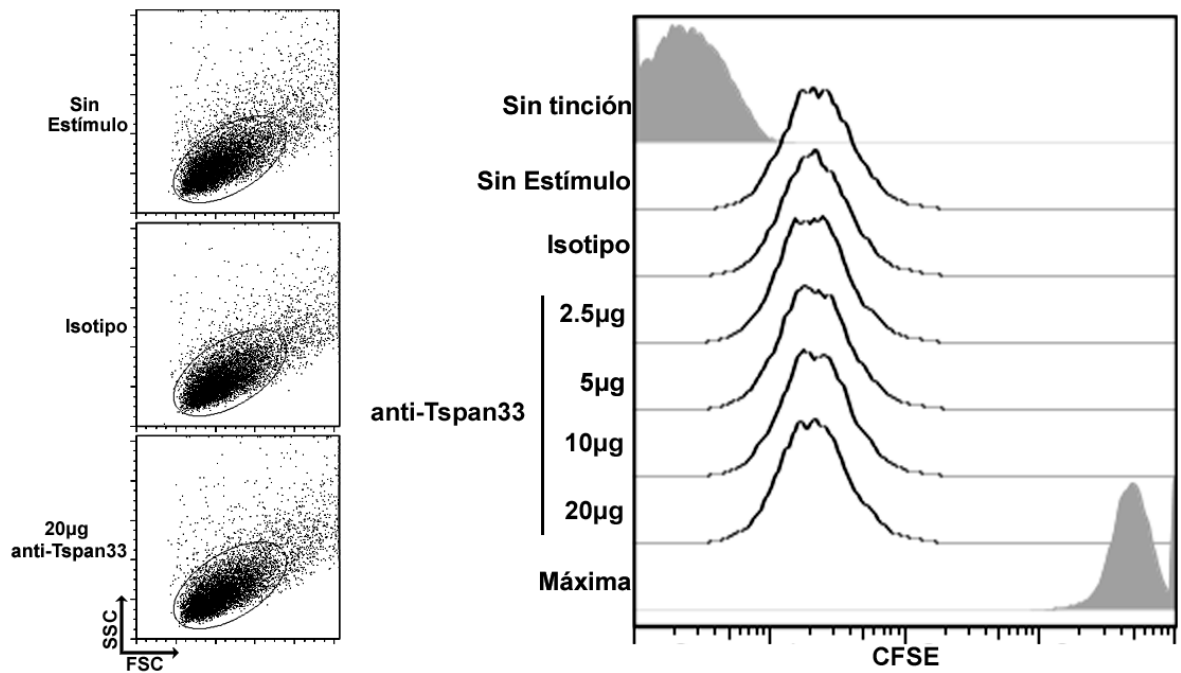
mismos resultados, es decir, las células cultivadas con anticuerpo inmovilizado anti-Tspan33 no tienen una proliferación diferente a las cultivadas con un control de isotipo. En conjunto, se confirma que el anticuerpo contra la Tspan33 no tiene un efecto en la proliferación celular de la línea Raji.



**Figura 14.** Las células Raji expresan la Tspan33 en la superficie de manera constitutiva. Los cultivos de células Raji fueron lavados y teñidos para la Tspan33, posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FITC y las células se analizaron por citometría de flujo. N=3.



**Figura 15.** Proliferación de las células Raji estimuladas con anti-Tspan33. Las células Raji fueron teñidas con CFSE y posteriormente cultivadas por 3 días en presencia de anti-Tspan33 a diferentes concentraciones. Luego cosechadas y analizadas por citometría de flujo para medir la dilución del colorante. Se comparan las mediciones con células recién teñidas con CFSE (Máxima) y células sin teñir.



**Figura 16. Proliferación de las células Raji estimuladas con anti-Tspan33 inmovilizado.** Las células Raji fueron teñidas con CFSE y posteriormente cultivadas en presencia de anticuerpo a diferentes concentraciones. El anticuerpo anti-Tspan33 se inmovilizó en las placas de cultivo, incubando por 1 hora a 37 °C. Después de 3 días de cultivo, las células se cosecharon y se analizaron por citometría de flujo para medir la dilución del colorante. La intensidad de fluorescencia de las muestras se compara con la tinción mínima (células sin tinción de CFSE) y con células recién teñidas con CFSE (tinción máxima).

### ***Construcción de plásmido pEGFP-Tspan33***

Para obtener información de la función de la Tspan33 en las células B, se decidió utilizar células Raji que sobreexpresan a la proteína. Para esto, se procedió a realizar una construcción con el plásmido pEGFP-N1, que fusiona la proteína verde fluorescente (GFP) en la región C-terminal. El marco de lectura abierto (ORF) de la Tspan33 se clonó utilizando los sitios de restricción de las enzimas *KpnI* y *AgeI* (Figura 17A). Para caracterizar el plásmido obtenido, se realizó una restricción enzimática con *EcoRI*. El plásmido que contiene el ORF de Tspan33 tiene dos sitios de restricción reconocidos por la enzima *EcoRI*, contrastando con el plásmido pEGFP-N1, que sólo tiene 1. Los plásmidos digeridos se corrieron en un gel de agarosa al 1%, donde se observaron los tamaños esperados para la construcción (Figura 17B). Se confirmó la continuidad del marco de lectura por secuenciación. El plásmido obtenido fue utilizado para transfectar células COS-7, después de 2 días se realizó un *Western blot* contra GFP. Por otra parte, las células se observaron al microscopio para ver la fluorescencia de las células transfectadas. Se observó el peso esperado de la proteína de fusión (Figura 17C). Además, se observó la localización de la proteína de fusión en la membrana de las células (Figura 17D), como se había reportado anteriormente [129]. En conjunto, esto comprueba la integridad del plásmido obtenido así como su funcionalidad.

### ***Obtención de células con transfección estable de Tspan33-GFP***

Para la obtención de las células Raji que expresan establemente a la Tspan33-GFP, primero se realizó una curva de resistencia a G418 (Geneticina), con el fin de seleccionar la concentración de antibiótico necesaria para seleccionar a células Tspan33-GFP<sup>+</sup>. Las células se cultivaron con concentraciones ascendentes de antibiótico y se monitorearon por

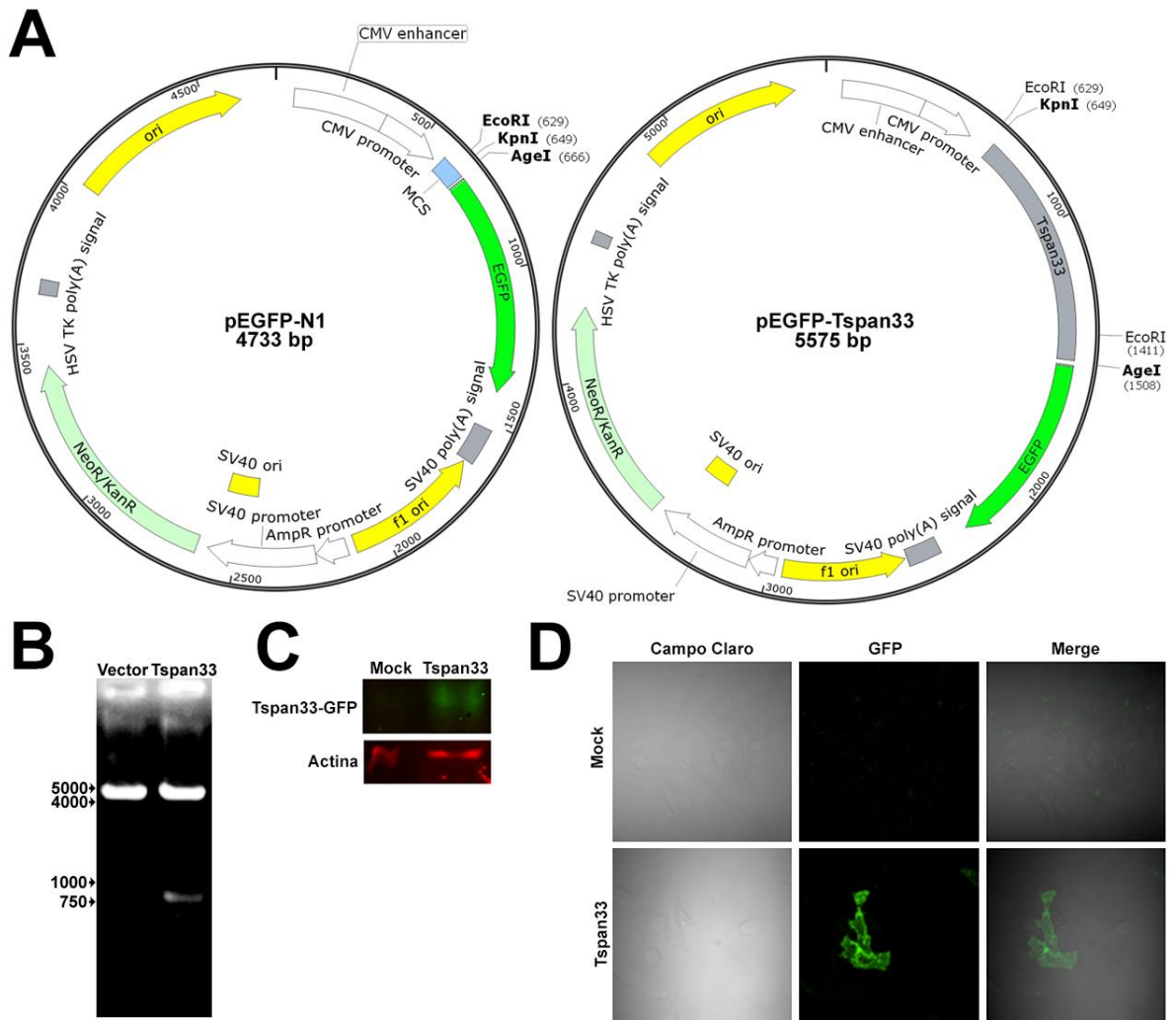


microscopia. Al día 6, se observó muerte celular en muchos cultivos y se procedió a contar las células vivas con Azul Tripano. Se seleccionó 1 $\mu$ g/mL de antibiótico para la selección de células transfectadas (Figura 18A). Con esto fue posible realizar las transfecciones estables, donde se transfectaron células Raji con las condiciones antes mencionadas y se cultivaron en presencia de G418 por 2 semanas, después de lo cual se procedió a realizar la clonación de las células para seleccionar células positivas para la Tspan33-GFP y para la GFP, como control. Brevemente, se cultivaron 0.5 células por pozo en placas de 96 pozos; después de 2 semanas, se escogieron 3 clonas las cuales fueron subclonadas de la misma forma, donde se seleccionaron 24 clonas para Raji-Tspan33-GFP y 24 para Raji-GFP. Se midió la expresión de GFP utilizando el citómetro de flujo, y se seleccionaron 3 clonas para Raji-Tspan33-GFP y Raji-GFP para determinar su expansión (Figura 18B). Estas clonas se utilizaron para realizar los experimentos funcionales y se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 200 $\mu$ g/mL de G418.

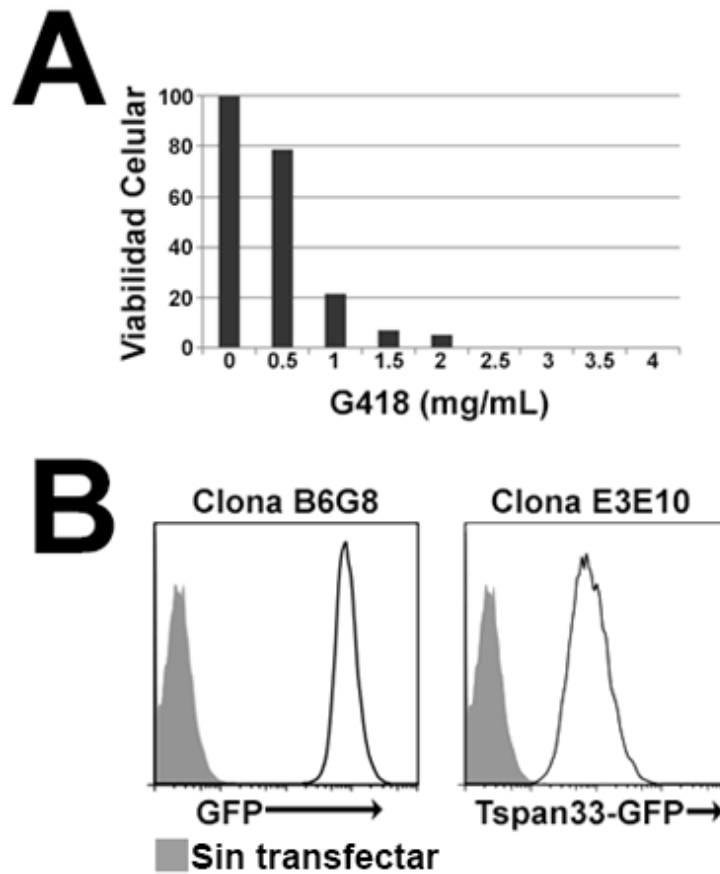
### ***Proliferación de las células que sobreexpresan Tspan33***

Para evaluar la participación de la Tspan33 en la proliferación celular, se midió la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina en diferentes clonas que expresaran Tspan33-GFP y se compararon con la incorporación de las células GFP<sup>+</sup>. Las células Raji clonadas se cultivaron por triplicado en medio suplementado por 5 días. Se midieron las cuentas por minuto después del pulso de 8 horas con [<sup>3</sup>H]-Timidina a los días 1, 3 y 5. Se normalizó con la incorporación del día 1 y los valores normalizados fueron graficados en GraphPad Prism. Se observaron diferencias en la proliferación de todas las clonas (Figura 19A). Para descartar que las diferencias en la proliferación se debieran a valores de expresión en Tspan33-GFP distintos, se analizó la fluorescencia por citometría de flujo de las clonas

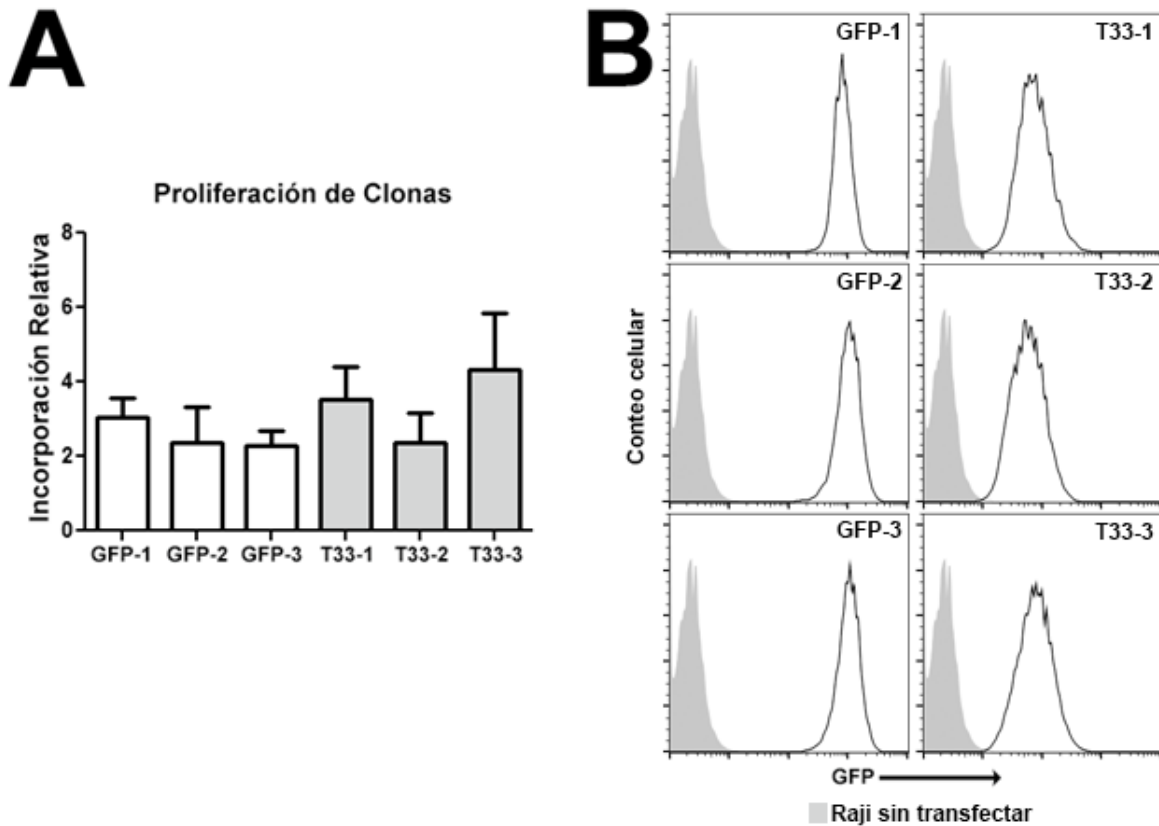
utilizadas para el ensayo de proliferación. Debido a que no se encontraron diferencias en la expresión de las proteínas fluorescentes (Figura 19B), consideramos que las diferencias en la proliferación se deben a variaciones intrínsecas de cada clona y no están relacionadas la expresión de Tspan33. Estos resultados, reiteran que la Tspan33 no está implicada en los procesos de proliferación de la línea celular Raji.



**Figura 17. Clonación de la Tspan33 en pEGFP-N1.** **A**, Mapa del vector (Izquierda) y de la construcción Tspan33-GFP (Derecha). **B**, Patrón de Restricción de pEGFP-N1 y pEGFP-Tspan33 con la enzima *EcoRI*. El vector linealizado tiene un tamaño de 4733. En el pEGFP-Tspan33 se esperaban dos bandas de 782bp y 4793bp. **C**, Las células COS-7 se transfectoron por electroporación con el pEGFP-Tspan33, después de dos días de cultivo, las células se lisaron y se realizó un *Western Blot* revelando con anti-GFP. La proteína de fusión tiene el peso esperado (~58kDa), se utilizó actina (~43kDa) como control de carga. **D**, Las células COS-7 se transfectoron y se cultivaron por dos días como antes mencionado, las células se observaron al microscopio confocal. La proteína de fusión se localiza en la membrana.



**Figura 18. Obtención de las células Tspan33-GFP<sup>+</sup> estables.** **A**, Curva de Resistencia al antibiótico G418 (Geneticina) en células Raji. Las células fueron cultivadas en medio suplementado con concentraciones crecientes del antibiótico por 6 días. Después, las células se contaron con Azul de Tripano y se compararon con las células cultivadas en ausencia del antibiótico. **B**, Histograma de expresión de GFP y Tspan33-GFP en las clonas de células Raji. Las células Raji se transfectaron por electroporación con el pEGFP-N1 o el pEGFP-Tspan33, después se cultivaron en medio con 1mg/mL de G418 por dos semanas. Posteriormente, las células se clonaron en dos ocasiones por el método de dilución limitante. La clona B6G8 expresa GFP y E3E10 expresa la proteína de fusión Tspan33-GFP.



**Figura 19. La sobreexpresión de la Tspan33 no afecta la proliferación celular.** **A**, Gráfica de barras de la Incorporación Relativa de [<sup>3</sup>H]-Timidina de 3 clonas GFP<sup>+</sup> y 3 clonas Tspan33-GFP<sup>+</sup> al día 5. Las células fueron cultivadas por 5 días en medio suplementado. La incorporación se midió a los días 1 y 5, adicionando un pulso con [<sup>3</sup>H]-Timidina durante las últimas 8 horas del cultivo. La incorporación relativa se calculó usando aquella del día 1. **B**, Expresión de la GFP y la Tspan33-GFP en las clonas utilizadas en el ensayo de incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina.

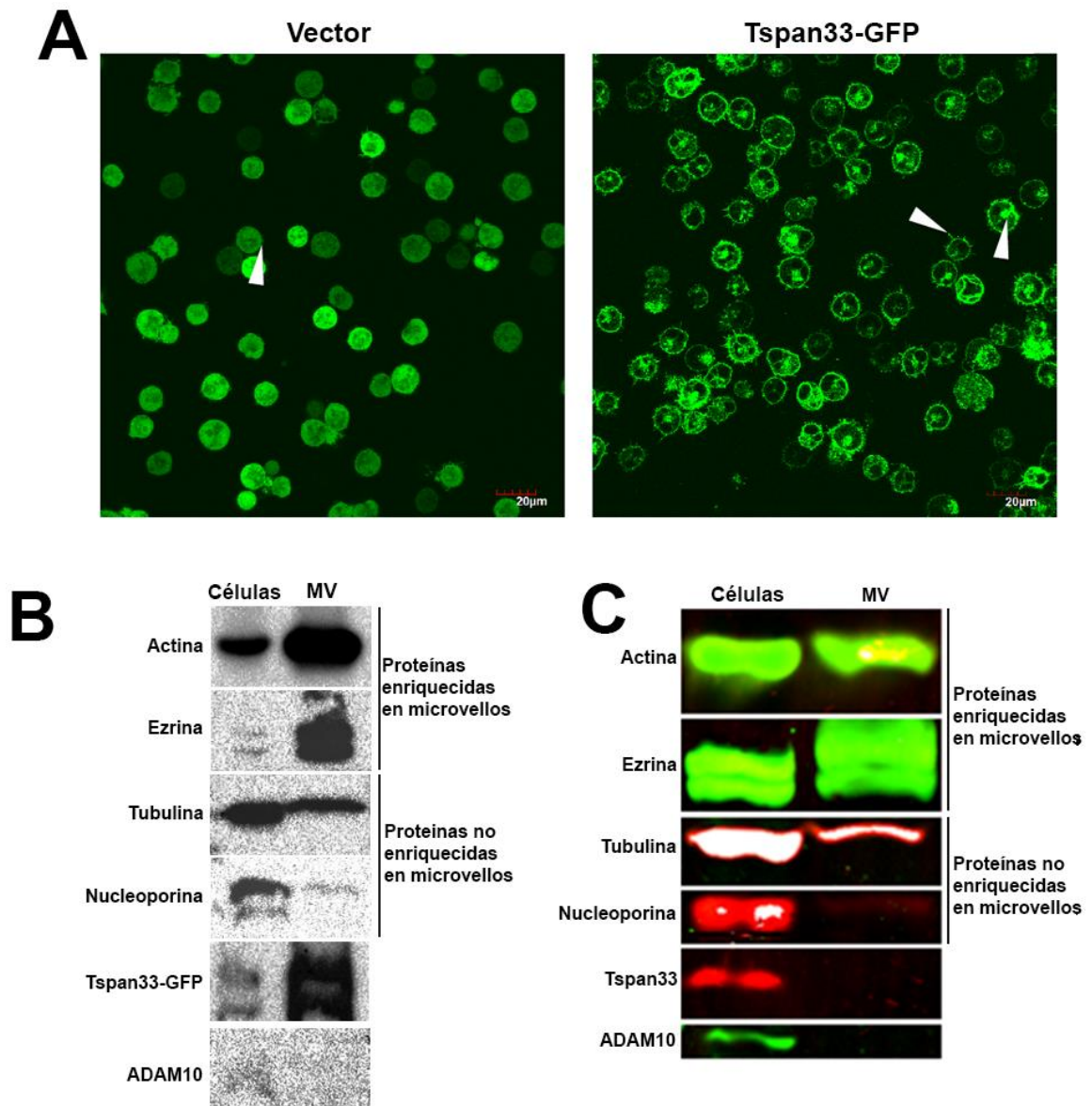
### ***Tspan33-GFP se localiza en las microvellosidades de células Raji***

Previamente se reportó a la Tspan33 localizada en la membrana celular de células Ba/F3 [129] y HeLa [87]. En una investigación paralela, se observó que la Tspan33-GFP se encuentra en la superficie de células Raji, en membranas internas de la célula y, particularmente, en las microvellosidades membranales (Meza-Herrera I. [159], Figura 20A). Como confirmación, se aislaron las microvellosidades de células Raji Tspan33-GFP<sup>+</sup> al pasar una suspensión celular por una aguja de calibre especial [93]. Las proteínas de las fracciones celulares, y las provenientes de las microvellosidades, fueron extraídas y separadas por SDS-PAGE. Posteriormente, se realizaron *Western blots* contra proteínas enriquecidas y no enriquecidas en los microvellos con el fin de garantizar la purificación de éstos [93]. Además, se procedió a realizar *Western blot* contra GFP buscando la proteína de fusión Tspan33-GFP (Figura 20B). Se encontró a la proteína de fusión enriquecida en la fracción de microvellos (MV) en una relación de 4:1. Estos resultados ubican a Tspan33-GFP en las microvellosidades de células Raji.

### ***ADAM10 no se encuentra en las microvellosidades de células Raji***

Tspan33, como se mencionó anteriormente, se asocia directamente con ADAM10 promoviendo su localización membranal [87, 88]. Debido a esto, se buscó la distribución de ADAM10 en estos mismos extractos encontrándose principalmente localizada en la fracción del cuerpo celular (Figura 20B). Esta localización indica que la proteína de fusión encontrada en microvellosidades no se encuentra asociada a ADAM10, lo que explica la ausencia de co-inmunoprecipitación con Tspan33-GFP (datos no mostrados). Esto es indicativo de otra función poco aparente de Tspan33 en las células B. Lo anterior nos dio la pauta para verificar la localización de Tspan33 en células Raji normales. Encontramos que

la Tspan33 se encuentra en el cuerpo celular junto con ADAM10, y no así en las microvellosidades (Figura 20C). Entonces, es la proteína de fusión la que deja de asociarse a ADAM10 y se dirige a las microvellosidades, posiblemente debido al exceso de Tspan33 o a la aparición de nuevas microvellosidades promovidas por la Tspan33.



**Figura 20. La Tspan33 se localiza en las microvellosidades de las células Raji.** **A**, Las células Raji transfectadas con la Tspan33 y con el Vector que contiene únicamente GFP vistas al microscopio confocal, se observa la localización de la Tspan33 en la membrana y en las microvellosidades (Imagen cortesía de Iván Meza-Herrera). **B**, *Western Blot* de las fracciones celulares y de las microvellosidades (MV) de células Raji transfectadas con Tspan33-GFP, reveladas con anti-GFP y las proteínas que se indican. **C**, *Western Blot* de las fracciones de células intactas y de las microvellosidades (MV) en células Raji sin transfectar, revelados contra Tspan33 endógena y las proteínas indicadas.



## ***DISCUSIÓN***

### ***Expresión de Tspan33 en células B***

Las características fenotípicas de las subpoblaciones de células B han sido estudiadas por muchos, con el fin de encontrar marcadores novedosos que proporcionen información inédita acerca de la fisiología y ontogenia normal de los linfocitos B. En una primera instancia, en este trabajo se describió la expresión de la Tspan33 en las subpoblaciones de células B, encontradas de manera normal en sangre periférica de donadores sanos. En un principio, la hipótesis era que la Tspan33 podría identificar una subpoblación de células B distinta a las ya reportadas. Aunque no se encontró una población claramente positiva, las células B, en las etapas tempranas y tardías de diferenciación, expresan Tspan33. Reportes previos muestran que la expresión de la Tspan33 es inducida tras la activación de las células B [38], por lo tanto, proponemos que, después de la activación, las células B mantienen la expresión de Tspan33.

Las tetraspaninas del grupo 3, incluyendo a la Tspan33, tienen distintos patrones de expresión pero presentan redundancia en sus funciones. ADAM10 requiere de la expresión de una de estas tetraspaninas para su maduración y su expresión en la superficie celular [87, 88]. ADAM10 es una enzima transmembranal que corta una gran variedad de proteínas (*shedase*) y es expresada ubicuamente [133]. Nuestros resultados sugieren que la alta expresión de ADAM10 es consecuencia de la expresión de la Tspan33 y otras tetraspaninas del grupo 3 en las células B, la identidad de estas tetraspaninas se desconoce, sin embargo, se ha reportado la presencia de Tspan5, Tspan14 y Tspan17 en las células B [153], lo cual está concordancia con lo que encontramos en las células Raji (Figura 10). Sin embargo,

recientemente se ha observado que cada tetraspanina de este grupo favorece el corte, por ADAM10, de un sustrato específico [134-136] (Tabla 2). La Tspan33 permite el corte de APP, GPVI [134, 135] y receptores Notch [131, 135]. Como consecuencia, la Tspan33 podría regular el corte por ADAM10 de otros sustratos presentes en la membrana de las células B transicionales y de las células B activadas y de memoria; p. ej. CD23 [160, 161], CD30 [162], CD44 [163], TACI [164] y TIM-2 [165]. Sin embargo, esto no descarta la participación de otras tetraspaninas y permanece sin ser evaluado.

Resulta de interés particular la expresión encontrada en las células B transicionales de humano y en las T2 en el bazo de ratón. Las células B transicionales pueden originar células B de zona marginal (MZ) cuando Notch2, presente en la célula B, encuentra a su ligando DL1 (Delta-like 1). DL1 se encuentra presente en compartimentos vasculares del bazo y la zona marginal [22, 25, 30, 138, 166]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la Tspan33, al permitir la localización de ADAM10 en la superficie celular, es importante para el desarrollo de las células B de MZ. Aunque los reportes anteriores no encontraron evidencias de la importancia de la Tspan33 en el desarrollo de las células B de MZ [88, 129], esto pudo haber sido pasado por alto debido a que las células B de MZ representan una proporción pequeña todas las células B y también por la redundancia entre las tetraspaninas del grupo 3 (TspanC8) [87, 88]. Si esta hipótesis es correcta, la deficiencia en la Tspan33 (y dada su restringido patrón de expresión) resultaría en una disminución de las células B de MZ, aunque nunca al nivel observado en el ratón deficiente de ADAM10 [138, 141].

En estudios anteriores se demostró la presencia del mRNA de la Tspan33 en las células B murinas activadas a partir de las 12 horas [38]. En otros trabajos, se activaron

macrófagos con LPS y se encontró al mensajero a las 2 horas y a la proteína a las 4 horas post-activación [167]. Nosotros encontramos a la proteína en la superficie de la célula B con citometría de flujo a las 8 horas post-activación, por lo que sugerimos que la expresión de la Tspan33 puede ser utilizada como un marcador temprano de activación.

Varias tetraspaninas se han propuesto como blancos terapéuticos para distintas enfermedades. Un anticuerpo que reconoce a la tetraspanina CD37 se utiliza como tratamiento para malignidades de células B (revisado en [168]). Conociendo que la Tspan33 se expresa en las células de linfoma de Hodgkin, el linfoma difuso de las células B grandes, la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico [38], la Tspan33 podría servir como blanco terapéutico, dada su baja expresión en las células B normales. Además, las células B activadas se han reportado en el lupus [169]. Nuestros datos indican que la expresión de la Tspan33 es inducida de manera temprana en las células B activadas, sugiriendo que puede ser usada para dirigir un tratamiento hacia las células B patogénicas que participan en el curso de estas enfermedades.

En resumen, la Tspan33 está expresada antes de la maduración de los linfocitos B y después de su activación, interesantemente ambos eventos implican la activación celular lo que refuerza el concepto de que la Tspan33 es un marcador de linfocitos B activados. La expresión de Tspan33 no se correlaciona con aquella de ADAM10, pero la expresión simultánea de éstas es importante para el procesamiento de los sustratos de ADAM10. La Tspan33 puede convertirse en un blanco terapéutico dado su baja expresión en células B en reposo.

### ***Expresión en Monocitos***

Los monocitos son células mononucleadas y fagocíticas encontradas en sangre periférica. Son reclutados al tejido durante un proceso inflamatorio, donde se convierten en macrófagos (revisado en [170]). Nosotros encontramos expresión de la Tspan33 en los monocitos de sangre periférica en estado basal. Además de la expresión de la Tspan33, los receptores de Notch han sido reportados en los monocitos, promoviendo la apoptosis de estas células cuando se encuentran al ligando DL-1 [171]. Por lo que, durante este proceso, es posible que la Tspan33 esté promoviendo el corte de los receptores a través de ADAM10, lo que conllevaría a la apoptosis de los monocitos. Esta hipótesis debe de ser revisada, por las posibles implicaciones de una posible terapia contra la Tspan33, como fue mencionado anteriormente.

### ***Función de Tspan33 en células B***

Muchas tetraspaninas han resultado importantes para la proliferación celular. Debido a esto, y a los reportes de la relación de la Tspan33 y la vía de Notch, nuestra hipótesis inicial era que esta proteína era importante para la proliferación de las células. Los resultados, de los diferentes ensayos realizados con anticuerpos para el entrecruzamiento de Tspan33 y con células que sobreexpresan a la Tspan33 no mostraron indicios de la participación de la Tspan33 en la proliferación de las células B.

### ***Presencia de la Tspan33 en microvellosidades***

Las células Raji expresan Tspan33 de manera constitutiva, y esta se encuentra en la membrana celular; ahí, se encuentra asociada a ADAM10 y no se encuentra en las microvellosidades. Sin embargo, la sobreexpresión de la Tspan33 promueve la presencia de ella misma en microvellosidades. Existe la posibilidad que la proteína de fusión utilizada

para sobreexpresar la Tspan33 sobrepasa la cantidad de ADAM10 y la Tspan33-GFP “libre” se dirija a las microvellosidades, originando redes de tetraspaninas con otras proteínas desconocidas hasta el momento o relocalizándolas hacia estas protrusiones celulares.

Otra posibilidad se explica con el efecto que tendría el colesterol en la interacción de la tetraspanina con su proteína acompañante, como se ha descrito recientemente para CD81 [45]. Bajo esta hipótesis, debido a la presencia del colesterol y de las balsas de lípidos en microvellosidades de células B [92], las tetraspaninas en las microvellosidades estarían en su configuración cerrada, no permitiendo la asociación con su proteína acompañante. Aunque no se ha demostrado la regulación del colesterol en la Tspan33, se sugiere debido a la presencia de residuos polares conservados en las tetraspaninas [45]. En este contexto, la Tspan33 estaría ejerciendo alguna función desconocida en las microvellosidades.

Las tetraspaninas, aunque con papeles diferentes, son importantes para la morfogénesis de microvellos encontrados en diferentes células [95]. Además, en las células B, las microvellosidades son promovidas durante la activación con rhIL-4 y anti-CD40 [92], los mismos estímulos que aumentan la expresión de la Tspan33. Aunque no se descarta que la localización de la proteína de fusión sea un artefacto, nuestros resultados sugieren que la Tspan33 promueve la aparición de nuevas microvellosidades, lo que ocurre con otras tetraspaninas como CD81 [95], CD9 [96] y CD151 [97]. Curiosamente, en estos casos, las tetraspaninas tienen una conexión con el citoesqueleto de actina [96, 97, 172]. Sin embargo, esto permanece por ser probado en el caso de la Tspan33.

## ***CONCLUSIONES***

En conclusión, la Tspan33 se expresa durante la maduración y durante la activación de las células B.

La expresión de la Tspan33 no correlaciona con aquella de ADAM10, pero la expresión simultánea puede ser importante para el procesamiento de los sustratos de ADAM10.

La sobreexpresión de la Tspan33 no afecta la proliferación de las células Raji. De igual forma, la estimulación con anticuerpos anti-Tspan33 no induce cambios observables en la proliferación.

La Tspan33 se encuentra localizada en las microvellosidades de las células Raji cuando es sobreexpresada, sin embargo, de manera basal se encuentra fuera de estas regiones.

## ***PERSPECTIVAS***

Evaluar los niveles de expresión de Tspan33 en enfermedades autoinmunes y malignidades de células B, ya que, debido a sus niveles bajos en las células B en reposo, la Tspan33 podría ser utilizada como un blanco terapéutico.

Medir los niveles de células B de zona marginal, así como la función de éstos, en los ratones deficientes de Tspan33.

Valorar la respuesta de anticuerpos, la activación de células B y la densidad de las microvellosidades en ratones deficientes de Tspan33.

Examinar los niveles de Tspan33 en las subpoblaciones de células B en órganos linfoides secundarios informaría de la función de la Tspan33 durante la activación de las células B *in vivo*.

Evaluar los niveles de las tetraspaninas TspanC8 durante el proceso de diferenciación de las células B con el fin de determinar el efecto redundante ante una deficiencia de Tspan33.

Determinar el efecto de los anticuerpos anti-Tspan33 durante la activación de la vía de Notch en las células que expresan Tspan33.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity*. Nature, 1983. **302**(5909): p. 575-81.
2. Perez-Andres, M., et al., *Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic*. Cytometry B Clin Cytom, 2010. **78 Suppl 1**: p. S47-60.
3. Defrance, T., M. Casamayor-Palleja, and P.H. Krammer, *The life and death of a B cell*. Adv Cancer Res, 2002. **86**: p. 195-225.
4. Tokoyoda, K., et al., *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development*. Immunity, 2004. **20**(6): p. 707-18.
5. Pelayo, R., et al., *Life before the pre-B cell receptor checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow*. Semin Immunol, 2006. **18**(1): p. 2-11.
6. Hillion, S., et al., *Signaling pathways regulating RAG expression in B lymphocytes*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(7): p. 599-604.
7. Kozmik, Z., et al., *The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(6): p. 2662-72.
8. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Inmunobiología de Janeway*. 7ma ed. 2008, Ciudad de México: Mc Graw-Hill Educación. 880.
9. Misener, V., G.P. Downey, and J. Jongstra, *The immunoglobulin light chain related protein lambda 5 is expressed on the surface of mouse pre-B cell lines and can function as a signal transducing molecule*. Int Immunol, 1991. **3**(11): p. 1129-36.
10. Karasuyama, H., A. Kudo, and F. Melchers, *The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain*. J Exp Med, 1990. **172**(3): p. 969-72.
11. Loffert, D., et al., *Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development*. Immunity, 1996. **4**(2): p. 133-44.
12. Espeli, M., et al., *Impaired B-cell development at the pre-BII-cell stage in galectin-1-deficient mice due to inefficient pre-BII/stromal cell interactions*. Blood, 2009. **113**(23): p. 5878-86.
13. Constantinescu, A. and M.S. Schlissel, *Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development*. J Exp Med, 1997. **185**(4): p. 609-20.
14. van Lochem, E.G., et al., *Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts*. Cytometry B Clin Cytom, 2004. **60**(1): p. 1-13.
15. Rolink, A.G., et al., *Selection events operating at various stages in B cell development*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 202-7.
16. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster, *Germinal-center organization and cellular dynamics*. Immunity, 2007. **27**(2): p. 190-202.
17. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.



18. Agematsu, K., et al., *CD27: a memory B-cell marker*. Immunol Today, 2000. **21**(5): p. 204-6.
19. Seifert, M. and R. Kuppers, *Human memory B cells*. Leukemia, 2016. **30**(12): p. 2283-2292.
20. Rothstein, T.L., et al., *Human B-1 cells take the stage*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1285**: p. 97-114.
21. Martin, F. and J.F. Kearney, *Marginal-zone B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 323-35.
22. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 161-96.
23. Allman, D. and S. Pillai, *Peripheral B cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 149-57.
24. Won, W.J. and J.F. Kearney, *CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5605-11.
25. Pillai, S. and A. Cariappa, *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 767-77.
26. Marie-Cardine, A., et al., *Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation*. Clin Immunol, 2008. **127**(1): p. 14-25.
27. Maecker, H.T., J.P. McCoy, and R. Nussenblatt, *Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 191-200.
28. Wirths, S. and A. Lanzavecchia, *ABCBI transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells*. Eur J Immunol, 2005. **35**(12): p. 3433-41.
29. Simon, Q., et al., *In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles*. J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(5): p. 1577-1584 e10.
30. Descatoire, M., et al., *Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties*. J Exp Med, 2014. **211**(5): p. 987-1000.
31. Warnatz, K., et al., *Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1544-51.
32. Rosel, A.L., et al., *Classification of common variable immunodeficiencies using flow cytometry and a memory B-cell functionality assay*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(1): p. 198-208.
33. Kurosaki, T., *B-lymphocyte biology*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 5-9.
34. Sanderson, R.D., P. Lalor, and M. Bernfield, *B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation*. Cell Regul, 1989. **1**(1): p. 27-35.
35. Lee, J., et al., *Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human postmortem tissues*. FASEB J, 2005. **19**(10): p. 1356-8.
36. Roth, R.B., et al., *Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS*. Neurogenetics, 2006. **7**(2): p. 67-80.
37. Burkhardt, A.M., et al., *CXCL17 is a major chemotactic factor for lung macrophages*. J Immunol, 2014. **193**(3): p. 1468-74.
38. Luu, V.P., et al., *TSPAN33 is a novel marker of activated and malignant B cells*. Clin Immunol, 2013. **149**(3): p. 388-99.

39. Oren, R., et al., *TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(8): p. 4007-15.
40. Charrin, S., et al., *Tetraspanins at a glance*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 17): p. 3641-8.
41. Hemler, M.E., *Tetraspanin functions and associated microdomains*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 801-11.
42. Levy, S. and T. Shoham, *The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(2): p. 136-48.
43. van Spriël, A.B., *Tetraspanins in the humoral immune response*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(2): p. 512-7.
44. Seigneuret, M., et al., *Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 40055-64.
45. Zimmerman, B., et al., *Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket*. Cell. **167**(4): p. 1041-1051.e11.
46. Berditchevski, F., et al., *Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 41165-74.
47. Cannon, K.S. and P. Cresswell, *Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82*. EMBO J, 2001. **20**(10): p. 2443-53.
48. Toyooka, K., et al., *Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association*. Int Immunol, 1999. **11**(12): p. 2043-52.
49. Tu, L., et al., *Integrity of all four transmembrane domains of the tetraspanin uroplakin Ib is required for its exit from the ER*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 24): p. 5077-86.
50. Kitadokoro, K., et al., *CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs*. EMBO J, 2001. **20**(1-2): p. 12-8.
51. Kitadokoro, K., et al., *Crystallization and preliminary crystallographic studies on the large extracellular domain of human CD81, a tetraspanin receptor for hepatitis C virus*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 1): p. 156-8.
52. Azzarone, B., et al., *Modulation of fibroblast-induced clot retraction by calcium channel blocking drugs and the monoclonal antibody ALB6*. J Cell Physiol, 1985. **125**(3): p. 420-6.
53. Angelisova, P., I. Hilgert, and V. Horejsi, *Association of four antigens of the tetraspanin family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins*. Immunogenetics, 1994. **39**(4): p. 249-56.
54. Szollosi, J., et al., *Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspanin molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY*. J Immunol, 1996. **157**(7): p. 2939-46.
55. Rubinstein, E., et al., *CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspanin network connected to HLA-DR and VLA integrins*. Eur J Immunol, 1996. **26**(11): p. 2657-65.
56. Hemler, M.E., *Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 397-422.

57. Nydegger, S., et al., *Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1*. J Cell Biol, 2006. **173**(5): p. 795-807.
58. Berditchevski, F., et al., *Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 36991-7000.
59. Yang, X., et al., *Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(3): p. 767-81.
60. Charrin, S., et al., *Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation*. FEBS Lett, 2002. **516**(1-3): p. 139-44.
61. Kovalenko, O.V., et al., *Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 2): p. 407-17.
62. Zhou, B., et al., *The palmitoylation of metastasis suppressor KAI1/CD82 is important for its motility- and invasiveness-inhibitory activity*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7455-63.
63. Sharma, C., X.H. Yang, and M.E. Hemler, *DHHC2 affects palmitoylation, stability, and functions of tetraspanins CD9 and CD151*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3415-25.
64. Ono, M., et al., *GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy*. Biochemistry, 2001. **40**(21): p. 6414-21.
65. Odintsova, E., et al., *Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains*. Biochem J, 2006. **400**(2): p. 315-25.
66. Stepanek, O., P. Draber, and V. Horejsi, *Palmitoylated transmembrane adaptor proteins in leukocyte signaling*. Cell Signal, 2014. **26**(5): p. 895-902.
67. Zhu, Y.Z., et al., *Significance of palmitoylation of CD81 on its association with tetraspanin-enriched microdomains and mediating hepatitis C virus cell entry*. Virology, 2012. **429**(2): p. 112-23.
68. Espenel, C., et al., *Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web*. J Cell Biol, 2008. **182**(4): p. 765-76.
69. Serru, V., et al., *Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions*. Biochem J, 1999. **340** ( Pt 1): p. 103-11.
70. Yauch, R.L., et al., *Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(10): p. 2751-65.
71. Charrin, S., et al., *A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins*. Eur J Immunol, 2003. **33**(9): p. 2479-89.
72. Charrin, S., et al., *Multiple levels of interactions within the tetraspanin web*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **304**(1): p. 107-12.
73. Claas, C., C.S. Stipp, and M.E. Hemler, *Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7974-84.

74. Ilangumaran, S. and D.C. Hoessli, *Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane*. *Biochem J*, 1998. **335** ( Pt 2): p. 433-40.
75. Silvie, O., et al., *Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites*. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 10): p. 1992-2002.
76. Zhang, X.A., A.L. Bontrager, and M.E. Hemler, *Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 25005-13.
77. Sala-Valdes, M., et al., *EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(28): p. 19665-75.
78. Yauch, R.L. and M.E. Hemler, *Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase*. *Biochem J*, 2000. **351** Pt 3: p. 629-37.
79. Lapalombella, R., et al., *Tetraspanin CD37 directly mediates transduction of survival and apoptotic signals*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(5): p. 694-708.
80. Tejera, E., et al., *CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase*. *Mol Biol Cell*, 2013. **24**(3): p. 261-73.
81. Min, G., et al., *Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-A resolution*. *J Cell Biol*, 2006. **173**(6): p. 975-83.
82. Zuidschewoude, M., et al., *The tetraspanin web revisited by super-resolution microscopy*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 12201.
83. Vences-Catalan, F., C.C. Kuo, and S. Levy, *Role of an arginine-lysine rich motif in maturation and trafficking of CD19*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **465**(3): p. 319-23.
84. Shoham, T., et al., *Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(4): p. 1373-85.
85. Russ, W.P. and D.M. Engelman, *The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association*. *J Mol Biol*, 2000. **296**(3): p. 911-9.
86. Tu, L., T.T. Sun, and G. Kreibich, *Specific heterodimer formation is a prerequisite for uroplakins to exit from the endoplasmic reticulum*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(12): p. 4221-30.
87. Dornier, E., et al., *TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals*. *J Cell Biol*, 2012. **199**(3): p. 481-96.
88. Haining, E.J., et al., *The TspanC8 subgroup of tetraspanins interacts with A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) and regulates its maturation and cell surface expression*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(47): p. 39753-65.
89. Marcello, E., et al., *An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(14): p. 10376-84.
90. Polliack, A., *The contribution of scanning electron microscopy in haematology: its role in defining leucocyte and erythrocyte disorders*. *J Microsc*, 1981. **123**(Pt 2): p. 177-87.
91. Polliack, A., et al., *Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy*. *J Exp Med*, 1973. **138**(3): p. 607-24.

92. Greicius, G., et al., *Microvilli structures on B lymphocytes: inducible functional domains?* Int Immunol, 2004. **16**(2): p. 353-64.
93. Hao, J.J., et al., *Enrichment of distinct microfilament-associated and GTP-binding-proteins in membrane/microvilli fractions from lymphoid cells.* J Proteome Res, 2008. **7**(7): p. 2911-27.
94. Majstoravich, S., et al., *Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology.* Blood, 2004. **104**(5): p. 1396-403.
95. Bari, R., et al., *Tetraspanins regulate the protrusive activities of cell membrane.* Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(4): p. 619-26.
96. Runge, K.E., et al., *Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution.* Dev Biol, 2007. **304**(1): p. 317-25.
97. Zhang, F., et al., *Tetraspanin CD151 maintains vascular stability by balancing the forces of cell adhesion and cytoskeletal tension.* Blood, 2011. **118**(15): p. 4274-84.
98. Liu, W.M., et al., *Tetraspanin CD82 inhibits protrusion and retraction in cell movement by attenuating the plasma membrane-dependent actin organization.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51797.
99. Shoham, T., et al., *The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment.* J Immunol, 2003. **171**(8): p. 4062-72.
100. Tedder, T.F., M. Inaoki, and S. Sato, *The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity.* Immunity, 1997. **6**(2): p. 107-18.
101. Depoil, D., et al., *Early events of B cell activation by antigen.* Sci Signal, 2009. **2**(63): p. pt1.
102. Mattila, P.K., et al., *The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling.* Immunity, 2013. **38**(3): p. 461-74.
103. Takahashi, S., et al., *TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, is associated on the cell surface with the Leu-13 antigen.* J Immunol, 1990. **145**(7): p. 2207-13.
104. Peng, W.M., et al., *Tetraspanins CD9 and CD81 are molecular partners of trimeric Fcγ2b on human antigen-presenting cells.* Allergy, 2011. **66**(5): p. 605-11.
105. Nichols, T.C., et al., *Gamma-glutamyl transpeptidase, an ecto-enzyme regulator of intracellular redox potential, is a component of TM4 signal transduction complexes.* Eur J Immunol, 1998. **28**(12): p. 4123-9.
106. van Zelm, M.C., et al., *CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency.* J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1265-74.
107. Vences-Catalan, F., et al., *A mutation in the human tetraspanin CD81 gene is expressed as a truncated protein but does not enable CD19 maturation and cell surface expression.* J Clin Immunol, 2015. **35**(3): p. 254-63.
108. van Sriel, A.B. and C.G. Figdor, *The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases.* Microbes Infect, 2010. **12**(2): p. 106-12.
109. Meyer-Wentrup, F., et al., *Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production.* J Immunol, 2007. **178**(1): p. 154-62.

110. van Spruiel, A.B., et al., *The tetraspanin protein CD37 regulates IgA responses and anti-fungal immunity*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000338.
111. Rops, A.L., et al., *The tetraspanin CD37 protects against glomerular IgA deposition and renal pathology*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2188-97.
112. Yunta, M. and P.A. Lazo, *Apoptosis protection and survival signal by the CD53 tetraspanin antigen*. Oncogene, 2003. **22**(8): p. 1219-24.
113. Voehringer, D.W., et al., *Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2680-5.
114. Rasmussen, A.M., et al., *Cross-linking of CD53 promotes activation of resting human B lymphocytes*. J Immunol, 1994. **153**(11): p. 4997-5007.
115. Olweus, J., F. Lund-Johansen, and V. Horejsi, *CD53, a protein with four membrane-spanning domains, mediates signal transduction in human monocytes and B cells*. J Immunol, 1993. **151**(2): p. 707-16.
116. Lazo, P.A., et al., *Ligation of CD53/OX44, a tetraspan antigen, induces homotypic adhesion mediated by specific cell-cell interactions*. Cell Immunol, 1997. **178**(2): p. 132-40.
117. Mollinedo, F., et al., *Recurrent infectious diseases in human CD53 deficiency*. Clin Diagn Lab Immunol, 1997. **4**(2): p. 229-31.
118. Miyake, M., et al., *Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1347-54.
119. Reyes, R., et al., *Different states of integrin LFA-1 aggregation are controlled through its association with tetraspanin CD9*. Biochim Biophys Acta, 2015.
120. Gil, M.L., et al., *A member of the tetra spans transmembrane protein superfamily is recognized by a monoclonal antibody raised against an HLA class I-deficient, lymphokine-activated killer-susceptible, B lymphocyte line. Cloning and preliminary functional studies*. J Immunol, 1992. **148**(9): p. 2826-33.
121. Romanska, H.M. and F. Berditchevski, *Tetraspanins in human epithelial malignancies*. J Pathol, 2011. **223**(1): p. 4-14.
122. Xuan, H., X. Hu, and J. Huang, *Role of motility-related protein-1 in promoting the development of several types of cancer (Review)*. Oncol Lett, 2014. **7**(3): p. 611-615.
123. Levy, S., *Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells*. Immunol Res, 2014. **58**(2-3): p. 179-85.
124. Ferrer, M., M. Yunta, and P.A. Lazo, *Pattern of expression of tetraspanin antigen genes in Burkitt lymphoma cell lines*. Clin Exp Immunol, 1998. **113**(3): p. 346-52.
125. Barrena, S., et al., *Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation*. Leukemia, 2005. **19**(8): p. 1376-83.
126. Serru, V., et al., *Sequence and expression of seven new tetraspans*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1478**(1): p. 159-63.
127. Oksvold, M.P., et al., *Expression of B-cell surface antigens in subpopulations of exosomes released from B-cell lymphoma cells*. Clin Ther, 2014. **36**(6): p. 847-862 e1.

128. Mirkowska, P., et al., *Leukemia surfaceome analysis reveals new disease-associated features*. Blood, 2013. **121**(25): p. e149-59.
129. Heikens, M.J., et al., *Penumbra encodes a novel tetraspanin that is highly expressed in erythroid progenitors and promotes effective erythropoiesis*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3244-52.
130. Chen, Z., et al., *The human Penumbra gene is mapped to a region on chromosome 7 frequently deleted in myeloid malignancies*. Cancer Genet Cytogenet, 2005. **162**(2): p. 95-8.
131. Dunn, C.D., et al., *A conserved tetraspanin subfamily promotes Notch signaling in Caenorhabditis elegans and in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 5907-12.
132. Arduise, C., et al., *Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 7002-13.
133. Pruessmeyer, J. and A. Ludwig, *The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer*. Semin Cell Dev Biol, 2009. **20**(2): p. 164-74.
134. Noy, P.J., et al., *TspanC8 Tetraspanins and A Disintegrin and Metalloprotease 10 (ADAM10) Interact via Their Extracellular Regions: EVIDENCE FOR DISTINCT BINDING MECHANISMS FOR DIFFERENT TspanC8 PROTEINS*. J Biol Chem, 2016. **291**(7): p. 3145-57.
135. Jouannet, S., et al., *TspanC8 tetraspanins differentially regulate the cleavage of ADAM10 substrates, Notch activation and ADAM10 membrane compartmentalization*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(9): p. 1895-915.
136. Zhou, J., et al., *Downregulation of Notch modulators, tetraspanin 5 and 10, inhibits osteoclastogenesis in vitro*. Calcif Tissue Int, 2014. **95**(3): p. 209-17.
137. Prox, J., et al., *Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(17): p. 2919-32.
138. Gibb, D.R., et al., *ADAM10 is essential for Notch2-dependent marginal zone B cell development and CD23 cleavage in vivo*. J Exp Med, 2010. **207**(3): p. 623-35.
139. Tanigaki, K., et al., *Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(5): p. 443-50.
140. Saito, T., et al., *Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development*. Immunity, 2003. **18**(5): p. 675-85.
141. Chaimowitz, N.S., et al., *A disintegrin and metalloproteinase 10 regulates antibody production and maintenance of lymphoid architecture*. J Immunol, 2011. **187**(10): p. 5114-22.
142. Chaimowitz, N.S., et al., *ADAM10 regulates transcription factor expression required for plasma cell function*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42694.
143. Diehl, S.A., et al., *STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 Is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4805-15.
144. Cruickshank, M.N. and D. Ulgiati, *The role of notch signaling in the development of a normal B-cell repertoire*. Immunol Cell Biol, 2010. **88**(2): p. 117-24.
145. Yoon, S.O., et al., *Notch ligands expressed by follicular dendritic cells protect germinal center B cells from apoptosis*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 352-8.

146. Thomas, M., et al., *Notch activity synergizes with B-cell-receptor and CD40 signaling to enhance B-cell activation*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3342-50.
147. Santos, M.A., et al., *Notch1 engagement by Delta-like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(39): p. 15454-9.
148. Kang, J.A., W.S. Kim, and S.G. Park, *Notch1 is an important mediator for enhancing of B-cell activation and antibody secretion by Notch ligand*. Immunology, 2014. **143**(4): p. 550-9.
149. He, F., et al., *Notch and BCR signaling synergistically promote the proliferation of Raji B-lymphoma cells*. Leuk Res, 2009. **33**(6): p. 798-802.
150. Lopez-Herrera, G., et al., *Characterization of Bruton's tyrosine kinase mutations in Mexican patients with X-linked agammaglobulinemia*. Mol Immunol, 2008. **45**(4): p. 1094-8.
151. Ying, H., J.F. Chang, and J.R. Parnes, *PU.1/Spi-1 is essential for the B cell-specific activity of the mouse CD72 promoter*. J Immunol, 1998. **160**(5): p. 2287-96.
152. Reiss, K. and P. Saftig, *The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions*. Semin Cell Dev Biol, 2009. **20**(2): p. 126-37.
153. Prottly, M.B., et al., *Identification of Tspan9 as a novel platelet tetraspanin and the collagen receptor GPVI as a component of tetraspanin microdomains*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 391-400.
154. Rodriguez-Alba, J.C., et al., *CD38 induces differentiation of immature transitional 2 B lymphocytes in the spleen*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3644-52.
155. Karpova, M.B., et al., *Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line*. Leukemia, 2005. **19**(1): p. 159-61.
156. Pulvertaft, J.V., *Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma)*. Lancet, 1964. **1**(7327): p. 238-40.
157. Drexler, H.G. and R.A. Macleod, *History of leukemia-lymphoma cell lines*. Hum Cell, 2010. **23**(3): p. 75-82.
158. Singer, P.A. and A.R. Williamson, *Cell surface immunoglobulin mu and gamma chains of human lymphoid cells are of higher apparent molecular weight than their secreted counterparts*. Eur J Immunol, 1980. **10**(3): p. 180-6.
159. Meza-Herrera, I., *Efecto del Incremento en la Expresión de la Tetraspanina 33 (Tspan33) en Células B, in Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. 2016, Intituto Politécnico Nacional: Ciudad de México, México. p. 72.
160. Moratto, D., et al., *Combined decrease of defined B and T cell subsets in a group of common variable immunodeficiency patients*. Clin Immunol, 2006. **121**(2): p. 203-14.
161. Klein, U., et al., *Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2639-44.
162. Stein, H., et al., *The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells*. Blood, 1985. **66**(4): p. 848-58.
163. Kremmidiotis, G. and H. Zola, *Changes in CD44 expression during B cell differentiation in the human tonsil*. Cell Immunol, 1995. **161**(2): p. 147-57.



164. Hoffmann, F.S., et al., *The immunoregulator soluble TACI is released by ADAM10 and reflects B cell activation in autoimmunity*. J Immunol, 2015. **194**(2): p. 542-52.
165. Dewitz, C., et al., *T-cell immunoglobulin and mucin domain 2 (TIM-2) is a target of ADAM10-mediated ectodomain shedding*. FEBS J, 2014. **281**(1): p. 157-74.
166. Tan, J.B., et al., *Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginal zone B cell precursor competition for delta-like 1 in splenic endothelial niches*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 254-63.
167. Ruiz-Garcia, A., et al., *The Tetraspanin TSPAN33 Controls TLR-Triggered Macrophage Activation through Modulation of NOTCH Signaling*. J Immunol, 2016.
168. Beckwith, K.A., J.C. Byrd, and N. Muthusamy, *Tetraspanins as therapeutic targets in hematological malignancy: a concise review*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 91.
169. Tipton, C.M., et al., *Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus*. Nat Immunol, 2015. **16**(7): p. 755-65.
170. Ginhoux, F. and S. Jung, *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 392-404.
171. Ohishi, K., et al., *Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1*. Blood, 2000. **95**(9): p. 2847-54.
172. Stipp, C.S., T.V. Kolesnikova, and M.E. Hemler, *EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 40545-54.