Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Evaluación de defectos intrínsecos de linfocito B en imunodeficiencia común variable pediátrica (IDCV)

Almejún, María Belén

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Almejún, María Belén. (2013). Evaluación de defectos intrínsecos de linfocito B en imunodeficiencia común variable pediátrica (IDCV). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Almejún, María Belén. "Evaluación de defectos intrínsecos de linfocito B en imunodeficiencia común variable pediátrica (IDCV)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Evaluación de defectos intrínsecos del linfocito B en inmunodeficiencia común variable pediátrica (IDCV)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

María Belén Almejún

Director de Tesis: Silvia Danielian

Consejero de Estudios: Alberto Kornblihtt

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Inmunología y Reumatología, Hospital Nacional de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan

Buenos Aires, Abril 2013

Índice

Resumen 9

Abstract 12

Agradecimientos 15

Dedicatoria 32

Publicaciones 34

Abreviaturas 38

Introducción 45

1. El sistema inmune 46

1.1 Respuesta innata y adaptativa 47

1.1.1 La inmunidad innata 48

1.1.2 La inmunidad adaptativa 50

1.2 Órganos Linfoides 51

1.2.1 La médula ósea 52

1.2.2 El timo 53

1.2.3 Los ganglios linfáticos 53

1.2.4 El bazo 53

1.2.5 El tejido linfoide asociado a mucosas 54

1.3 Inmunidad humoral 54

1.3.1 Los anticuerpos 55

1.4 Linfocitos B 59

1.4.1 Activación de los linfocitos B 65

1.4.2 Formación del centro germinal 67

1.4.3 Diversificación de inmunoglobulinas 67

1.4.3.1 Cambio de clase de inmunoglobulinas 68

1.4.3.2 Hipermutación somática 70

1.4.4 Diferenciación de linfocitos B 71

1.4.5 Producción de inmunoglobulinas 72

1.4.5.1 Respuesta T dependiente 73

1.4.5.2 Respuesta T independiente 73

1.4.5.3 Señalización vía BCR 74

1.4.5.4 Señalización vía CD40 75

1.4.5.5 Señalización vía TACI, BCMA y BAFF-R 75

1.4.5.6 Señalización vía receptores de citoquinas 78

2 Inmunodeficiencias Primarias 78

2.1 Deficiencias primarias de anticuerpos 80

2.1.1 Inmunodeficiencia común variable (IDCV) 80

Objetivos **87**

Materiales y métodos **89**

1. Reactivos utilizados 90

2. Cohorte de pacientes y controles 96

3. Aislamiento de leucocitos totales, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y B naïve 97

4. Análisis por citometría de flujo de subpoblaciones de LB de sangre periférica 98

5. Extracción de ADN, ARN y síntesis de ADNcopia 99

6. Ensayo de SHM mediante corte por enzimas de restricción en hot spot de Igκ 101

7. Ensayo de SHM en IgH mediante multiprimers 102

8. Clonado, secuenciación y alineamiento de regiones Smu-Salpha 103

9. Generación de líneas B linfoblastoides 105

10. Primers y condiciones utilizados para PCR, RT-PCR y/o qRT-PCR 106

11. Activación de PBMC, B naïve y líneas B linfoblastoides vía CD40, TACI y TLR9 108

12. Análisis bioinformáticos 110

13. Extracción de proteínas, SDS-PAGE y western blots 110

14. Análisis de inmunoglobulinas por ELISA 112

15. Ensayo de unión a APRIL 114

16. Microscopía confocal 114

17. Clonado de TACI y elección del sistema de expresión 116

18. Producción y purificación de TACI en células *E.coli* 118

19. Análisis estadísticos 121

Resultados 122

Capítulo 1 123

1.1 Caracterización de la cohorte de pacientes pediátricos con IDCV 124

1.1.1 Estudios moleculares para la exclusión de otras IDP con genes identificados y con fenotipo clínico-inmunológico similar a IDCV 124

1.1.2 Fenotipo clínico de los pacientes 127

Tabla I 129

1.1.3 Fenotipo inmunológico de los pacientes 130

Tabla II 132

1.1.4 Comparación de datos clínicos e inmunológicos 133

Tabla III 135

Capítulo 2 137

2.1 Estudios funcionales en LB de los pacientes IDCV 138

2.1.1 Estudios de SHM 139

2.1.1.1 Análisis de SHM en la región V de Igκ 140

i. Fundamentos del ensayo IgκREHMA 140

ii. Resultados del ensayo IgκREHMA 141

Tabla IV 144

2.1.1.2 Análisis de SHM en la región V de IgH 145

i. Fundamentos del ensayo IGH-SHA 145

ii. Resultados del ensayo IGH-SHA 147

Tabla V 149

2.1.2 Estudios de CSR 150

2.1.2.1 Evaluación de la reparación de las regiones S 150

i. Fundamentos del análisis de la región Sμ-Sα 150

ii. Resultados del análisis de la región Sμ-Sα 152

Tabla VI 155

2.1.2.2 Activación vía TD y TI 156

i. Fundamentos de la evaluación de los transcriptos *GLT*, *CT* y *AICDA* 156

ii. Resultados de la evaluación de los transcriptos *GLT*, *CT* y *AICDA* 158

Capítulo 3 160

3.1 Estudios del receptor TACI en pacientes IDCV 161

3.1.1 Estudios moleculares en TACI 161

3.1.1.1 Secuenciación del gen TNFRSF13B 161

3.1.1.2 Análisis bioinformáticos de las nuevas mutaciones en TACI 164

3.1.1.3 Análisis de la expresión de TACI en las nuevas mutaciones encontradas 166

3.1.2 Estudios funcionales en células TACI-S231R 168

3.1.2.1 Análisis de expresión proteica del receptor, capacidad de unión al ligando y activación de CSR en células TACI-S231R 169

3.1.2.2 Análisis de sinergismo en la activación del LB entre las vías TACI y CD40 en células TACI-S231R 173

3.1.2.3 Análisis de la capacidad de reclutamiento de MyD88 al THC de TACI en células TACI-S231R 175

Discusión 179

1. Marcada disminución de los LB memoria con switch en población pediátrica con IDCV ¿Posible defecto en la diferenciación tardía del LB? 180

2. Heterogeneidad en los estudios de los estadíos de diferenciación terminal de los LB ¿Camino a una posible clasificación de pacientes IDCV? 181

3. Hallazgo de dos nuevas mutaciones en el receptor TACI 191

4. Las células B TACI-S231R no conservan la capacidad de realizar correctamente el CSR por vías TI como TACI y TLR9 195

5. Las células B portadoras de la proteina TACI-S231R no logran

reclutar MyD88 para desencadenar el CSR ¿Cuáles son los posibles mecanismos moleculares implicados en la cooperación con otras vías de activación del CSR en los LB? ¿Existe correlación entre el genotipo y el fenotipo clínico? 197

Conclusiones 206

Anexo 1 210

Producción de proteína TACI recombinante 211

Anexo 2 215

Análisis de activación del CSR vía TACI en otras familias con Mutaciones en TNFRSF13B 216

Bibliografía 219

Resumen.

Evaluación de defectos intrínsecos del linfocito B en inmunodeficiencia común variable pediátrica (IDCV)

La inmunodeficiencia común variable (IDCV) es un síndrome heterogéneo que se caracteriza por producción defectuosa de inmunoglobulinas. Un defecto molecular en los estadios de diferenciación tardía de los linfocitos B, hasta el momento poco explorados en pacientes con IDCV, podría ser causal del desarrollo de la enfermedad dado que estas células pueden producirse normalmente en estos pacientes. Además, al ser la inmunodeficiencia primaria más frecuente, resulta un buen modelo experimental para el estudio de la biología del desarrollo terminal del linfocito B humano. Los resultados obtenidos en los ensayos funcionales que permiten evaluar los procesos fundamentales en la diferenciación tardía del linfocito B, SHM y CSR, así como el estudio de subpoblaciones B en sangre periférica de pacientes argentinos con IDCV de presentación pediátrica, nos permitieron definir subgrupos acotando los probables defectos genéticos a determinadas etapas de la regulación terminal del linfocito B.

Por otro lado, el análisis en nuestros pacientes de la secuencia de *TNFRSF13B*, el gen que codifica para TACI, permitió la identificación de dos nuevas mutaciones. Entre ellas, S231R, la primera mutación descripta en el dominio citoplasmático altamente conservado del receptor (THC) específicamente en el sitio de unión a MyD88. Los experimentos llevados a cabo para evaluar funcionalmente la variante TACI-S231R

demostraron que las células portadoras no logran desencadenar los eventos moleculares del CSR cuando se las estimula vía TACI y/o TLR9, incluyendo la secreción de inmunoglobulinas. Además, se observó que la cooperación entre TACI y el receptor CD40 estimulado en condiciones subóptimas se encuentra deteriorada. Por último, tras la estimulación con su ligando, el receptor TACI-S231R no logra colocalizar con MyD88 ni con TRAF2, proteínas esenciales para activar la cascada del CSR. Colectivamente estos resultados ponen de relieve la necesidad de un sitio de unión a MyD88 intacto para desencadenar el CSR mediado por TACI.

En suma, este trabajo realiza un aporte al conocimiento de los eventos moleculares que suceden en el desarrollo y activación de los linfocitos B humanos y abre las puertas para la búsqueda de nuevos blancos genéticos implicados en el desarrollo de la enfermedad.

Palabras clave: Inmunodeficiencia común variable; linfocito B; TACI; CSR; SHM; switch; hipermutación; MyD88

Abstract.

Evaluation of B cell intrinsic defects in common variable immunodeficiency (CVID) with pediatric presentation

Common variable immunodeficiency (CVID) is a heterogeneous syndrome characterized by an impaired immunoglobulin production with usually normal B cell numbers in peripheral blood. The latter suggests that the molecular defect may be found in the late stages of B cell differentiation (SHM, CSR), so far unexplored in patients with CVID. Moreover, being the most prevalent primary immunodeficiency, it could be a good experimental model to study the terminal steps of the human B cell development. Actually, the results obtained in functional assays of SHM and CSR, and the study of B cell subpopulations in peripheral blood of pediatric Argentinean patients with CVID, allowed to discriminate different subgroups and approached possible genetic defects in their B lymphocytes.

Furthermore, the sequence analysis of *TNFRSF13B*, the gene encoding TACI, led the identification of two novel mutations. Among them, S231R, the first mutation described in the highly conserved cytoplasmic domain of the receptor (THC) at the MyD88-specific binding site. The results obtained in the evaluation of the functional relevance of TACI-S231R variant, showed that the B cells failed to trigger the CSR related events (including the immunoglobulin secretion) when stimulated via TACI and/or TLR9. It was also noted an impaired APRIL-mediated enhancement of CD40

activation in suboptimal conditions. Finally, after stimulation with its ligand, the receptor TACI-S231R failed to colocalize with MyD88 nor with TRAF2, essential proteins to activate the CSR cascade. Collectively, these results highlight the requirement of an intact MyD88-binding site in TACI to trigger CSR.

In summary, this work makes a contribution to the knowledge of the molecular events that occur in the differentiation and activation of human B lymphocytes and it provides a glimpse of possible pathways that lead to the discovery of new genetic factors involved in the onset of the disease.

Key words: Common variable immunodeficiency; B lymphocyte; TACI, CSR, SHM; switch; hypermutation; MyD88

Agradecimientos.

Cómo empezar con los agradecimientos es un tema complejo; creo, y sin miedo a equivocarme, mucho más complejo que la escritura de toda la tesis. Durante estos años de trabajo, así como durante mis años de estudio universitario, y más genéricamente durante mi vida entera, hubo personas irremplazables (¡y algunos cuantos personajes!) que me han marcado de alguna u otra manera, quizás sin intentarlo siquiera, pero han dejado marcas en mí que me definen como persona. Es por eso que digo que la escritura de este ítem es compleja, porque no quiero olvidarme de nadie y son tantas, pero tantas las personas a las que quiero y debo agradecer que me hace pensar que este texto debería ser, al menos, un capítulo más de la tesis.

Voy a empezar por los mejores; los irremplazables; los incondicionales; los que siempre me alentaron en todo (y a veces me frenaron, porque con mi hiperquinesis y atolondramiento creo que no podían los pobres…); a mis maestros de la vida; los que me conocen mejor que nadie; los que forjaron los cimientos de mi forma de ver el mundo y me dejaron verlo con mis propios ojos y sentir que toda, pero absolutamente toda tu realidad la podés cambiar si te lo proponés (lo que no indica que el trayecto sea para nada fácil, eso también me lo han dejado en claro); los que me enseñaron a buscar (de manera irrisoria a veces) la verdad en cada momento; los que aceptan la crítica y me enseñaron que la autocrítica sincera es uno de los mejores atributos que una persona puede tener (y que no hay que avergonzarse de errar, pero hay que

aprender de ello; sólo si caminás podés llegar a caerte); en definitiva los indispensables para que este escrito exista: mis viejos…Mis queridos viejos, gracias! Gracias por las horas de sus vidas destinadas a mi formación como persona, gracias por soportar mi rebeldía y haber mantenido para conmigo siempre una posición de diálogo desde donde cambiar o discutir las cosas (y mirá que hay que tener infinita paciencia para discutir conmigo!), gracias por bancarme en mis horarios de vida estrambóticos, incompatibles, así como mis infinitas horas donde usurpé el living con carpetas, libros, compu y con mi cara de no muchos amigos…y a pesar de eso siempre escuchar la frase ¿Necesitás algo? ¿Te hago unos matecitos? ¿Querés un pucho? (a pesar de que el humo del ambiente claramente decían que no lo necesitaba), gracias por abrir las puertas a cada uno de mis compañeros de estudio y amigos hasta altas horas de la noche o de la madrugada en casa, gracias…gracias y muchos más gracias. No alcanzan ni las páginas de toda esta tesis para describir lo mucho que aprecio todos los esfuerzos realizados por ambos a lo largo de los años, por tratar de darme siempre incluso más de lo que tenían, y para exponer lo mucho (pero mucho, eh!) que los quiero. Ustedes se llevan en estas páginas el más grande de todos los agradecimientos, pero sepan que es muy poco respecto de lo que debería ser.

Voy a seguir por otro de los grosos que me acompañaron, con paciencia infinita y ya no desde el lugar de padre (lo que a veces se justifica por su incondicionalidad) sino desde un lugar de un par que te conoce al detalle, incluso en cosas que los viejos

suelen pasar por alto, a mi compañero de picardías, a quien ví crecer a mí lado y convertirse en una excelente persona, a vos que me conocés mejor que nadie, que has compartido conmigo la habitación por muchos años y viviste en carne propia el quilombo de papeles de estudio; a mi hermano pero por sobre todas las cosas mi compañero y amigo, a vos Fer. ¡Te quiero mucho loco! Gracias por haber compartido y seguir compartiendo tu vida conmigo, por brindarme una oreja cuando la necesité, por prestarme tu habitación cuando tuve que estudiar hasta tarde a pesar que te la dejaba con olor a pucho por doquier, por escuchar, opinar, aconsejar y tantas otras cosas sin pedir nada a cambio. ¡¡Gracias por estar siempre!! Cuando pienso en un hermano y compañero de la vida, no puedo imaginar alguien mejor que vos para cursar todas mis aventuras y desventuras.

Aquí, respecto a mi formación, no puedo dejar de mencionar a mis abuelos, Roberto, Antonio, Betty y Elsa. Ellos me cuidaron muchos días y noches en mi infancia, con el amor de todo abuelo (¡me dejaban hacer las travesuras que mis viejos no, claro está!) y gran parte de lo que soy se los debo, ya que mi niñez estuvo plagada de estímulos gracias a ellos. Gracias a los cuatro por haberme brindado muchísimo amor y cariño. ¡Los amo!

Y si seguimos en orden de acuerdo a mi recorrido en la vida universitaria, tengo que empezar por un grande si los hay, una persona transparente, alegre, inteligente, que te sabe sacar una sonrisa aún en tus peores días (y mirá que mis días malos son

jodidos!), por vos Ezequiel o “Petry” para los amigos. Recuerdo cuando nos conocimos en el CBC, en esa marea de gente donde te sentís chiquitito, chiquitito y solo, en ese contexto que no sirve a mi entender como nivelación ni para formar un grupo de estudios que te contenga, el conocerte a vos hizo que cursar fuera ameno, divertido y hasta fácil. Pero además me hizo conocer a una persona a la que quiero como a un hermano (y no lo digo por las veces en que te mimetizabas con mi hermanito jugando a la compu) y con la que forjé una hermosa amistad. Gracias loco por el oído prestado en muchos momentos, por tu sencillez y tu locura, por tus mates, por abandonar botánica conmigo, bah! por estar en mi vida!...En el transcurso del tiempo de los primeros años, y de la mano de Petry, conocimos al resto de la gran familia de *mbututu*, a Lau que ofició de amiga con un cariño hasta maternal para con todos nosotros; a Gaby que nos hizo saber que mantener esa niña adentro que se ruboriza por pavadas puede sostenerse hasta aún pasados los 30; a Nico Michan que es EL alma del grupo y cuya energía y chistes constantes (que a veces cuesta entender!) nos cambiaron el humor en duros momentos de estudio y flaqueos; a Fede por las largas e interesantes charlas, por la sinceridad, por ser un ejemplo de garra infinita, de perseverancia, de consecuencia; a Juan por compartir tu locura, tus fiestas, tu mundo con nosotros, aunque muchas veces no entendamos tus escritos; a San por brindar tu amistad de fierro y compartir además muchas convicciones políticas; a Boris por las muchas cervezas compartidas y sobre todo por brindar siempre un oído que escuche sin juzgar; a Guido por las largas e interesantes

discusiones políticas (que no siempre llegaban a buen puerto); a Leti por hacernos ser parte de cada una de sus aventuras incluso en contra de nuestra voluntad (mentira); a Lava por tu particular humor y por los debates políticos siempre sinceros aún en la disidencia; a Sandra por demostrar una tenacidad impresionante, una convicción ante las decisiones de tu vida y un particular modo irónico de vivir las adversidades y obvio por hacerme sentir parte de tu familia y del crecimiento de tus dos hermosos hijos; y a Guada, gracias por la infinita paciencia en las noches de estudio, por prestarme tus apuntes (sé que por la perfección, por no decir obsesión, con los que los hacías te costaba prestarlos a gente enquilombada de papeles como yo!) y por compartir los momentos de tu vida, familia e hijos conmigo. Sin todos ustedes mi vida universitaria hubiera sido otra, muy otra; ustedes hicieron que tuviera ganas de ir a la facultad todos los días para encontrarme con mis amigos, porque fueron y son mis amigos, no sólo mis compañeros. Gracias a todos y cada uno por ser parte de mi vida, y a pesar de haber tomado caminos distintos seguir haciendo el esfuerzo por juntarnos y saber en qué y cómo anda el otro. Los quiero muchísimo, son un tesoro que me regaló la facultad de exactas, mucho mayor a mi formación académica.

En paralelo, además fui conociendo a mis compañeros de militancia, esos locos lindos con los que quisimos y queremos cambiar las cosas, con los que recorrimos buenos y malos momentos, a muchos de los cuales considero mis maestros, mis amigos, mis hermanos. Mi participación en la vida política de la facultad, a veces muy dura

cuando se está en minoría y también muy satisfactoria por el hecho de seguir tus convicciones contra viento y marea, así como el crecimiento individual pero por sobre todas las cosas colectivo, se las debo a todos ellos. Me enseñaron a luchar con alegría, con la alegría de saber que lo que se pelea es justo, más allá de que sea complicado el camino a transitar. Me enseñaron a buscar la verdad y dudar de quienes se creen dueños de ella; a que ante las injusticias hay que tomar partido porque no hacer nada también es tener posición y siempre perjudica al más débil; a saber que algo ganamos cada vez que vemos que un estudiante quiere cambiar el mundo; a entender que tal vez fuimos derrotados en muchas peleas pero que dejamos todo para intentar que eso no suceda; a, como dijo Brecht, no aceptar lo habitual como cosa natural. Me enseñaron a comprometerme con mi país, con mi gente, con mi tierra; a tener la convicción de que es justo y necesario pelear por un desarrollo científico tecnológico que nos permita recuperar nuestros recursos naturales y resolver las necesidades de alimentación y salud que se presentan en nuestro pueblo; pero que ese proyecto científico no puede llevarse adelante si no peleamos por la liberación nacional y social, si no rompemos con la dependencia…Gracias a todos los que compartieron y comparten esta lucha todos los días; por compartir los aciertos y aprender de los errores; por saber que cada uno de nosotros es un ser social y por lo tanto las ideas que están en la sociedad las tenemos en nuestras cabezas y necesitamos pelear juntos para combatir las ideas incorrectas…en fin: Gracias! A Ren, Pablo, Lu, Lau, Cuervo, Quimey, Mariano, Rodo, Cris, Mary ojos, Mary rubia, Leo, Tamy, Renzo, Santi,

Sabri, Fede, Fede “enano”, Marce, Emi, Charly, Santi “El oso”, Javi, Sol, Gi, Martín, Marina, Ana, y a muchos más que compartieron y/o comparten la convicción de que *“nada es imposible en el mundo si uno se atreve a escalar las alturas”*.

Y en el transitar de mis estudios universitarios, también conocí otros locos lindos, con los que compartí y comparto el mundo por fuera de exactas (si si; lo hay, lo hay): los peñeros. Desde aquella vez que escuché por primera vez a los chicos de Correntada en la facu, en una peña que organizamos a pulmón con muchos otros estudiantes (y que después pasaron a ser parte del folklore de exactas, al menos durante mis años estudiantiles), pasando por el viaje que hicimos con el groso de Pablo barba a Mosconi (donde conocimos a la mayor parte de los chicos de la leguera, hasta el día de hoy), podría decirse que mi grupo de amigos “peñeros” es una de las cosas más lindas que tengo, toda gente con un corazón enorme. Los quiero lindos, libres y locos; como los conocí. Yo creo que nos une mucho más que el gusto por la revalorización de la música y cultura de nuestro país, nos unen sueños de cambio, sueños de aventuras, tal vez no exactamente por los mismos caminos pero lo que es seguro es que nos fuimos y nos vamos a seguir cruzando en ese trajinar de la vida. Gracias Pablito, Dani Tru, Maru, Lucy, Negro, Ari, Santi, Tincho, Dani, Sabri, Sabri ojos, Fran, Fresco, Edu, Andres, Male, José, Karo, Fer, Julia, Vir, Xime, Tamy por todas las aventuras vividas y las que faltan por venir, ¡los quiero mucho locos!

En el medio, en el transcurso de la facultad y luego de terminada mi carrera de grado, compartí y aporté a la construcción de algunos hermosos espacios con mucha gente a la que quiero y aprecio por lo que creo importante mencionarlos: a los compañeros del Taller de Aguas, a los Jóvenes Científicos Precarizados, a los compañeros del viejo ciclo de charlas Ciencia para Quién?, a los compañeros de la Multisectorial de CyT. En todos los casos, va mi agradecimiento en particular a todos aquellos que jugaron y juegan a construir espacios sin mezquindades y hacen el esfuerzo de mantenerlos vivos.

Y una vez finalizada la facultad comenzamos en el laboratorio, pero no inmediatamente, sino luego de una búsqueda interna de qué cornos hacer como bióloga que no resultara inútil. Así, después de casi un año de recibida y prácticamente de casualidad, porque un currículum mío cayó en sus manos y se le ocurrió escribirme un mail para comentarme el trabajo que hacían, comencé a trabajar en el Labo de Biología Molecular del Hospital Garrahan en la tesis que se presenta aquí. En esta instancia quiero y debo agradecer primeramente a Silvia y a Marta. A Marta por compartir humildemente toda tu sabiduría conmigo, por siempre hacerte un espacio, aún jubilada, para debatir los resultados que se iban obteniendo y por haberme dado la oportunidad, a pesar de mis escasos conocimientos de las inmunodeficiencias humanas y más aún de medicina, de trabajar en el Hospital en este tema. A Silvia, por haberme recibido con los brazos abiertos a pesar de la falta

de espacio, por confiar en mí, por brindarme seguridad, por permitirte hablar de cualquier cosa con nosotros en el labo, por preocuparte por el crecimiento de la gente de tu grupo, por ser guía y a la vez brindar libertad, por demostrar que los resultados se obtienen de esa manera y no con verticalismos ni abusos de autoridad. Gracias por tu amor cuasi maternal, por tus críticas y tus halagos, por tu paciencia frente a mis debilidades y tu incentivo constante ante mis fortalezas, por abrirme las puertas de cuanto estuvo a tu alcance. Gracias por demostrarme que se pueden analizar muchos experimentos, leer cantidad de artículos, ser una grosa y aún así tener tiempo para la familia, amigos y mucho más. Sos una gran maestra y una gran científica. Les estoy a ambas eterna e infinitamente agradecida.

Del labo, les estoy agradecida a todas, porque saben que parte de esta tesis les pertenece, si pude hacerla se debe a la buena onda que se vive todos los días y a que uno va al trabajo a sabiendas que hay ahí un grupo humano de gente hermosa, con la que comparte la mayor parte del día y cuya vida personal, con sus altibajos, son importantes en todas y cada una de nosotras y somos compañeras que traspasan el protocolo de un ensayo o las paredes del laboratorio.

A la primera que conocí en el labo fue a Emma, loquita linda, ¡hermosa! Sabés que sos el alma indiscutida del grupo, la fuente generadora de vitalidad de todo lo que en el grupo se hace o se deshace. Gracias por llenarnos todos los días de tu terrible alegría, de tus locuras, por inundar el labo de hitasos musicales y hacerme conocer

musicalmente tantas cosas nuevas, por hacer de nuestro espacio de laburo un lugar lleno de risas, de locuras, un lugar especial a donde querer estar y no perderte ni un segundo de cada una de las aventuras en medio de extracciones de ADN, ARN y formación de residentes a los cuales les dedicás un cariño y paciencia admirables. Por festejarme y bardearme con ternura, por prestar una oreja en muchos momentos, por haber compartido risas y lágrimas conmigo. Por tus ideales, tus sueños, tu inmenso corazón y humildad. Por compartir tu vida con nosotros, ¡gracias!

Luego vino Gaby, la "bomba tucumana", llegadita directo de la República de Tucumán para llenar de alegría el labo con su idioma particular (aprendimos muchas palabras nuevas en el labo gracias a vos, ¡je!). Gracias por tus historias, tus chistes, por tu empuje, tu humildad norteña que te caracteriza y hace que a veces te sientas tan chiquito a tu lado y otras dan ganas de matarte porque te pasas de buena. Gracias por tu sonrisa aún en tus duros momentos, por ser una gran persona.

Posteriormente, al tiempito no más, llegó Veritz, ¡qué te puedo decir! laboralmente sos una bestia y lo sabés, personalmente al principio manteníamos cierta distancia pero al tiempo nos fuimos acercando, nuestros caracteres particulares nos hacen un tanto ásperas para entrar en confianza pero entre nosotras encontramos un equilibrio, un entender a la otra que derivaron en la amistad y el cariño que te tengo hoy en día. Gracias por los bailes en el labo, por los videitos donde estás cantando y te desplazás con las sillas, por estar siempre dispuesta a analizar cada situación con una lógica

admirable, por los mates y los almuerzos de todos los días (que me ayudaron a recuperar peso, ¡je!), por cuidar a Emma y preocuparte porque la cuidemos cuando no estás =)

¡¡Las quiero a todas loquitas!!

Parte del personal del labo también es Judith, aunque habita en otro pasillo que ha defendido a lo largo del tiempo colocando cualquier aparato que se te pueda ocurrir en el lugar menos previsto, haciendo allí casi un refugio, ¡una trinchera! Pero las veces que pasas por el labo llenás ese breve instante de vida, aún en una forma extraña y ruidosa. Gracias por brindarte a explicarme algunos experimentos aunque hayas dejado más entropía de la que pude imaginar en la mesada del labo. Porque aunque sólo crucemos a veces un hola y chau, en algunas cosas puede que casi, casi nos entendamos.

Y llegamos a Barby, la reina del secuenciador (que habita en su casita, ¡cuac!) y es parte indiscutible de nuestro labo. Qué decir de mi compañera de experimentos en el último tiempo y de inglés en los últimos años, la verdad es que sos una persona hermosa, con la que me reí mucho, mucho compartiendo mi spanglish sin tapujos (¡aunque ya tengas reemplazo de compañera de inglés y sepas que no pienso perdonar el hecho de que me hayas encontrado suplente tan rápido!). Sos una grosa, no sólo por cómo trabajás, que eso es indiscutible que lo hacés de forma impecable, sino también por estar para tomar unos mates y charlar del mundo, la crisis, la argentina,

los amores, en fin prácticamente de cualquier cosa! Toda charla resulta interesante, amena y profunda con vos, ¡gracias! Gracias por haber prestado oído y dar una opinión sincera, gracias por tus buenas caras, gracias también por tus malas caras, por haberte entusiasmado en colaborar con algunos experimentos de esta tesis (o al menos yo lo sentí así, ¡tal vez actuaste muy bien!) y por bancar sumado al trabajo diagnóstico de todas las semanas mis miles de secuencias de a tandas enormes. ¡Gracias por brindarme tu sincera amistad! ¡Te quiero!

Además de las increíbles personas que integran mi labo, fui conociendo en paralelo a mucha gente de otros laboratorios del área molecular del hospital que alegraron mis días de laburo, en primer lugar debo mencionar a los Genéticos, por los mates, las charlas, los almuerzos en las canchitas que muchas veces terminaban con helado, por los préstamos de enzimas, en fin por la buena onda. Gracias a los genéticos actuales: Vero, Euge, Pablo, Caro, Abel y Mara, y a los que pasaron: Flavia, Clari y Ale. Gracias también a Lilién por que, a pesar de tu carácter particular, con el tiempo uno ve lo mucho que te preocupás por la gente de tu grupo, porque salgan adelante, con tu formato, claro está. Gracias también por compartir mates y charlas a altas horas en el hospi.

A los viejos retrovirus, porque hacían que quedarse hasta tarde en el hospi no fuera aburrido, por las charlas, el café y muchas anécdotas en el aulita. Lamentablemente les tocó estar en un laboratorio donde los jefes ejercen la autoridad a través del

autoritarismo y el verticalismo y no dejan crecer a la gente de su grupo por pura mezquindad y mediocridad, a ustedes les tocó tener que irse del hospi o cambiarse de lugar y dejaron un espacio vacío que no pudo ser ocupado por nadie. Gracias a Guille, Sily, Naty, Carlitos, Ceci, Cintia, el Ruso, Caro y Fede.

A los endócrinos, en particular a Pablo por hacer que uno quiera matarte por tus provocaciones porque sí, hasta que casi, casi entiende que estas haciendo un chiste y a Romi, por ofrecer siempre que se necesitara una mano sincera.

A Adrianita por tu humor, tu buena onda, tu simpatía. Gracias por hacer que uno se sienta querido con tus saludos en forma de festejo todos los días. El hospi no sería el mismo (y hemato-onco tampoco) sin tu presencia.

A los inmuno-celulares, por brindarme siempre una ayuda con los experimentos de citometría y cultivo celular, en especial a Eli, Marian y Andrea (que aunque a veces parece que uno te molesta cuando te propone un experimento, en el fondo sos más buena que lassie y siempre accedés a dar una mano).

A los médicos y residentes médicos, por ser el nexo indispensable para que este trabajo haya sido posible, por la paciencia para conmigo durante estos años. Gracias en particular a Matías, Naty Basile, Diana, Emi, Naty Tahuil y Miguel.

A los residentes bioquímicos que pasaron por el labo y le brindaron un brillo particular durante su estadía, en particular a Silvana por ser una mujer admirable

que demuestra que se pueden dirigir residentes, ser brillante en el labo, preparar seminarios y además tener una familia con dos hijos hermosos. A Lore principalmente por brindarme tu amistad, por ser una gran compinche en el labo y además por darme una mano con algunos experimentos. A Javi por ser una persona increíblemente humilde, con la que daba gusto sentarse a tener una charla durante los almuerzos a pesar de las grandes disidencias políticas. Raque y Fer también merecen una mención en este punto.

Respecto de la tesis como un todo, estoy en el deber de agradecer a todos los pacientes y sus familias, ya que sin su colaboración y confianza, llevar adelante este trabajo hubiera resultado imposible.

En paralelo a mi desarrollo en el laboratorio fuimos juntándonos en lo que se dio en llamar las inmunocenas, con algunos locos lindos becarios de diferentes áreas de la inmunología, para presentar ante pares nuestros resultados, colaborar y dar una opinión o aprender del otro, ahí conocí a gente muy linda y las reuniones terminaron siendo más una excusa para juntarnos a comer entre amigos que un lugar donde debatir científicamente. Gracias Rafa por ser el motor y mentor de este espacio hermoso, ¡se te va a extrañar ahora que te nos vas pa Europa! Gracias a Andrea, Mechi, Andrés, Carla, Mariana y Euge y a todos los que hicieron posible durante estos años la existencia de estas reuniones!!

En el transcurso de mi tesis tuve la oportunidad de viajar a otros laboratorios donde conocí también gente muy grosa no sólo científicamente sino humanamente, que hicieron que uno se sientiera como en casa y que el desarraigo prácticamente no se sintiera. Gracias a todos los cumpas del Instituto Pasteur de Montevideo, en particular a Flopi, Ceci, el Colo, la Pili, Mariana, Nicole, Felipe, Gonza y Lore. Y obviamente muchísimas gracias a Pablo, mi jefe en el Uruguay, ya que sin él hubiese sido imposible trabajar con todos esos locos lindos! Gracias Pablo Oppezzo por abrirme las puertas, lanzarte de cabeza a cuanta propuesta existiera de colaborar entre grupos, a tu hiperquinesis, por confiar en mí y por estar armando un hermoso grupo en Uruguay, con todo lo que cuesta arrancar de cero en un país latinoamericano. También debo agradecer a las hermosas personas que vivieron conmigo en las pensiones que fui recorriendo en las distintas estadías en Montevideo y que hoy se puede decir son amigas de la vida, a Lau, la polaca y Maru, ¡¡gracias por ser mi familia en el Uruguay!! Por otro lado, no puedo dejar de mencionar a una hermosa persona, otra gran amiga con la que la vida por suerte me hizo topar y que conocí en Nueva York durante mi trabajo en Mount Sinai. Puede decirse que fuiste mi cable a tierra en esa maldita ciudad e hiciste que no fuese tan terrible laburar en ese ambiente inescrupuloso y chinezco, gracias por todo Montse, por los chats, por las correcciones, por estar siempre del otro lado y sentirte cerca de pesar de que estamos tan distantes, por los té verdes con miel por las tardes, por las cervecitas compartidas, por venir a conocer mi mundo argento, por tu humor, ¡¡por todo nena!!

¡¡¡No alcanzan en estos renglones las palabras adecuadas para decirte gracias!!!! ¡¡Te quiero!!

Muchas gracias a Andrea Cerutti y a Charlotte Cunnigham-Rundles por permitirme formar parte de su grupo durante los meses que estuve en Nueva York y brindarme todo lo necesario como para que lograramos los objetivos propuestos.

Gracias también a mi prima Paty por preocuparte por venirme a visitar a Nueva York para que no esté sola y oficiar de gran amiga y compinche, ¡muchas gracias! También a mis tíos Marta y Luis, por hacerme sentir como en casa en los Estados Unidos, por brindarse de corazón, por sentir con ustedes que mi familia estaba cerca, gracias!!

Y por último a Mario. A vos lindo tengo, aunque no lo creas, mucho que agradecerte. Primero, me resulta raro y a la vez hermoso, lo mucho que llegaste a conocer de mí en tan poco tiempo, a veces me da miedo. Gracias por los mimos, por hacerme de comer cuando estaba en plena escritura estresante de esta tesis (aunque un poquito salado, je!), por hacer que el estres sea necesario con tal de tomarme unos días de vacaciones con vos, por las vacaciones hermosas que tuvimos, gracias por tu simpleza, por tu humildad, por tus besos, por querer compartir cada noche conmigo, por darle nuevamente significado a la frase “te amo”, porque si bien quiero no necesito explicarte en estas hojas lo mucho que te quiero y que significas para mí, porque no me alcanzan los adjetivos para poder escribirlo, simplemente gracias!

Dedicatoria.

a mis Viejos,

a Fer "el enano",

a mis Abuelos.

"Un intelectual que no comprende lo que pasa en su tiempo y en su país es una contradicción andante y el que comprendiendo no actúa tendrá un lugar en la antología del llanto pero no en la historia viva de su tierra"

Rodolfo Walsh

Publicaciones.

Publicaciones:

- **Almejun, M. B.**, Sajaroff, E., Galicchio, M., Oleastro, M., Bernasconi, A., Zelazko, M. and Danielian, S., **Immunological characteristics and two novel mutations in TACI in a cohort of 28 pediatric patients with common variable immunodeficiency.** J Clin Immunol 2012, Feb; 32(1): 89-97.

- Martinez-Gallo, M., Radigan, L., **Almejun, M. B.**, Martinez-Pomar, N., Matamoros, N. and Cunningham-Rundles, C., **TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes.** J Allergy Clin Immunol 2013, Feb; 131(2): 468-476.

- **Almejun, M. B.**, Cols, M., Zelazko, M., Oleastro, M., Cerutti, A., Oppezzo, P., Cunningham-Rundles, C. and Danielian, S., **A naturally occurring mutation affecting the MyD88-binding site of TNFRSF13B impairs triggering of class switch recombination.** Eur J Immunol 2012, Dec 7; doi:10.1002/eji.201242945.

Presentaciones a congresos:

Orales:

- LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de

Inmunología. Mar del Plata, 18 al 21 de Noviembre de 2009. **"Evaluación de la hipermutación somática de inmunoglobulinas permite definir subgrupos en pacientes pediátricos con inmunodeficiencia común variable (IDCV)".** **Almejún M.B;** Bernasconi A.; Rossi J.; Roy A.; Oleastro M.; Gallicchio M.; Zelazko M.; Danielian S.

- First French-Argentine Immunology Congress. Buenos Aires, 3 al 5 de Noviembre de 2010. **"Novel mutations in TNFRSF13B in pediatric patients with common variable immunodeficiency".** **Almejún M. B.;** Sajaroff E.; Oleastro M.; Gallicchio M.; Bernasconi A.; Zelazko M.; Oppezzo P.; Danielian S.

- Second Meeting of the Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID-2011). Ciudad de México, 13 al 15 de Octubre de 2011. **"A unique mutation in the TACI conserved motif that binds MyD88 impaired CSR in a pediatric CVID patient".** **Almejún M. B.;** Cols M.; Zelazko M.; Cerutti A.; Oppezzo P.; Cunningham-Rundles Ch.; Danielian S.

- LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, 14 al 17 de Noviembre de 2012. **"Análisis del cambio isotópico de inmunoglobulinas mediante el estudio de uniones**

switch Smu-Salpha permite definir subgrupos en pacientes pediátricos con inmunodeficiencia común variable (IDCV)". **Almejún M.B.;** Campos B.; Gallicchio M.; Zelazko M.; Oleastro M.; Danielian S.

Poster:

- First Meeting of the Latin American Society for Immunodeficiencies (LASID-2009). Cartagena de Indias, Colombia, 15 al 19 de Octubre de 2009. **"Novel mutations in TNFRSF13B causing common variable immunodeficiency with pediatric presentation".** **Almejún M. B.;** Oleastro M.; Gallicchio M.; Zelazko M.; Danielian S.

- LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Tucumán, 19 al 21 de Octubre de 2011. **"Nueva mutación en TACI en el dominio de unión a MyD88 afecta la inducción del cambio isotípico de inmunoglobulinas (CSR) en un paciente pediátrico con inmunodeficiencia común variable (IDCV)".** **Almejún M. B.;** Cols M.; Oleastro M.; Zelazko M.; Cerutti A.; Oppezzo P.; Cunningham-Rundles Ch.; Danielian S.

Abreviaturas.

- **Ac** Anticuerpo
- **ADN** Ácido desoxiribonucléico
- **Ag** Antígeno
- **AICDA** Citidina deaminasa inducida por activación
- **APRIL** Ligando inductor de proliferación
- **ARN** Ácido ribonucléico
- **BAFF** Factor de activación de las células B
- **BCMA** Antígeno de maduración de células B
- **BCR** Receptor de las células B
- **C** Región constante
- **CDF** Células dendríticas foliculares
- **CDR** Regiones determinantes de la complementariedad
- **C_H** Región constante de la cadena pesada
- **CG** Centro germinal
- **CRD** Dominio rico en cisteínas
- **CSR** Cambio de clase de inmunoglobulinas

- **CT** Transcriptos circulares
- **C-terminal** Carboxi terminal
- **D** Región de diversidad
- **DC** Células dendríticas
- **DMSO** Dimetil Sulfóxido
- **DSB** Ruptura de doble hebra
- **ESID** Sociedad Europea de IDPs
- **FR** Regiones de armazón
- **GTL** Transcriptos germinales
- **HIGM** Hiper IgM
- **HR** Recombinación homóloga
- **IDCV** Inmunodeficiencia común variable
- **IDP** Inmunodeficiencias primarias
- **Ig** Inmunoglobulinas
- **IgH** Cadena pesada de inmunoglobulinas
- **IgL** Cadena liviana de inmunoglobulinas

- **IL** Interleuquina
- **INF** Interferón
- **iNKT** NKT invariante
- **J** Región de unión
- **J_H** Región de unión de la cadena pesada
- **J_L** Región de unión de la cadena liviana
- **LB** Linfocitos B
- **LPS** Lipopolisacárido
- **LT** Linfocitos T
- **LT_C** Linfocitos T citotóxicos
- **LT_H** Linfocitos T helper
- **LT_{HF}** Linfocitos T helper foliculares
- **MALT** Tejido linfoide asociado a mucosas
- **MHC** Complejo mayor de histocompatibilidad
- **MMR** Sistema de reparación con desajustes
- **MZ** Zona marginal

- **NEMO** Modulador esencial del factor nuclear κB
- **NF-κB** Factor nuclear κB
- **NHEJ** Sistema de reparación por unión de extremos no homólogos
- **NK** Natural Killer
- **N-terminal** Amino terminal
- **PAGID** Grupo panamericano de IDPs
- **PAMP** Patrones moleculares asociados a patógenos
- **PBMC** Células mononucleares de sangre periférica
- **PBS** Tampón fosfato salino
- **PLC** Progenitor linfoide común
- **PMC** Progenitor mieloide común
- **PRR** Receptores de reconocimiento de patrones
- **RCLB** Tampón de lisis de glóbulos rojos
- **S** Switch
- **SCID** Inmunodeficiencia combinada severa

- **SFB** Suero fetal bovino
- **SHM** Hipermutación somática
- **smB** Células B de memoria con switch
- **STAT** Transductor de señal y activador de la transcripción
- **TACI** Activador transmembrana y modulador de calcio y ligando de interacción con ciclofilinas
- **TCR** Receptor de las células T
- **TD** T dependiente
- **TdT** Desoxinucleotidil transferasa terminal
- **THC** Dominio de TACI altamente conservado
- **TI** T independiente
- **TIR** Receptor de Toll-IL-1
- **TLR** Receptores de tipo Toll
- **TNFR** Receptores de factores de necrosis tumoral
- **TRAF** Factor asociado a TNFR
- **UNG** Uracil N-glicosilasa

- **V** Región variable
- **V_H** Región variable de la cadena pesada
- **V_L** Región variable de la cadena liviana
- **WCLB** Tampón de lisis de glóbulos blancos
- **XLA** Agamaglobulinemia ligada al cromosoma X
- **XLP** Síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X

Introducción.

1. El sistema inmune

El sistema inmune (del latín, *immunis: exento*) es un conjunto de estructuras físicas y procesos biológicos altamente integrados que protegen al cuerpo humano contra las enfermedades. Protección que implica el reconocimiento y la eliminación desde moléculas tóxicas hasta microorganismos complejos (virus, bacterias, hongos y parásitos), denominados en conjunto antígenos (Ag). Por otro lado, es también el sistema encargado de eliminar células anormales del huésped capaces de causar inflamación o desarrollo de tumores.[1] Para llevar adelante estas funciones posee un complejo conjunto de receptores que discriminan moléculas asociadas a células sanas de aquellas asociadas a células extrañas, muertas o anormales.[2, 3] La perturbación de esta capacidad da lugar a la aparición de autoinmunidad, inflamación o cáncer.[4]

En vertebrados existen dos tipos complementarios de respuesta inmune, la *innata* y la *adaptativa* cuya especificidad es creciente y que actúan si los patógenos logran romper la primera línea de defensa. Dicha línea defensiva está formada por una serie de obstáculos a la infección: barreras físicas (piel y membranas mucosas), factores químicos (el bajo pH de la secreción gástrica, el manto ácido que cubre la superficie de la piel, la lisozima presente en las lágrimas y la saliva) y fisiológicos (permeabilidad de los orificios y conductos naturales, flujo normal de las secreciones).[5]

1.1 Respuesta innata y adaptativa

Cuando se produce invasión de un patógeno, a través de la piel o las mucosas generalmente, las células del sistema inmune conocidas como leucocitos detectan la presencia de Ags y montan respuestas para eliminarlos. Los leucocitos pueden ser subdivididos en granulocitos (o polimorfonucleares), monocitos, macrófagos, células dendríticas (DCs, del inglés *Dendritic Cells*), mastocitos y linfocitos. Los granulocitos incluyen neutrófilos, eosinófilos y basófilos, mientras que los linfocitos están compuestos por natural killer (NK), invariant NKT (iNKT), linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) (Ver Figura 1).

Los granulocitos, monocitos, macrófagos, DCs, mastocitos y NK juegan un papel esencial en el sistema inmune innato, mientras que los LT y LB pertenecen funcionalmente al sistema inmune adaptativo. Las células iNKT ocupan una posición intermedia junto con subconjuntos específicos de LT y LB, incluyendo las células T gamma delta, células B peritoneales y de la zona marginal del bazo (MZ, del inglés *Marginal Zone*). En general, los linfocitos cooperan con el sistema inmune innato para montar respuestas protectoras específicas que se producen más lentamente, pero confieren una protección duradera.[6]

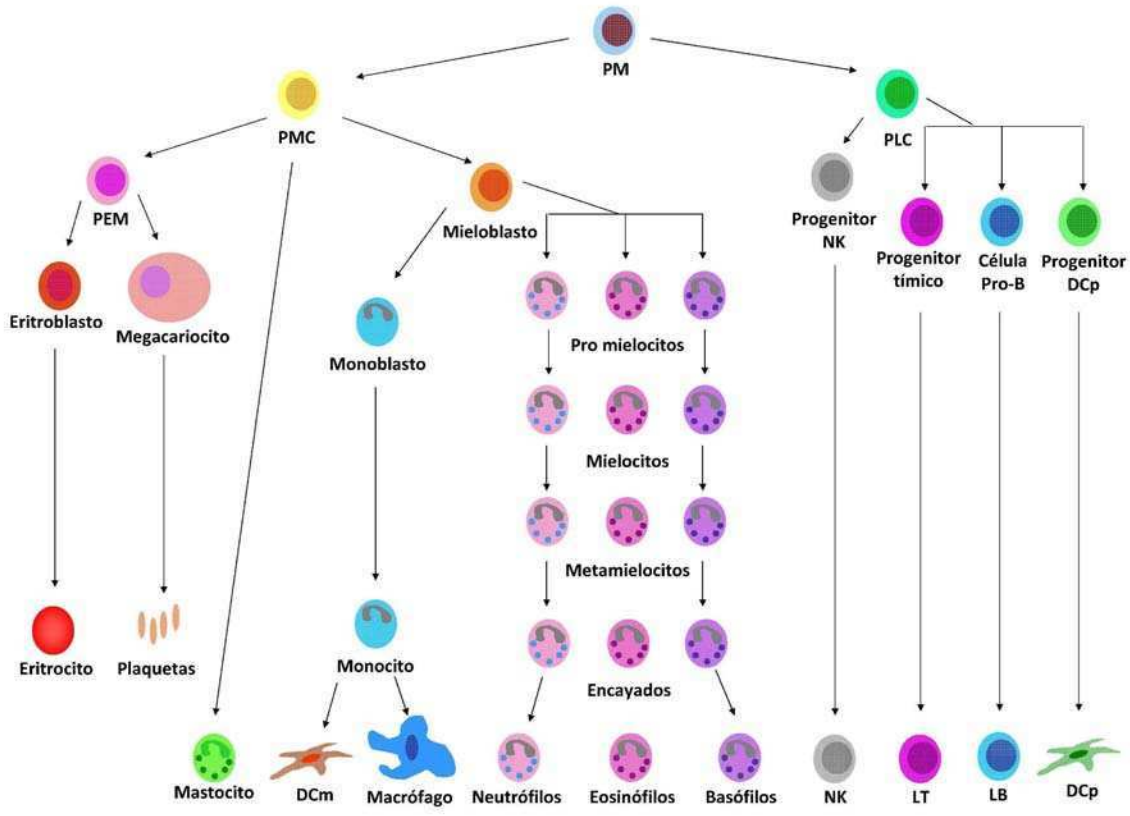


Figura 1: Origen de las células inmunes: Las células Progenitoras Multipotentes (PM) dan lugar al Progenitor Mieloide Común (PMC) y al Progenitor Linfoide Común (PLC) en la médula ósea. Las células PMC se diferencian en Mieloblastos, células Progenitoras de Eritrocitos/Megacariocitos (PEM) y Mastocitos. Los mieloblastos darán lugar a Neutrófilos, Eosinófilos y Basófilos a través de una serie de etapas de diferenciación secuenciales: Pro mielocitos, Mielocitos, Metamielocitos y Encayados. Los mieloblastos también darán lugar a Mieloblastos y Mielocitos que se diferenciarán en Macrófagos y Células Dendríticas Mieloides (DCm) en los tejidos periféricos. Las células PEM darán lugar a eritroblastos y megacariocitos que se diferenciarán en eritrocitos maduros y plaquetas a través de varios pasos de diferenciación. Por otro lado las células PLC se diferencian en Progenitores de células NK, de células T (progenitor tímico), de células B (células pro-B) y de células dendríticas plasmocitoides (DCp) que darán lugar a células NK, LT, LB y DCp maduras, respectivamente.

1.1.1 La inmunidad innata. Las células que promueven la respuesta inmune innata lo hacen a través de los receptores no específicos de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *Pattern Recognition Receptors*) que reconocen patrones moleculares conservados en diferentes grupos de patógenos microbianos (PAMPs, del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*).[2, 7] Estas estructuras como el lipopolisacárido (LPS), el ARN bicatenario y polisacáridos ricos en manosa, entre otras, no se encuentran en las células de los mamíferos. La unión de estos receptores

con sus ligandos induce la activación de diferentes mecanismos dirigidos a la eliminación de los patógenos. Algunos PRRs como los receptores de tipo Toll (TLRs, del inglés, *Toll Like Receptors*) promueven la producción de proteínas que ayudan a la eliminación de estos microorganismos y la producción de citoquinas que inducen la reacción inflamatoria local, caracterizada por la atracción y activación de otros leucocitos.[8]

Los neutrófilos son los primeros leucocitos que migran desde la circulación hacia el sitio de la infección, donde eliminan las células muertas y desechos celulares, fagocitan y matan a los microbios. Las células NK desempeñan un papel importante en el reconocimiento y la destrucción de las células que están infectadas por virus o transformadas por un proceso neoplásico. Los monocitos contribuyen a la inducción de la inflamación y también se diferencian a macrófagos y DCs. Los macrófagos fagocitan microbios, células muertas y residuos celulares, matan a los agentes patógenos envolviéndolos e inducen inflamación.[9, 10] Además, los macrófagos presentan Ags a los LB mientras que las DCs presentan péptidos antigénicos a los LT en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*). Este proceso por lo general se lleva a cabo después de la migración al sitio de la infección de las DCs desde los ganglios linfáticos y conduce a la activación de los LT y LB. Las DCs promueven el reclutamiento, la

activación y maduración de múltiples células del sistema inmune innato y adaptativo, incluyendo LT y LB.[11]

Finalmente, los mastocitos provocan inflamación y cooperan con los eosinófilos y basófilos para inducir la expulsión de los parásitos que infectan órganos y mucosas.[12]

1.1.2 La inmunidad adaptativa. Los LT y LB promueven este tipo de respuesta inmune al reconocer a los Ags a través de receptores específicos conocidos como receptor de células T (TCR, del inglés *T Cell Receptor*) y receptor de células B (BCR, del inglés *B cell Receptor*), respectivamente. Los LT constituyen lo que se denomina inmunidad celular y pueden dividirse en dos grandes subgrupos: LT $CD4^+$ y LT $CD8^+$.[13] Los LT $CD8^+$ activados por Ag desarrollan LT citotóxicos (LT_C) que matan células infectadas para prevenir la propagación de microorganismos invasores tales como virus.[14] Los LT $CD4^+$, tras ser activados por el Ag, se diferencian en subconjuntos de LT colaboradores (LT_H, del inglés *LT Helper*) específicos que ayudan al reclutamiento y activación de granulocitos y macrófagos, así como a la colaboración con los LB para inducir la producción de anticuerpos (Acs).[15]

Los LB tras ser activados, se diferencian en células plasmáticas que secretan Acs Ag-específicos constituyendo lo que se denomina inmunidad humoral. Los Acs generados tienen distintas funciones efectoras de acuerdo a la clase a la que pertenecen: IgM, IgG, IgA o IgE. Estos Acs median la lisis por complemento, proporcionan protección inmune contra toxinas y virus, y mejoran las funciones fagocíticas e inflamatorias de

los granulocitos, monocitos, macrófagos, NK y mastocitos. Además, los Acs de tipo IgA interactúan con las células epiteliales para generar inmunidad de mucosas.[16]

Otra característica de la respuesta adaptativa es la de generar LT y LB de memoria de larga vida que patrullan los órganos linfoides y la circulación durante muchos años después de la infección inicial, permitiendo montar respuestas rápidas y potentes al encontrarse con el Ag por segunda vez.

1.2 Órganos linfoides

Son tejidos hematopoyéticos especializados que promueven el desarrollo y la activación de los linfocitos, pudiendo ser clasificados como *primarios*, *secundarios* o *terciarios*.

En los órganos linfoides primarios los linfocitos maduran y adquieren funcionalidad a partir de las células progenitoras. Durante la vida embrionaria los tejidos primarios son el saco vitelino, la región aorta-gonadal-mesonefro y el hígado fetal. En los adultos, los órganos linfoides primarios son la médula ósea, donde residen todos los progenitores linfoides, y el timo, donde maduran los LT y adquieren competencia funcional.[17]

Los órganos linfoides secundarios o periféricos incluyen los ganglios linfáticos, el bazo, y varios tejidos linfoides asociados a mucosas. Allí, los linfocitos interactúan entre sí y con células no linfoides para montar la respuesta contra el Ag. Además, los órganos

linfoides secundarios son importantes para la regulación de la tolerancia periférica ya que controlan linfocitos autorreactivos que se escapan de los procesos de selección centrales.[18]

Los órganos linfoides terciarios son acumulaciones ectópicas de células linfoides que se forman en los sitios de inflamación crónica.[19]

Después de salir de los órganos linfoides primarios, los linfocitos maduros entran en la circulación general y el sistema linfático.

1.2.1 La médula ósea es un órgano linfoide primario altamente vascularizado y celularizado que se localiza en la cavidad central de los huesos axiales y largos. Tiene como función regular la renovación celular, la diferenciación y la quiescencia mediante la entrega de señales dependientes e independientes del contacto a través de las células del estroma, componentes de la matriz y factores solubles. Las células estromales son esenciales para mantener la reserva de células madre e inducir la diferenciación de células progenitoras multipotentes tanto de linajes linfoides como eritro-mieloides, resultando en la formación del progenitor linfoide común (PLC) y del progenitor mieloide común (PMC). Los PLCs además se diferencian en LB y LT. Mientras que el desarrollo de los LB tiene lugar exclusivamente en la médula ósea, los LT se desarrollan en el timo.[20]

1.2.2 El timo, un órgano linfoide primario T, es linfoepitelial bilobulado situado en el mediastino antero-superior. Los linfocitos del timo (timocitos) son LT en distintos estadios de maduración. Sólo los LT maduros abandonan el timo y entran en la sangre y los tejidos linfoides periféricos.[21]

1.2.3 Los ganglios linfáticos son estructuras ubicadas en diferentes posiciones en puntos estratégicos a lo largo de la vasculatura linfática. Morfológicamente, están divididos en tres compartimentos: la corteza, la paracorteza y la médula interna. La corteza contiene LB densamente empaquetados, células dendríticas foliculares (CDF) y macrófagos dispuestos en racimos discretos llamados folículos primarios. Los folículos primarios se componen en gran parte de LB naïve que migran en busca de Ag. La interacción de los LB con Ag y LT genera folículos secundarios que contienen un centro germinal (CG) que está repleto de LB que experimentan una proliferación activa, el cambio de clase de inmunoglobulinas (CSR, del inglés *Class Switch Recombination*) y la maduración de afinidad o hipermutación somática (SHM, del inglés *Somatic Hymermutation*).[22] La paracorteza se encuentra debajo de la corteza y es el sitio de interacción de LT con DCs. La médula se compone de cordones medulares compuestos de linfocitos y numerosos LB plasmáticos empaquetados que secretan Acs activamente.

1.2.4 El bazo juega un papel importante en la iniciación de las respuestas rápidas de Acs contra patógenos de la sangre mediante la combinación de las vías

inmune innata y adaptativa. Posee una pulpa blanca que consta de dos compartimentos separados: la zona de los LT y la zona de los LB, que incluye los folículos rodeados por la MZ. En general, la pulpa blanca está implicada en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa. La MZ desempeña un papel único, ya que contiene LB especializados que montan una respuesta rápida de Acs contra Ags altamente conservados en ausencia de colaboración de LT (respuesta *T independiente*, TI).[23]

1.2.5 Las superficies mucosas comprenden diversas estructuras linfoides conocidas colectivamente como el ***tejido linfoide asociado a mucosas*** (MALT). Se divide funcionalmente en sitios inductivos, donde los Ags son muestreados a partir de la superficie de la mucosa y se presentan a LT y LB naïve, y a los sitios efectores, donde las células inmunes ejercen sus funciones de protección, incluyendo la liberación de citoquinas y Acs. Estos últimos son predominantemente IgA secretoria que se transloca a través de las células epiteliales y proporciona protección contra microorganismos comensales y patógenos.[24]

En general todos los órganos linfoides secundarios están organizados en áreas destinadas a los LB (folículos y zona marginal) y áreas destinadas a los LT (zonas parafoliculares).

1.3 Inmunidad humoral

En la inmunidad humoral (*humor*: fluido) son los Acs y no las células las que actúan directamente contra los Ags. En la fase efectora, los Ac secretados se unen al Ag con una elevada especificidad, marcándolos de este modo para su destrucción mediante diversos mecanismos tales como la neutralización, la activación del sistema del complemento, la opsonización, etc. Aunque la especificidad de la fase efectora se debe a las interacciones Ag-Ac, las funciones efectoras no suelen ser específicas del Ag desencadenante.[16]

1.3.1 Los anticuerpos. Las inmunoglobulinas (Igs) o Acs son un grupo de glucoproteínas presentes en el suero y en los líquidos intersticiales de todo el organismo, así como en la superficie de los LB y son fabricados exclusivamente por éstos. Las primeras Igs sintetizadas son moléculas de membrana, que actúan como receptores de los LB contra el Ag. Posteriormente, cuando un LB es estimulado, los Acs se acoplan con una parte específica del Ag conocida como determinante antigénico o epítope. Por lo tanto, los Acs son específicos para los epítopes y no para el total de la molécula antigénica. La unión Ag-Ac es reversible y sólo se mantiene por fuerzas no covalentes de carácter débil. Se denomina afinidad a dicha fuerza de unión entre Ag y Ac.

La estructura básica de las Igs o Acs consiste en dos cadenas polipeptídicas livianas (IgL, del inglés *Light*) idénticas y otras dos cadenas polipeptídicas pesadas (IgH, del inglés *Heavy*) idénticas, enlazadas por puentes disulfuro para formar una estructura

en forma de Y.[25] Las cadenas IgH e IgL presentan dos regiones diferenciadas: la región variable (V) amino terminal (N-terminal), y la región constante (C) carboxi terminal (C-terminal).[26] (Ver Figura 2)

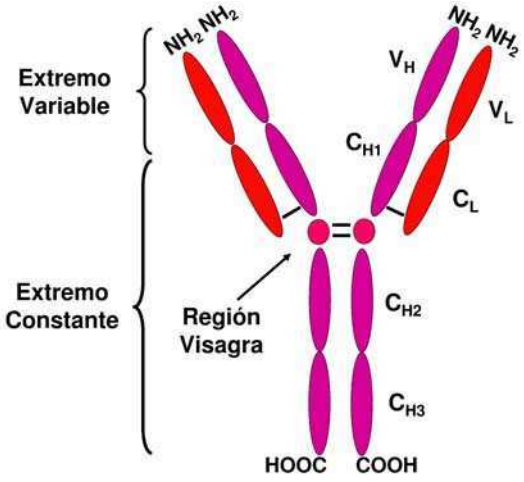


Figura 2: Esquema de un Ac: En rojo la cadena liviana (IgL) y en violeta la cadena pesada (IgH). La IgL está compuesta de una región variable (V_L) y una constante (C_L), mientras que la IgH está compuesta por una región variable (V_H) y tres regiones constantes (C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}), en el caso de Igs de membrana, la IgH posee una región constante más (C_{H4}). Las líneas negras representan puentes disulfuro intercatenarios.

La región V recibe este nombre debido a que contiene regiones de variabilidad en su secuencia de aminoácidos, que diferencian los Acs sintetizados por distintos clones de LB. Estas regiones son las responsables de reconocer al Ag y unirse a él, ya que ahí se encuentra el paratope que se une al epítope del Ag. La variabilidad de los dominios variables no es totalmente aleatoria, sino que éstos poseen zonas relativamente conservadas, a las que se denomina regiones de entramado o armazón (FR del inglés *Framework Region*), entre las que se encuentran intercaladas tres regiones hipervariables, llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR del inglés *Complementary Determining Regions*), por ser las que condicionan la unión

selectiva a cada Ag. La asociación de todas esas regiones forma el lugar de unión con el Ag, cuya conformación es mantenida por los FR.[27] (Ver Figura 3)

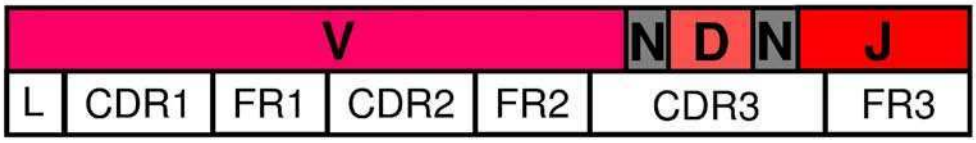


Figura 3: Esquema de la región V de las Igs: contiene diferentes segmentos variable (V), de diversidad (D) y de unión (J) que se unen tras el reordenamiento durante las primeras fases de la diferenciación de la célula linfoide quedando entre las uniones aminoácidos insertos (N). Dentro de cada reordenamiento V(D)J se distinguen la región conservada líder (L) y las regiones hipervariables o CDR en asociación con zonas conservadas denominadas regiones FR.

Existen tres CDRs diferentes en longitud. La CDR3 es la región que más varía en longitud porque está construida a partir de varios componentes (V_H, D y J_H) que aportan diversidad. Además, a menudo contiene nucleótidos N aleatoriamente insertados en las uniones V_H-D y D-J_H, que aportan mayor diversidad. Tanto su longitud como la composición de aminoácidos codificados contribuyen a la especificidad antigénica.[28]

La región variable de una cadena pesada (V_H) se superpone con la región variable de una cadena liviana (V_L) para formar el sitio de unión al Ag. Debido a que la unidad estructural básica de cada molécula de Ac contiene dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, la molécula contiene dos sitios de unión al Ag.

Los dominios de la región C son independientes del sitio de unión al Ag y no participan en el reconocimiento antigénico. La región C se une a las células del sistema inmune para activarlas, siendo responsable de la variedad de funciones

efectoras y por tanto de los tipos de Igs. Adopta por lo general una de cinco formas, que determinan la clase o isotipo de Ig. La Ig de superficie, producida por un LB como receptor para el Ag, y la Ig que esa célula secreta son idénticas excepto por una porción de aminoácidos en el extremo C-terminal de las IgH.

La variabilidad de los Acs se puede clasificar en tres: isotípica, alotípica e idiotípica. La variabilidad isotípica se da porque las moléculas de Ac pueden separarse en clases y subclases específicas en función de las diferencias en la estructura de las regiones C de sus IgH (C_H). Estas distintas clases de moléculas de Ac reciben el nombre de isotipos. En humanos hay cinco clases o isotipos diferentes denominadas: IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE.[29] Cada isotipo está asociado con una función efectora específica determinada mayoritariamente por la región C_H (μ, δ, γ, α, y ε). La IgG e IgA incluyen también subclases o subtipos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

También hay dos clases de isotipos de IgL, denominadas κ y λ, pero se encuentran en combinación con todos los isotipos de IgH. Toda molécula de Ac tiene dos cadenas L κ o dos cadenas L λ, pero nunca una de cada una.

La variación alotípica se refiere a la variación genética dentro de una especie que implica alelos diferentes en un locus determinado.

La variación en los dominios variables produce idiotipos. Todas las moléculas de Ig comparten las mismas características estructurales básicas, pero presentan una

notable variabilidad en las regiones de unión al Ag. Esta variabilidad permite la capacidad de los diferentes Acs de unirse a muchos Ags estructuralmente distintos. Las variantes idiotípicas se pueden encontrar en un solo individuo de una misma especie o en varios, dependiendo si estuvieron o no en contacto con el mismo Ag. Están inducidas por los diferentes epítopes de los Ags y se localizan en las zonas hipervariables de las IgH e IgL.

1.4 Linfocitos B

Los LB recibieron este nombre debido a que en las aves se observó que maduraban en un órgano denominado bolsa de Fabricio.[30] Esta nomenclatura resultó no ser muy adecuada ya que en mamíferos, la maduración central u ontogénica de los LB a partir de precursores comprometidos ocurre en el hígado fetal y, tras el nacimiento, en la médula ósea. Durante este proceso los LB pasan por diversos estadios secuenciales de maduración (Ver Figura 4), cada uno de los cuales se caracteriza por un patrón específico de expresión de genes de Igs y por la expresión de otras proteínas de la superficie celular que sirven de marcadores fenotípicos.

Las fases iniciales de la maduración de los LB están controladas por múltiples moléculas, tales como citoquinas secretadas, proteínas unidas a la membrana y factores reguladores de la transcripción (Ikaros, E2A, Pax5/BSAP, etc.), que actúan de manera coordinada sobre los linfocitos en desarrollo.

Las primeras células de la médula ósea comprometidas con la estirpe de los LB se denominan células pro-B, las cuales aún no poseen Ig. En esta etapa se activa el gen Pax5, que codifica la proteína activadora específica del linaje de LB (BSAP del inglés *B-cell lineage specific activator protein*), la cual es esencial para el desarrollo de los LB.[31] Es en este estadío donde comienzan los reordenamientos génicos que producirán la IgH de la Igμ, donde primero se fusionan los fragmentos D_H y J_H y en una segunda fase, se asocia el fragmento variable, llamado V_H.

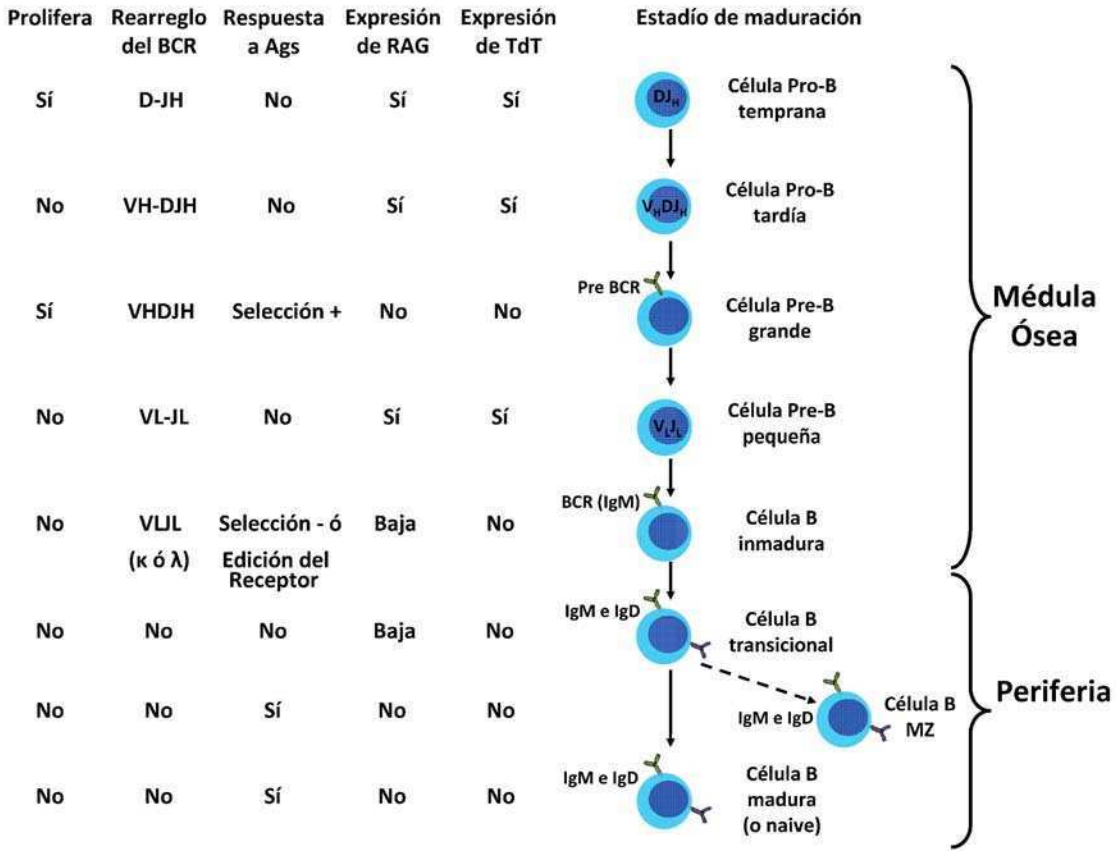


Figura 4: Desarrollo de LB en médula ósea: se produce de manera independiente de Ag y se caracteriza por diferentes estadíos de maduración del BCR. Las células pro-B emergen del progenitor linfoide común (Ver Figura 1). (Tomado y modificado de Bartholdy B., Matthias P.; Transcriptional control of B cell development and function. Gene, 2004. 327(1), 1-23)

Las células pre-B representan el siguiente estadío de desarrollo, y es el primer tipo celular que sintetiza una forma inmadura de Ig de membrana, compuesta por la IgH

μ asociada a una proteína invariable adicional, denominada cadena L sustitutiva, que presenta homología estructural con las cadenas L κ y λ, pero que es invariable, es decir, no tiene regiones V y son idénticas en todos los LB en este estadio. La expresión de la Igμ estimula la reorganización de las cadenas livianas κ y λ que corresponden.

En el siguiente estadío, los LB inmaduros producen además una cadena ligera κ o λ, y expresan IgM de membrana.

Tras el estadío de expresión de IgM, la célula coexpresa cadenas pesadas μ y δ en asociación con la cadena ligera κ o λ y, por lo tanto, produce tanto IgM de membrana como IgD. Ambas clases de Ig de membrana tienen la misma región V y por consiguiente la misma especificidad antigénica.

En resumen, en la médula ósea los precursores de los LB sufren una serie de modificaciones de genes de Ig para generar un repertorio de Acs capaces de reconocer cualquier Ag presente en el medio externo. Los LB maduros (también llamados vírgenes o naïve ya que aún no han estado en contacto con un Ag) que salen de la médula ósea expresan IgM e IgD en superficie como BCR para el reconocimiento antigénico. Después de reconocer el Ag a través del BCR, los LB maduros se someten a una segunda oleada de modificaciones de genes de Ig en los órganos linfoides secundarios. Estas modificaciones aumentan la afinidad por el Ag y activan los LB para expresar IgM, IgG, IgA o IgE que proporcionan nuevas funciones efectoras.

Eventualmente, los LB activados se convierten en células plasmáticas que liberan grandes cantidades de Acs solubles en la circulación, los tejidos y las secreciones mucosas. Los LB maduros o naïve si no encuentran un Ag en un cierto tiempo, mueren por apoptosis.[32]

El acontecimiento clave de la maduración ontogénica de los LB es la expresión de los genes del BCR ya que es la base para que se genere un repertorio diverso de especificidades antigénicas. Durante la maduración de los LB se generan Acs funcionales mediante un proceso denominado recombinación somática, en el cual un conjunto relativamente limitado de secuencias de ADN de la línea germinal, que inicialmente se encuentran separadas unas de otras, se ponen en contacto mediante procesos enzimáticos de deleción y unión. La diversidad se genera durante la unión de los diferentes segmentos génicos (V, D y J). La recombinación somática es un proceso que sólo ocurre en un momento temprano del desarrollo de los LT y LB. Además, cada clon de linfocitos y su progenie expresan una combinación única de esos segmentos génicos para formar el código genético de sus receptores antigénicos.[33] (Ver Figura 5)

En humanos se han identificado más de 100 genes V_H de la línea germinal en el cromosoma 14. Debido a que no todos esos genes son funcionales y que algunos de ellos son casi idénticos (pudiendo tratarse de variantes alélicas) hay tan solo 51 genes disponibles para el reagrupamiento los cuales pertenecen a 7 familias. También se

conoce la existencia de 6 segmentos génicos J_H y 27 segmentos génicos D también agrupados en 7 familias.[34]

Para la formación del gen funcional completo resultante se requieren tres eventos de recombinación (V_H-D, V_HD-J_H y V_HDJ_H-C) para las IgH, mientras que bastan dos eventos de recombinación (V_L-J_L y $V_L$$J_L$-C) para las cadenas L.

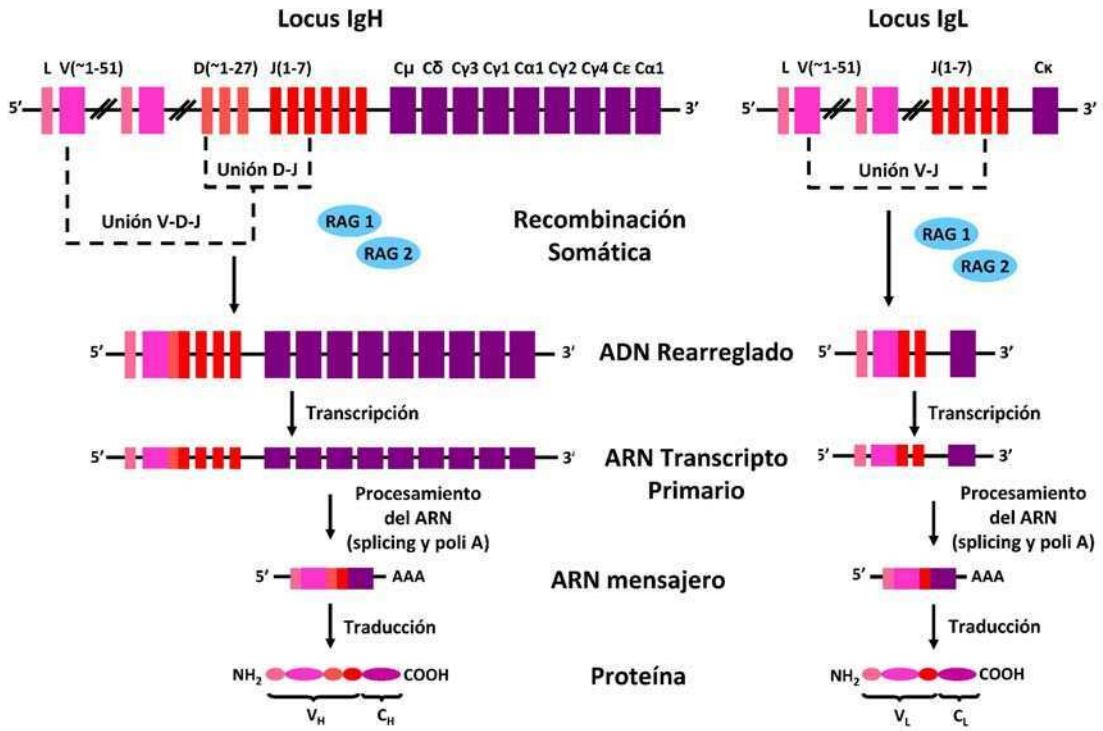


Figura 5: Recombinación somática V(D)J: Durante el desarrollo de los LB en médula ósea, se produce el reordenamiento de los genes que darán lugar a las Igs con participación de las enzimas RAG1 y RAG2. En la cadena pesada (IgH) un segmento D se combina con un segmento J_H y consecuentemente ese rearreglo DJ_H se combina con un segmento V_H, para dar lugar al exón V_HDJ_H. Al transcribirse este exón producirá un ARN que tras sufrir splicing dará lugar a un ARN mensajero unido a una región C (Cμ y Cδ en las primeras etapas de maduración B). En el caso de la cadena liviana (IgL), un segmento V_L se combina con un segmento J_L, dendo lugar a un exón $V_L$$J_L$ que al transcribirse generará un ARN que tras sufrir splicing dará lugar a un ARN mensajero unido a una región Cκ o Cλ. (Tomado y modificado de "The immune system in Health and disease", Janeway et al 2001, 5° Edición)

El proceso molecular subyacente a la recombinación V(D)J consiste primero en las rupturas de doble hebra de ADN (DSB, del inglés, *double strand breaks)*, catalizadas por el complejo enzimático de la recombinación V(D)J, seguido de la recombinación

de los extremos de los fragmentos, uniéndose en un proceso de reparación de ADN denominado ensamblado de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *Non Homologous End Join*). Los dos componentes específicos de la recombinasa V(D)J son dos enzimas codificadas por los genes activadores de la recombinación RAG-1 y RAG-2 (del inglés *Recombination Activating Gene*)[35], que sólo se expresan en los linfocitos inmaduros de los órganos linfoides primarios. Las otras enzimas que forman parte de la recombinasa V(D)J se expresan en muchos tipos celulares y participan en la reparación del ADN. Además, la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)[36] aumenta la diversidad de los genes de Ig mediante la adición de N-nucleótidos en cada unión V_HDJ_H.

Después del rearreglo del BCR, los LB inmaduros que expresan un BCR autorreactivo se someten a un proceso denominado edición del receptor. En este proceso los genes RAG se reactivan y se producen recombinaciones adicionales V-J de la cadena L dando lugar a una nueva cadena L de la Ig, lo que permite a la célula expresar un receptor Ig diferente que no sea autorreactivo.[37] Aquellos LB inmaduros incapaces de editar su BCR autorreactivo son eliminados por apoptosis mediante un proceso llamado deleción clonal. De esta manera se mantiene la tolerancia de los LB frente a los autoantígenos (tolerancia central).

Las recombinasas RAG1 y RAG2 son también necesarias para el reordenamiento de segmentos de genes del TCR y de hecho, mutaciones deletéreas de RAG1 o RAG2,

conducen a la inmunodeficiencia combinada severa (SCID, del inglés *Severe Combined Immunodeficiency*), que se caracteriza tanto por la falta de LB como de LT.

Las células estromales de la médula ósea proporcionan señales obligatorias de supervivencia tales como el factor de activación de células B (BAFF, del inglés, *B cell activating factor*) o el ligando inductor de proliferación (APRIL, del inglés, *A proliferation-inducing ligand*), que permite el mantenimiento de un repertorio altamente diversificado y completamente funcional de LB periféricos. En el caso de los LB autorreactivos su hiperactivación inhibe la expresión de BAFF y/o la hiperexpresión del factor pro-apoptótico BIM (del inglés, *Bcl-2 interacting mediator of cell death*).

El resultado final de la diferenciación de los LB es la generación de un BCR funcional formado por una Ig unida a la membrana celular, responsable del reconocimiento antigénico, y el heterodímero Igα/Igβ responsable de la transducción de señales.

1.4.1 Activación de los linfocitos B. Luego de la maduración en médula ósea, los LB naïve que salen a la periferia se someten a pasos adicionales de diferenciación tras enfrentarse al Ag en los órganos linfoides secundarios, tales como los nódulos linfáticos, el bazo y los MALT. Los LB naïve reconocen e internalizan al Ag mediante los receptores IgM e IgD de superficie.[38] Después de recibir señales de activación, los LB bajan la expresión de IgD de superficie, procesan el Ag

internalizado para formar un complejo MHC-II-péptido y migrar a la zona de los LT, también conocida como la frontera T-B. Allí, los LB presentan Ags a los LT_{HF} (Linfocitos T Helper Foliculares), un subset de LT $CD4^+$ especializado en la interacción con LB, que expresan CD40L y citoquinas tales como IL-4, IL-10, IL-21 e IFN-γ.[39] Los LB activados por Ag se diferencian en dos vías alternativas: la vía extrafolicular que genera plasmoblastos de vida corta que secretan IgM, y la vía folicular que produce CGs de LB conocidos como centroblastos y centrocitos que median la diversificación, la selección y la producción de Acs.[40] (Ver Figura 6)

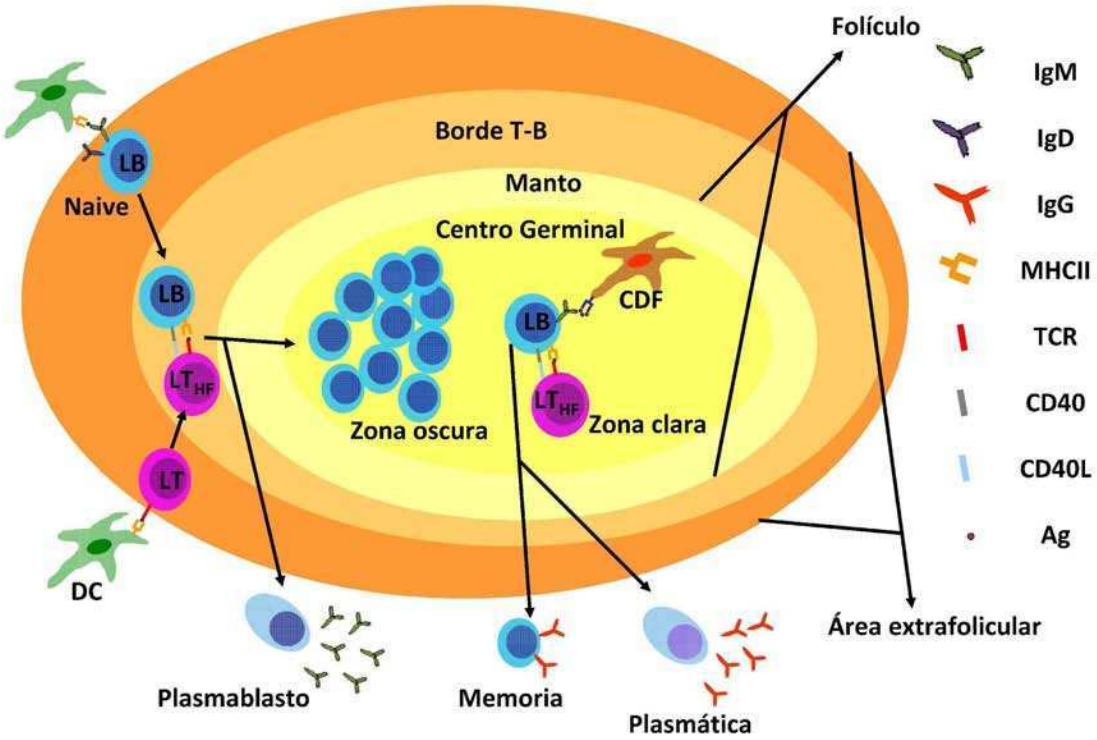


Figura 6: Formación de CG. Los LB naïve pueden ser activados tras reconocer a través de su BCR a Ags presentados por DCs. Posteriormente establecen interacciones con los LT_{HF} en la zona borde T-B, como ser CD40-CD40L y MCHII-TCR. La señalización vía CD40L sumado a citoquinas llevan al LB a madurar por una vía extrafolicular, que dará lugar a plasmablastos de vida corta secretores de IgM, o por una vía folicular que dará lugar a los centroblastos del CG. En la zona oscura del CG los centroblastos expresan AID y sufren SHM y CSR al mismo tiempo se van diferenciando en centrocitos que interaccionan con las CDF quien le presenta Ag. Entonces aquellos LB que tienen baja afinidad para el Ag mueren por apoptosis, mientras que los que tienen alta afinidad se diferencian a LB de Memoria y plasmáticas de larga vida que secretan IgM, IgG, IgA o IgE. (Tomado y modificado de Klein U. & Dalla-Favera R., Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy, Nature Reviews Immunology 2008. 8: 22-33)

1.4.2 Formación del centro germinal. Los LB activados se mueven al folículo en respuesta a la quimiocina CXCL13, un ligando de CXCR5 producido por las CDFs.[41] Los LT_{HF} del CG sostienen la proliferación, la diferenciación, la diversificación y selección de centroblastos y centrocitos, mediante la expresión de altos niveles de CD40L e IL-21. Los centroblastos experimentan expansión clonal en la zona oscura del CG, así como SHM y CSR, dos procesos de diversificación de Igs dependientes de la enzima inducida por activación, citidina deaminasa (AICDA, del inglés *Activation Induced cytidine Deaminase*).[42] Entonces, los centroblastos salen del ciclo celular como centrocitos que reconocen los Ags nativos atrapados en la superficie de las CDFs utilizando su nuevo BCR hipermutado. Después de la unión al Ag, los centrocitos establecen una interacción con los LT_{HF} del CG. Esta interacción no sólo contribuye al mantenimiento y la selección de centrocitos de alta afinidad y con cambio de clase, sino también en la diferenciación de centrocitos en LB de memoria o células plasmáticas. Aquellos centrocitos que expresan un BCR con baja afinidad por el Ag, mueren por apoptosis y son engullidos por fagocitosis.

1.4.3 Diversificación de Inmunoglobulinas. Fuera de la médula ósea los LB diversifican sus genes de Ig a través de dos procesos dependientes de Ag conocidos como SHM y CSR. Como mencionamos anteriormente, estos procesos requieren AICDA, una enzima de edición del ADN fuertemente expresada por centroblastos y centrocitos.[42, 43]

El CSR y la SHM también ocurren en los LB extrafoliculares que participan en una respuesta TI contra carbohidratos o lípidos.[44]

1.4.3.1 Cambio de clase de inmunoglobulinas. Este proceso es un evento de recombinación de ADN irreversible que reemplaza el gen Cμ que codifica la C_H de la molécula de IgM por los genes Cγ1, Cγ2, Cγ3, Cγ4, Cα1, Cα2 o Cε que codifican la región C_H de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 o IgE, respectivamente, mediante la deleción de un segmento de ADN.[45]

El CSR tiene lugar en las regiones de "switch" (S) situadas hacia el 5' de cada gen de C_H (a excepción de Cδ). El primer evento que da lugar al CSR es la producción de transcriptos germinales (*GLT*, del inglés *Germ Line Transcripts*) situados río arriba de las regiones S a partir de promotores I específicos de cada C_H en respuesta a señales de receptores y citoquinas específicas. La activación de los promotores I produce un transcripto primario que abarca la región S y su gen C_H aguas abajo. Esto representa el inicio de CSR debido a que da lugar a la apertura de la doble hebra del ADN en las regiones S, donde el ARN de los *GLTs* se encuentra físicamente asociado con la cadena de ADN molde de la región S específica formando un híbrido ADN-ARN que se convierte en sustrato de AICDA.[45] (Ver Figura 7)

Las señales de citoquinas son importantes para dirigir hacia genes específicos C_H. Así, mientras que la IL-4 y la IL-13 activan preferentemente Cγ4 y Cε; TGF-β induce

predominantemente Cα1 y Cα2. Por otra parte, IL-4, IL-10 e IL-21 en su mayoría tienen como blanco Cγ1, Cγ2 y Cγ3.[46]

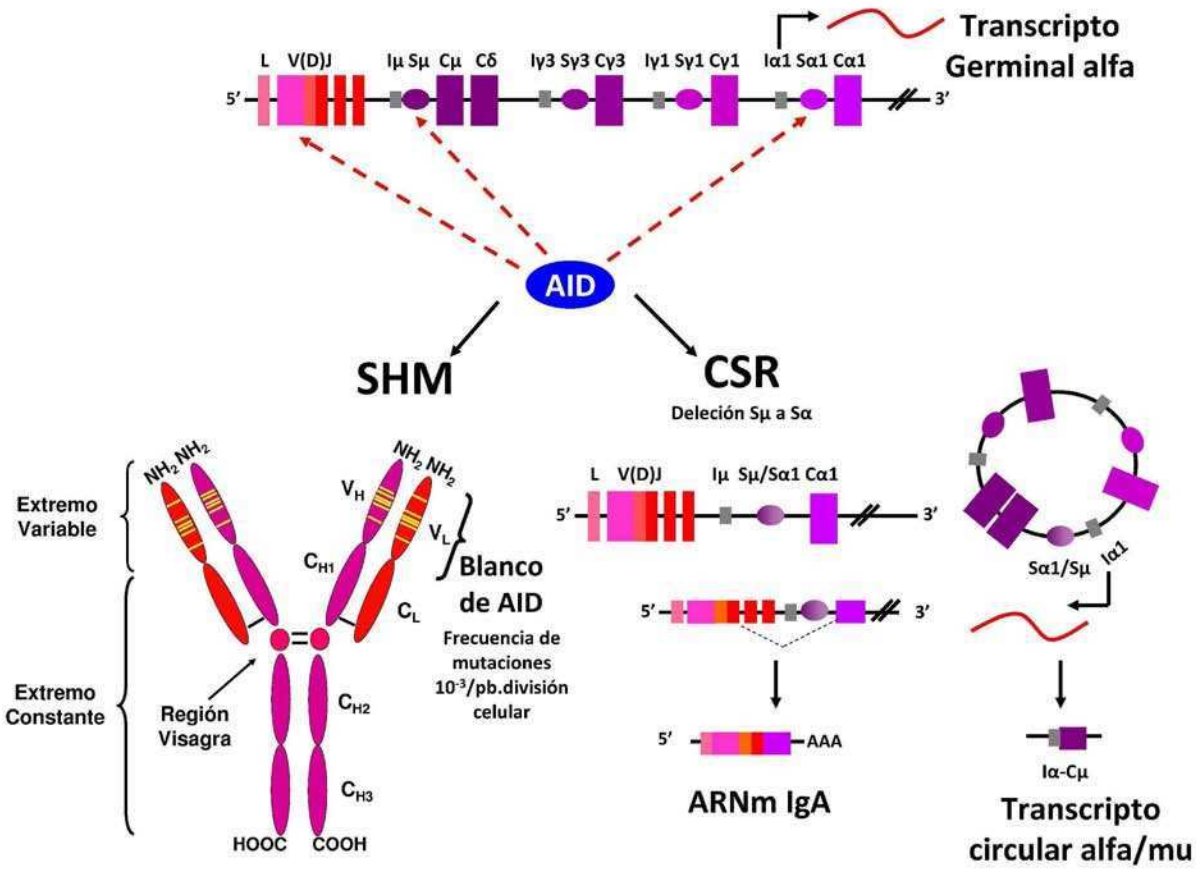


Figura 7: Mecanismo CSR y de SHM: Luego del reordenamiento del locus de cadena pesada IgH y liviana IgL, las células B producen IgM e IgD. La producción de IgG, IgA o IgE con la misma especificidad por el Ag se produce a través del CSR. El diagrama muestra el mecanismo del CSR a IgA, un mecanismo similar sucede para IgG e IgE. Mediante estímulos específicos se induce en IgH la transcripción de los *GLT* Cα a partir del promotor situado río arriba de la región Iα, dando lugar a un transcripto estéril. Ese ARNm estéril permite que el ADN del gen Cα sea sustrato de AICDA, un componente esencial de la maquinaria del CSR. El incremento en la expresión de *AICDA* se produce tras la activación de los LB. Mediante la generación de las roturas del ADN en Sα y Sμ y su posterior reparación por el sistema de NHEJ, la maquinaria del CSR reorganiza el locus IgH que dará lugar a ARNm de IgA y al mismo tiempo a la deleción de un círculo de ADN episomal que transcribe un ARNm estéril denominado *CT*. Éste posee unido Iμ con Sα quienes físicamente se encontraban muy distantes en el ADN del locus IgH original.
Al mismo tiempo, AICDA posee como sustrato la región variable de las Igs, tanto del locus IgH como IgL, dando lugar al mecanismo de SHM que incrementa la afinidad por el Ag. En la figura se esquematizan los cambios en la región variable tras la reparación mediante un sistema propenso a errores. (Tomado y modificado de Cerutti A., The regulation of IgA class switching. Nature Rev. Immunol. 2008. 8: 421-434)

AICDA desamina residuos de citosina en las dos cadenas de ADN de la región S transcripcionalmente activa para generar múltiples lesiones que son posteriormente procesadas por una compleja maquinaria de reparación del ADN que dará lugar a

roturas bicatenarias. La fusión de las rupturas de la doble hebra del ADN a través de la vía de reparación de NHEJ induce la deleción de un círculo de ADN que contiene Cμ junto al promotor I del gen C_H aguas abajo por el que será reemplazado. El resultado es que la región V(D)J se encontrará unida a un gen Cγ, Cα o Cε permitiendo a los LB adquirir una Ig con nuevas funciones efectoras pero idéntica especificidad por el Ag.[45]

Un marcador que se utiliza para evaluar una CSR activa es la presencia de los transcriptos circulares (*CT* del inglés, *Circular Transcripts*) que surgen de la expresión constitutiva de los círculos de ADN escindidos.

1.4.3.2 Hipermutación somática.

A pesar de la gran diversidad en el repertorio de Igs generada por recombinación somática, la primera puede aumentar aún más mediante otro mecanismo que se produce en los LB durante su maduración periférica, específicamente en los CGs de los órganos linfoides secundarios mediante el proceso de SHM. Este proceso permite generar sitios de unión de alta afinidad para el Ag.[47]

En humanos, las regiones V de los genes de Ig (principalmente en las CDRs de unión al Ag) de los centroblastos muestran tasas de hasta 10^{-3} mutaciones por cada pb y división celular. Estas tasas mutacionales son por lo menos un millón de veces

superiores a las observadas en otros genes, motivo por el cual la mutación del los genes V de las Ig se denomina hipermutación.

Este proceso introduce mutaciones puntuales en las regiones que codifican la región V de unión al Ag.[48] En el CG de ganglios linfoides secundarios, estas mutaciones puntuales proporcionan la base para la selección posterior de LB de alta afinidad por el Ag expuestos por las CDFs. Las mutaciones puntuales son inducidas principalmente por AICDA[49] con una fase inicial que requiere la actividad mutagénica de esta enzima, seguida por una segunda fase que implica la reparación a través de una maquinaria propensa a errores. Cabe destacar que estas mutaciones ocurren en puntos específicos, incluyendo el motivo DGYW, donde D indica los nucleótidos G, A o T, Y indica nucleótidos C o T y W indica nucleótidos A o T. La reparación a través de la maquinaria propensa a errores se lleva a cabo por los miembros de una familia de polimerasas de ADN de baja fidelidad.[50] Las sustituciones no modifican las regiones C que regulan la organización estructural de las moléculas de Ig, así como tampoco el promotor y enhancers intrónicos, que regulan la actividad transcripcional del locus de Ig. (Ver Figura 7)

1.4.4 Diferenciación de linfocitos B. Luego de la formación del CG se generan células plasmáticas de larga vida que secretan Acs y migran hacia la médula ósea, y LB de memoria que entran en la circulación y los órganos linfoides para detectar la presencia de Ags.[51] Las células plasmáticas acumulan IgM, IgG, IgA o IgE

en su citoplasma y normalmente expresan V(D)J mutados, CD19, altos niveles de CD27 y CD38, pero no IgD o CD24.[52] Después de una exposición secundaria a un Ag, los LB de memoria que expresan IgG rápidamente generan plasmoblastos secretores de Acs, mientras que aquellos que expresan IgM de memoria inician una reacción secundaria en el CG. Todas estas reacciones se caracterizan por la rapidez en la activación, proliferación, diferenciación y secreción de Acs de alta afinidad. Los LB de memoria expresan V(D)J mutados, IgG, IgA o (más raramente) IgM así como CD19, CD24 y CD27, pero no CD38 o IgD.[53] La diferenciación de los LB del CG en células plasmáticas y de memoria implica una compleja red de reguladores transcripcionales que incluyen Bcl-6, Pax5 y Blimp-1. Además, Blimp-1 regula la expresión de proteínas XBP-1 e IRF-4 que es un factor de transcripción necesario para CSR y diferenciación en células plasmáticas.[54]

1.4.5 Producción de inmunoglobulinas. La respuesta de Acs específicos contra Ags requiere la interacción de LB foliculares con LT_{HF} que expresan CD40L. Esta vía de respuesta TD (T dependiente), a pesar de generar protección inmune y memoria, es relativamente lenta y necesita ser integrada con una vía TI más rápida que active los LB extrafoliculares a través de factores similares a los de la vía CD40L que son liberados por las células del sistema inmune innato (ej: BAFF y APRIL). Estos factores cooperan con el BCR y los TLRs para inducir respuestas rápidas de Acs contra Ag altamente conservados.[55]

1.4.5.1 Respuesta T dependiente. Como se mencionó anteriormente la unión del BCR al Ag induce la activación de las señales que causan la internalización de los mismos, su procesamiento y la interacción de los LB con los LT_{HF}.

Los LT_{HF} inducen a los LB a migrar al CG a través de las señales co-estimulatorias del CD40L y citoquinas, donde se someten a expansión clonal, CSR, SHM y selección. Entonces los LB se diferencian tanto en memoria como en células plasmáticas productoras de Acs protectores con alta afinidad por el Ag, IgG, IgA e IgE.

Por lo general, las respuestas de Acs TD requieren de 5 a 7 días, un tiempo demasiado largo como para controlar los patógenos. Para compensar esta limitación, subconjuntos especializados de LB extrafoliculares inician respuestas rápidas de Acs contra determinantes microbianos altamente conservados.

1.4.5.2 Respuesta T independiente. Los LB extrafoliculares se encuentran situados en la mucosa y la MZ del bazo donde responden a carbohidratos TI y Ags glucolipídicos capturados por macrófagos y DCs.[56] Estos LB incluyen los B-1 y los B de la MZ. Los B-1 generan inmunidad "natural" adaptativa mediante la liberación espontánea de IgM pero también de IgA e IgG, proporcionando una primera línea de defensa contra las infecciones virales y bacterianas. Los LB de la MZ, de forma similar a los B-1, expresan Acs que reconocen Ags TI con baja afinidad.[57, 58]

Tanto los B-1 como los B de la MZ se caracterizan por estar disponiblemente activos, lo que implica una elevada expresión de los TLRs y de un BCR escasamente diversificado con la capacidad de reconocer múltiples productos microbianos. Los B-1 y B de la MZ también muestran una expresión elevada del activador transmembrana y modulador de calcio y ligando de interacción con ciclofilinas (TACI, del inglés *Transmembrane Activator and Calcium-modulating cyclophilin-ligand Interactor*), un receptor que desencadena el CSR y la producción de Acs en respuesta a los factores BAFF y APRIL.[56] Estos factores son liberados por las células del sistema inmune innato, como los macrófagos, DCs, granulocitos y células epiteliales tras la detección de la presencia de microorganismos a través de los TLRs.

Los B de la MZ, además de estar en el límite entre la pulpa blanca y roja del bazo, en los seres humanos también están presentes en la sangre periférica donde expresan en superficie, V(D)J moderadamente mutado, alta IgM, baja IgD, CD19, CD24, CD27, alto CD21, pero no CD38. También pueden participar en la respuesta de Acs TD debido a su capacidad de capturar el Ag y transportarlo desde la MZ al folículo, donde pueden depositar el Ag en las CDFs e incluso presentar el Ag a los $LT_{HF.}$[59]

1.4.5.3 Señalización vía BCR. Las señales activadoras del BCR son necesarias tanto para la respuesta de Acs TD como TI. La unión del BCR al Ag inicia una compleja cascada de eventos de señalización que requiere los heterodímeros Igα y Igβ (o CD79a y CD79b) asociados de forma no covalente con el BCR así como

también de los co-receptores de las moléculas CD19, CD21 y CD81, para formar el complejo del receptor que amplificará la señal.[60]

La señalización del BCR en última instancia induce la translocación nuclear de diversos factores de transcripción, incluyendo NF-κB, AP-1 y NFAT, que activan una serie de genes implicados en la supervivencia, activación, proliferación y diferenciación de los LB.[61]

1.4.5.4 Señalización vía CD40. En las respuestas de Acs TD, la unión de CD40 al CD40L provoca el reclutamiento de TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 y TRAF6, proteínas adaptadoras a la cola citoplasmática de CD40 en el LB.[62, 63] Este evento es seguido por la activación de IKK, que desencadena la degradación de IκB y la translocación nuclear de NF-κB. Las señales de CD40 inducen la proliferación de los LB, la supervivencia, la diferenciación a CG, el CSR y la producción de Acs. El papel crítico de la interacción CD40-CD40L en la inmunidad queda reflejado en los pacientes inmunodeficientes primarios con síndrome de hiper IgM (HIGM), quienes poseen mutaciones deletéreas de los genes que codifican CD40L o CD40. Estos pacientes desarrollan infecciones recurrentes debidas a un deterioro severo del CSR y de la maduración de la afinidad.[64, 65] (Ver Figura 8)

1.4.5.5 Señalización vía TACI, BCMA y BAFF-R. En las respuestas de Acs TI, la unión de TACI a BAFF o APRIL conduce a la activación de los B de la MZ y los B-1. BAFF y APRIL son moléculas estructuralmente relacionadas,

producidas como ligandos transmembrana o trímeros solubles por las DCs, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, CDF, células endoteliales, células epiteliales y células estromales.[66, 67] (Ver Figura 8)

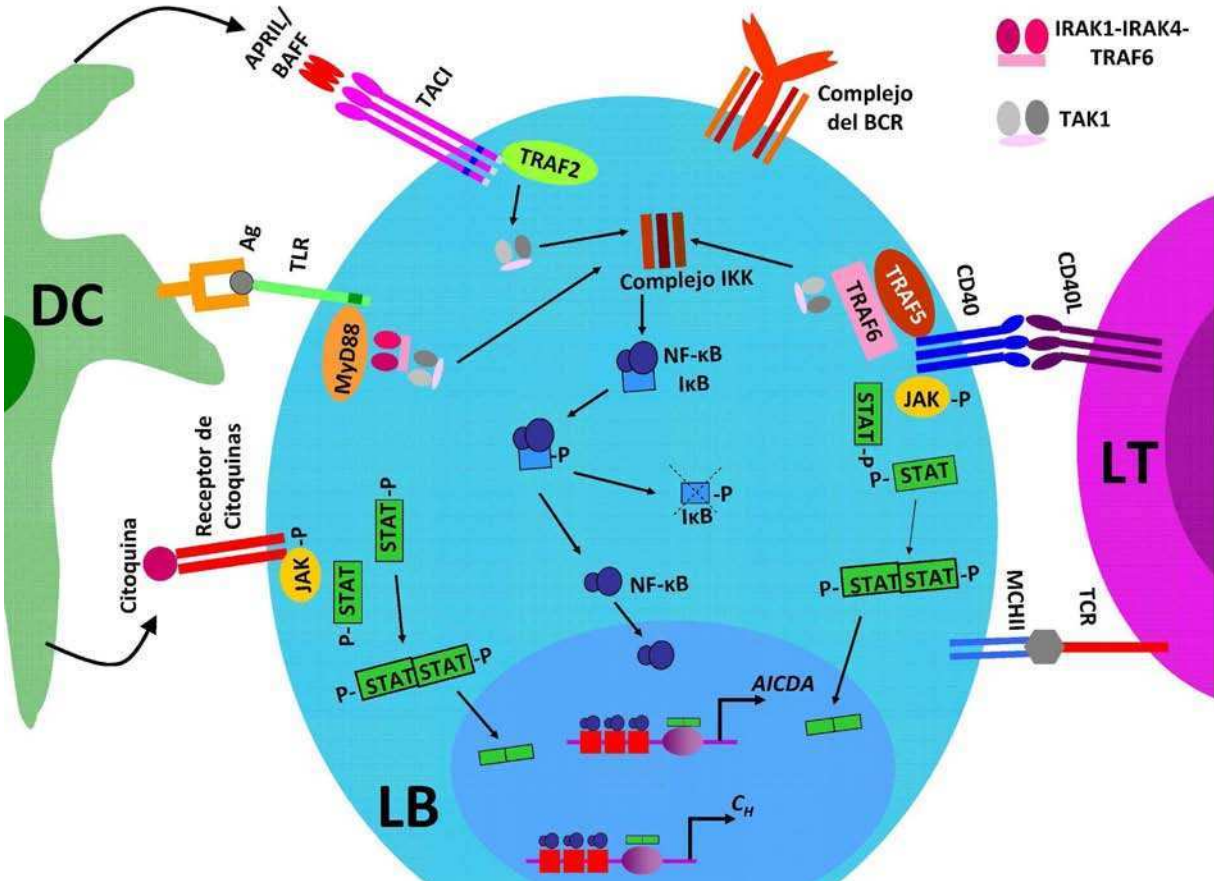


Figura 8: Vías de activación del LB. La activación de TACI por BAFF y/o APRIL liberado por DCs desencadena la oligomerización del receptor y el reclutamiento de TRAF2 y TAK-1 (que forma un complejo con dos proteínas adicionales conocidas como TAB1 y TAB2), provocando la activación del complejo IKK, que a su vez desencadena la fosforilación y la degradación vía proteasoma de IκBα. La fosforilación y degradación de IκBα son seguidas por la translocación nuclear de NF-κB, que interactúa con sus sitios enhancers para iniciar la activación transcripcional de promotores de genes de línea germinal C_H y del gen *AICDA*. Estos eventos transcripcionales finalmente provocan el CSR en la presencia de co-señales proporcionadas por las citoquinas y los ligandos de TLR microbianos (Ag). Los receptores de citoquinas inducen la fosforilación y translocación nuclear de dímeros de STAT, que se unen a sus motivos enhancer cercanos a los de NF-κB en los genes C_H y *AICDA*. Por otro lado los ligandos de TLR señalizan a través de MyD88 por una vía TIR dependiente. Los TLR cooperan con los ligandos de TACI y citoquinas para inducir la secreción de Acs. Por último, la interacción de CD40 del LB con CD40L del LT induce la activación de una vía dependiente de TRAF5, TRAF6 que llevará a la translocación nuclear de NF-κB de forma similar a la de TACI, y al mismo tiempo también vía fosforilación de JAK producen la dimerización de STAT y su translocación nuclear de forma similar a los receptores de citoquinas.

En los LB, TACI se une eficazmente a grandes oligómeros de BAFF y APRIL, la agregación subsiguiente del receptor en la membrana, activa NF-κB a través de un

mecanismo que implica el reclutamiento de TRAF2, TRAF3, TRAF5 y TRAF6 a la cola citoplasmática de TACI.[68] Recientemente se ha descripto que este receptor también activa NF-κB mediante el reclutamiento de MyD88, una proteína adaptadora generalmente asociada con los TLRs [69, 70].

Si bien TACI y TLRs están altamente expresados en los LB de la MZ y B-1, también se expresan en los LB foliculares y por lo tanto contribuyen tanto a la respuesta de Acs TI como TD.

BAFF y APRIL, además de interactuar con TACI, interactúan con el Ag de maduración de células B (BCMA, del inglés *B Cell Maduration Antigen*), un receptor que promueve la supervivencia de las células plasmáticas. BCMA se expresa principalmente en los plasmablastos productores de Acs y células plasmáticas y su interacción con BAFF o APRIL causa activación de la vía NF-κB, de forma similar a la inducida por CD40 y TACI.

A diferencia de APRIL, BAFF también se une al receptor BAFF (BAFF-R o BR3), una proteína ampliamente expresada por los LB en cualquier etapa de diferenciación, a excepción de las células plasmáticas. BAFF-R suele ser activado por trímeros de BAFF solubles que son continuamente liberados por las células inmunes y las células del estroma. En general, BAFF-R es esencial para la supervivencia de los LB periféricos.[71]

1.4.5.6 Señalización vía receptores de citoquinas. Las señales de los receptores de citoquinas cooperan con las señales del BCR, CD40, TACI, BCMA, BAFF-R y TLRs para inducir una óptima proliferación, supervivencia y diferenciación de los LB, incluyendo el CSR, SHM y la producción de Acs. La interacción de los receptores de IL-4, IL-6, IL-10 e IL-21 con sus ligandos induce la activación de las quinasas Jak que provocan la fosforilación, dimerización y translocación nuclear de las proteínas transductores de señal y activadores de transcripción (STAT, del inglés *Signal Transducer and Activator Transcription*). Mientras que los receptores de IL-6, IL-10 e IL-21 activan STAT1 y STAT3, el receptor de IL-4 activa STAT6.[72] (Ver Figura 8)

2. Inmunodeficiencias primarias

Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un grupo heterogéneo de enfermedades del sistema inmune que al día de la fecha resultan mayoritariamente monogénicas (www.bioinf.uta.fi/idr). En algunos casos se sospecha que podrían ser causadas por defectos en más de un gen, poligénicas, o ser el resultado de interacciones de agentes infecciosos o medioambientales con características determinadas genéticamente. Suelen presentarse durante la primera o segunda década de la vida, aunque pueden también manifestarse en la edad adulta.

Los defectos inmunológicos en las IDP, cuantitativos y/o funcionales, pueden involucrar a cualquiera de los componentes del sistema inmune: linfocitos (T, B o

NK), células fagocíticas (polimorfonucleares o mononucleares) o proteínas del sistema complemento. Estos defectos producen generalmente pérdida de protección o defensa contra agresiones externas, caracterizándose por susceptibilidad a infecciones crónicas y recurrentes, enfermedades autoinmunes, cáncer (principalmente linfomas), y en algunos casos inflamación no controlada debido a una infiltración anormal de linfocitos en tejidos y órganos.[73]

La incidencia global de estas entidades es de 1/10000 recién nacidos vivos, correspondiendo aproximadamente el 70% de los casos a deficiencias humorales o deficiencias primarias de Acs.

Durante los últimos años se han producido grandes avances en el conocimiento de las bases moleculares y genéticas de estos defectos del sistema inmune, que han servido para mejorar el diagnóstico, el asesoramiento genético, el seguimiento o evolución y la terapéutica. En la última década se han descrito más de 100 defectos genéticos asociados a IDP y es probable que otros tantos se definan en los próximos años (www.esid.org).

Estos avances han permitido que las IDP, enfermedades o eventos raros a escala global, al ser estudiadas de forma sistemática aportaran a una mejor comprensión de los mecanismos básicos relacionados con activación, regulación, función y diferenciación de los diferentes componentes del sistema inmunitario humano. Este conocimiento está además revolucionando los enfoques actuales de diagnóstico y

tratamiento de muchas otras enfermedades como las deficiencias inmunológicas adquiridas, las enfermedades autoinmunes y tumorales con un impacto importante en la calidad y sobrevida de muchos pacientes.[74]

2.1 Deficiencias primarias de anticuerpos. Este grupo de IDP comprende una amplia variedad de defectos genéticos que afectan la formación de Acs ya sea por una alteración intrínseca del LB o por un fallo en la respuesta efectiva de estas células a las señales de los LT. Los síndromes que presentan un déficit de Igs son un grupo heterogéneo de defectos inmunológicos, clínicamente definidos por una mayor susceptibilidad a infecciones recurrentes. Los defectos moleculares y celulares son muy heterogéneos pudiendo afectar tanto a células como a mediadores, receptores, etc que participan en la respuesta inmune humoral (www.esid.org).

2.1.1 Inmunodeficiencia común variable (IDCV)

Bajo esta denominación se reconoce una IDP heterogénea que se manifiesta clínicamente en las primeras tres décadas de la vida. Es diagnosticada con mayor frecuencia entre los 20 y 30 años afectando por igual a ambos sexos. A partir de los registros internacionales se ha observado que la incidencia de esta IDP es de 1/25.000 a 1/66.000 siendo, dentro de las que requieren atención médica, la más prevalente en humanos. La mayoría de los casos son esporádicos pero al menos un 10% son familiares.

El diagnóstico de IDCV es aplicado a un grupo heterogéneo de pacientes con hipogamaglobulinemia, producción defectuosa de Acs específicos y susceptibilidad aumentada a infecciones recurrentes bacterianas sino-pulmonares y gastrointestinales. En el tracto respiratorio inferior, las infecciones conducen frecuentemente a enfermedad pulmonar crónica.[75, 76]

La Sociedad Europea de IDP (ESID) junto al Grupo Panamericano de IDP (PAGID) consensuaron los criterios diagnósticos para IDCV a saber: hipogammaglobulinemia en al menos dos isotipos (IgG e IgA y frecuentemente IgM) con dos DS por debajo del valor correspondiente para la edad; susceptibilidad aumentada a infecciones bacterianas recurrentes (principalmente sino-pulmonares y gastrointestinales); producción defectuosa de Acs específicos y edad al diagnóstico mayor a 2 años.[77]

La presentación y evolución clínica es variable, en algunos pacientes se observa hipertrofia del tejido linfoide y/o esplenomegalia, otros pueden presentar enfermedad inflamatoria gastrointestinal con diarrea crónica, malabsorción y pérdida de peso. Un 20 a 25% de pacientes adultos desarrollan autoinmunidad, siendo la anemia hemolítica, trombocitopenia, vasculitis y artritis reumatoidea las más frecuentes. Por último, en un grupo de pacientes con IDCV, las lesiones granulomatosas tipo sarcoidosis pueden ser la manifestación clínica más relevante.[78-80]

En lo que respecta a los defectos inmunológicos se ha encontrado asimismo una amplia variabilidad de anormalidades. Los defectos de la inmunidad celular incluyen

alteraciones en la activación del LT, en la señalización del TCR, en la producción de citoquinas, en la distribución de sub-poblaciones T, así como inversión de la relación $CD4^+$:$CD8^+$ y aumento de apoptosis en LT y LB. Los LB circulantes totales suelen ser normales en cantidad en la mayoría de los pacientes, sin embargo se han encontrado disminuidos en algunos casos. Estudios fenotípicos y funcionales del LB tendientes a relevar posibles defectos que estén en la base de esta producción defectuosa en número y calidad de Acs, fueron poco explorados en pacientes con IDCV de comienzo pediátrico.

El primer defecto genético descripto en pacientes con IDCV, en su mayoría adultos, fueron mutaciones en la molécula coestimulatoria ICOS (MIM 604558),[81] expresada en LT activados. Más recientemente pudieron detectarse en un número bajo de pacientes, especialmente adultos, mutaciones en otros cinco genes funcionalmente relacionados con el LB maduro como TNFRSF13B (TACI; MIM 604907)[82, 83], CD19 (MIM 107265)[84], TNFRSF13C (BAFFR; MIM 606269)[85], CD81 (MIM 613496)[86] o CD20[87], variabilidad genética que sumada a las diferencias en la presentación clínica y en los parámetros inmunológicos evaluados, sugiere heterogeneidad en los mecanismos subyacentes en la patogénesis de las IDCV.

Esta patología es mayormente diagnosticada en la 2º o 3º década de vida pero existe un grupo de pacientes que presenta un comienzo temprano, en quienes se han propuesto múltiples mecanismos en la aparición del cuadro clínico. Si bien en algunos

se han descripto defectos en la señalización de receptores del LB y en la maduración de estas células, las etapas de diferenciación tardía llevadas a cabo en los órganos linfoides secundarios no han sido suficientemente exploradas en pacientes con comienzo pediátrico de la enfermedad. De hecho, estos pacientes podrían resultar un buen modelo experimental para el estudio de la fisiopatología del LB humano.

Al estudiar pacientes con IDCV hay que tener presente que las manifestaciones clínicas de otras IDP pueden ser confundidas con esta enfermedad por eso es necesario descartar la presencia de mutaciones en genes ya descriptos y asociados a otras entidades médicas.[88]

El desarrollo madurativo del LB implica una serie de etapas que pueden ser definidas a través del estado de rearreglo de los genes de Igs, la expresión de marcadores en la superficie celular y la localización de las células en la médula ósea, el bazo o los nódulos linfáticos. Los pacientes con defectos en los estadios tempranos de la maduración del LB frecuentemente desarrollan infecciones recurrentes, causadas por bacterias encapsuladas, en los primeros años de vida y en algunos casos se reconoce la inmunodeficiencia al ser hospitalizados por una infección severa. Aproximadamente el 80% de los pacientes con desarrollo precoz de infecciones recurrentes, hipogamaglobulinemia y ausencia o reducción de LB circulantes tienen agamaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), debido a mutaciones en el gen BTK que codifica para una tirosina quinasa específica de células hematopoyéticas. Es

la transición de pro-B a célula pre-B la afectada en esta patología. Defectos en componentes del receptor pre-B dan cuenta de un 7-10% de los pacientes con hipogamaglobulinemia congénita. La mayoría de estos pacientes tienen mutaciones en el gen que codifica para la región C de la cadena pesada μ de Ig, pero un número pequeño presenta mutaciones en el gen lambda 5 o en Igalpha. La expresión de estas proteínas está limitada al linaje B. Entre los blancos de la activación de los receptores pre-B o del receptor B se encuentran BTK y BLNK, este último gen mutado en dos pacientes con agamaglobulinemia. Todas estas mutaciones llevan a bloqueo de la maduración B en la transición pro-B a pre-B, lo que determina, salvo en algunos casos excepcionales, reducidos números o ausencia de LB circulantes.[89, 90]

A pesar de que en los diversos intentos de clasificación de los pacientes con IDCV mediante parámetros clínicos e inmunológicos se han presentado evidencias de malfuncionamiento T y B, los LB circulantes están generalmente en número normal o reducido pero no ausentes.

La inmunidad humoral implica la producción de Acs neutralizantes de alta afinidad. Como ya hemos visto, estos Acs son generados en los CGs de los órganos linfoides secundarios de manera dependiente de Ag y del LT. Anormalidades en el proceso de maduración de los Acs causa inmunodeficiencias de la célula B. Una de ellas es el síndrome de HIGM, en el cual los niveles de IgM son normales o elevados y las IgG, IgA e IgE están ausentes o presentes en pequeñas cantidades, indicando un defecto en

el proceso de CSR. Esta IDP es genéticamente heterogénea, dado que diferentes defectos moleculares resultan en HIGM. La forma ligada al cromosoma X está causada por mutaciones en el gen que codifica para CD40 ligando (CD40L). Mutaciones en el receptor de CD40L (CD40) generan también HIGM. CD40L se expresa en LT activados y su interacción con CD40, constitutivamente expresado en LB, es requerida para la diferenciación terminal de la célula B en los CGs de los órganos linfoides secundarios.[64, 65]

CD40 está también expresada en monocitos y en DCs y la interacción CD40L-CD40 es requerida para respuestas completas de la célula T. Los pacientes con deficiencia en CD40L y CD40 son por lo tanto proclives no sólo a infecciones bacterianas, como en otras deficiencias del LB, sino también a infecciones por patógenos oportunistas. Otra forma de HIGM ligada al X, se asocia con displasia ectodérmica anhidrótica y es causada por mutaciones en el gen que codifica para el modulador esencial del factor nuclear κB (NEMO) requerido para la activación del factor de transcripción NF-κB, inducida por CD40.[91] Estas patologías en las cuales una defectuosa CSR se asocia con una generación alterada de SHM demuestran el rol esencial de la vía de activación por CD40 en estos dos eventos de maduración de Acs. Un defecto específico de la célula B, responsable de susceptibilidad sólo a patógenos bacterianos, ha sido identificado en HIGM de transmisión autosómica recesiva. Ésta es causada por mutaciones en el gen que codifica para AICDA, que se expresa sólo en LB que

realizan CSR o SHM *in vivo*, en los CGs. Los estudios en HIGM revelaron el papel central de AICDA en ambos procesos, CSR y SHM, uniendo estos dos eventos por primera vez. Estudios en pacientes con mutaciones en el gen que codifica para uracil N-glicosilasa (UNG) aportan nuevos conocimientos en los mecanismos de CSR y de SHM. Otros tipos de HIGM han sido molecularmente definidos (PMS2, Msh5, Msh6, etc) pero otros aún quedan por dilucidar y podrían ser causados probablemente por un defecto en la reparación de ADN específico de CSR.[92-94]

Por último, un fenotipo similar a IDCV, en cuanto a la presencia fundamental de una hipogamaglobulinemia, también ha sido descripto en pacientes varones con mutaciones en el gen que codifica para SH2D1A o SAP, responsable del síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP).[95]

Objetivos.

En base a lo expuesto en la introducción, entendemos que los pacientes con IDCV resultan un buen modelo experimental para el estudio de la biología del LB humano ya que además de ser la IDP humoral más frecuente, posee un número considerable de LB en sangre periférica sin ser capaces de producir Acs protectores. En este contexto es posible que un defecto genético asociado a la sobrevida, la diferenciación y/o las interacciones inmunes de los LB sea el responsable de la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo estos mecanismos han sido hasta el momento poco explorados en estos pacientes.

Se proponen como objetivos generales de esta tesis:

- ➔ *Dilucidar defectos biológico-funcionales intrínsecos al LB en las formas de comienzo pediátrico de IDCV.*

- ➔ *Correlacionar los datos obtenidos con el perfil clínico, evolución y pronóstico de los pacientes.*

- ➔ *Definir nuevos subgrupos de pacientes pediátricos con IDCV sobre la base de los estudios funcionales realizados, que permitan orientar en futuros estudios de localización genética.*

- ➔ *Evaluar la relevancia de nuevas mutaciones encontradas mediante estudios moleculares y funcionales.*

Materiales y Métodos.

1. Reactivos utilizados

a. Tampón de lisis de glóbulos rojos (RCLB). La solución se preparó con 5 ml de Tris-HCl 2M pH 8; 5 ml de $MgCl_2$ 1 M; 2 ml NaCl 5 M y se llevó a volumen final de 1 litro con agua destilada.

b. Tampón de lisis de glóbulos blancos (WCLB). Para una solución de 50 ml se utilizaron 0,25 ml de Tris-HCl 2 M; 1 ml de EDTA 0,5 M pH 8; 0,5 ml de NaCl 5 M; 1 ml de SDS 10% y se llevó a volumen con agua destilada.

c. Tampón fosfato salino (PBS). Solución preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na_2HPO_4 0,078 M y KH_2PO_4 0,015 M; pH=7,4. Las marcaciones de células con Acs para evaluación por citometría de flujo se realizaron con PBS con 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA) de Weiner Laboratorios (Santa Fé, Argentina)

d. Solución de Turk para el recuento de células. La solución se preparó con 100 mg de violeta de genciana, 31,25 ml de ácido acético glacial y se llevó a 500 ml con agua destilada. Para el recuento de células se realizaron diluciones de esta solución y se contó en cámara de Neubauer.

e. Medios de cultivo. Para el cultivo de células humanas o líneas B linfoblastoides se utilizó RPMI 1640-GlutaMAX 1X (Gibco) al que cada 500 ml se le agregaron 5 ml de Hepes 1M (Sigma); 5 ml de Piruvato de sodio 100 X (Gibco); 5 ml de antibiotic-antifungy 100 X (Gibco) y 20% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) en

el caso de medio completo, mientras que 10% de SFB en el caso de las activaciones celulares.

Para el caso de los cultivos bacterianos se utilizó el medio Luria-Bertani (mLB) que se preparó con 10 g de triptona (Becton, Dickinson), 5 g de extracto de levadura (Becton, Dickinson), 10 g de NaCl y se llevó con agua destilada a un volumen final de 1 litro, para el caso del medio líquido; mientras que para el medio sólido se agregaron además 16 g de bacto-agar (Becton, Dickinson).

f. Medios de congelamiento. Se utilizó un medio 2X compuesto por 55% de RPMI-1640 GlutaMax 1X (Gibco), 15% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma) y 30% de SFB (Gibco). Al momento de congelar las células se diluyó 1: 2 con medio completo RPMI 20% SFB.

g. Soluciones utilizadas para extracción de ADN plasmídico.

Solución 1. 50 mM de glucosa; 25 mM de Tris-Cl pH 8 y 10 mM de EDTA pH 8

Solución 2. 0,2 N de NaOH (diluida en el momento de un stock 10N) y 1% de SDS

Solución 3. 60 ml de Acetato de potasio 5M; 11,5 ml de ácido acético glacial y 28,5 ml de agua destilada

h. Soluciones utilizadas para geles SDS-PAGE.

Tampón para el gel separador Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. La solución se preparó con 18,17 g de Tris-base (Bio Basic) que se disolvieron en 80 ml de agua destilada luego de lo cual se ajustó el pH a 8,8 con HCl concentrado y se llevó a volumen final de 100 ml**.**

Tampón para el gel concentrador Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. La solución se preparó con 6,05 g de Tris-base (Bio Basic) que se disolvieron en 80 ml de agua destilada luego de lo cual se ajustó el pH a 6,8 con HCl concentrado y se llevó a 100 ml de volumen final.

SDS al 10%. Se pesaron 10 g de SDS que se disolvieron en 80 ml de agua destilada y luego se llevó a volumen final de 100 ml. Debido a que el SDS precipita si la temperatura ambiente es inferior a 18 ºC se calentó ligeramente la solución para favorecer la disolución.

Persulfato amónico (APS) al 10%. Se pesó 1 g de APS y se disolvió en 8 ml de agua destilada, posteriormente se llevó a 10 ml de volumen final. Una vez preparados los10 ml se prepararon alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se conservaron a -20ºC hasta su uso.

Gel separador al 13% de acrilamida en tampón Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8. Se preparó pipeteando las diferentes soluciones en el siguiente

orden: 2,5 ml de Tris HCl 1,5 M pH 8,8; 0,1 ml de SDS 10%; 4,3 ml de acrilamida/bisacrilamida 30%; 0,05 ml de APS 10%; 0,005 ml de TEMED y se llevó a 10 ml de volumen final con agua destilada.

Gel concentrador al 3% de acrilamida en tampón Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8. Se preparó pipeteando las diferentes soluciones en el siguiente orden: 2,5 ml de 0,5M Tris HCl pH 6,8; 0,1 ml de SDS 10%; 1 ml de Acrilamida/bisacrilamida 30%; 0,1 ml de APS 10%; 0,005 ml de TEMED y se llevó a volumen final de 10 ml con agua destilada.

Tampón de la muestra. La solución se preparó con 1 ml de Tris HCl 0,5M pH 6,8; 0,8 ml de Glicerol; 1,6 ml de SDS 10%; 0,4 ml de Azul de Bromofenol 1%; 0,4 ml de 2-mercaptoetanol y 3 ml de agua destilada. Se debe preparar inmediatamente antes de usar. Alternativamente se puede preparar y mantener a temperatura ambiente, sin el 2-mercaptoetanol, y añadir éste inmediatamente antes de su uso.

Tampón de electroforesis Tris-Glicina pH 8,3. Se preparó una solución 10 X que se diluyó 1: 10 al momento de su uso. Cada 1 litro de solución se colocaron 30 g de Tris base (Bio Basic); 144 g de glicina; 10 g de SDS; se disolvió en 800 ml de agua destilada, se ajustó el pH y se llevó a volumen final.

Tampón de tinción azul de Coomassie. Para teñir los geles se preparó la solución con 1 g de azul de Coomassie R-250; 100 ml de Ácido acético; 400 ml de metanol y se llevó a 1 litro con agua destilada.

Solución decolorante de geles. Se preparó con 100 ml de ácido acético; 400 ml de metanol y se llevó a 1 litro con agua destilada.

Tampón de lisis A. Solución preparada en 50 ml en agua destilada con 50 mM de Tris HCl pH 7,4; 150 mM de NaCl; 1 mM de EDTA; 1 mM de EGTA; 5 mM de $MgCl_2$; 0,5% de Tritón X100 y 0,2 mg/ml de BSA. Al momento de usar se le agregaron inhibidores de proteasas (Halt Protease Inhibitor Cocktail, 100X, Thermo Scientific).

i. Soluciones utilizadas para ELISA.

Tampón de revestimiento 10 X. Se disolvieron 53 g de Na_2CO_3 en 900 ml de agua destilada y luego se le agregaron 42 g de $NaHCO_3$, se ajustó el pH a 9,6 y se llevó a 1 litro de volumen final. Se filtró en filtros de 0,22 μg de poro. Al momento de usar se diluyó 1:10.

Tampón de bloqueo. Se preparó con PBS 1 % en BSA.

Tampón de lavado. Se preparó con PBS 0,1 % en Tween 20

Solución de frenado. H_2SO_4 1 M

j. Soluciones para western blot. Se utilizaron las soluciones NuPAGE MES 1X running buffer, NuPAGE transfer buffer y TNE buffer (Invitrogen), que se prepararon como indica el protocolo provisto.

k. Soluciones para purificación de proteínas recombinantes.

Tampón de lisis B. Se preparó la solución con 21,13 ml de HPO_4^{-2} 1M; 3,88 ml de $H_2PO_4^-$ 1 M; 50 ml de NaCl 5 M; 0,68 g de imidazol, se ajustó el pH a 7,6 y se llevó a volumen de 500 ml. Al momento de usar se disuelve una pastilla de EDTA (Roche) cada 50 ml de solución.

Tampón de extracción (fosfato 50 mM NaCl 500 mM EDTA 50 mM pH 7). Se preparó la solución con 21,13 ml de HPO_4^{-2} 1M; 3,88 ml de $H_2PO_4^-$ 1 M; 50 ml de NaCl 5 M; 5 ml de EDTA 5 M, se ajustó el pH a 7 y se llevó a volumen de 500 ml.

Tampón de siembra (Fosfato 50 mM NaCl 500 mM Imidazol 20 mM pH 7,6). Se preparó la solución con 21,13 ml de HPO_4^{-2} 1M; 3,88 ml de $H_2PO_4^-$ 1 M; 50 ml de NaCl 5 M; 0,68 g de imidazol, se ajustó el pH a 7,6 y se llevó a volumen de 500 ml.

Tampón de elución (Fosfato 50 mM NaCl 500 mM Imidazol 500 mM pH 7,6). Se preparó la solución con 10,56 ml HPO_4^{-2} 1M; 1,94 ml de

$H_2PO_4^-$ 1 M; 25 ml de NaCl 5 M; 8,51 g de imidazol, se ajustó el pH a 7,6 y se llevó a volumen de 250 ml

Tampón final (Tris 25 mM NaCl 300 mM pH 8). Se preparó la solución con 25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8,5 y 60 ml de NaCl 5 M, se ajustó el pH a 8 y se llevó a volumen final de 1 litro.

l. Tampón para electroforesis en geles de agarosa, TAE 50X. Solución preparada con 242 g de Tris base (Bio Basic); 57,1 ml de ácido acético glacial; 100 ml de EDTA y se llevó a volumen final de 1 litro con agua destilada. Al momento de usar se realizó una dilución 1:50.

2. Cohorte de pacientes y controles.

Este trabajo se llevó a cabo con muestras de sangre periférica de 41 pacientes pediátricos pertenecientes a 41 familias no relacionadas, seguidos por los médicos inmunólogos del Servicio de Inmunología y Reumatología del Hospital Garrahan y del Hospital Vilela de Rosario, Santa Fé. Todos fueron diagnosticados con probable IDCV de acuerdo a los criterios diagnósticos de la ESID.[88] En todos los casos los pacientes y sus familiares o personas a cargo fueron informados acerca de los objetivos de este estudio y firmaron un consentimiento informado en acuerdo con la Declaración de Helsinki. El proyecto de investigación se encuentra aprobado por el comité de ética interno del Hospital Garrahan.

Por otro lado, las muestras de sangre periférica de donantes sanos pertenecen a pacientes que se tratan en el área clínica del Hospital Garrahan y poseen edades similares a la de nuestro grupo de pacientes con IDCV. En todos los casos, los donantes fueron informados del propósito de este estudio y, previo a la extracción de la muestra, proporcionaron un consentimiento en virtud de un protocolo de ética independiente para donantes sanos.

3. Aislamiento de leucocitos totales, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y B naïve .

A partir de muestras de sangre periférica extraídas sobre EDTA de pacientes, familiares y donantes sanos, se aislaron los distintos tipos de células a utilizar en los diferentes ensayos realizados.

Para el aislamiento de leucocitos totales se diluyeron las muestras con dos volúmenes de RCLB en tubos falcon de 15 ml estériles y se centrifugaron a 400 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, se desarmó el pellet y se resuspendió nuevamente en 15 ml de RCLB. Se repitió el paso de centrifugación, descarte del sobrenadante y resuspención en RCLB tantas veces como fuese necesario para eliminar todos los glóbulos rojos, observando un pellet blanco correspondiente a los leucocitos totales. Finalmente el pellet de leucocitos se resuspendió en la solución adecuada al ensayo que se realizaría posteriormente.

Para aislar las PBMC, se diluyeron 10 ml de sangre periférica con un volumen de PBS. En un tubo falcon de 50 ml estéril se colocaron 10 ml de Ficoll-Hypaque plus (GE Healthcare) y suavemente con pipeta se colocó la sangre diluida en la parte superior del Ficoll Hypaque. Se centrifugó a 450 g durante 20 min y se colectaron las PBMC de la interface PBS/ficoll con pipeta, transfiriéndolas a un tubo falcon de 15 ml estéril que se llevó a 15 ml con PBS. Para el lavado se centrifugaron las células a 400 g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 15 ml de PBS. Se repitió 2 veces más el paso de lavado para obtener las PBMC aisladas que se resuspendieron en medio completo RPMI 20% SFB o en la solución indicada de acuerdo al ensayo que se realizaría posteriormente.

Los LB naïve IgD^+ se aislaron a partir de PBMC mediante la utilización MACS (Naïve B Cell Isolation Kit II, human, Miltenyi Biotec).

4. Análisis por citometría de flujo de subpoblaciones de LB de sangre periférica

Para la cuantificación de las subpoblaciones de LB, se analizaron por citometría de flujo estándar de tres colores, muestras de sangre periférica extraídas sobre heparina de los pacientes y sus familiares. La tinción se realizó usando los siguientes Acs monoclonales a concentraciones óptimas: anti-CD27-PE (BD), anti-CD19-PC5 (Beckman Coulter, IOTest), anti-IgM-FITC (BD Pharmingen), anti-IgD FITC-(BD Pharmingen), anti-IgG-PE (BD Pharmingen). La adquisición de muestras se realizó

en un citómetro FACSort (BD), y los datos se analizaron con el software Cell Quest (BD). Los porcentajes de las subpoblaciones de LB ($CD27^-IgD^+$, $CD27^+IgD^+$, $CD27^+IgD^-$, IgM^+ e IgG^+) se refirieron a la ventana de linfocitos $CD19^+$. Los valores de referencia pediátricos para las distintas subpoblaciones de LB, obtenidos en laboratorio de inmunología celular del Hospital Garrahan, se utilizaron para comparar con el grupo de IDCV. Para la detección de TACI, se aislaron PBMC y se tiñeron alícuotas con anti-TACI-PE (R & D Systems), anti-BAFF-R-FITC (R & D Systems); anti-CD19-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences) y anti-CD27-APC (BD Biosciences) y se analizaron por citometría de flujo de cuatro colores. Se adquirieron al menos $1x10^5$ células en un citómetro FACS Canto II, se analizó mediante el software FACSDiva y los porcentajes de BAFF-R, TACI y expresión de CD27 se analizaron en linfocitos $CD19^+$.

5. Extracción de ADN, ARN y síntesis de ADNcopia

Para la ***extracción de ADN*** se utilizó el método de precipitación salina, las células aisladas se resuspendieron en 600 µl de WCLB con 10 µl de Proteinasa K (20 mg/ml, Invitrogen), se vortexeó la solución por 2 min y se incubó a 56 ºC ON. Posteriormente se agregaron 380 µl de NaCl 5 M, se vortexeó 1 min y se centrifugó a 12000 g durante 30 min. El sobrenadante (1 ml) se traspasó con pipeta a un falcon de 15 ml estéril conteniendo 2 ml de etanol 100% frío, se mezcló por inversión y se centrifugó la solución en eppendorf de 1,5 ml a 12000 g por 5 min. Se descartó el

sobrenadante y el pellet de ADN se lavó dos veces con etanol 70%. Luego se extrajo todo el etanol con pipeta, se dejó secar el pellet durante 15 min a temperatura ambiente y se resuspendió el ADN con 200 µl – 800 µl de agua destilada estéril, dependiendo de la muestra. La concentración y pureza de ADN se midió por absorbancia 260/280 en Nano Drop (Invitrogen).

Para la ***extracción de ARN*** se utilizó el método de extracción por TRIzol (Invitrogen). Las células aisladas se resuspendieron en 1 ml de TRIzol (cada 1-10 x 10^6 células totales, mientras que si fuesen menos de 10^6 células se utilizó 0,8 ml y se ajustaron todos los volúmenes siguientes), se homogeneizó con pipeta y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. El lisado resultante se pasó a un eppendorf de 1,5 ml estéril y se agregaron 200 µl de cloroformo, se vortexeó 15 seg y se incubó 3 min a temperatura ambiente, centrifugando luego por 10 min a 12000 g a 4 ºC. La fase acuosa se transfirió a un eppendorf estéril conteniendo 800 µl de isopropanol frío, se mezcló por inversión, se incubó en hielo durante 15 min y se centrifugó por 15 min a 12000 g a 4 ºC. Se descartó el sobrenadante con pipeta y el pellet de ARN se lavó dos veces con 1 ml de etanol 75%, centrifugando a 7500 g durante 5 min en cada lavado. Se descartó el sobrenadante con pipeta, se dejó secar el pellet por 5 min a temperatura ambiente y se resuspendió con pipeta en 30 µl de agua DEPC. La concentración y pureza del ARN se midió por absorbancia 260/280 en Nano Drop (Invitrogen).

Una vez obtenido el ARN, el ***ADNcopia*** (ADNc) se preparó mediante una reacción de transcripción reversa utilizando la enzima SuperScript II (Invitrogen), 100 ng - 1 μg de ARN, OligodT (GE Healthcare) y dNTP's (Invitrogen). Las condiciones de reacción fueron las recomendadas por el protocolo de la enzima.

6. Ensayo de SHM mediante corte por enzimas de restricción en hot spot de Igκ

A partir de ADNc de pacientes y donantes sanos, se amplificó mediante PCR utilizando primers acoplados a fluorocromos, la región variable VκA27 de la C_L kappa de Igs (Fw TET-coupled 5'- CAGAGGGAACCATGGAAA-3'; Rev FAM-coupled 5'-CCACTGCCACTGAACCTGT-3').[96] Se utilizó la enzima Taq Gold (Biosystem) y las condiciones de ciclado fueron: 94 ºC durante 2 min; 35 ciclos de 94 ºC 1 min, 52 ºC 1 min y 72 ºC 1 min; con una elongación final a 72 ºC durante 10 min.

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa 1,5% (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) con bromuro de etidio (Merk), junto a marcadores de peso molecular (Invitrogen) y se evidenció al UV la presencia de una banda de 271 pb correspondiente a VκA27, así como también la ausencia de una banda de posible contaminación por ADN genómico (ADNg) de 458 pb.

El producto de PCR de 271 pb fue digerido por la enzima de restricción *Fnu*4HI (Fermentas) que reconoce 3 sitios (GCNGC), uno en el péptido señal y dos

adyacentes en el CDR1 de la región variable (AGCAGCAGC) (Ver Figura 10). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 5 – 7 µl de producto de PCR, 2 µl Buffer G 10X, 5 U de *Fnu*4HI y agua c.s.p. 20 µl se incubaron a 37 °C ON. En paralelo se realizó una digestión control utilizando 5,0 U de la enzima *Dde*I (Fermentas) en lugar de *Fnu*4HI para evidenciar ADNg que pueda contaminar el ADNc, lo que quedaría revelado por la presencia de un fragmento fluorescente acoplado a FAM de 131 pb. Durante todo el estudio no se observó contaminación de ADNg.

Los fragmentos resultantes del corte por enzimas de restricción se corrieron por electroforesis capilar en el secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) y se analizaron con el software de análisis de fragmentos Gene Mapper Software (Applied Biosystem).

7. Ensayo de SHM en IgH mediante multiprimers

Se utilizaron las master mix Hypermutation Mix 1 e Hypermutation Mix 2 de InVivoScribe (Tecnolab) y el ensayo se llevó a cabo en ADNc en muestras de pacientes y donantes sanos de acuerdo a las especificaciones de manufactura del producto.

Los fragmentos resultantes de la amplificación por PCR se corrieron por electroforesis capilar en el secuenciador ABI 3130 (Applied Biosystems) y se analizaron con el software de análisis de fragmentos Gene Mapper Software (Applied Biosystem).

8. Clonado, secuenciación y alineamiento de regiones Smu-Salpha

A partir de ADN extraído de leucocitos totales o PBMC de pacientes y donantes sanos, se amplificaron las regiones switch Sμ-Sα mediante una reacción de PCR nested previamente descripta.[97] Los productos obtenidos se corrieron en geles de agarosa 1 % (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) con bromuro de etidio (Merk) junto con marcadores de peso molecular (Invitrogen) y se purificaron por columnas de gel (GE Healthcare, PCR purification kit). Se clonaron 3 μl de producto purificado en 25 ng de vector pGEMT (Invitrogen), y la reacción de ligación se llevó a cabo a 4 ºC ON.

Se ***transformaron bacterias E.coli XL1 Blue electrocompetentes*** con los productos de ligación. El protocolo de electroporación fue el siguiente: 3 μl del producto de ligación se pipetearon en eppendorf conteniendo 40 μl de bacterias competentes y se dejó reposar en hielo durante 3 min, se traspasó la suspensión bacteriana a una cuba de electroporación y se dio un pulso de 500 V durante 8 mseg. Inmediatamente se agregaron 500 μl de mLB líquido y se traspasó la suspensión a un eppendorf estéril que se colocó en estufa a 37 ºC con agitación (200 rpm) durante 1 hs. Posteriormente se sembraron 100 μl de la suspensión en placas con mLB sólido

con ampicilina (100 ng/ml), 10 µl de IPTG 1 M (Tecnolab) y 40 µl de X-Gal 20 mg/ml (Merk). Se colocaron las placas en estufa a 37 ºC ON. Al día siguiente se repicaron 25 colonias blancas de cada placa en falcon de 15 ml conteniendo 2 ml de mLB líquido con ampicilina 100 mg/ml) y se colocaron en estufa a 37 ºC con agitación (200 rpm) ON. Se traspasaron los cultivos a eppendorf de 2 ml, se centrifugó 5 min a 12000 g y se descartó el sobrenadante.

Al pellet bacteriano obtenido se lo sometió a ***extracción de ADN plasmídico (ADNp)***, para ello se resuspendió en vortex con el agregado de 100 µl de la solución 1, se adicionaron 200 µl de la solución 2, se mezcló por inversión 15 veces y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 150 µl de la solución 3, se mezcló por inversión 15 veces y se dejó reposar otros 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g 5 min y 400 µl del sobrenadante se traspasaron a un tubo eppendorf de 1,5 ml conteniendo 800 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 g durante 5 min, descartando el sobrenadante con pipeta. El pellet de ADNp se lavó dos veces con etanol 75%, se descartó todo el etanol con pipeta, se dejó secar durante 15 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 µl de agua destilada estéril con 1 µl de RNasa A 10 mg/ml (Sigma).

El ADNp obtenido de cada colonia se secuenció con primer T7 (Invitrogen) y los productos de secuenciación se corrieron en el secuenciador ABI 3130 (Applied

Biosystem) y se analizaron con el software de análisis de secuencias de ADN (PE Applied Biosystem). Las regiones switch Sμ-Sα se determinaron mediante la alineación de nuestras secuencias con las Sμ (X54713) y Sα1 (L19121) o Sα2 (AF030305) del banco de datos del NCBI.

9. Generación de líneas B linfoblastoides

Las líneas de células B linfoblastoides fueron generadas en el laboratorio a partir de PBMC de pacientes y donantes sanos. Para ello se colocaron en botellas de cultivo T-25, al menos 1 x 10^6 PBMC resuspendidas en 1 ml de medio completo RPMI 20% SFB junto a 1 ml del sobrenadante obtenido de cultivos de la línea celular de mono B 95/8 y se cultivaron durante 2 hs a 37 ºC. Luego se agregó al cultivo 2 ml de medio completo RPMI 20% SFB y ciclosporina A a una concentración final de 2 μg/ml (Sigma). Se dejó en cultivo durante 1 semana en estufa a 37 °C, se retiró 1 ml del sobrenadante y se lo reemplazó por 1 ml del sobrenadante obtenido de cultivos de la línea celular de mono B 95/8 con ciclosporina A fresca.

Luego de 2-3 semanas de cultivo en estufa a 37 °C, el medio de cultivo comenzó a tornarse ácido y se empezaron a observar agrupamientos macroscópicos de células, momento en el cual se amplificaron las células dividiendo el cultivo en dos y adicionando 2 ml de medio completo RPMI 20% SFB fresco.

Por último, las líneas celulares se congelaron con medio de congelamiento en alícuotas de 1 ml conteniendo 2 – 10 x 10^6 células.

10. Primers y condiciones utilizados para PCR, RT-PCR y/o qRT-PCR

En los análisis moleculares realizados en ADNc de los pacientes IDCV y controles sanos para los genes *Btk*; *CD40L; CD40; UNG; SAP y TACI* se utilizaron los siguientes juegos de primers

Primer Fw (5'-3')	*Primer Rev (5'-3')*
Btk1-13 CAG TGT CTG CTG CGA TCG AG	*CAG TGG AAG GTG CAT TCT TG*
Btk11-19 TCA TTG TCA GAG ACT CCA GC	*TTG CTC AGA AGC CAC TAT CC*
CD40L GCC AGA AGA TAC CAT TTC AAC	*CCG CTG TGC TGT ATT ATG AA*
CD40 GTG GTC CTG CCG CCT GGT CTC	*GCT CCA GGG TGA AGT GAG AG*
UNG CAG CTC CAG GAT GAT CGG CCA	*ATT CCT GGA CAG CCT GGT TC*
SAP GTT GAC TTG TGC CTG GCT GC	*ATT TGT AGC TCA CCG AAC TG*
TACI AGC ATC CTG AGT AAT GAG TGG	*AGA TAG AGC AGG AGG TCG G*

Las condiciones de amplificación fueron: 94 ºC durante 2 min, 35 ciclos de 94 ºC 1 min, TA ºC 1 min y 72 ºC 1 min 30 seg, con una elongación final de 10 min a 72 ºC. Donde TA es la temperatura de alineamiento que fue de: 52 ºC a excepción de *TACI* que fue de 63 ºC.

Para los análisis moleculares realizados sobre ADNg de pacientes y controles para los genes *AICDA, TACI* y *UNG* se utilizaron los siguientes juegos de primers

Primer Fw (5'-3')	***Primer Rev (5'-3')***
AICDA	
Ex1 ACT GAG ACA GAG AAC CAT CA	*GAG CAA ATC TGA GTA ATG AG*
Ex2 GAG TTT GAG GTA CAA GTT GGA CAC	*GTC AGC TTT GCA AGC AGT TTA ATG*
Ex3 TAG CGT GGT CCT CTC TGT CT	*AGC AGC CCG CAT TCG GGA TT*
Ex4 TTT GGA ACC TGA ACT GTC TT	*CTC TAC AGT CTT TTT TGG AG*
Ex5 CCA ACC TCG TTT TGA AGC CA	*GGA CCT CCT AAT GAG AGT ATC*
TACI	
Ex1 GCC CGG CAG GCC TTC CAC T	*CCT CTG GGA TGT GGG GCT TGC*
Ex2 GCC CCA GGC CCC TAG CAA GTG	*TGA GGA AAG GGT GGC AGG AGG AGA*
Ex3 GGC TTA CTC TGG AAT TGC CTT CT	*AGT CCA AGC AAA TGG CCA GAA G*
Ex4-5 CCA GCC TCT CCA GGA GCC AGA C	*GAT AGA GCA GGA GGT CGG GGC A*
UNG	
Ex1 CAG CTC CAG GAT GAT CGG CCA	*CGG AGG GCG TGC AGG ATC*
Ex7 ATG TTC TAA TGC AAA TGC TGA ATG	*GAA CCA GGC TGT CCA GGA A*

Las condiciones de amplificación fueron: 94 ºC durante 2 min, 35 ciclos de 94 ºC 1 min, 60 ºC 1 min y 72 ºC 30 seg, con una elongación final de 5 min a 72 ºC.

Los primers y condiciones de PCR efectuados para la amplificación de los 15 exones del gen *PMS2* fueron los mismos a los descriptos en publicaciones previas.[98, 99] En el

caso de *Cadena μ*, los 5 exones se amplificaron utilizando las condiciones de PCR previamente descriptas.[100]

En todos los casos se secuenciaron los fragmentos obtenidos con los primers utilizados para la reacción de PCR, luego de haber chequeado los productos obtenidos en geles de agarosa 1,5% (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) con bromuro de etidio (Merk) y purificado los mismos por columnas de gel (GE Healthcare, PCR purification kit). Las secuencias obtenidas se analizaron en los secuenciadores ABI 310 o ABI 3130 (Applied Biosystem) y se analizaron con el software de análisis de secuencias de ADN (PE Applied Biosystem).

Para la amplificación por RT-PCR o qRT-PCR de los transcriptos *GLTγ1* (*Iγ1-Cγ1*), *CTγ1* (*Iγ1-Cμ*), *CTε* (*Iε-Cμ*), *AICDA*, *ACTB* (beta-actina) y *GAPDH* se utilizaron las condiciones y primers descriptas previamente.[70, 101] En el caso de la cuantificación por qRT-PCR los resultados se normalizaron al ADNc de *ACTB* y se presentan como expresión relativa (RE) resultante de la comparación con las células sin activar (Control).

11. Activación de PBMC, B naïve y líneas B linfoblastoides vía CD40, TACI y TLR9

Para los ensayos de activación de PBMC, LB naïve o líneas B linfoblastoides, se incubaron 2 x 10^6 células en placas de 6 pocillos (Trading New Technologies S.A.) con

2 ml de medio RPMI 10% SFB en presencia y/o ausencia de 1 μg/ml de anti-TACI mAB 11H3 (eBioscience); 500 ng/ml de anti-CD40 (PeproTech); 500 ng/ml de APRIL MegaLigand (Alexis); 200 U/ml de IL-4 (Schering-Plough); 50 mg/ml de IL-10 (Peprotech) dependiendo del ensayo. El Ac anti-TACI fue reticulado con 1 μg/ml de un mAb de ratón anti-11H3 conjugado con biotina (eBioscience) y microesferas magnéticas anti-biotina (Miltenyi). Una estrategia similar se siguió para la reticulación de anti-CD40 utilizando 1 μg/ml de un mAb de ratón (Schering-Plough). Se utilizó como control un mAb de IgG1 de ratón con actividad irrelevante (Santa Cruz Biotechnology). TLR9 se activó con 5 μg/ml de un fosforotioato modificado 5'-tcgtcgttttgtcgttttgtcgtt-3' oligo desoxi nucleótido-2006 (CpG-ODN, Operon Technologies).

Para los ensayos donde se midió la activación de los *GLTγ1, AICDA* y *CTγ1*, las líneas B linfoblastoides y las PBMC fueron cultivadas durante 2 y 4 días, respectivamente, luego de lo cual se procedió a la extracción de ARN de las mismas.

Para los ensayos donde se midió la producción de IgG de los LB naïve , las células se cultivaron durante 7 días, luego de lo cual se extrajo el sobrenadante al que se le realizó el ensayo de ELISA.

En el ensayo para la determinación de CD40 subóptimo, 2 x 10^6 células de líneas B linfoblastoides de donantes sanos se cultivaron en placas de 6 wells con 2 ml de RPMI 10% SFB y se activaron con diferentes concentraciones de anti-CD40

(PeproTech) (500 ng/ml, 100 ng/ml, 75 ng/ml, 50 ng/ml y 0 ng/ml) y 50 mg/ml de IL-10 (Peprotech) durante 2 días, luego de lo cual se extrajo ARN y se midió activación de *AICDA* por qRT-PCR. Se determinó como subóptima la concentración de 75 ng/ml que fue utilizada para los ensayos en líneas B linfoblastoides de pacientes IDCV y donantes sanos.

12. Análisis bioinformáticos

Para el estudio de nuevas mutaciones en *TACI*, se utilizó el PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) que es un método bioinformático que predice el posible impacto de una sustitución de aminoácidos en la estructura y función de una proteína humana mediante el uso de consideraciones físicas y comparativas. El resultado se da como una puntuación resultante para el cambio en la proteína como " probablemente benigna" (0,00-1,50),"posiblemente dañina" (1,51 a 2,00), y "probablemente dañina" (> 2,01).

13. Extracción de proteínas, SDS-PAGE y western blots

Para la obtención de proteínas a utilizar en los diferentes geles para western blots, se lisaron las células humanas o líneas celulares con buffer de lisis A incubando la suspensión durante 30 min a 4 °C con agitación. Se centrifugó el lisado durante 20 min a 12000 g a 4 °C en tubos eppendorf de 1,5 ml de manera de remover el debris celular. Se transfirió el sobrenadante (extracto celular) a un nuevo tubo y se

cuantificaron las proteínas utilizando BSA Protein Assay kit, Reagent ABC (Thermo Scientific).

Para western blots se utilizaron geles 12% NuPAGE bis tris de 10 calles (Invitrogen). Se sembraron las muestras (previamente se ajustó la cantidad de proteína a sembrar con PBS y 7,5 μl de tampón de muestra) junto con marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color, Bio-rad) y se corrieron utilizando NuPAGE MES 1X running buffer (Invitrogen) durante 60 min a 125 V. Para la transferencia se utilizaron membranas PVDF 0,2 μm (Invitrogen) y papel watman, la corrida se realizó con NuPAGE transfer buffer (Invitrogen) durante 60 min a 30 V. Las membranas se bloquearon luego con TNE buffer 1X (Invitrogen) 0.05% Tween 20 con 5% de leche descremada, incubando a 4 °C ON. Se lavaron dos veces con TNE buffer 1X 0.05% Tween 20. Luego se incubaron las membranas con diluciones de diferentes Acs primarios dependiendo del western blot a realizar (Acs monoclonales de ratón anti-TACI (eBiosciense) 1:400; anti-MyD88 (Millipore AB16527) 1:300; o anti-actina 1:500 (Santa Cruz)) en TNE buffer 1X 0.05% Tween 20 con 3% BSA y se incubaron a 4 °C ON con agitación.

Se realizaron tres lavados de 15 min con agitación en TNE buffer 1X 0.05% Tween 20 y se incubaron las membranas con una dilución 1:5000 de Ac anti-mouse IgG ligado a peroxidasa (GE Healthcare) en TNE buffer 1X 0.05% Tween 20 con 1% de leche descremada durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación.

Se realizaron tres lavados de 15 min con agitación en TNE buffer 1X 0.05% Tween 20 y un lavado final con TNE 1X. Se revelaron las membranas utilizando ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Ge Healthcare) y placas radiográficas con diferentes tiempos de exposición (30 seg, 1 min, 3 min y 10 min).

Para la detección de TACI recombinante se utilizaron geles SDS-PAGE al 13% preparados en el laboratorio. Las proteínas se sembraron utilizando el tampón de muestra junto a marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color, Bio-rad) y se corrieron utilizando el tampón de electroforesis Tris-Glicina pH 8,3 durante 60 min a 100 V. Los geles se tiñeron posteriormente con el tampón de tinción azul de Coomasie y se decoloraron con la solución decolorante de geles.

14. Análisis de inmunoglobulinas por ELISA

Para realizar los ELISA para la medición de IgG en el sobrenadante de cultivos celulares, se dispensaron 100 μl por pocillo de tampón de revestimiento 1X conteniendo 5 μg de Ac policlonal anti-IgG humana hecho en conejo (A0423, Dako) en placas de 96 pocillos (Immulon 4 HBX – Extra High Binding Plate/ Flat – bottom/ VWR#:62402-959). Se incubaron las placas a 4 °C durante 48 hs. Se lavaron 3 veces con tampón de lavado descartando el líquido con pipeta.

Se añadieron 100 µl por pocillo de tampón de bloqueo y se incubaron las placas durante 30 min con agitación. Se lavaron 3 veces con tampón de lavado, descartando el líquido con pipeta.

Se añadieron 100 µl por pocillo de la muestra a analizar y al menos 2 diluciones seriadas al medio de la misma. Al mismo tiempo, para luego trazar la curva estándar, se añadieron 100 µl por pocillo de un suero conteniendo IgG humana con concentración conocida (100 ng en el primer pocillo y diluciones seriadas al medio hasta completar los 12 pocillos de una tira de la placa, por duplicado). Se cubrieron las placas con papel film y se incubaron durante 1 hs a temperatura ambiente con agitación. Se lavaron 4 veces con tampón de lavado, descartando el líquido con pipeta.

Se dispensaron 100 µl por pocillo de tampón de lavado con una dilución 1:5000 de Ac policlonal anti-IgA, IgG, IgM, kappa y lambda humana acoplado a la enzima peroxidasa de rabanito hecho en conejo (P0212, Dako). Se incubaron las placas durante 1 hs a temperatura ambiente con agitación. Se lavaron 3 veces con tampón de lavado, descartando el líquido con pipeta.

Se añadieron 100 µl por pocillo TMB One-Step Substrate Reagent (Piercenet) y se incubaron las placas durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se añadieron 50 µl por pocillo de la solución stop. Se obtuvieron los resultados a través de un lector de ELISA para placas utilizando una absorbancia de 450 nm.

Con los datos de los pocillos conteniendo el estándar, se realizaron curvas de calibración de absorbancia vs ng/μl de proteína, a las que se les realizó regresión lineal. Los datos de las absorbancias de las muestras analizadas fueron interpolados en dicha curva para obtener la concentración de IgG producida.

15. Ensayo de unión a APRIL

En placas de 96 pocillos se colocaron 2 x 10^6 células a las que se les agregó 100 μl de PBS (control) o de APRIL MegaLigand unido a un Flag 300 ng/ml (Axxora) y se incubaron 40 min en hielo.

Se centrifugaron las placas 1 min a 12000 g, se descartó el sobrenadante y se lavó con PBS 2 veces. Se resuspendieron las células con 100 μl de Anti-Flag conjugado a Biotina 1 mg/ml (M2 Sigma). Se incubó 30 min en hielo, se lavó con PBS dos veces y se resuspendieron las células con 100 μl de PBS y 100 μl de streptavidina-PE. Se incubó 25 min en hielo, se lavó con 100 μl PBS, se resuspendieron las células en 200 μl de PBS final, se transfirieron a tubos para pasar las muestras por un citómetro FACSCalibur (BD), y los datos se analizaron con el software Flow Jo.

16. Microscopía confocal

Las células se resuspendieron en solución adhesiva para células según las instrucciones del fabricante (Crystalgen), a continuación, se aplicaron a portaobjetos (Gold Seal Products), se fijaron con paraformaldehído 1,6% (V/V) y se permeabilizaron con

Triton X -100 0,2% (V/V) en PBS. Las células permeabilizadas se tiñeron con los siguientes Acs policlonales primarios no conjugados o conjugados a biotina: anti-MyD88 de cabra (N-19), anti-TRAF2 de conejo (C-20), anti-TACI de ratón (11H3; eBioscience).

Los controles negativos fueron Acs primarios con actividad de unión irrelevante e incluyeron: la porción F(ab')2 conjugada a biotina de un Ac policlonal y Acs policlonales no conjugados de cabra, ratón o conejo (Santa Cruz Biotechnology).

Los reactivos secundarios incluyeron estreptavidina, anti-ratón conjugado a alexa Fluor 488 (A21202), anti-conejo conjugado a alexa Fluor 546 (A10040) o anti-cabra conjugado a alexa Fluor 647 (A21447), todos los Acs fueron policlonales de Molecular Probes. Los núcleos fueron visualizados con DAPI 4',6-diamidina-2'-fenilindol dihidrocloruro (Boehringer Mannheim). Los portaobjetos fueron sellados con cubreobjetos y reactivo FluorSave (Calbiochem). Las imágenes fluorescentes se generaron con un microscopio confocal Leica SP5 DMI vertical (Wetzlar) a través de la adquisición de al menos tres planos XY diferentes con un objetivo de 63X, una apertura numérica de 1,4 (Carl Zeiss) y con espaciamiento óptimo z (~ 0,016 micras). Las imágenes fueron construidas con una proyección máxima y se exportaron como imágenes etiquetadas 30-40 en formato de archivo de imagen. Se utilizó el software AutoQuant X2 AutoDeblur (Media Cybernetics) para todas las imágenes. Para la

transformación posterior se utilizó el programa Adobe Photoshop CS3 para Macintosh, versión 10 (Adobe Systems).

17. Clonado de TACI y elección del sistema de expresión

A partir de ADNc del paciente 28 y controles sanos, se amplificaron por PCR las secuencias de *TACI* de longitud completa, TACI-S231R y TACI-wt, respectivamente, utilizando los primers descriptos en el punto 9 de materiales y métodos. Las secuencias amplificadas se corrieron en geles de agarosa 1,5% (Ultra Pure Agarose, Invitrogen) con bromuro de etidio (Merk) y se purificaron por columnas de gel (GE Healthcare, PCR purification kit). Los productos purificados se clonaron en el vector pTARGET (Promega) con el que se transformaron bacterias XL1-Blue que se utilizaron para amplificar los clones positivos chequeados mediante secuenciación en ABI 3130 (Applied Biosystem). Luego se subclonaron las secuencias que codifican la región citoplasmática entre los residuos 187 y 292 en los vectores de expresión pQE-TrisSystem y pET29a (Invitrogen). Los productos de clonado se utilizaron para transformar mediante electroporación, las siguientes cepas de expresión BL21 pLys S (pET29a) y TOP 10 F´ (pQETriSystem), que se cultivaron en placas conteniendo mLB con kanamicina (25 μg/ml). Se repicaron las colonias positivas en mLB líquido con kanamicina, se cultivaron en estufa a 37 ºC ON y luego se extrajo el ADNp sobre el cual se chequeó la secuencia del inserto con ABI 3130 (Appplied Biosystem). (Nota: los procedimientos de transformación, electroporación y

extracción de ADN plasmídico fueron los mismos que los descriptos en el punto 7 de materiales y métodos)

Para definir el mejor sistema de expresión para las proteínas recombinantes, realizamos un cultivo en 500 ml de mLB líquido con kanamicina de cada cepa de expresión transformada. Se midió la DO cada 20 min y cuando llegó a 0,8 se tomó una alícuota de 10 ml a la que realizamos un spin para pelletera las células, descartamos el sobrenadante y congelamos el pellet celular (bacterias pre-inducción). El cultivo restante se indujo con IPTG 0,1 M durante 4 hs a 37 ºC con agitación, tras lo cual se centrifugó en falcon de 50 ml durante 15 min a 4 ºC a 4500 g, descartamos el sobrenadante y congelamos el pellet celular (bacterias post-inducción).

Las células bacterianas obtenidas pre y post inducción de cada cepa de expresión, se lisaron con 5 ml de tampón de lisis B cada gramo de pellet, se les agregó 100 µl de lisozima (Sigma) cada 10 ml de suspensión (10 mg/ml) y se incubaron a 42 ºC hasta que se observó una solución viscosa. Se colocaron las suspensiones en hielo y se sonicaron 6 veces durante 30 seg a 30 % de potencia, obteniendo una solución líquida. Se agregaron 150 µl de DNasa I (2000 U/ml, BioLabs), se centrifugaron a 18000 g durante 30 min a 4 ºC y el sobrenadante conteniendo las proteínas se traspasó a un tubo limpio en hielo, descartando el pellet.

Se tomaron 100 µl de los sobrenadantes obtenidos de las bacterias de cada cepa pre y post inducción, se trataron 15 min a 100 ºC con buffer de muestra para geles SDS-PAGE y se reservaron hasta su siembra.

18. Producción y purificación de TACI en células *E.coli*

Para la producción de la región THC de la proteína TACI-S231R y TACI-wt se repicaron en 20 ml de mLB líquido con kanamicina bacterias *E.coli* BL21 pLys S conteniendo el plásmido pET29a + TACI-S231R o pET29a + TACI-wt y se cultivaron en estufa a 37 ºC ON con agitación. Se traspasaron 12 ml de cada procultivo a 1 litro de mLB líquido con kanamicina y se continuó cultivando en estufa a 37 ºC con agitación. A partir de los 90 min se midió la DO cada 30 min hasta llegar a un valor de 0,8. Se reservó a -20 ºC el pellet bacteriano de una alícuota de 1 ml de cada cultivo (pre inducción) y se indujo el resto con 1 ml de IPTG 1 M durante 4 hs a 37 ºC con agitación. Se reservó una alícuota de 1 ml de cada cultivo (post inducción) y las células del cultivo restante se colectaron por centrifugación a 4500 g durante 15 min a 4 ºC. Se descartó todo el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en frío con 5 ml de tampón de lisis B cada gramo de pellet al que se le agregó 100 µl de lisozima (100 mg/ml, Sigma) cada 10 ml. Se colocaron las suspensiones celulares en un baño a 42 ºC hasta observar una solución viscosa y se pasaron a hielo. Para la ruptura celular se sonicó en hielo 6 veces durante 30 seg a 30 % de potencia, observando la formación de una solución líquida a la que se

adicionaron 300 µl de DNasa I (2000 U/ml, BioLabs). Se centrifugó a 18000 g durante 30 min a 4 ºC y el sobrenadante se reservó en hielo.

Columnas HisTrap se utilizaron como primer paso para purificar las proteínas recombinantes TACI-S231R y TACI-wt ya que poseen una cola de histidinas. Para ello se lavaron las columnas con 5 volúmenes de tampón de extracción, seguidos de 5 volúmenes de agua destilada; 5 volúmenes de NaCl 1,5 M; 5 volúmenes de agua destilada; 3 volúmenes de NaOH 0,1 M; 5 volúmenes de agua destilada; 2 volúmenes de $NiSO_4$ 0,1 M y 5 volúmenes de agua destilada. Se realizó una corrida en blanco con tampón de elución, se equilibró con tampón de siembra y se cargaron las muestras en la columna, recogiendo lo no unido en un tubo aparte. (Todo realizado en cámara fría para mantener la estabilidad de la proteína). Se conectó la columna a dos bombas conteniendo tampón de siembra (bomba A) y tampón de elución (bomba B), realizando un gradiente de elución durante 20 min a 100% en la bomba B, tomando alícuotas de a 1 ml y controlando la salida de la proteína por absorbancia 280 nm. Al finalizar la corrida se juntaron las alícuotas del pico proteico y se lavaron las columnas con agua y etanol 100%.

Columnas de filtración en gel – Desalting se utilizaron para realizar un cambio de tampón de manera de separar las sales de Imidazol de mi proteína. Para ello se lavó la columna con 2 volúmenes de agua seguidos de 2 volúmenes de tampón final. Se inyectaron las muestras que fueron eluídas con tampón final, tomando

alícuotas de a 1 ml y controlando la salida de la proteína por absorbancia 280 nm. Al finalizar la corrida se juntaron las alícuotas del pico proteico y se lavó la columna con agua y etanol 100%. Debido a la dilución proteica, las muestras se concentraron en tubos centricon con tope de 10 kDa (Millipore) centrifugando a 5000 g a 4 ºC hasta alcanzar un volumen final de 4 ml.

Tratamiento con ditiotreitol (DTT) e iodoacetamida (IAM) Los 4 ml de muestra concentrada fueron tratados durante con 5 mM de DTT 30 min a 22 ºC y posteriormente con 30 mM de IAM durante 20 min a 22 ºC, para reducir los puentes disulfuro y metilar los sitios irreversiblemente, ya que la proteína recombinante forma multímeros de alto peso molecular.

Filtración Molecular en S75 16/60 como último paso de purificación se inyectaron las muestras en columnas S75 16/60 previamente lavadas con 2 volúmenes de agua y 2 volúmenes de tampón final y mediante seguimiento por absorbancia a 280 nm, se recogieron las fracciones del pico de 42 kDa correspondiente a las proteínas recombinantes. Al finalizar la corrida se juntaron las alícuotas del pico proteico y se lavó la columna con agua y etanol 100%. Debido a la dilución proteica, las muestras se concentraron en tubos centricon con tope de 10 kDa (Millipore) centrifugando a 5000 g a 4 ºC hasta alcanzar un volumen final de 1 ml.

La concentración de proteína recombinante en cada muestra se calculó por absorbancia a 280 teniendo en cuenta que el ε de mi proteína es ~0,5.

Para chequear los diferentes pasos de purificación, se tomaron 100 µl de los sobrenadantes obtenidos en cada uno de ellos y se trataron 15 min a 100 ºC con buffer de muestra para geles SDS-PAGE, reservándolos hasta su siembra.

19. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se realizaron utilizando Student's *t* test de una y dos colas; *Chi* cuadrado o test exacto de Fisher para tablas de contingencia de 2x2, dependiendo del ensayo, mediante la utilización del software PRISM (GraphPad Software Inc.)

Resultados.

Capítulo 1.

1.1 Caracterización de la cohorte de pacientes pediátricos con IDCV

Como se mencionó en la introducción, bajo el nombre de IDCV se reconoce una IDP heterogénea cuya etiología es aún desconocida. Al ser la inmunodeficiencia humoral más frecuente y sumado al hecho de que los pacientes que presentan criterio diagnóstico de IDCV poseen un número considerable de LB en sangre periférica sin ser capaces de producir Acs protectores, resulta ser un buen modelo experimental para estudiar la biología molecular de los LB.[75, 76] En este contexto es posible que un defecto genético asociado a la sobrevida, la diferenciación y/o las interacciones inmunes de los LB sea el responsable de la fisiopatología de la enfermedad. Sin embargo estos mecanismos han sido hasta el momento poco explorados en estos pacientes.

1.1.1 Estudios moleculares para exclusión de otras IDP con genes identificados y con fenotipo clínico-inmunológico similar a IDCV

En los inicios de este estudio, se incluyeron 41 pacientes pediátricos con fenotipo clínico de IDCV con una media de edad al diagnóstico de 9.2 años (rango: 2 a 16 años) y un período de seguimiento con una media de 6.3 años (rango: 1 a 14 años).

Antes de realizar estudios funcionales en las células de los pacientes, se evaluaron diferentes genes conocidos relacionados con defectos en la función de los LB, ya que el diagnóstico de IDCV sólo puede hacerse después de descartar otras IDPs bien caracterizadas.[77, 88]

En una primera etapa, se distinguió dentro del grupo de pacientes hipogamaglobulinémicos, aquellos con LB circulantes menores y mayores al 2% de PBMC. En los primeros, cuando se trataba de pacientes de sexo masculino, se procedió al estudio del gen BTK responsable de XLA, patología de transmisión ligada al sexo, que puede presentarse clínicamente como una IDCV y que constituye la forma más habitual de agamaglobulinemia genéticamente identificable. Además, defectos en componentes del receptor pre-B dan cuenta de un 7-10% de los pacientes con hipogamaglobulinemia congénita, por eso en el grupo con LB circulantes menores al 2% se estudió el gen que codifica para la cadena pesada mu de Igs (Cμ), tanto en pacientes de sexo femenino como masculino, por ser el responsable de la forma más común de agammaglobulinemia autosómica recesiva.

Dentro del grupo, seis pacientes presentaron niveles séricos normales de IgM y se procedió a descartar mutaciones en los genes *AICDA*, *UNG*, *CD40*, *CD40L* y PMS2 los cuales son responsables de defectos en la inducción de los LB para realizar correctamente el CSR.[65, 93, 94, 102]

También se realizaron estudios moleculares para exclusión de otras IDPs con genes identificados y con fenotipo clínico-inmunológico similar a IDCV. Por ejemplo la deficiencia del gen SH2D1A o SAP, responsable del síndrome XLP.[95]

En todos estos casos (a excepción del gen PMS2 en el que se estudiaron los 15 exones a partir de ADN genómico) se procedió a evaluar la secuencia del ADNc de estos

genes a partir de ARN obtenido de linfocitos de sangre periférica de los pacientes. El ARN total se obtuvo de PBMC con TRIzol (Invitrogen). La amplificación se llevó a cabo con uno o dos pares de oligonucleótidos seleccionados para cada gen para cubrir así la región codificante completa. Por otro lado los exones individuales, incluyendo las uniones intrón-exón, se amplificaron a partir de ADN extraído de sangre total con oligonucleótidos específicos (Ver Materiales y Métodos). La secuenciación de los productos se realizó usando el secuenciador automático ABI PRISM 310 y ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) y se analizaron las secuencias con DNA Sequencing Analysis software (PE Applied Biosystems). Las secuencias se compararon con las de la base de datos del Immunodeficiency Resource (http://bioinf.uta.fi/idr) para analizar la presencia o ausencia de mutaciones ya descriptas para cada patología.

Como resultado de estos ensayos: cuatro pacientes del grupo de estudio presentaron mutaciones en el gen BTK siendo diagnosticados como XLA (en dos de ellos p.Arg288Gln; en otro p.Arg544Gly y por último p.Arg28His); un paciente del grupo de estudio presentó deficiencia en CD40L (p.Leu155Pro); un paciente fue diagnosticado como XLP al presentar una mutación en el gen SH2D1A (p.Asn82X22); ningún paciente de los estudiados presentó mutaciones en Cμ, UNG, PMS2 o AICDA.

Además, mediante citometría de flujo se estudió la expresión de los genes CD19, CD20, y ICOS por haberse encontrado pacientes que presentan fenotipo IDCV con falta de expresión en membrana de alguna de estas proteínas.[81, 84, 87] Todos los pacientes evaluados presentaron expresión normal de estas moléculas.

1.1.2 Fenotipo clínico de los pacientes

De esta manera nuestro grupo inicial de estudio quedó circunscripto a 34 pacientes con diagnóstico de IDCV de comienzo pediátrico. Seis de ellos presentaban < 2% de LB circulantes, por lo que no fueron incorporados a los posteriores estudios funcionales realizados en los LB, debido a no contar con material biológico suficiente para realizar los mismos. En la Tabla I se puede observar el fenotipo clínico de cada uno de los pacientes con LB >2% (28/34 pacientes). (Ver Tabla I)

Todos presentaron infección respiratoria, la mayoría del tracto respiratorio inferior, de estos últimos más de la mitad evolucionó a enfermedad pulmonar crónica o bronquiectasias, incluso estando bajo tratamiento sustitutivo con gammaglobulina endovenosa desde el momento del diagnóstico. Además, 27 de los 28 casos desarrollaron IDCV de forma esporádica y sólo 1 presentaba historia familiar (P12) de padre con hipogamaglobulinemia.

Las manifestaciones de autoinmunidad han sido poco frecuentes (~17% de los pacientes), sólo 2 presentaron granulomas tipo sarcoidosis y ninguno enfermedad tumoral maligna.

Se puede observar en nuestro grupo de IDCV de comienzo pediátrico, la presencia de manifestaciones neurológicas, baja talla, retraso madurativo, características no descriptas en las formas de comienzo adulto. Por otro lado, cinco pacientes presentaron neutropenia aislada, intermitente o persistente en la evolución y en el 50% de los pacientes evaluados se observó inversión de la relación CD4/CD8 y/o disminución en la respuesta proliferativa a mitógenos y Ags.

Tabla I Características clínicas de pacientes Argentinos con presentación pediátrica de IDCV

Nº	Edad al diagnóstico (años)	Sexo (a)	Primera manifestación clínica (años)	Infección Resp. Baja (b)	Secuelas BQP (c)	Patología Digestiva		AI (f)	GR (g)	SPM (h)	Otras Infecciones (i)	Otras
						GI (d)	HP (e)					
1	5,3	H	5,0	NMN R	BQT	Diarrea	-	-	-	-	-	Epilepsia
2	11,0	M	2,0	NMN R	BQT	-	HPT	-	-	SPM	Meningitis viral	Pancitopenia 2º
3	12,5	H	11,9	NMN	-	-	-	-	-	-	Varicela/ Parotiditis	-
4	4,0	M	3,0	NMN	-	-	-	-	-	-	Respiratoria Alta	-
5	5,4	H	4,2	NMN R	BQT	-	-	-	-	-	OMA recurrente	Baja talla
6	5,8	H	4,0	NMN R	BQT	-	-	-	-	-	Respiratoria Alta	Artritis
7	6,8	H	1,5	NMN R	BQT	-	-	-	-	-	Varicela Impetigizada	Molusco contagiosa en cara
8	7,2	H	6,0	NMN R /BQ	BQT	-	-	-	-	-	-	No
9	8,8	M	8,0	NMN	-	-	-	-	-	-	Respiratoria Alta/ OMA recurrente	Dolor abdominal recurrente
10	9,0	M	6,0	NMN R	BQT	Diarrea	-	-	-	-	Varicela	Retraso pando-estatural
11	10,0	H	5,0	NMN	BQT	-	-	-	-	-	Varicela/ Parotiditis/ Hepatitis A	-
12	11,0	H	7,0	NMN R	-	-	-	-	-	-	-	-
13	11,0	H	8,0	NMN R	BQT	-	HPT	DTI	-	-	-	-
14	11,0	M	6,0	NMN R	BQT	-	-	-	-	-	OMA/ Eccema	-
15	11,2	M	2,0	NMN R	BQT	-	-	-	-	-	Varicela	-
16	12,0	H	3,0	BQ	-	Diarrea	-	PTI	-	-	OMA/ Sinusitis/ Aftosis/ Herpes Zoster	-
17	12,0	H	1,0	NMN R	BQT	Diarrea	-	-	-	-	OMA crónica/ Varicela	Cándida Oral/ Facies Peculiar
18	13,0	M	11,0	NMN	-	-	-	-	-	-	Piodermitis	-
19	13,0	M	6,0	NMN R /BQ	BQT	-	-	-	GR	-	Varicela/ Herpes Zoster	Neumonía Instersticial Linfoidea
20	13,1	M	7,3	NMN R /BQ	-	-	HPM	PTI	-	SPM	Sinusitis	Herpes/hipoacusia
21	14,0	H	3,0	NMN R /BQ	BQT	-	-	-	-	-	Sinusitis/ Adenoiditis	-
22	14,0	M	1,0	NMN R	BQT	Diarrea	-	-	-	-	-	-
23	14,1	H	5,0	NMN R	BQT	-	-	-	-	-	Respiratoria Alta/ OMA/ Sinusitis	-
24	14,9	M	4,0	NMN R	BQT	-	-	PTI	-	-	OMA/ Varicela/ Herpes Zoster	-
25	15,0	M	8,0	NMN R	BQT	-	HPM	-	-	SPM	OMA supurada/ Sinusitis crónica	Anemia crónica
26	15,3	H	12,0	NMN	BQT	-	-	-	GR	SPM	Herpes Labial/ Parotiditis	-
27	15,6	M	14,0	NMN	BQT	-	HPM	-	-	SPM	Celulitis Preseptal	Anemia/ Urticaria crónica
28	16,1	M	4,9	NMN	-	-	-	PTI / AHA	-	SPM	Sinusitis/ Varicela	Hepatomegalia transitoria

(a) H: Hombre; M: Mujer **/ (b)** Infección respiratoria baja: NMN: neumonía; R: recurrente; BQ: bronquitis **/ (c)** Secuelas Bronquiopulmonares: BQT: bronquiectasias

(c) Secuelas Bronquiopulmonares: BQT: bronquiectasias; EPC: enfermedad pulmonar crónica **/ (d)** GI: Gastrointestinales **/ (e)** HP: Hepáticas; HPT: hepatitis; HPM: hepatomegalia

(f) AI: Autoinmunes; DTI: diabetes tipo I; PTI: púrpura trombocitopenia; AHA: anemia hemolítica autoinmune **/ (g)** GR: Granulomas **/ (h)** SPM: Esplenomegalia **/ (i)** OMA: otitis media alta

1.1.3 Fenotipo inmunológico de los pacientes

Ha habido muchos intentos por clasificar a los pacientes con IDCV, pero ninguna clasificación ha resultado completamente satisfactoria con respecto a poder explicar la heterogeneidad del síndrome. Algunas clasificaciones basadas en la capacidad de producción de Acs en sistemas de cultivo celular no fueron aceptadas de manera general ya que involucraban laboriosas y costosas técnicas, lo cual sumado a la falta de correlación con fenotipos linfocitarios y/o características clínicas (ej. esplenomegalia, autoanticuerpos) explican su limitada aplicación. La clasificación más aceptada hoy en día surgió de un consenso europeo (EUROClass 2004) y establece puntos de corte en la cuantificación de las subpoblaciones de LB en sangre periférica, identificadas mediante citometría de flujo.[103]

Como se mencionó en la introducción, tras la diferenciación independiente de Ag en la médula ósea, los LB inmaduros abandonan la médula y se acumulan en el pool de LB maduros o naïve $IgD^{+}IgM^{+}CD27^{-}$. Cuando estas células son estimuladas con el Ag en presencia de una apropiada coestimulación, participan de una reacción en el CG que llevará finalmente a la diferenciación en célula plasmática o célula memoria. Estudios en pacientes adultos con IDCV, mostraron que el desarrollo de estos dos tipos de LB se encuentra muy perturbado mientras que los LB maduros (naïve) están presentes en general en número normal, sugiriendo defectos en la diferenciación B tardía.

Teniendo en cuenta estas observaciones las siguientes clasificaciones de IDCV se basaron en el análisis de dos marcadores de “checkpoints” de la diferenciación B, tomando a CD27 como marcador de LB memoria (con reacción CG) y CD21 como marcador de progresión de LB inmaduros hacia maduros. En la última década, las clasificaciones de "Freiburg" y "París" simplificaron el análisis para clasificación de IDCV, evaluando la expresión de IgD y de CD27 en la superficie de los LB.[104, 105] El objetivo principal de estas clasificaciones era predecir complicaciones clínicas. Este análisis puede realizarse en pacientes con IDCV que no posean números muy reducidos de LB por la dificultad que representa en ese caso el análisis del compartimiento B periférico. Las primeras cuantificaciones de células inmaduras y memoria de sangre periférica de pacientes con IDCV señalan posibles defectos en diferentes estadios de la diferenciación B, apoyando la clasificación basada en el fenotipo B.

Los LB memoria $CD27^+$, que portan receptor de Ig con SHM representan, particularmente en humanos, un número muy importante dentro del compartimiento B de sangre periférica, pudiendo alcanzar el 40% de los LB circulantes. Estos LB de memoria incluyen los LB con cambio de clase de Igs y una población IgM^+, que no sería homogénea y que incluiría por lo menos a una población sólo IgM^+ y a otra IgM^+IgD^+. Muy recientemente, pudo demostrarse que los LB $IgM^+IgD^+CD27^+$ de sangre periférica son LB circulantes provenientes de la MZ del bazo, a cargo de las

respuestas TI. Como se mencionó anteriormente la MZ del bazo constituye un compartimiento B especial que contiene LB con alta densidad de IgM en superficie y CD21, que se activan rápidamente y secretan Acs en respuesta a Ags TI.

Tabla II Características inmunológicas de pacientes Argentinos con presentación pediátrica de IDCV

	Nº	Edad al diagnóstico (años)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	% LB (a)	LB memoria con switch (b)	LB memoria sin switch (c)	LB naive (d)	EUROclass (e)
PACIENTES Parte A	1	5,3	150	49	21	6%	ND	ND	ND	ND
	2	11,0	473	<7	171	15%	ND	ND	ND	ND
	3	12,5	222	<7	16	21%	ND	ND	ND	ND
PACIENTES Parte B	4	4,0	322	16	24	17%	Norm (10%)	↓ (7%)	Norm (79%)	smB+
	5	5,4	360	19	10	6%	↓ (5%)	↓ (5%)	Norm (81%)	smB+
	6	5,8	6	<7	13	13%	↓ (0%)	↓ (3%)	↑ (97%)	smB-
	7	6,8	296	<7	13	14%	↓ (3%)	Norm (9%)	↑ (85%)	smB+
	8	7,2	472	<7	21	15%	↓ (1%)	↓ (3%)	↑ (95%)	smB-
	9	8,8	288	<7	24	31%	↓ (3%)	↑ (19%)	Norm (76%)	smB+
	10	9,0	123	20	21	13%	↓ (0%)	↓ (6%)	↑ (89%)	smB-
	11	10,0	61	<7	10	3%	↓ (2%)	↓ (2%)	↑ (95%)	smB-
	12	11,0	439	13	32	5%	↓ (2%)	Norm (9%)	↑ (88%)	smB-
	13	11,0	74	<7	27	19%	↓ (0%)	↓ (2%)	↑ (96%)	smB-
	14	11,0	484	<7	36	20%	↓ (0%)	↓ (1%)	↑ (97%)	smB-
	15	11,2	262	<7	58	26%	↓ (0%)	↓ (2%)	↑ (97%)	smB-
	16	12,0	450	18	20	24%	↓ (1%)	↓ (5%)	↑ (93%)	smB-
	17	12,0	220	<7	18	7%	↓ (0%)	↓ (7%)	↑ (91%)	smB-
	18	13,0	333	<7	15	20%	↓ (5%)	Norm (14%)	Norm (77%)	smB+
	19	13,0	321	16	78	8%	↓ (1%)	↓ (5%)	↑ (86%)	smB-
	20	13,1	376	25	33	3%	↓ (1%)	↓ (2%)	↑ (91%)	smB-
	21	14,0	336	<7	15	6%	↓ (1%)	↓ (5%)	↑ (93%)	smB-
	22	14,0	524	<7	40	12%	↓ (3%)	↓ (7%)	↑ (88%)	smB+
	23	14,1	301	<7	25	13%	↓ (3%)	Norm (10%)	↑ (85%)	smB+
	24	14,9	426	8	35	7%	↓ (2%)	↓ (0%)	↑ (91%)	smB-
	25	15,0	36	<7	10	7%	↓ (0%)	↓ (2%)	↑ (97%)	smB-
	26	15,3	147	<7	28	25%	↓ (0%)	↓ (2%)	↑ (96%)	smB-
	27	15,6	106	<7	20	11%	↓ (0%)	↓ (2%)	↑ (98%)	smB-
	28	16,1	33	<7	129	16%	↓ (2%)	Norm (15%)	Norm (80%)	smB-

	Rango etario citometría de flujo (años)	Media (años)	Número donantes	% LB (a)	LB memoria con switch (c)	LB memoria sin switch (d)	LB naive (e)
Donantes Sanos	2,4 - 15,8	10,0	60	(14 ± 4)%	(14 ± 7) %	(11 ± 4) %	(74 ± 10) %

(a) % LB: representado como porcentage del gate linfoide
(c) LB memoria sin switch representado como pocentaje de CD27+IgD+ dentro del gate de CD19+
(d) LB naive representado como el porcentaje de CD27-IgD+ dentro del gate CD19+
(b), (c) y (d) ND= No Determinado, ↓= número disminuído, ↑= número incrementado, Norm= dentro del rango nomal
(e) smB+ sigifica < 2% LB memoria con switch; smB- means ≤2% LB memoria con switch

Para caracterizar nuestra población desde el aspecto inmunológico, se cuantificaron en el área de inmunología celular del Hospital Garrahan, los diferentes subgrupos de LB de sangre periférica en aquellos pacientes en los que no se encontró ningún defecto génico conocido y que poseían un número superior a 2% de LB en sangre periférica, mediante análisis por citometría de flujo con Acs monoclonales específicos.

Se analizaron las siguientes poblaciones de LB de sangre periférica: $CD27^{-}IgM^{+}IgD^{+}$ (naïve), $CD27^{+}IgM^{+}IgD^{+}$ (memoria sin "switch") y $CD27^{+}IgD^{-}IgM^{-}$ (memoria con "switch"). En la tabla Tabla II puede observarse junto con el nivel sérico de Igs en suero de los 28 pacientes al momento del diagnóstico (ya que luego comienzan a recibir gammaglobulina supletoria que modifica los parámetros fisiológicos de Igs) el fenotipo B de sangre periférica de 25 pacientes.

1.1.4 Comparación de datos clínicos e inmunológicos

Analizando los datos clínicos (Tabla I) e inmunológicos (Tabla II) de los pacientes con más de 2% de LB en sangre periférica, podemos observar que la relación entre hombres y mujeres fue 1:1 y la media de edad al comienzo de los síntomas fue de 5,7 años (rango 1-14 años), mientras que la media de edad al diagnóstico fue de 11,1 años (rango 4-16,1 años). Se descartó la hipogamaglobulinemia transitoria de la infancia en aquellos pacientes cuyos síntomas clínicos se manifestaron antes de los 4 años de vida. Como se reportó en otros estudios,[106] nosotros también observamos un retraso aproximado de 6 años (5,4 años) entre la aparición de los síntomas y el diagnóstico

clínico. La cohorte europea mostró una media de retraso de los síntomas de 8 años (mediana: 4 años).[103]

En este grupo de pacientes el porcentaje de LB totales sólo superó por dos desvíos estándar (DS) el valor medio para la edad en 4 de los 28 casos (Tabla II). Debido a la disponibilidad de muestra, en 25 de los 28 pacientes se pudo realizar el análisis de los diferentes subtipos de LB de sangre periférica (Tabla II, Pacientes Parte B). El porcentaje de LB naïve $CD19^{+}CD27^{-}IgD^{+}$ se mostró incrementado en el 80% de los pacientes IDCV (20/25) comparado con los controles sanos. Asimismo, la proporción de LB de memoria sin cambio de clase de Igs $CD19^{+}CD27^{+}IgD^{+}$ (memoria sin switch) se encontró disminuida en el 76% de los pacientes (19/25) (Tabla II), resultando comparable a lo observado en otros reportes de población pediátrica de IDCV.[107] Por otro lado, el porcentaje de LB de memoria con cambio isotípico de Igs $CD19^{+}CD27^{+}IgD^{-}$ (memoria con switch) se encontró disminuido en 24 de los 25 pacientes.

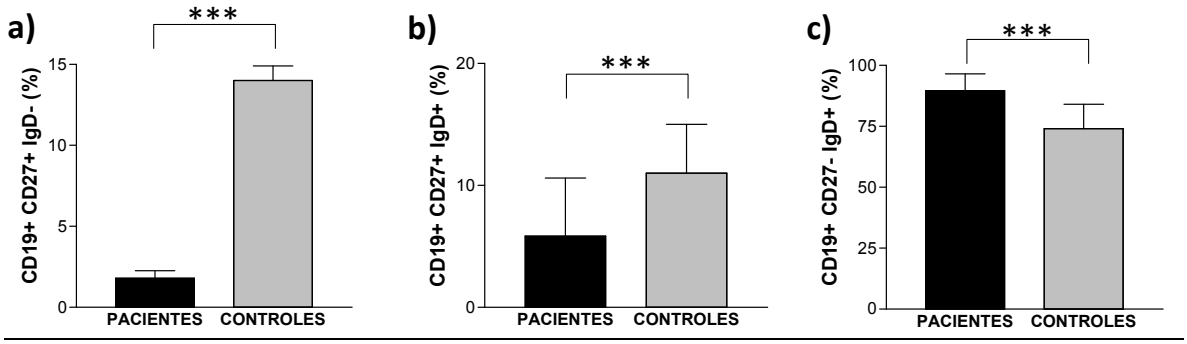


Figura 9: Subpoblaciones B de pacientes IDCV y los donantes sanos. a), b) y c) Media y desvío estándar de LB memoria con switch, memoria sin switch y naïve , respectivamente. *** p<0,0001 two tailed Studen't *t* test.

La comparación del grupo de pacientes IDCV con un grupo control de donantes sanos de edad similar (Tabla II), reveló una diferencia significativa en los porcentajes de LB naïve , memoria con cambio isotípico de Igs, y memoria sin cambio isotípico de Igs (two tailed Studen't *t* test, $p<0,0001$). (Ver Figura 9)

Como queda evidenciado al observar los niveles de Igs en suero al momento del diagnóstico (Tabla II) y compararlos con los valores normales para la edad (Tabla III, datos del laboratorio de inmunología humoral del Hospital Garrahan), en todos los pacientes se observó una disminución marcada en la IgG como era de esperar (al menos 2 DS por debajo de la media de la edad), mientras que la IgA se presentó muy baja en la mayoría de ellos. Los títulos en suero de IgM, por el contrario, mostraron una amplia variabilidad entre pacientes, como se observó previamente en la población europea[103], resultando incluso normales o aumentados en 5 pacientes de nuestra cohorte (P2, P15, P19, P22 y P28). Es en éstos últimos donde realizamos los estudios moleculares para evaluar los genes CD40L, PMS2, AICDA y UNG y se analizó la expresión de CD40 para descartar síndrome HIGM, como se mencionó anteriormente.

Tabla III: Valores normales de Inmunoglobulinas en suero

Rango de edad (años)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)
1,1 - 2,0	760 ± 209	50,0 ± 24,0	58,0 ± 23,0
2,1 - 3,0	890 ± 183	71,0 ± 37,0	61,0 ± 19,0
3,1 - 5,0	920 ± 228	93,0 ± 27,0	56,0 ± 18,0
5,1 - 8,0	920 ± 256	124,0 ± 45,0	65,0 ± 25,0
8,1 - 11,0	1120 ± 235	131,0 ± 60,0	79,0 ± 33,0
11,1 - 16,0	940 ± 124	148,0 ± 63,0	59,0 ± 20,0
Adultos	1150 ± 305	200,0 ± 61,0	99,0 ± 27,0

Las infecciones en el tracto respiratorio fueron las manifestaciones clínicas más frecuentes. De hecho, el 46% de los pacientes (13 de 28) presentó infecciones del tracto respiratorio alto como sinusitis y otitis media, y casi el 68% de los pacientes presentó infecciones recurrentes del tracto respiratorio inferior.

En la Tabla I se resumen los hallazgos clínicos no relacionados a infecciones. La autoinmunidad resultó ser principalmente hematológica (trombocitopenia y anemia hemolítica). Dos pacientes, P19 y P26, presentaron granulomas en pulmón, comprobándose a través de biopsia la presencia de enfermedad granulomatosa crónica.

La clasificación Europea de IDP, EUROClass 2004, ha dividido en dos grandes grupos a los pacientes IDCV, aquellos que poseen un porcentaje ≥ 2% o < 2% de LB de memoria con cambio de clase de Igs, denominándose los subgrupos smB^+ o smB^- respectivamente (del inglés, *switch memory B*). En nuestro grupo de pacientes IDCV, todos los que manifestaron complicaciones clínicas como autoinmunidad, granulomas o esplenomegalia presentaron menos de 2% de LB de memoria con cambio de clase de Igs (P13, P16, P19, P20, P24, P25, P26, P27 y P28), perteneciendo al subgrupo smB^- de la EUROClass, sin embargo no se encontró ninguna asociación significativa entre las complicaciones no infecciosas y el porcentaje de LB de memoria con cambio de clase de Igs mediante el uso del test exacto de Fisher para tablas de contingencia de 2x2.

Capítulo 2.

2.1 Estudios funcionales en LB de los pacientes IDCV

Al día de la fecha resulta un gran desafío aún encontrar un parámetro de clasificación adecuado que contemple la heterogeneidad clínico-inmunológica de los pacientes ICDV y su evolución clínica.

Como se mencionó anteriormente, los pacientes con IDCV no pueden producir cantidades suficientes de Acs específicos contra Ags, hecho que puede ser causado por defectos en cualquier etapa crítica de la diferenciación tardía y maduración de los LB.[88, 108]

El nivel en plasma de IgG tiene bajo valor predictivo de la severidad de IDCV, dado que incluso pacientes con niveles levemente disminuidos de IgG pueden ser altamente susceptibles a infecciones y se benefician con una terapia de sustitución con gammaglobulina endovenosa.[109] Por eso es necesario considerar también los aspectos cualitativos de los Acs producidos.

Debido a que anormalidades en diferentes vías pueden dar cuenta de los defectos inmunes en los pacientes con IDCV, un estudio funcional de sus LB podría dar lugar a una nueva clasificación y permitir la búsqueda de nuevos blancos genéticos de acuerdo a la vía que en estos estudios se encuentre alterada.

Por lo anteriormente expuesto, nos propusimos evaluar *in vivo* e *in vitro*, los estadios de diferenciación tardía de los LB en nuestra población de pacientes con IDCV.

Para evaluar el compartimento B de sangre periférica *in vivo*, utilizamos diferentes técnicas que nos permitieron medir la cantidad y calidad de la SHM así como la etapa de reparación llevada a cabo durante el CSR.

Para la evaluación *in vitro*, activamos por vías TD y TI los LB de sangre periférica de los pacientes y evaluamos *a posteriori* los diferentes eventos moleculares del CSR.

2.1.1 Estudios de SHM

Como mencionamos en la introducción, en las respuestas a infecciones, la maduración en la afinidad de los Acs es el resultado de la acumulación de mutaciones puntuales en las regiones V de los genes de Igs (tanto de IgH como de IgL), seguida de una selección de los LB que expresan Acs de alta afinidad para ese Ag. Este proceso conocido como SHM puede incrementar la afinidad del Ac por el Ag de 10 a 1000 veces.[110-112] La SHM es esencial para la generación de LB plasmáticas de larga vida y LB de memoria, que secretan y codifican Acs de alta afinidad, respectivamente.

La maduración de afinidad por SHM no depende del cambio de clase de Igs, prueba de esto es que se puede producir también en los LB productores de IgM.[113, 114] El análisis de la incapacidad del paciente de disponer de Acs con alta afinidad en todos los isotipos podría ser de mejor valor predictivo que el análisis cuantitativo de las Igs que ya realizaron CSR.

2.1.1.1 Análisis de SHM en la región V de Igκ

i. Fundamentos del ensayo IgκREHMA

Los ARNm de Igs obtenidos a partir de PBMC son predominantemente transcriptos por plasmablastos y LB plasmáticas.[115] En individuos sanos se pueden encontrar alrededor de 1000 células secretoras de Acs por ml de sangre (~1% de los LB).[116] Más del 90% de los transcriptos Igκ portan SHM, la cual tiende a concentrarse en ciertos "hot spot" localizados en particular en el CDR1. De los genes de cadena liviana, el gen VκA27 es el mayoritariamente usado, correspondiendo al 10 a 15% de los transcriptos Vκ en circulación.[117, 118]

El CDR1 del gen VκA27 contiene un fuerte "hot spot" para SHM que consiste en tres motivos RGYW solapados (donde R indica los nucleótidos G, A, Y indica nucleótidos C o T y W indica nucleótidos A o T). Es conocido que estos motivos son blanco preferencial para la enzima AICDA en la SHM (ver introducción). La enzima de restricción *Fnu*4HI que reconoce la secuencia GCNGC (donde N representa cualquier nucleótido), presenta dos de sus sitios de corte solapados en la zona "hot spot" del CDR1 de VκA27. Si un LB es activado y tras la SHM sufre mutaciones en estos dos sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *Fnu*4HI o al menos en uno de ellos, se impide el corte por la misma.

Teniendo en cuenta estas observaciones, Andersen y col desarrollaron un método para evaluar la capacidad *in vivo* de realizar SHM mediante un ensayo basado en corte de esta enzima de restricción sobre ADNc del gen VκA27 de IgL (para independizarse del isotipo de Ig) a partir del ARN extraído de PBMC de los pacientes IDCV (IgκREHMA, *del inglés Restriction enzyme hot-spot mutation assay*).[96] Se decidió evaluar entonces la SHM en nuestros pacientes utilizando este ensayo, pero debido a disponibilidad de muestra de ARN, el análisis se realizó en 25 de los 28 pacientes (Pacientes Tabla II Parte B).

Se utilizaron primers ya descriptos[96] marcados con fluorescencia para amplificar la región VκA27 y, tras el corte con *Fnu*4HI, se analizó el área de los fragmentos obtenidos mediante una corrida electroforética capilar. En la Figura 10 se muestra la secuencia nucleotídica amplificada con sus sitios de restricción, así como una ejemplificación de los posibles resultados de la técnica descripta.

ii. Resultados del ensayo IgκREHMA

Se relativizaron los resultados obtenidos en nuestros pacientes ICDV considerando 100% a la media de SHM obtenida en 22 donantes sanos.

La variabilidad observada en el grupo control se encuentra dentro de los parámetros reportados previamente para esta técnica así como también el hecho de que el % de SHM no se encuentra modificado por la edad del donante si éste supera los 2 años. [96]

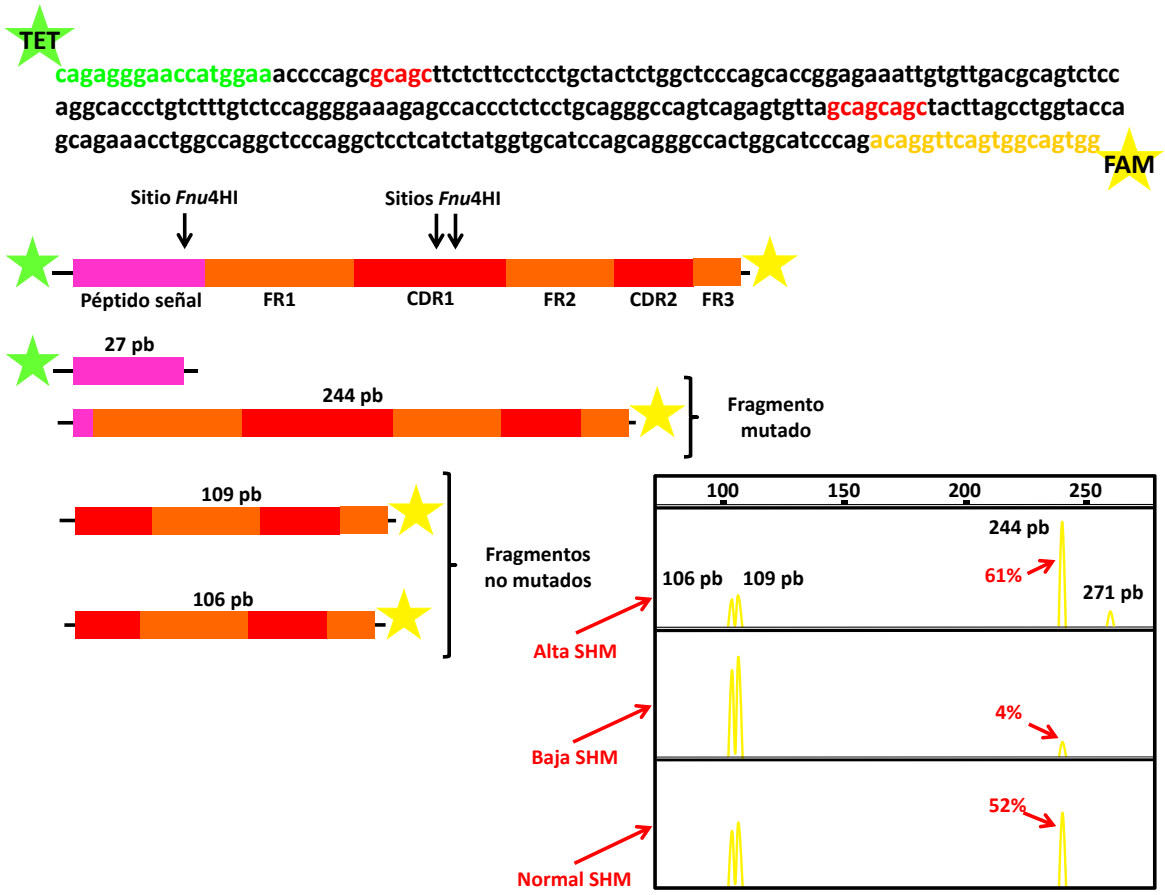


Figura 10: Esquema del ensayo IgκREHMA: Arriba la secuencia con los sitios de corte para la enzima de restricción Fnu4HI; a la izquierda un esquema de los productos del ensayo; abajo a la derecha, esquemas de posibles resultados luego de la corrida en electroforesis capilar. (Tomado y modificado de Andersen P., et al. Deficiency of somatic hypermutation of the antibody light chain is associated with increased frequency of severe respiratory tract infection in common variable immunodeficiency. Blood 2004. 105: 511-517)

La comparación del grupo de pacientes IDCV con el grupo control de donantes sanos de edad similar reveló una diferencia significativa en la SHM (two tailed Studen't *t* test, p<0,0001). A la vez, puede observarse que la población de nuestros pacientes pediátricos IDCV es heterogénea en cuanto a la capacidad de generar SHM (Ver Figura 11).

En la Tabla IV se exponen los valores obtenidos para cada paciente en la evaluación por IgκREHMA junto a los datos de subpoblaciones B de sangre periférica, la

clasificación EUROclass (smB^+ y smB^-) y las complicaciones no infecciosas observadas en la clínica.

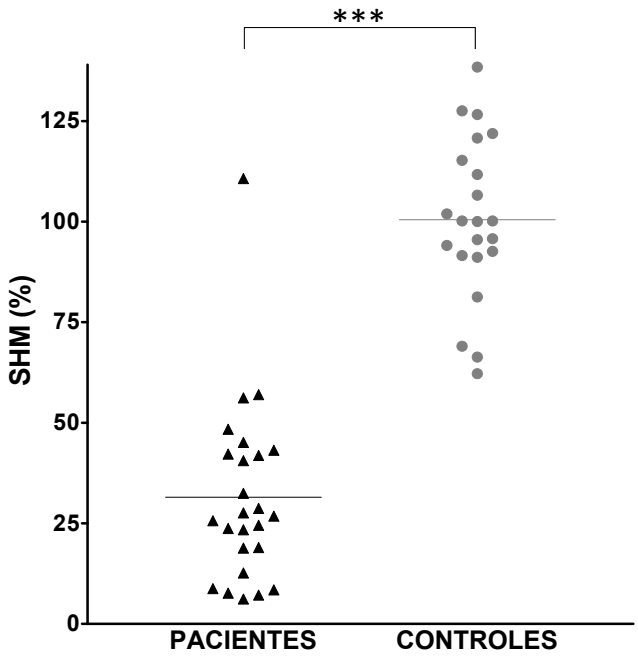


Figura 11: Valores obtenidos de % SHM a través del ensayo IgκREHMA en la población de pacientes IDVC (pacientes) y donantes sanos (controles) relativizando al 100% con la media de donantes sanos. Comparación de media y DS por two tailed Studen't *t* test *** p<0,0001.

Prácticamente todos los pacientes (24/25) presentan una SHM alterada y el 64% de ellos (16/25) se encuentra por debajo del 30% de SHM respecto de los controles sanos, valores similares han sido reportados en estudios previos con pacientes IDCV.[96]

Si se grafican los valores de cuantificación de SHM obtenidos como valores continuos, puede proponerse un punto de inflexión entre los pacientes con SHM <30% y aquellos con SHM >30%, es decir que se pueden distinguir al menos dos subgrupos que presentan la vía de SHM alterada: un grupo A con SHM inferior al 30% y un grupo B con SHM entre 30% y 60%.

Tabla IV Resultados de la SHM medidos por IgκREHMA y su correlación con datos clínicos e inmunológicos

	Nº	IgkREHMA: %SHM (a)	LB memoria con switch (b)	LB memoria sin switch (c)	EUROclass (d)	Complicaciones no Infecciosas (e)
GRUPO A PACIENTES	27	6,17	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	SPM
	6	7,14	↓ (0%)	↓ (3%)	smB-	
	13	7,63	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	AI
	15	8,44	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	
	17	8,77	↓ (0%)	↓ (7%)	smB-	
	25	12,66	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	SPM
	10	18,83	↓ (0%)	↓ (6%)	smB-	
	28	18,99	↓ (2%)	Norm (15%)	smB-	AI y SPM
	21	23,38	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	
	26	23,70	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	GR y SPM
	7	25,51	↓ (3%)	Norm (9%)	smB+	
	9	25,65	↓ (3%)	↑ (19%)	smB+	
	20	26,79	↓ (1%)	↓ (2%)	smB-	AI y SPM
	8	27,60	↓ (1%)	↓ (3%)	smB-	
	14	28,73	↓ (0%)	↓ (1%)	smB-	
	11	29,47	↓ (2%)	↓ (2%)	smB-	
GRUPO B PACIENTES	22	40,58	↓ (3%)	↓ (7%)	smB+	
	18	41,88	↓ (5%)	Norm (14%)	smB+	
	23	42,21	↓ (3%)	Norm (10%)	smB+	
	5	43,18	↓ (5%)	↓ (5%)	smB+	
	19	45,13	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	GR
	12	48,38	↓ (2%)	Norm (9%)	smB-	
	4	56,17	Norm (10%)	↓ (7%)	smB+	
	24	56,98	↓ (2%)	↓ (0%)	smB-	AI
	16	110,71	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	AI

	N	IgkREHMA: % SHM (a)	Rango etario (años)	Media (años)
DONANTES SANOS	22	100,0 ± 21,1	2,2 - 17,4	10,5
PACIENTES	25	31,39 ± 22,56	4,0 - 16,1	11,3

(a) % SHM: tomando como 100% la media de controles sanos

(b) LB memoria con switch representado como porcentaje de CD27+IgD- dentro del gate de CD19+

(c) LB memoria sin switch representado como pocentaje de CD27+IgD+ dentro del gate de CD19+

(d) smB+ sigifica < 2% LB memoria con switch; smB- means ≤2% LB memoria con switch

(e) AI: Auitoinmunidad; GR: Granulomas; SPM: esplenomegalia

(b) y (c) ↓= número disminuído, ↑= número incrementado, Norm= dentro del rango nomal

A su vez es posible correlacionar estos valores de SHM con defectos en el proceso de maduración de los LB: el 88% de los pacientes del grupo A (14/16) presentan también un número bajo (< 2%) de LB de memoria con switch perteneciendo al grupo smB$^-$ de EUROclass y correlacionan con presencia de complicaciones clínicas o presentaciones más severas de la enfermedad como esplenomegalia, autoinmunidad y granulomas (6/9 pacientes con autoinmunidad, esplenomegalia o granulomas caen dentro de este grupo). Por otro lado, el 88% de los pacientes que integran el grupo B (8/9) presentan un número mayor al 5% de LB CD27$^+$ (memoria total) y siete de ellos tiene una evolución clínica sin complicaciones no infecciosas.

A pesar de esta importante correlación entre SHM, fenotipo inmunológico y presentación clínica observamos un paciente (P16) que presentó valores de SHM similares a los controles sanos, y que sin embargo desarrolló autoinmunidad y posee LB de memoria con switch menores al 2%. Lo mismo sucede con dos pacientes con SHM intermedia pertenecientes al Grupo B que desarrollaron granulomas y autoinmunidad (P19 y P24, respectivamente) y pertenecen al subgrupo smB$^-$ de EUROclass.

2.1.1.2 Análisis de SHM en la región V de IgH

i. Fundamentos del ensayo IGH-SHA

Decidimos entonces evaluar la SHM mediante un ensayo alternativo: IGH Somatic Hypermutation Assay (IGH-SHA, InVivoScribes Technologies). El mismo se basa en amplificar en el ADNc las regiones V N-terminal de las cadenas pesadas de Ig a través de PCR multiprimer y observar los productos de los clones mediante electroforesis capilar. Esto permite evaluar microdeleciones y microinserciones producidas en el contexto de SHM.[119] La región amplificada se encuentra entre las regiones FR1 y J del gen de IgH, mientras que el primer de la región J se encuentra marcado con fluorescencia. Al separar los productos por electroforesis capilar se logran distinguir productos que difieren incluso en 1 o 2 pb. (Ver Figura 12.a)

La población sana presenta una distribución gaussiana de los fragmentos obtenidos por PCR, mientras que fallas en la SHM llevan a que algún pico se encuentre sobrerrepresentado, alguno esté ausente o se perturbe la distribución.

Para obtener un valor numérico que cuantifique la diferencia entre la distribución de cada paciente respecto de la de controles sanos realizamos el siguiente cálculo: módulo ($|D_i|$) de la resta surgida entre el área relativa de cada pico en un paciente ($A_{rel.Pi.paciente.Nx}$) y la media del área relativa de cada pico en los controles sanos ($mA_{rel.Pi.controles}$). Llamamos perturbación (P) respecto de la distribución gaussiana observada en controles sanos, al número resultante de la sumatoria de los módulos ($|D_i|$) para cada paciente:

$A_{rel.Pi.paciente.Nx} = A_{Pi.paciente.Nx}/A_{total.paciente.Nx}$ donde Pi representa un pico y Nx un individuo

$mA_{rel.Pi.controles} = (\sum A_{rel.Pi.control.Nx}) / N_c$ donde N_c representa al número de controles

$|D_i| = |A_{rel.Pi.paciente.Nx} - mA_{rel.Pi.controles}|$

$P_{paciente.Nx} = \sum |D_i|$

Luego calculamos la media y el desvío estándar poblacional de P como:

$mP_{pacientes} = (\sum P_{paciente.Nx}) / N_p$ donde N_p representa al número de pacientes

$DS = [\sum (P_{paciente.Nx} - mP_{pacientes})^2] / (N_p - 1)$

Para calcular la perturbación media y el desvío estándar de la población de controles sanos realizamos el mismo procedimiento que para los pacientes, en cada control retirándolo del pool de la población de controles.

Por otro lado, se realizó un análisis matemático para graficar los datos calculando el área relativa de cada pico ($A_{rel.Pi}$) para independizarnos de la amplificación de cada muestra (A_{Pi}/A_{total}).

ii. Resultados del ensayo IGH-SHA

Se graficaron los resultados de las áreas relativas de los picos obtenidos para cada paciente junto con la media de cada pico surgida de la población de controles sanos. En la figura 12 b. se observan los gráficos de algunos pacientes IDCV. Además, los resultados obtenidos de los cálculos de desviación a distribución Gaussiana (perturbación) se muestran en la Tabla V.

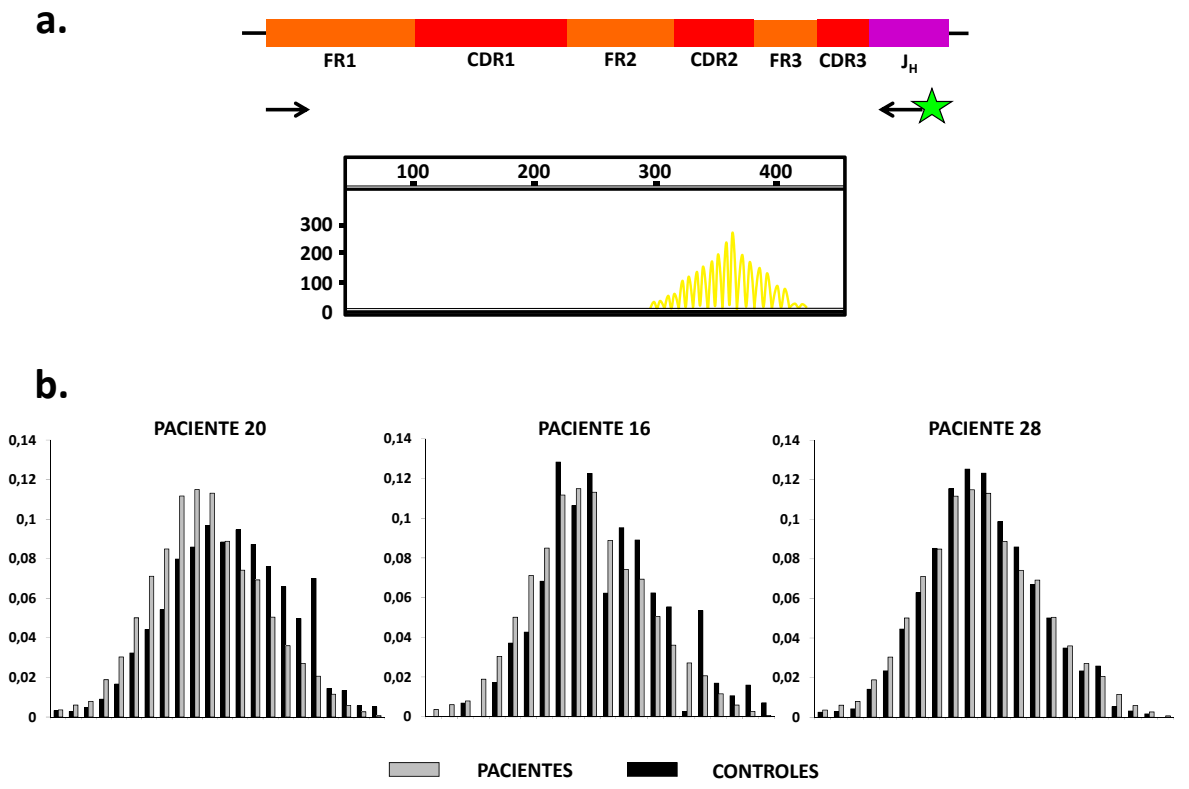


Figura 12: Ensayo SHA. a) Esquema del análisis**:** Arriba la secuencia amplificada; abajo ejemplificación del resultado luego de la corrida en electroforesis capilar. **b)** Gráficos del área relativa de cada pico obtenido por electroforesis capilar de diferentes pacientes contrastados con la media de donantes sanos (controles).

A través de este ensayo, la comparación de la distribución de los fragmentos de SHA entre el grupo de pacientes IDCV y el grupo control de donantes sanos de edad similar reveló una diferencia significativa (two tailed Studen't *t* test, $p<0{,}05$ y $p<0.01$ para media y varianza respectivamente).

Tabla V Resultados de la SHM medidos por SHA y su correlación con datos clínicos e inmunológicos

	Nº	% Perturbación (a)	EUROclass (b)	Complicaciones no Infecciosas (c)
PACIENTES ↓ (d)	6	4,06	smB-	
	18	4,82	smB+	
	28	5,18	smB-	AI y SPM
	27	5,21	smB-	SPM
	4	6,06	smB+	
	7	7,02	smB+	
	13	7,22	smB-	AI
	23	7,25	smB+	
	19	8,86	smB-	GR
	5	8,96	smB+	
	12	9,80	smB-	
	24	10,05	smB-	AI
	9	10,96	smB+	
PACIENTES > + 1 DS (e)	15	11,49	smB-	
	21	11,72	smB-	
	17	12,07	smB-	
	8	12,49	smB-	
PACIENTES > + 2DS (f)	16	14,32	smB-	AI
	11	14,84	smB-	
	25	15,45	smB-	SPM
	26	16,05	smB-	GR y SPM
	22	17,41	smB+	
	10	17,50	smB-	
	20	18,06	smB-	AI y SPM
	14	18,36	smB-	
	N	**% Perturbación (a)**	**Rango etario (años)**	**Media (años)**
DONANTES SANOS	22	8,75 ± 2,37	2,2 - 17,4	10,5
PACIENTES	25	11,01 ± 4,55	4,0 - 16,1	11,3

(a) % Perturbación: respecto de la distribución Gaussiana de los controles sanos
(b) smB+ sigifica < 2% LB memoria con switch; smB- means ≤2% LB memoria con switch
(c) AI: Auitoinmunidad; GR: Granulomas; SPM: esplenomegalia
(d) Pacientes con baja perturbación
(e) Pacientes que superan la media de controles sanos por 1 DS
(d) Pacientes que superan la media de donantes sanos por 2 DS

Más del 30% de los pacientes presentó una perturbación que superó por 2 DS la media de los donantes sanos, y el 48% se encuentra por encima de 1 DS (12/25). Si bien 11 de los 12 pacientes con perturbación de la SHM en su capacidad de realizar

microinserciones y microdeleciones pertenecen al grupo smB$^-$ de EUROclass y al grupo A del análisis de SHM por IgκREHMA, este ensayo sólo correlaciona con cuatro de los nueve pacientes que poseen complicaciones no infecciosas en la clínica, pudiendo ser considerado entonces menos robusto que el análisis IgκREHMA.

Resulta interesante notar que el paciente 16, que presentaba una SHM normal medida mediante el ensayo de IgκREHMA sin correlación con los hallazgos clínicos, presenta sin embargo SHM perturbada a través del análisis IGH-SHA (muchos fragmentos faltan y otros están sobrerrepresentados, ver Figura 12.b y Tabla V). De este modo, la técnica IGH-SHA permite complementar la evaluación de la SHM analizada mediante la técnica IgκREHMA.

En suma, ya sea por la capacidad de realizar mutaciones de desaminación de citocinas en hot spot del CDR1 de la cadena VκA27 o bien por la capacidad de generar microinserciones o microdeleciones durante la reparación en la región variable de las IgH, todos los pacientes IDCV de nuestro grupo de estudio poseen en mayor o menor medida alterada la SHM.

2.1.2 Estudios de CSR

2.1.2.1 Evaluación de la reparación de las regiones S

i. Fundamentos del análisis de la región Sμ-Sα

Como se mencionó en la introducción, durante el proceso de CSR la región C del gen Cμ es reemplazada por un gen C_H río abajo, resultando en un cambio de IgM a IgG, IgA o IgE. Este proceso involucra regiones llamadas S que se encuentran río arriba de cada gen C_H, a excepción de Cδ (Ver Figura 7). Las regiones S se componen de secuencias repetidas en tándem. En humanos, las regiones Sμ y Sα están muy relacionadas y caracterizadas, poseen un agrupamiento de repeticiones pentaméricas GAGCT y GGGCT, pero difieren en la longitud total, la secuencia global y el número de alelos polimórficos.[120]

Al activarse el CSR en los LB, las lesiones que genera la enzima AICDA en las regiones S son posteriormente procesadas, lo que lleva a la generación de DSBs en el ADN. Existen dos mecanismos principales de reparación de las DSBs, la recombinación homóloga (HR, del inglés *Homologous Recombination*) que depende de homología de secuencia, y la unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés *Non-Homologous End Joining*) que utiliza poca o nula homología de secuencia. Este último es el que se utiliza principalmente en el CSR.[121]

La maquinaria de NHEJ requiere de un gran número de factores (Ku70/Ku80, DNA-PKcs, DNA-ligasa IV, Artemis, Cernunos, etc)[122-127], y cuando esta vía falla, una vía alternativa actúa en las DSBs, produciendo reducción del CSR y/o mayor uso de microhomología en la reparación de las uniones de las regiones S como se ha visto en pacientes con otras IDPs que involucran defectos en genes del NHEJ.[97, 128]

Es interesante, dado el defecto en calidad y/o cantidad de Acs producidos en los pacientes con IDCV, investigar si las deficiencias en la producción de los mismos involucran alteraciones inherentes a la eficiencia para realizar CSR.

ii. Resultados del análisis de la región Sμ-Sα

Para investigar en profundidad la calidad de las reparaciones en este proceso *in vivo*, se amplificaron las regiones Sμ-Sα utilizando una PCR-nested anteriormente descripta (Ver Figura 13.a)[97] a partir del ADN genómico de PBMC de los pacientes. A pesar de los bajos niveles de IgA en suero de nuestros pacientes, los fragmentos pudieron ser amplificados, aunque se presentan en menor intensidad y cantidad que en los donantes sanos. Sin embargo, estos cambios resultaron modestos en comparación con las pocas bandas y la débil amplificación de un paciente deficiente en ADN ligasa IV, gen en el que la vía de reparación de NHEJ del CSR se encuentra altamente comprometida (Ver Figura 13.b).[129]

Posteriormente, los fragmentos amplificados se clonaron y secuenciaron. Se analizaron un total de 194 fragmentos de las regiones Sμ-Sα de 20 pacientes IDCV, así como 53 fragmentos de 10 donantes sanos. Todos los fragmentos clonados fueron únicos y por ende representan eventos independientes de CSR en cada individuo. En la figura 13.c pueden observarse algunas secuencias alineadas de pacientes y controles.

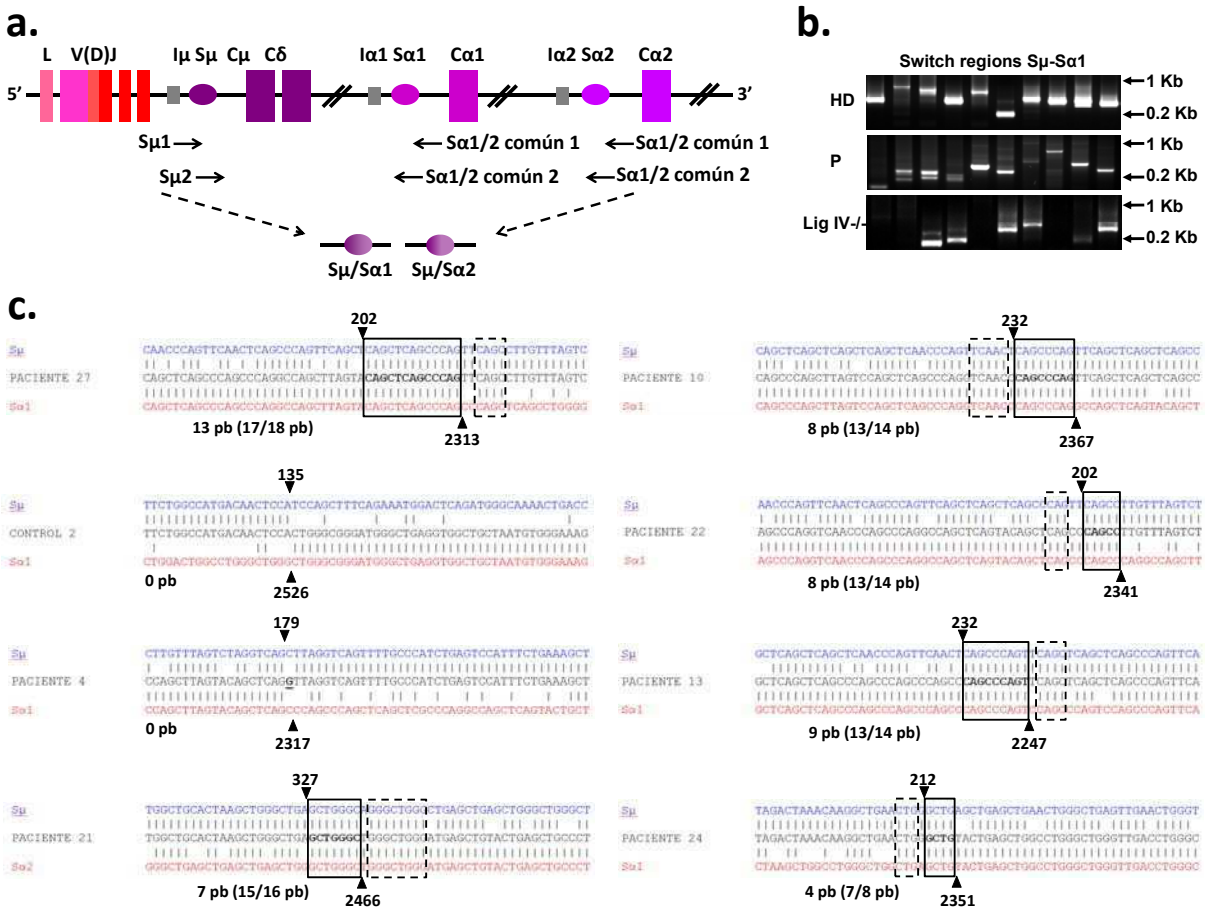


Figura 13: Estudio de CSR a través de las regiones Sμ-α a) Estrategia utilizada para amplificar los fragmentos Sμ-Sα, con flechas se indican los primers. **b)** Se corrieron en paralelo 10 reacciones de PCR utilizando 30 ng de ADN genómico de cada idividuo. **c)** Se muestran secuencias Sμ-Sα de algunos pacientes y un control. Las secuencias Sμ y Sα o Sα2 se encuentran alineadas arriba y debajo de la correspondiente secuencia del paciente. La microhomología donor-aceptor se determinó mediante la identificación de la región más larga en la unión S-S que posea un *missmatch* a ambos lados del sitio donor / aceptor (circunscripto dentro de la caja con líneas continuas). Las repeticiones imperfectas se determinaron mediante la identificación de la región de solapamiento más larga al lado de la unión switch con un *missmatch* en uno de los sitios donor / aceptor (circunscripta dentro de la caja con línea punteada). Los sitios de *missmatch* para cada unión switch en Sμ o Sα se indican mediante ▼ y ▲, respectivamente, y sus posiciones en las secuencias de la línea germinal se indican en la parte superior de o por debajo de las puntas de flecha. El número de pares de bases que participan en la microhomología y las repeticiones imperfectas para cada unión se muestra en la parte inferior de cada secuencia.

Como puede observarse en la Figura 14, nuestra población de pacientes IDCV muestra diferencias significativas en la utilización de microhomología en la región switch respecto de la observada en el grupo control. Se observa una clara disminución, en pacientes IDCV, de la proporción de secuencias capaces de

reparación en ausencia de homología (0 pb) o con la utilización de sólo 1 a 3 pb. Por el contrario, registramos un franco aumento de las que poseen de 7 a 9 pb y >10 pb de homología en la reparación de las DSBs, en comparación con los donantes sanos (p<0,001 y p<0,01 respectivamente *Chi* cuadrado test).

a.

	Caracterización de las uniones Sμ-Sα						
	Uniones cortas con perfecta homología						nº total de fragmentos analizados
	0 bp		1-3 bp	4-6 bp	7-9 bp	>10 bp	
	Sin inserción	1 bp inserción					
Controles	16 (30,2%)	10 (18,9%)	15 (28,3%)	4 (7,6%)	5 (9,4%)	3 (5.6%)	53
Pacientes	**16 (8,2%)*** **	23 (11.9%)	**15 (7,7%)*** **	35 (18,0%)	**55 (28,4%)** **	**50 (25,8%)** **	194

b.

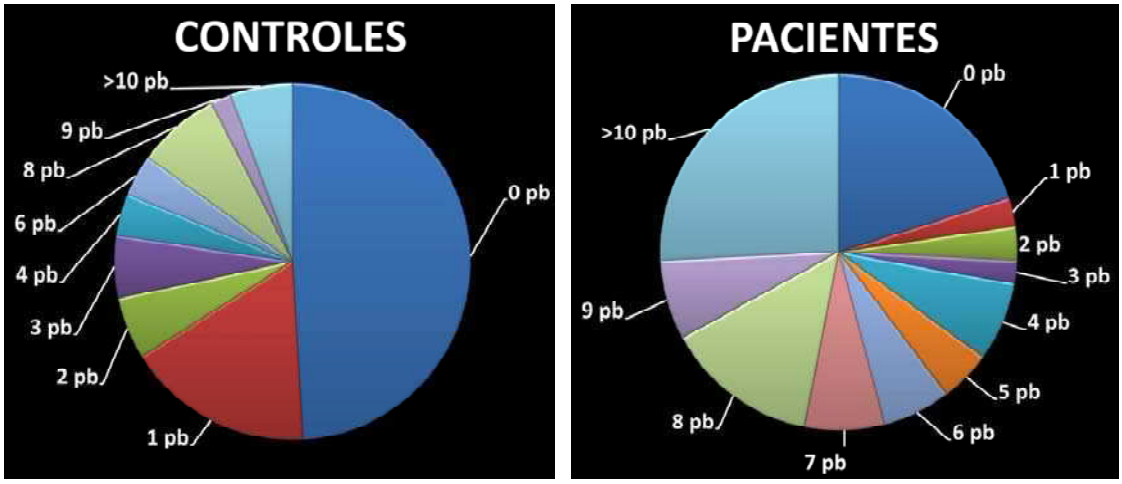


Figura 14: Estudio del CSR a través del análisis de las uniones Sμ-Sα: a) Comparación de la presencia de microhomología entre pacientes IDCV y donantes sanos (controles) en las regiones Sμ-Sα, ** p<0,01; *** p<0,001 *Chi* cuadrado **b)** Los gráficos circulares muestran la utilización de uniones cortas con perfecta homología en las uniones Sμ-Sα en los controles y pacientes. El tamaño de cada rodaja indica la proporción utilizada para las diferentes longitudes en pb.

Por lo tanto, al examinar los resultados de manera global se revela un incremento significativo en la extensión de la homología donor-aceptor en las uniones Sμ-Sα en pacientes respecto de controles sanos (media de secuencias con perfecta homología 2,28 ± 3,52 pb en controles sanos vs 6,95 ± 5,32 pb en pacientes IDCV; P<0.0001 two tailed Studen't *t* test) (Ver Tabla VI). Sumado a esto, la mayoría de las

secuencias de los pacientes presentan repeticiones imperfectas alrededor de la unión Sμ-Sα (Ver Figura 13). La presencia de microhomología y repeticiones imperfectas en la reparación de las uniones Sμ-Sα recuerda lo descripto en pacientes con defectos en la vía de reparación del NHEJ.[92, 93, 97, 129]

Tabla VI Resultados del análisis de la microhomología de las uniones Sμ-Sα y su correlación con datos clínicos e inmunológicos

	Nº	Uniones de perfecta homología Sμ-Sα (a)	LB memoria con switch (b)	LB memoria sin switch (c)	EUROclass (d)	Complicaciones no Infecciosas (e)
PACIENTES MICROHOMOLOGÍA AUMENTADA	25	12,50 ± 2,65 ***	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	SPM
	20	10,70 ± 6,38 ***	↓ (1%)	↓ (2%)	smB-	AI y SPM
	15	9,71 ± 7,67 ***	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	
	10	9,17 ± 5,34 ***	↓ (0%)	↓ (6%)	smB-	
	26	8,93 ± 6,33 ***	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	GR y SPM
	16	8,75 ± 6,41 ***	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	AI
	14	8,33 ± 6,75 ***	↓ (0%)	↓ (1%)	smB-	
	8	7,57 ± 5,08 ***	↓ (1%)	↓ (3%)	smB-	
	11	7,57 ± 2,15 ***	↓ (2%)	↓ (2%)	smB-	
	7	7,56 ± 3,68 ***	↓ (3%)	Norm (9%)	smB+	
	21	7,10 ± 4,48 ***	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	
	19	7,00 ± 3,92 ***	↓ (1%)	↓ (5%)	smB-	GR
	6	6,60 ± 5,46 **	↓ (0%)	↓ (3%)	smB-	
	13	6,43 ± 1,99 **	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	AI
	27	6,22 ± 4,38 **	↓ (0%)	↓ (2%)	smB-	SPM
	24	4,89 ± 4,70 *	↓ (2%)	↓ (0%)	smB-	AI
PACIENTES MICROHOMOLOGÍA NORMAL	22	4,71 ± 5,28 ns	↓ (3%)	↓ (7%)	smB+	
	28	4,09 ± 4,37 ns	↓ (2%)	Norm (15%)	smB-	AI y SPM
	18	3,92 ± 5,53 ns	↓ (5%)	Norm (14%)	smB+	
	4	1,50 ± 1,76 ns	Norm (10%)	↓ (7%)	smB+	
CONTROLES		**2,28 ± 3,52**				
PACIENTES		**6,95 ± 5,32 *****				

(a) Se muestran la media y el DS para de pacientes y controles. * p<0,05; ** p<0,001; *** p<0,0001 two tailed Studen't *t* test
(b) LB memoria con switch representado como porcentaje de CD27+IgD- dentro del gate de CD19+
(c) LB memoria sin switch representado como pocentaje de CD27+IgD+ dentro del gate de CD19+
(d) smB+ sigifica < 2% LB memoria con switch; smB- means ≤2% LB memoria con switch
(e) AI: Auitoinmunidad; GR: Granulomas; SPM: esplenomegalia
(b) y (c) ↓= número disminuído, ↑= número incrementado, Norm= dentro del rango nomal

En la Tabla VI se detallan los resultados, obtenidos en estos estudios de la reparación en las uniones S junto a la clasificación EUROclass y a las complicaciones no infecciosas de cada paciente. El 80% de los pacientes (16/20) posee diferencias significativas en la longitud de pares de bases homólogos usadas en la reparación de las regiones S. Los cuatro pacientes que poseen microhomología similar a la observada en los donantes sanos, poseen más de 10% de LB de memoria total ($CD19^+CD27^+$) y todos a excepción del paciente 28 pertenecen al grupos smB^+ de EUROclass y no manifestaron complicaciones no infecciosas en el desarrollo de la enfermedad (en el próximo capítulo retomaremos al paciente 28).

De los 16 pacientes que presentan microhomología aumentada, el 94% (15/16) poseen <2% de LB memoria con switch y todos aquellos que tienen las presentaciones clínicas más severas (a excepción de P28) pertenecen a esta categoría, incluso los pacientes 19 y 24 que no presentaban una SHM alterada por los dos métodos descriptos en el punto 1 de este capítulo.

2.1.2.2 Activación vía TD y TI

i. Fundamento de la evaluación de los transcriptos GLT, CT y AICDA

El proceso de CSR es precedido por la expresión de *GLT* (I_H-C_H) iniciada a partir de promotores I, los cuales están regulados específicamente por varias citoquinas. La capacidad para generar *GLT* es independiente de la capacidad de realizar las etapas

siguientes de CSR, por ejemplo los *GLT* son normalmente inducidos *in vitro* en células deficientes para AICDA (Activation induced cytidine Deaminase), proteína esencial para CSR.[45]

Tras la activación de los LB mediante estímulos adecuados, la expresión de los GTL resulta incrementada (por la apertura de la cromatina en un gen de cadena pesada isotipo específico) representando, junto con la activación de la expresión de *AICDA*, la primera fase de CSR.[45]

Si el proceso de CSR es exitoso, tras la deleción del segmento de ADN que contiene la región Cμ y otros genes C_H a partir del cromosoma, se producen *CT* específicos de isotipo generados a partir de los promotores I localizados en el ADN circular escindido (transcriptos I isotipo específico-Cμ). Estos son producidos solamente en células que expresan *AICDA* y que realizan CSR. Análisis cinéticos mostraron que los *CTs* desaparecen más rápidamente al removerse el estímulo de citoquinas que los *GLT*, los ADN circulares y *AICDA*, siendo desde entonces utilizados como marcador de una activa CSR *in vivo* e *in vitro*.[130]

En este contexto, con la finalidad de localizar el paso exacto del defecto de CSR, se analizó, en 15 pacientes y 5 donantes sanos, la capacidad de generar *GLT* (I_H-C_H), *CT* (I_H-*Cμ*) y de activar *AICDA* en PBMC sin estimular y después de ser activadas *in vitro* con estímulos TD (CD40L e IL-4) así como TI (CpG e IL-10). Se evaluaron

cualitativamente los transcriptos mediante RT-PCR y además se analizó la activación de *AICDA* mediante qRT-PCR cuantitativa.

ii. Resultados de la evaluación de los transcriptos GLT, CT y AICDA

Puede observarse en la figura 15 que las células de los donantes sanos, como se ha descripto previamente, muestran un aumento de la expresión de los *GLTγ1* (*Iγ1-Cγ1*), *CTγ1* (*Iγ-Cμ*) y activación de *AICDA* medidos por RT-PCR, tras estímulos TD (lo mismo sucede con un estímulo TI, datos no mostrados). Hemos puesto en evidencia asimismo un incremento en la transcripción de *AICDA* medida por qRT-PCR tanto para estímulos TD como TI.

Por el contrario, ninguno de los pacientes IDCV logró evidenciar estos parámetros de activación por estímulos TI, y resultaron heterogéneos en cuanto a la capacidad de respuesta frente a la activación por estímulos TD. (Ver Figura 15)

Analizando la figura 15, los pacientes IDCV pueden diferenciarse en tres subgrupos respecto de la respuesta TD: Grupo 1, se comportan como si no hubiese estímulo, por lo que no aumentan la expresión de los *GTLγ1*, *AICDA* ni, como es lógico los *CTγ1* (P6, P7, P13, P14, P15, P16, P21, P25 y P27); Grupo 2: no expresan *GLTγ1* pero conservan la activación de *AICDA* (P4 y P22); Grupo 3: presentan un comportamiento similar a los controles sanos (P9, P18, P24 y P28). El paciente 9, si bien mostró diferencias significativas (p=0.044) en el análisis de la activación de

AICDA mediante qRT-PCR, es capaz de expresar los *GLTγ1*, siendo probablemente suficiente esa baja expresión de la enzima, para realizar CSR *in vitro* y generar los *CTγ1*, razón por la cual se incluyó a este paciente en el Grupo 3.

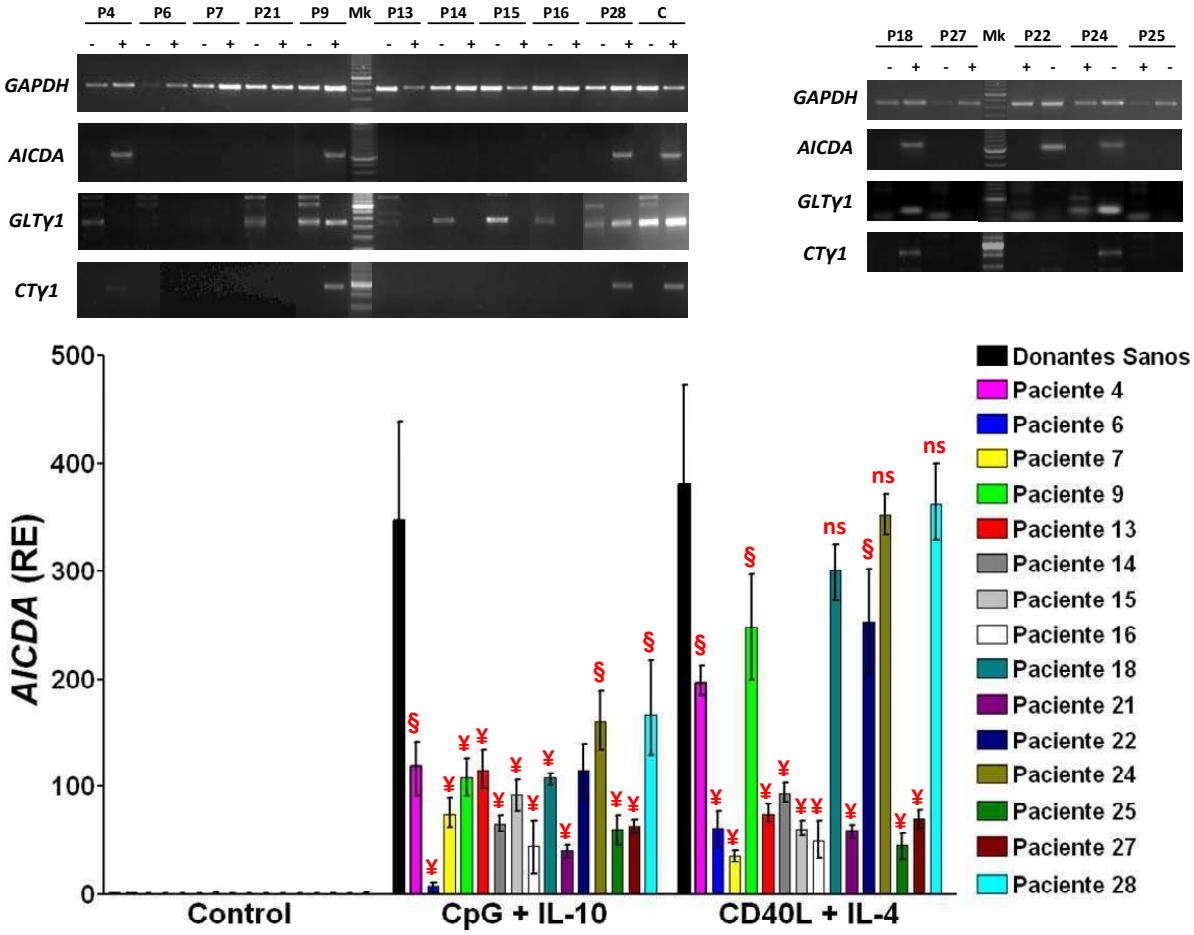


Figura 15: Activación de PBMC por vías TD y TI. Arriba: expresión de los transcriptos *AICDA*, *Iγ-Cγ1*(*GLTγ1*), *Iγ1-Cμ* (*CTγ1)* y *GAPDH* (control de carga) amplificados mediante RT-PCR a partir de ADNc de células de pacientes y controles pre (-) y post (+) activación con CD40L e IL-4 (vía TD) **Abajo:** análisis de los transcriptos de *AICDA* en células de pacientes y controles activadas por 2 o 4 días con CpG e IL-10 o anti-CD40 e IL-4. Las barras representan la media y el DS de tres experimentos independientes ¥ = ** $p<0.001$; § = * $p<0.05$, ns = no significativo.

Capítulo 3.

3.1 Estudios del receptor TACI en pacientes con IDCV

Como se expuso en la introducción, el miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNFR, del inglés *Tumor necrosis factor receptor*), TACI, se expresa en la superficie de los LB donde se une a dos ligandos, BAFF (TNFSF13B) y APRIL (TNFSF136). Ambos ligandos son mediadores inmunes específicos capaces de activar el CSR hacia IgG o IgA en los LB que expresan TACI.

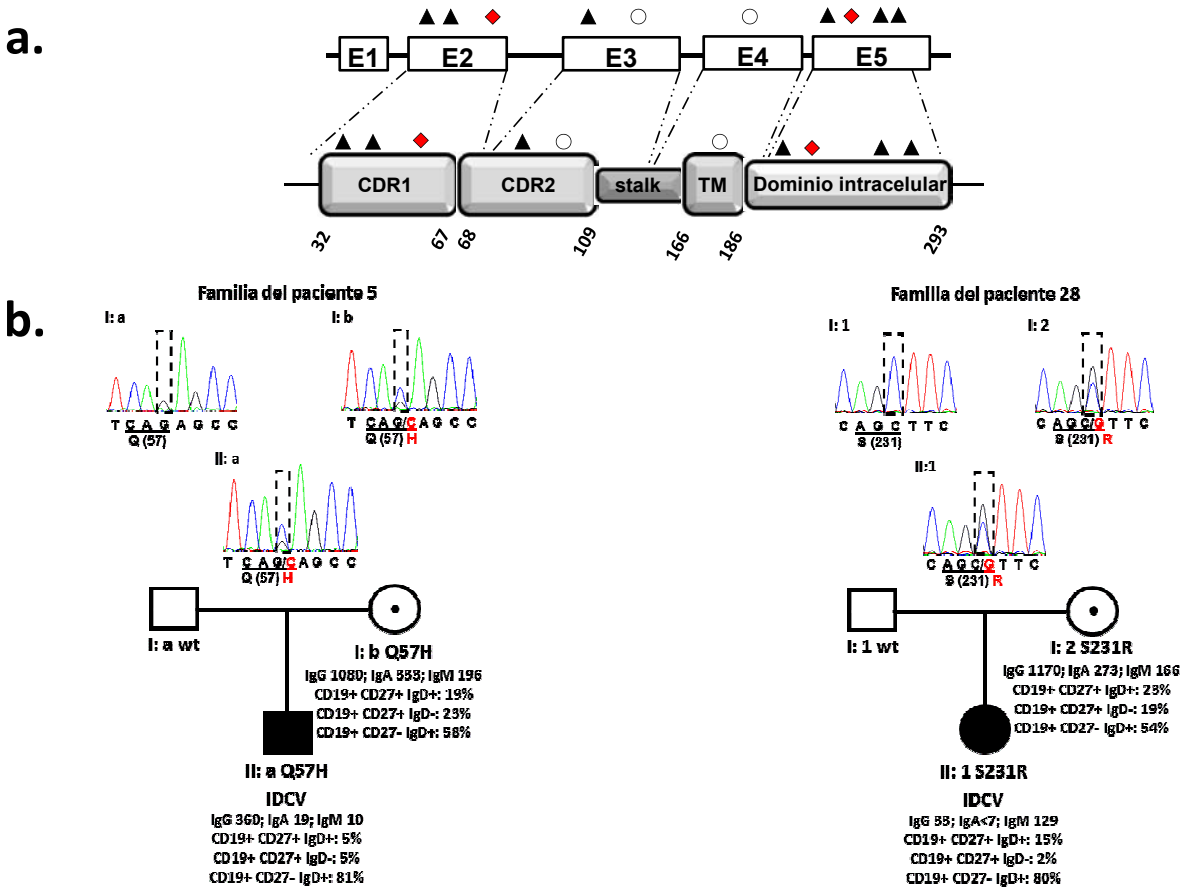
Mutaciones en el gen que codifica para TACI, *TNFRSF13B*, han sido reportadas en un 5 a un 10% de los pacientes con IDCV. Los estudios previos, llevados a cabo principalmente en adultos con IDCV, han identificado una gran cantidad de variantes alélicas, siendo A181E y C104R las más comunes, con frecuencias variables en diferentes poblaciones étnicas.[131] De hecho, estas dos variantes fueron las únicas evaluadas en un estudio reciente de mutaciones en TACI en población pediátrica.[107] Ambas variantes, sin embargo, también fueron observadas en estado heterocigota en individuos sanos aunque en frecuencias más bajas que en pacientes IDCV.

3.1.1 Estudios moleculares en TACI

3.1.1.1 Secuenciación del gen TNFRSF13B

Se analizaron los 5 exones codificantes de TACI y las regiones intrónicas adyacentes mediante secuenciación directa utilizando primers intrónicos en los 28 pacientes IDCV y en 60 controles sanos.

Se identificaron dos pacientes que portan mutaciones no descriptas hasta el momento en TACI, en ambos casos en estado heterocigota, Q57H y S231R (P5 y P28, respectivamente) (Ver Figura 16.a y b).[132]



c.

Mutaciones	T27T▲	W40R▲	Q57H◆	P97P▲	C104R○	A181E○	V220A▲	S231R◆	P251L▲	S277S▲	IVS4 -60t>c	IVS3 +25a>c
Pacientes FAM %	64,3	0,0	1,8	8,9	0,0	0,0	3,6	1,8	5,4	53,6	21,4	32,1
Controles FAM %	81,3	1,3	0,0	6,3	1,3	0,0	3,8	0,0	11,3	38,8	14,3	21,4

Figura 16: Análisis de la secuencia del gen *TNFRSF13B* en la población de pacientes IDCV. a) Representación esquemática del gen (arriba) y la proteína (abajo) de TACI, triángulos grises= polimorfismos; círculos blancos= C104R y A181E; diamantes rojos= mutaciones nuevas; E= exón; CDR= dominios ricos en cisteína; TM= dominio transmembrana. **b)** Elecroferogramas de la secuencia de ADN de *TNFRSF13B* y pedigrees de las dos familias con mutaciones nuevas en TACI. Símbolos: círculos indican mujer; cuadrados, hombres; los símbolos rellenos de negro indican pacientes IDCV; los símbolos rellenos de blanco, familiares sanos; el punto negro central indica portador sano. Debajo del pedigree se indica el fenotipo B y los niveles de Igs (en mg/dl) para todos los portadores de las mutaciones. **c)** Frecuencia de las mutaciones en TACI en los pacientes IDCV y los donantes sanos (rango de edad: 2,5 – 14,9 años; N = 60). FAM = frecuencia del alelo minoritario. Los símbolos representan lo mismo que en a).

Por otro lado, en nuestra cohorte de pacientes y controles se encontraron los polimorfismos T27T (rs8072293), P97P (rs35062843), V220A (rs56063729), P251L (rs34562254) y S277S (rs11078355) en frecuencias comparables a las previamente publicadas tanto en IDCV como en NCBI build 36,3 para individuos sanos y pacientes. (Ver Figura 16.c) [85, 131, 133-135]

Resulta interesante notar que las mutaciones C104R y A181E, típicamente descriptas como las variantes más frecuentes en IDCV[85, 134, 135], no fueron identificadas en nuestra cohorte de pacientes. Además, la mutación W40R descripta previamente en un paciente IDCV[135] fue hallada en estado heterocigota en nuestra población sana. Esta última mutación se encuentra también en la base de SNP del NCBI (dsSNP, del inglés *data base Single nucleotide polymorphism*) (rs72553874), indicando que puede ser hallada tanto como un polimorfismo como en pacientes IDCV, siendo una demostración más de la penetrancia clínica variable de esta enfermedad autosómica dominante.

Las dos mutaciones nuevas observadas en nuestra cohorte de pacientes IDCV en el gen *TNFRSF13B*, Q57H y S231R, no han sido descriptas con anterioridad a este estudio. Estas sustituciones aminoacídicas tampoco fueron reportadas como polimorfismos de un solo nucleótido en la base de datos dbSNP ni halladas en nuestra cohorte de donantes sanos. (Ver Figura 16.c)

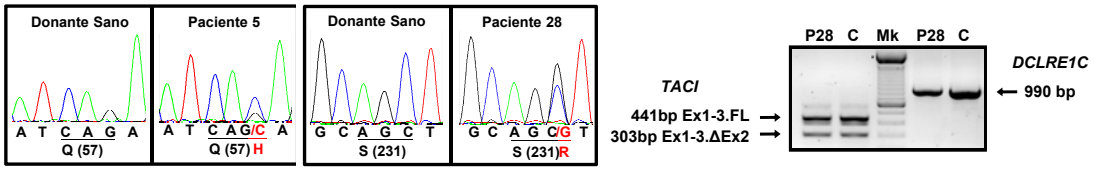
3.1.1.2 Análisis bioinformáticos de las nuevas mutaciones en TACI

Teniendo en cuenta que las herramientas bioinformáticas pueden resultar útiles para predecir los efectos de las sustituciones aminoacídicas, se llevaron adelante análisis de las nuevas mutaciones *missense* mediante el uso de diferentes programas informáticos. El PolyPhen (del inglés, *Polymorphism phenotyping*),[136] un método bioinformático que evalúa el posible impacto de un cambio *missense* en la estructura y función de una proteína humana mediante el uso de consideraciones físicas y comparativas, predijo que ambas mutaciones Q57H y S231R son "posiblemente dañinas" por alterar la estructura local de la proteína (score 1,664 y ,1764 respectivamente) (Ver Figura 17.a). El otro método utilizado, SIFT (del inglés, *Sorting intolerant from toleran*)[137], no reveló información útil, (bajo nivel de confianza de sus predicciones), probablemente debido al número limitado de secuencias comparables en las posiciones aminoacídicas en las que se encuentran las nuevas mutaciones. De hecho, el uso de métodos que tienen en consideración el grado de conservación de la secuencia en la estimación del impacto de una sustitución de aminoácidos en la proteína, en cuanto a su funcionalidad y estructura tridimensional, se encuentra restringido debido a la falta de proteínas con estructura resuelta y alta homología con TACI.

a.

Paciente	Símbolo del gen (Nombre, secuencia de referencia)	Cambio nucleotídico	Cambio protéico	Polyphen score	Predicción del efecto del SNP
5	TNFRSF13B (TACI, NM_012452.2)	c.171G>C	Q57H	1,664	Posiblemente dañina
28		c.693C>G	S231R	1.764	Posiblemente dañina

b.



c.

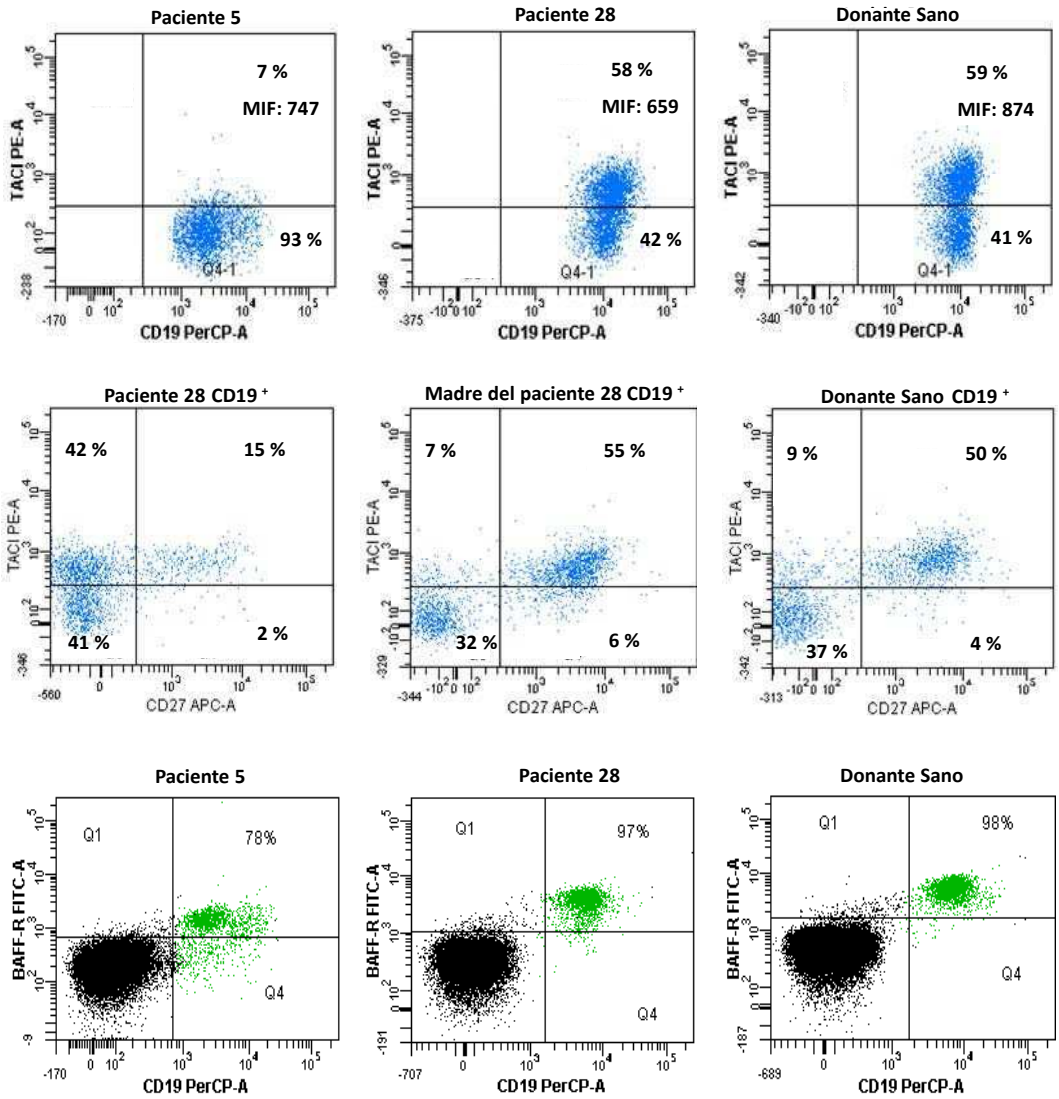


Figura 17: Análisis de las nuevas mutaciones en TACI. a) Análisis bioinformático de las nuevas sustituciones aminoacídicas en TACI mediante el uso de PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*). **b)** Análisis de la secuencia de ARNm en donantes sanos y pacientes con las nuevas mutaciones y expresión del ARNm de TACI y ARTEMIS (*DCLRE1C,* control de carga) en el paciente 28 y controles (C). **c)** Análisis por citometría de flujo de la expresión de TACI en la superficie de las células B de los pacientes con nuevas mutaciones y los donantes sanos (arriba); co-expresión de TACI con CD27 en células B del paciente IDCV TACI-S231R, su madre y donantes sanos (medio); expresión de BAFF-R en la superficie de las células B (en verde) en pacientes con mutaciones nuevas en TACI y donantes sanos (abajo). MIF = Media de intensidad de Fluorescencia.

3.1.1.3 Análisis de la expresión de TACI en las nuevas mutaciones encontradas

Para evaluar las consecuencias que los cambios nucleotídicos podrían tener a nivel del ARNm, en términos de expresión y fidelidad del splicing, se analizó la expresión y secuencia del ARNm en estos dos pacientes. En ambos casos, se encontraron presentes los alelos mutados, sin efecto aparente en el splicing. (Ver figura 17.b)

Además se analizó en ambos pacientes con mutaciones nuevas en *TNFRSF13B,* la expresión de la proteína TACI en LB de sangre periférica a través de citometría de flujo. Mediante el uso de un Ac monoclonal que reconoce el dominio extracelular de TACI, se detectó expresión de esta proteína en la superficie de los LB tanto en los pacientes como en los donantes sanos, (Ver Figura 17.c). Sin embargo, en el paciente 5 la expresión de TACI en LB $CD19^{+}$ resultó disminuida de forma reproducible, reflejando probablemente el bajo porcentaje de LB de memoria presentes en sangre periférica de este paciente con respecto a nuestro grupo control ($CD27^{+}$ IgD^{+}: 5% y $CD27^{+}$ IgD^{-}: 5%, ambos medidos como porcentajes de la ventana de LB $CD19^{+}$) (Ver Tabla II). Esto último teniendo en cuenta que TACI se expresa principalmente en LB de memoria de sangre periférica $CD27^{+}$[138], y que en el paciente 5 la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de TACI se mantiene dentro del intervalo esperado. (Ver Figura 17.c)

La expresión de TACI no se vio afectada en LB de sangre periférica del paciente 28, lo que coincide con lo observado en estudios previos en células transfectadas que portan la sustitución S231R generada *in vitro* mediante el uso de mutagénesis dirigida [70] (Ver punto 2 de este capítulo). Es importante señalar además que el paciente 28, TACI-S231R, posee una expansión relativa de los LB TACI^{+} CD27^{-} IgD^{+} (Ver Figura 17.c). En este paciente, la expresión de BAFF-R en la superficie de los LB, otro miembro perteneciente a las proteínas de la superfamilia de TNFR, fue comparable a la cohorte de donantes sanos (Ver Figura 17.c).

El estudio de los padres, todos ellos sin compromiso inmunológico, de los pacientes 5 y 28 reveló que ambas madres sanas portan en estado heterocigota, las mutaciones Q57H y S231R, respectivamente (ver parámetros inmunológicos en la Figura 16.b). Estos resultados son compatibles con estudios previos de mutaciones heterocigotas en *TNFRSF13* y apoyan la hipótesis de una penetrancia clínica incompleta en la deficiencia de TACI.[135]

Por otro lado, comparando parámetros clínicos e inmunológicos ninguna correlación puede establecerse entre los dos pacientes portadores de estas nuevas mutaciones. En efecto, mientras que el paciente 28, TACI-S231R presenta menos de 2% de LB de memoria así como autoinmunidad y esplenomegalia, el paciente 5, TACI-Q57H, pertenece al subgrupo smB^{+} de EUROclass para pacientes IDCV en ausencia de complicaciones no infecciosas.

3.1.2 Estudios funcionales en células TACI-S231R

Se ha demostrado que la activación del proceso de CSR necesita una primer señal derivada de la interacción entre un TNFR (como CD40 o TACI), expresado en la superficie de los LB, y una co-señal de citoquinas.

TACI a su vez requiere la unión a APRIL y puede actuar en sinergia con CD40 y TLR9 para aumentar la producción de Igs y la generación de células plasmáticas *in vitro*.[139, 140]

Como se mencionó en la introducción, la respuesta TD de activación de los LB a nivel fisiológico, requiere un largo período de tiempo para controlar a los patógenos. Para superar esta limitación los LB extrafoliculares producen IgM, IgG e IgA a través de una vía TI más rápida que involucra APRIL y BAFF.[141] Estos factores son liberados por las células inmunes en respuesta a señales que emanan de los TLR tras reconocer PAMPs microbianos y son capaces de activar NF-κB mediante el reclutamiento de los llamados factores asociados a TNFR (TRAFs) al receptor TACI. (Ver Figura 8)[55, 142, 143]

Una publicación reciente señala que BAFF y APRIL requieren para inducir CSR el reclutamiento de MyD88 a un dominio citoplasmático altamente conservado de TACI (THC, del inglés *TACI highly conserved domain*). El mismo fue identificado a través de la generación por mutagénesis dirigida de sustituciones, E228R, T229R, S231R y

C233R, que ponían en relieve la importancia de este nuevo dominio THC.[70] MyD88 es un regulador de la inmunidad innata conocido por activar NF-κB y otros factores de transcripción a través de su unión al dominio TIR (del inglés, *Toll interleukin-1 receptor*) de los TLR y del receptor de IL-1 (IL-1R). Sin embargo, BAFF y APRIL promueven el reclutamiento de MyD88 al THC de TACI mediante un dominio diferente del dominio TIR de los TLR. Se ha demostrado que la inducción del CSR por TACI se encuentra bloqueada en células humanas y de ratón deficientes en MyD88 o en la quinasa IRAK4, indicando la importancia de MyD88 en la vía dependiente de TACI que lleva a la diversificación de Igs en los LB.[70]

Dado que el paciente 28 presentó la mutación TACI-S231R[132], la cual mostró en los estudios in silico que afecta el sitio THC de la proteína, específicamente el dominio de unión a MyD88, decidimos evaluar el funcionamiento de esta vía en las células del paciente.[69]

Cabe destacar que el paciente 28, al constituir el primer caso de IDCV asociado con una mutación en el dominio THC de TACI, resulta un modelo de importancia para ampliar los resultados obtenidos a partir de modelos *in vitro* e *in silico*.

3.1.2.1 Análisis de expresión proteica del receptor TACI, capacidad de unión al ligando y activación de CSR en células TACI-S231R

Para evaluar la capacidad de activación del CSR a través de TACI en células del paciente 28 primero investigamos, en estas células TACI-S231R, el nivel de expresión de este receptor y su capacidad de unión a APRIL. La expresión de TACI resultó similar a la observada en controles (Ver Figura 18.a) y la unión al ligando APRIL se encontró dentro de los rangos observados en donantes sanos (Ver Figura 18.b). Cabe destacar que, como fue demostrado anteriormente, TACI puede expresarse en su forma completa o como resultado de una forma alternativa de splicing no conteniendo los aminoácidos codificados por el exón 2, cuyo rol fisiológico no se encuentra definido aún.[144]

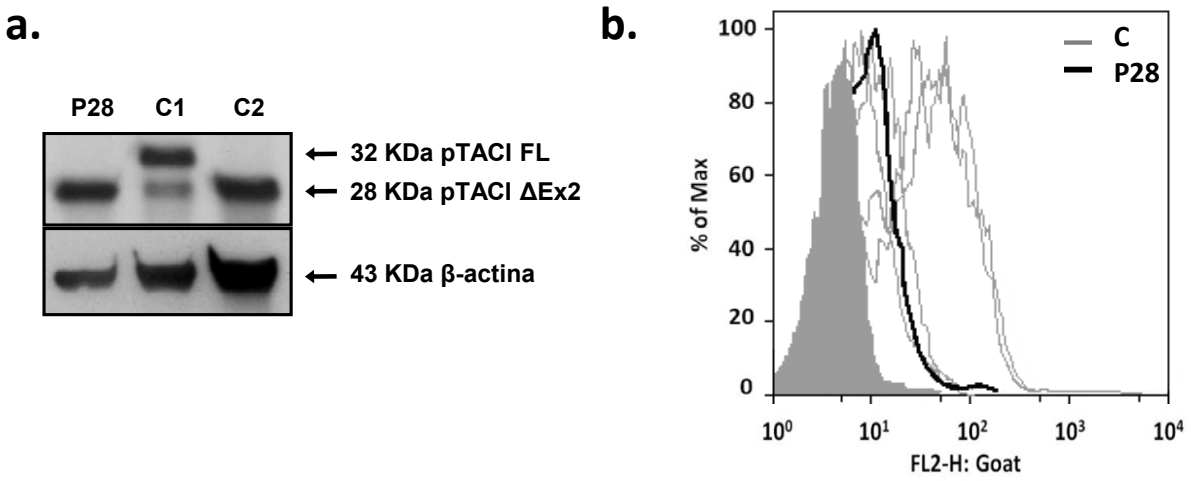


Figura 18: Caracterización de la expresión proteica de TACI y la capacidad de unión a APRIL en células TACI-S231R a) Análisis por western blot de la proteína TACI y β-actina (control de carga) en el paciente 28 controles sanos. **b)** Unión a APRIL. C = Controles, P28 =paciente 28. pTACI FL = proteína TACI completa; pTACIΔEx2= proteína TACI sin el exón 2.

Con la finalidad de evaluar *in vitro* la activación del CSR a través de TACI, se cultivaron LB naïve del paciente 28 en presencia o ausencia de un Ac agonista anti-TACI junto a citoquinas necesarias para ello como IL-4 e IL-10 (co-señales). La

secreción de IgG analizada por ELISA permitió evaluar la capacidad de inducción de CSR (Ver Figura 19.a).

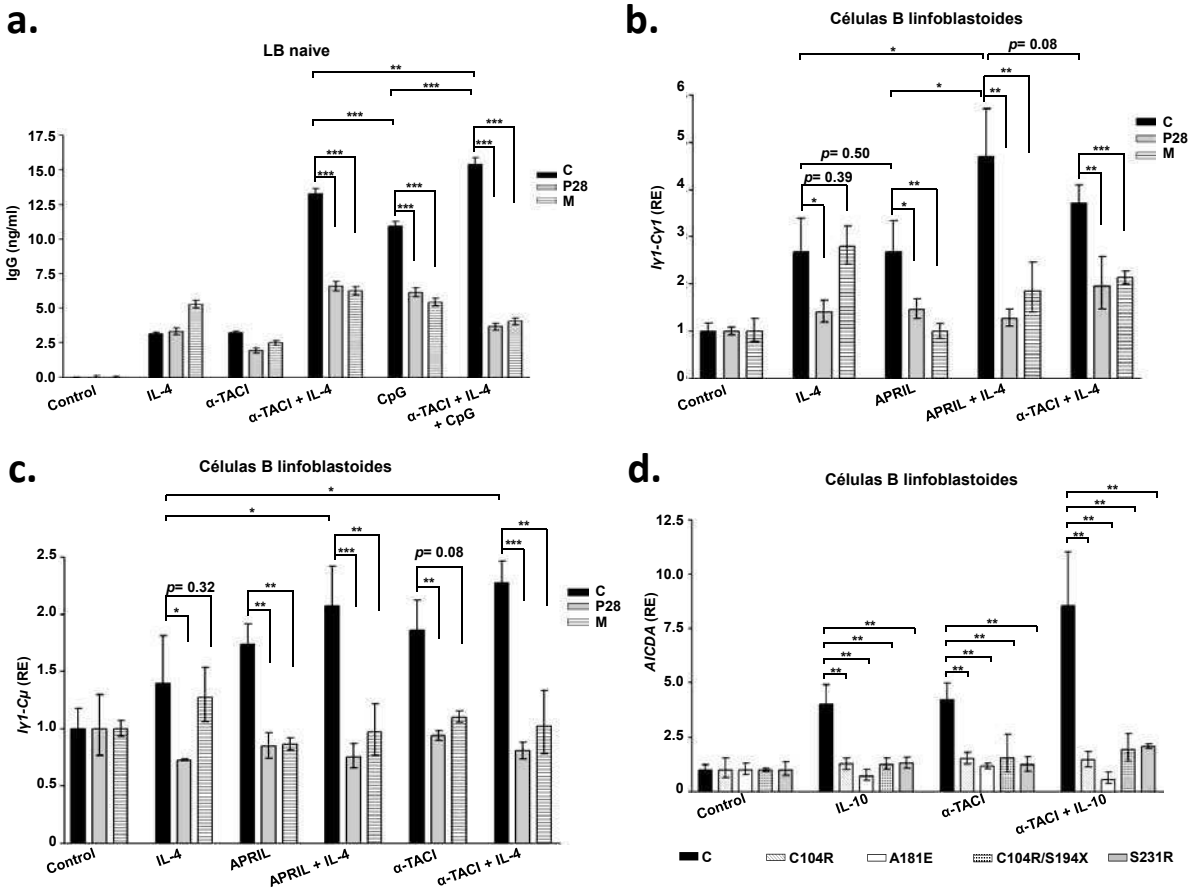


Figura 19: Evaluación de la inducción del CSR en LB mediante estímulos específicos. a) Secreción de IgG medida por ELISA en LB naïve incubados por 7 días con: Ac control de isotipo (Control), anti-TACI, IL-4 y/o ADN CpG. **(b-c)** Análisis mediante qRT-PCR de *GLTγ1* (*Iγ1-Cγ*) (b) y *CTγ1* (*Iγ1*-Cμ) (c) en células cultivadas durante 2 días en presencia o ausencia de anti-TACI, APRIL y/o IL-4. **d)** Análisis mediante qRT-PCR de *AICDA* en células deficientes de TACI y controles sanos, cultivas por 2 días en presencia o ausencia de anti-TACI y/o IL-10. Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes. ***p<0.001; **p<0.005; *p<0.05. C = controles; P28= paciente 28; M = madre del paciente.

Se puede observar en la Figura 19.a que la secreción de IgG resultó incrementada en células de donantes sanos expuestas a anti-TACI o anti-TACI y citoquinas luego de 7 días de activación, mientras que, en las células TACI-S231R este aumento se encontró significativamente atenuado. Resulta interesante resaltar en este punto que

las células de la madre del paciente 28, que portan la misma mutación[132], tampoco son capaces de secretar IgG ante estos estímulos. (Ver Figura 19.a)

Estudios previos mostraron que la unión de ADN CpG al TLR9 mejora la secreción de IgG en LB expuestos a anti-TACI y citoquinas activadoras[143, 145]. Decidimos entonces evaluar su efecto en los LB naïve que portan la mutación S231R. Como se observa en la Figura 19.a, luego de 7 días de exposición a anti-TACI, IL-4 y ADN CpG, los LB TACI-S231R mostraron un deterioro pronunciado respecto de los controles sanos en la capacidad de producción de IgG. Puede observarse también que las células TACI-S231R presentaron una respuesta alterada respecto a la producción de Igs al ser estimuladas únicamente mediante el TLR9, hecho que ya había sido demostrado en trabajos previos con pacientes con IDCV[146]. Esta falla, que no pudo ser corregida a través de la activación de TACI (Ver Figura 19.a), plantea una posible interferencia entre las dos vías de señalización. De hecho ya se había observado que el paciente 28, capítulo 2 punto 3, no logra activar *AICDA*, tras la estimulación con CpG e IL-10 (Ver Figura 15).

En un intento de localizar la etapa de CSR en la cual ocurre el freno tras estímulo de la vía de TACI, analizamos los transcriptos *GLTγ1*, *CTγ1* y *AICDA* por RT-PCR cuantitativa en las células B linfoblastoides obtenidas del paciente y de su madre, de forma similar a la descripta en el capítulo 2 (Ver Figuras 19.b - d).

Al comparar las células TACI-S231R con las células control, se observa que poseen poca o nula inducción de *GLTγ1*, *CTγ1* y *AICDA*, tras 2 días de estimulación con IL-4 y ligandos de TACI como APRIL (Ver Figura 19.b - d). La activación de TACI arrojó resultados similares utilizando anti-TACI o APRIL como agonista (Ver Figura 19).

Una disminución en la expresión de *AICDA* ha podido verificarse también en células de pacientes IDCV que no pertenecen a nuestra cohorte y que portan mutaciones heterocigotas para cualquiera de las dos mutaciones más comunes encontradas en TACI, C104R y A181E (Ver Figura 19.c). La mutación C104R suprime la unión al ligando y, en consecuencia, la señalización [82, 83], mientras que la mutación A181E, que está en el dominio transmembrana de la proteína, no afecta a la unión del ligando pero limita la señalización de TACI *in vitro* e *in vivo*.[147]

3.1.2.2 Análisis de sinergismo en la activación del LB entre las vías TACI y CD40 en células TACI-S231R

Se ha sugerido que, además de su papel clave en la respuesta de Acs frente a Ags TI, TACI podría ser importante para la respuesta de Acs frente a los Ags TD.[70, 139, 145] Podemos observar en la Figura 20.a que, en concordancia con lo reportado previamente, la activación de TACI en células de donantes sanos estimuladas con concentraciones subóptimas de anti-CD40 e IL-10 resulta en un incremento en los transcriptos *AICDA*. Por el contrario, las células B linfoblastoides del paciente 28,

TACI-S231R, tratadas con APRIL no mostraron ningún efecto aditivo por sobre la estimulación de CD40 (Ver Figura 20.a).

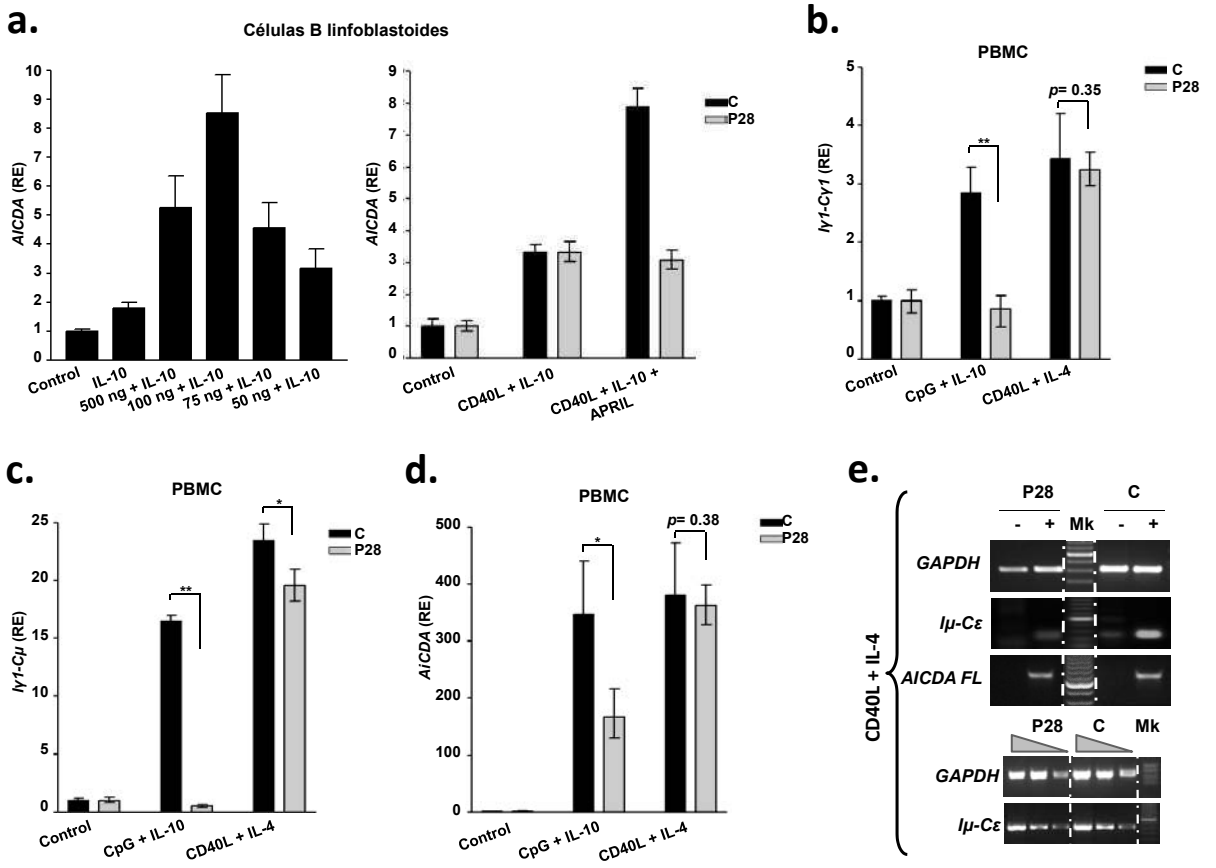


Figura 20: APRIL colabora con la activación del CSR en respuestas TI y TD. a) A la izquierda, estimulación de células de donantes sanos con IL-10 y diferentes concentraciones de anti-CD40. A la derecha, análisis por qRT-PCR de la activación de *AICDA*, en células cultivadas durante 2 días con APRIL y concentraciones subóptimas de anti-CD40 (75 ng/ml). **(b-d)** Análisis por qRT-PCR de *GLTγ1* (*Iγ1-Cγ*) (b), *CTγ1* (*Iγ1-Cμ*) (c) y *AICDA* (d) en células cultivadas durante 2 o 4 días en presencia o ausencia de CpG e IL-10 o anti-CD40L e IL-4. Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes. ***p<0.001; **p<0.005; *p<0.05. **e)** Arriba, expresión del ARNm de *GLTε* (*Iε-Cε*) y *AICDA* medida por RT-PCR en LB estimulados durante 2 días con CD40L e IL-4. Abajo, análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión de los *GLTε* luego de 2 días de activación. P28 = paciente 28, C = donantes sanos.

Es importante señalar que en las células del paciente, la estimulación de CSR mediante concentraciones óptimas de activación de CD40, se encuentra conservada (Ver Figuras 15 y 20.b-d), lo que sugiere que la mutación TACI-S231R afecta específicamente la cooperación entre TACI y la vía de señalización de CD40 que llevarían a una inducción óptima de CSR.

Como puede observarse en la Figura 20.e, los *GLTε* también se expresan normalmente luego de la activación en condiciones óptimas con CD40L e IL-4.

En conjunto, y teniendo en cuenta los resultados hasta el momento, las células portadoras de la mutación S231R, presentan un deterioro en la capacidad de inducción del CSR a través de las vías de señalización de TACI y TLR9, así como una falla en la cooperación mediada por APRIL en condiciones subóptimas de activación de CD40 en los LB.

Estos resultados apuntan a la presencia de un defecto *in vivo* del CSR, así como a una falla en la activación *in vitro* con ligandos afines a TACI en presencia de citoquinas activadoras, sugiriendo un defecto localizado aguas arriba de la etapa de transcripción, dado que incluso la producción de los *GLTγ1* resultó deficiente (Ver Figuras 19.b y 20.b). De hecho, las etapas distintivas de la síntesis de IgG1, tales como la expresión de *GLTγ1*, *CTγ1* y *AICDA* tuvieron lugar normalmente tras activación a través de la vía CD40, descartando así una deficiencia intrínseca en la maquinaria del CSR (Ver Figura 20.b-d). Dado que TACI presenta una expresión normal en las células TACI-S231R (Ver Figura 18.a), estos resultados parecen estar específicamente vinculados a una falla en la activación del CSR mediante la vía de señalización de TACI.

3.1.2.3 Análisis de la capacidad de reclutamiento de MyD88 al THC de TACI en células TACI-S231R

Hasta ahora, se puede inferir que los LB TACI-S231R expuestos a ligandos de TACI y TLR9 o de TACI y CD40, no integran las señales de estos receptores para lograr una producción óptima de Acs. La señalización intracelular de todas estas vías de inducción de CSR conduce a la activación de NF-κB[148], factor crítico para la expresión de *AICDA*.[149]

Teniendo en cuenta que la mutación S231R afecta el dominio THC de TACI, se evaluó la capacidad de APRIL de inducir el reclutamiento de MyD88 a TACI en LB naïve que portan la mutación S231R. Previamente se pudo comprobar que estas células expresan valores comparables de la proteína MyD88 respecto de los donantes sanos (Ver Figura 21.a). A través del uso de la microscopía confocal, pudo observarse que luego de la exposición a APRIL, los LB de donantes sanos desarrollan grandes parches de membrana donde co-localiza TACI con MyD88 (Ver Figura 21.b). Es importante señalar que las células del control seleccionado para este experimento no difieren significativamente de las células del paciente 28 en su capacidad de unión a APRIL (Ver Figura 18.b).

Como se indicó anteriormente, la asociación de TRAF2 a este complejo también es necesaria para desencadenar los eventos de señalización río abajo, y de hecho, como se observa en la Figura 21.b, puede identificarse junto con TACI después de la estimulación de los LB de donantes sanos con APRIL.[70] Estos resultados pudieron ser reproducidos mediante el uso de células B linfoblastoides de dador sano, y esto a

pesar de que en líneas celulares de LB hay una ocupación constitutiva de TACI por ligandos autócrinos que podrían complicar la demostración del reclutamiento de MyD88 a TACI vía APRIL (Ver Figura 21.b). Por el contrario, en los LB naïve y células B linfoblastoides TACI-S231R, tanto del paciente 28 como de su madre, APRIL no logró inducir estos parches en la membrana celular (Ver Figura 20.b).

Cabe destacar que el defecto observado es específico de esta mutación que afecta el dominio THC, ya que las células B linfoblastoides de un paciente ICDV heterocigota para la mutación A181E, mantienen conservada la capacidad de reclutar MyD88 a TACI vía APRIL (Ver Figura 21.b). Resultados previos respecto de esta mutación han indicado que a pesar de la falla en la señalización, TACI-A181E es capaz de unirse al ligando APRIL correctamente y acoplarse mediante interacciones homotípicas.[147, 150] Nuestros hallazgos ahora también excluyen en estas células TACI-A181E una falla en el reclutamiento de MyD88 como causa de la falta de inducción de *AICDA* en respuesta a la activación de TACI (Ver Figuras 19.c y 21.b).

Por último es importante señalar que todos los experimentos realizados con las células del padre del paciente 28, que no portan la mutación S231R, mostraron resultados similares a los obtenidos con las células de donantes sanos. Estos datos sin embargo no fueron incluidos en las figuras con el fin de simplificar los gráficos de los resultados.

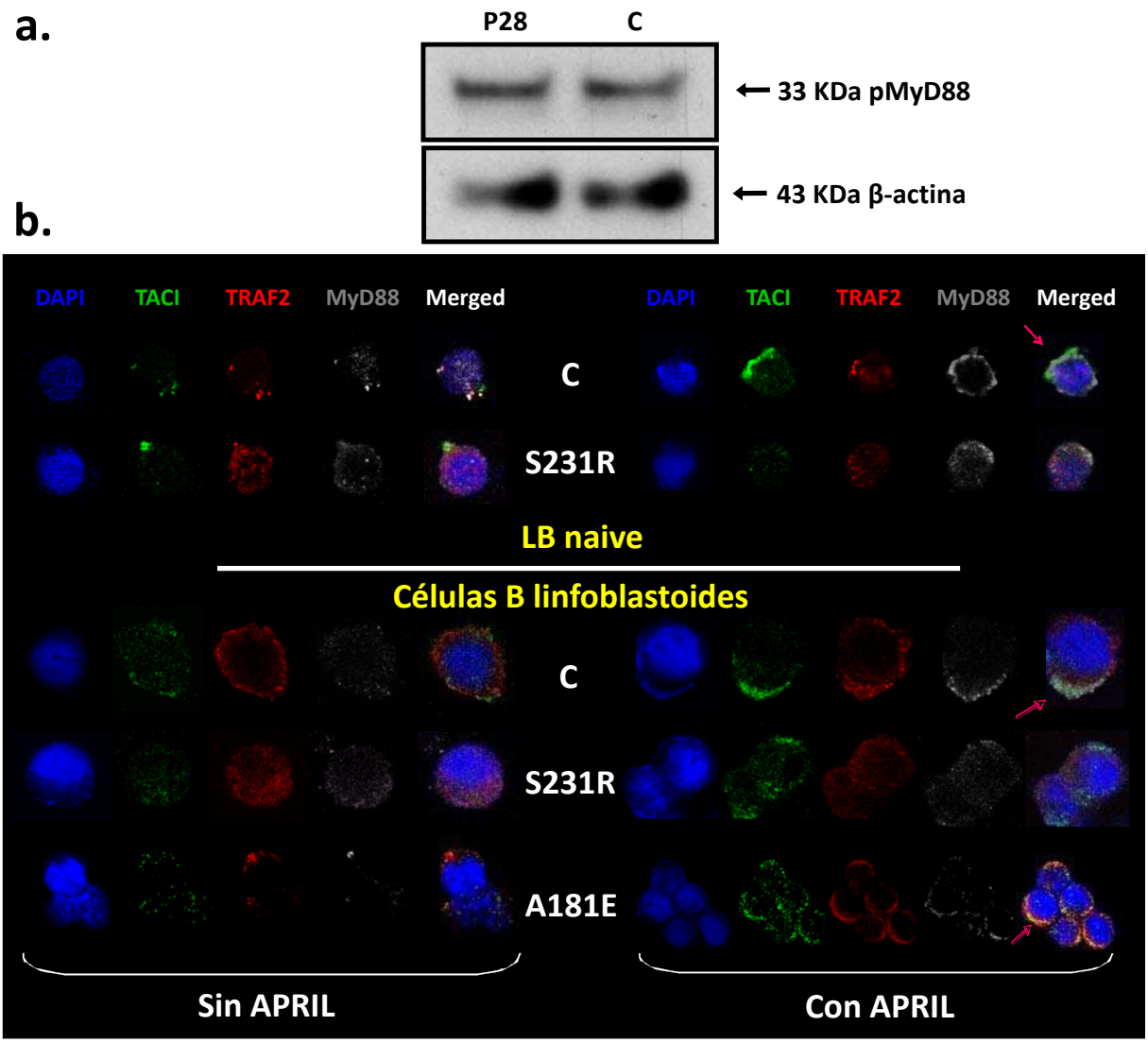


Figura 21: Reclutamiento de MyD88 y TRAF2, luego de la unión de APRIL a TACI. a) Análisis por western blot de la proteína MyD88 y β-actina (control de carga) en el paciente 28 y controles sanos. **b)** Microscopía confocal de TACI (verde), TRAF2 (rojo) y MyD88 (gris), en células expuestas a APRIL o medio sólo durante 15 minutos. Las flechas indican co-localización.

Discusión.

1. Marcada disminución de los LB *memoria con switch* en población pediátrica con IDCV. ¿Posible defecto en la diferenciación tardía del LB?

En este estudio se evaluaron los datos inmunológicos y clínicos en una cohorte de 28 pacientes pediátricos argentinos con IDCV (Ver Tablas I y II). Las anormalidades inmunológicas y sintomatologías clínicas que se encuentran en el grupo de pacientes son comparables a las encontradas en otra población pediátrica con IDCV en un informe reciente y también en la población adulta.[103, 107] Las infecciones de las vías respiratorias se presentaron como la manifestación clínica más frecuente en nuestro grupo de pacientes, mientras que la autoinmunidad presentó en este caso una baja incidencia (~17%).

Al analizar en estos pacientes las subpoblaciones de LB de sangre periférica se reveló una disminución en los LB de *memoria sin switch* (19/25) y un aumento de los LB naïve (20/25). Además, se observó una marcada disminución de los LB *memoria con switch* en 24 de los 25 pacientes y una mayor incidencia del subgrupo smB^- (18/25) en comparación con lo reportado en poblaciones de adultos IDCV.[103] Este hallazgo también reportado en otro grupo de IDCV de comienzo pediátrico[107], podría indicar que los pacientes pediátricos tienen un defecto más grave en la diferenciación de los LB que los adultos. En todas las subpoblaciones de LB analizadas, la cohorte de pacientes IDCV resultó significativamente diferente al grupo control de donantes sanos (two tailed Studen't *t* test, $p<0,0001$; Ver Figura 9).

Todos los pacientes que manifestaron complicaciones clínicas como autoinmunidad, granulomas o esplenomegalia se encuentran dentro del subgrupo smB$^-$. A pesar de no haberse hallado asociación significativa entre las complicaciones no infecciosas y el porcentaje de LB de memoria con switch, el alto número de pacientes de nuestra cohorte con disminución en esta subpoblación linfocitaria reforzaba la hipótesis de un defecto en la diferenciación tardía B.

2. Heterogeneidad en los resultados de los estudios de los estadíos de diferenciación terminal de los LB ¿Camino a una posible clasificación de pacientes IDCV?

Se decidió evaluar mediante ensayos de funcionalidad, los aspectos cualitativos de los Acs producidos por los pacientes con IDCV ya que el defecto molecular en los mismos podría encontrarse en cualquier etapa crítica de la diferenciación tardía y maduración de los LB.[88, 108] Además, al día de hoy no existe una clasificación que correlacione estos datos con la evolución clínica de los pacientes, por lo que estudios de este tipo podrían dar lugar a una nueva clasificación además de orientar en la búsqueda de nuevos blancos genéticos.

En los últimos años, la evaluación de deficiencias funcionales en los LB respecto a su capacidad de realizar el CSR ha llevado al descubrimiento de nuevos defectos moleculares que pueden o no estar asociados con la generación defectuosa de SHM en la región V de las Igs.[128, 151, 152] La identificación molecular y el análisis de varias

deficiencias de Igs han hecho posible describir mejor los mecanismos subyacentes a las vías de CSR y SHM, las cuales son elementos clave en la maduración de las respuestas de Acs.[153]

Como se mencionó en la introducción, el CSR y la SHM ocurren ambos en los CGs con activación TD o TI[42-44], sin embargo, no son prerrequisito uno del otro[113, 114], pero comparten enzimas y cofactores entre sus vías de activación.

Dentro de las alteraciones genéticas encontradas que provocan un defecto tanto en el CSR como en la SHM, se encuentran aquellas que causan los síndromes de HIGM, como ser las deficiencias de *CD40* y *CD40L*[64, 65], demostrando el papel esencial de la vía de señalización de CD40 en los LB para ambos mecanismos. Otras deficiencias en CSR y SHM se encuentran provocadas por defectos intrínsecos en las primeras etapas de ambas vías[154], como ser mutaciones en el gen *AICDA*[155] o en *UNG.*[156]

La reparación de las lesiones en el ADN inducidas por AICDA y UNG se da de manera distinta en las regiones S y V. Mientras que en las regiones S luego de la DSBs del ADN se requiere del sistema de reparación de NHEJ con fosforilación de la histona H2AX[157], presencia del complejo MRE11/RAD50/NBS1[158, 159] y de las proteínas 53BP1[160] y MDC1[161], entre otras; en las regiones V se requiere del sistema de reparación con desajustes (MMR, del inglés, *Mismatch repair*) y de polimerasas de ADN propensas a errores, pero no del sistema NHEJ[124, 126] ni de H2AX, MRE11,

NBS1[162] o 53BP1[127, 161]. Por otro lado el complejo Msh2/Msh6 es esencial para SHM ya que recluta a Exo1 y la polimerasa.[163]

Los mecanismos de CSR y SHM no se encuentran totalmente dilucidados, por lo que es muy probable que otras moléculas río abajo o río arriba de la escisión de la doble hebra del ADN estén involucradas en uno, otro o ambos mecanismos. Se han detectado en pacientes con IDP, deficiencias de CSR y/o SHM sin defecto génico dentro de las moléculas conocidas.[92, 94] En este sentido, el estudio de la capacidad de SHM y CSR en pacientes IDCV, podría ayudar a encontrar y revelar el rol de nuevas proteínas implicadas.

Se han presentado a lo largo del capítulo 2 de esta tesis los resultados, en pacientes con IDCV, de los análisis de la SHM *in vivo* y el CSR *in vivo* e *in vitro*.

En el caso de los resultados de la evaluación de la vía de SHM analizaremos en conjunto, tanto los resultados arrojados por el método de IgκREHMA como por el de SHA, ya que evalúan dos aspectos complementarios de esta vía, como ser mutaciones por sustitución o por microinserción/microdeleción, respectivamente.

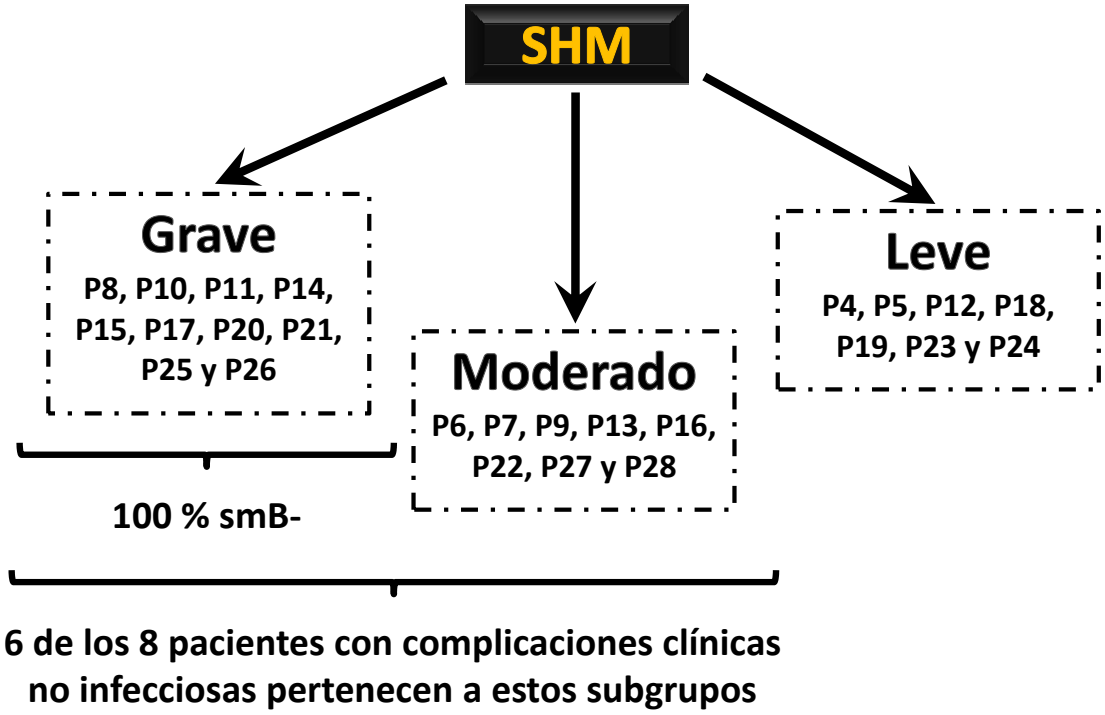
De esta manera, combinando los datos volcados en las tablas IV y V, se observa que en mayor o menor medida, todos los pacientes IDCV poseen alterada la SHM y se los puede agrupar en al menos tres categorías:

- ***Defecto grave de SHM:*** aquellos pacientes con IgκREHMA Grupo A y SHM perturbado.

- ***Defecto moderado de SHM:*** aquellos pacientes con IgκREHMA Grupo A y SHA de perturbación normal ó IgκREHMA Grupo B y SHA perturbado.

- ***Defecto leve de SHM:*** aquellos pacientes con IgκREHMA Grupo B y SHA de perturbación normal.

Esquemáticamente teniendo en cuenta estas categorías los pacientes quedan distribuidos de la siguiente manera:

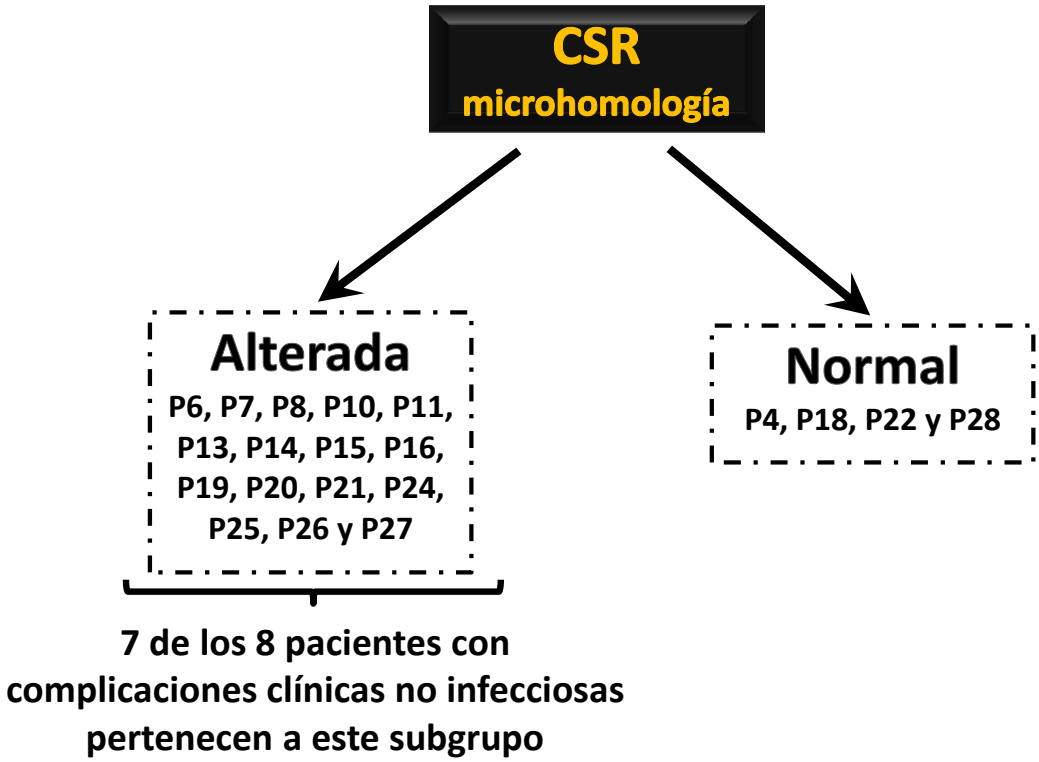


Por otro lado, de los datos obtenidos del análisis de reparación del ADN en la región S -S (Ver Tabla VI) se pueden proponer dos subgrupos:

- ***Reparación CSR alterada:*** aquellos pacientes con microhomología aumentada en la reparación de las regiones S.

- ***Reparación CSR normal:*** aquellos pacientes sin diferencias significativas en la reparación de las regiones S respecto a lo observado en donantes sanos.

Un esquema con estos subgrupos deja a los pacientes con la siguiente distribución:



Un análisis que combine los resultados de los estudios de CSR y SHM arroja al menos tres escenarios:

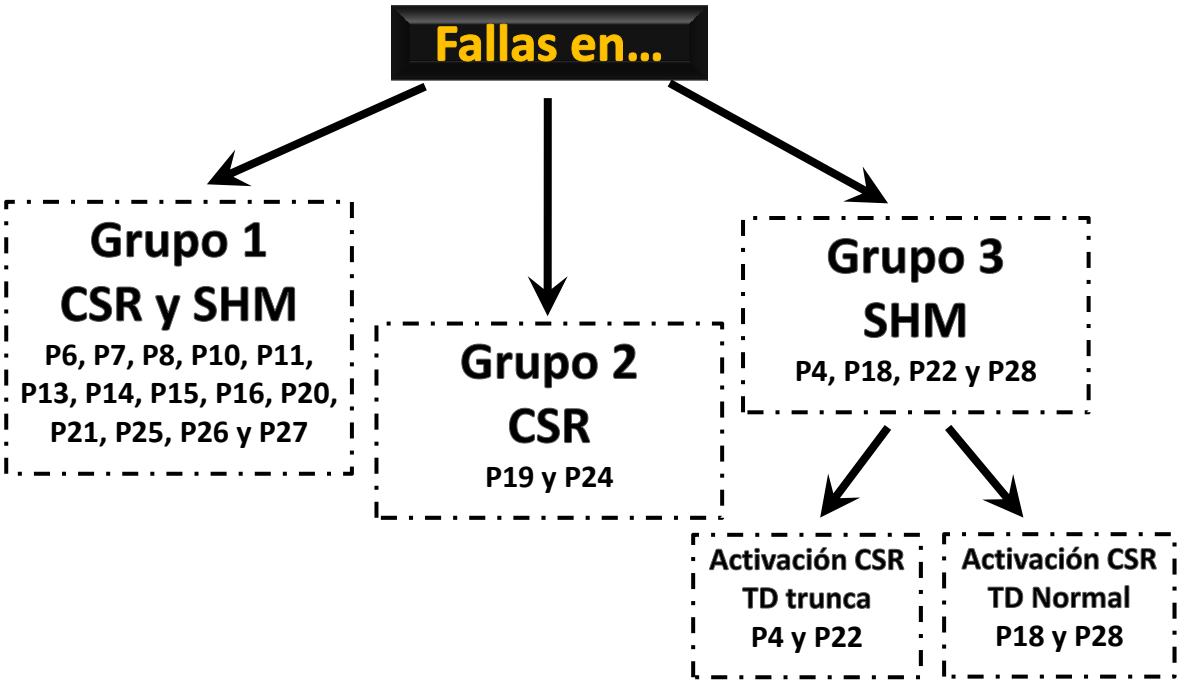
- ***Grupo 1:*** pacientes con fallas en ambos mecanismos, todos los que presentaron reparación en CSR alterada y defecto grave o moderado en SHM.

- ***Grupo 2:*** pacientes con fallas principalmente en reparación en CSR, todos los que presentaron reparación CSR alterada y defecto leve SHM.

- ***Grupo 3:*** pacientes con fallas en SHM, todos los que presentaron reparación normal en CSR y defecto moderado o leve en SHM.

Dentro de este último grupo podemos diferenciar dos nuevos subgrupos, si sumamos los resultados de la activación de CSR *in vitro* por vía TD: pacientes que logran activar sólo *AICDA*, y pacientes que poseen conservada toda la vía de activación del CSR.

Esquemáticamente la distribución quedaría de la siguiente manera:



Esta clasificación resulta útil para acotar los posibles defectos moleculares responsables del fenotipo celular en cada subgrupo de pacientes. Así, si en el Grupo 1 que posee fallas en ambos mecanismos se suma el hecho de que los pacientes poseen bajos LB de memoria total y todos a excepción del paciente 7 pertenecen al subgrupo de pacientes smB$^-$, junto a la presencia mayoritaria en este subgrupo de las complicaciones clínicas no infecciosas, es posible proponer la presencia de un defecto en genes que participan de la diferenciación tardía de los LB, como Bach2, que reprime la expresión de XBP-1 y Blimp1, es decir en factores que participan en la diferenciación a células plasmáticas y que juegan un rol crítico en el CSR y la SHM en ratones.[164]

Es factible también pensar en un defecto en las señales de supervivencia de los LB, que involucran por ejemplo la interacción de BAFF con BAFF-R [71, 165, 166], sin

embargo el hecho de haber observado en nueve pacientes (de los 14 que pertenecen a este grupo 1), en los cuales pudimos realizar la activación *in vitro* vía TD, un defecto en el mecanismo intrínseco del CSR vía CD40, no resulta acorde con este modelo fisiopatológico.

Sería posible también pensar en un defecto en proteínas que se activan en respuesta al daño en el ADN y que se encuentran reprimidas en los LB vía Bcl-6.[167] Si bien no existe hasta el momento un modelo animal que avale esta hipótesis, la identificación de los genes que están directamente reprimidos por Bcl-6 ha reforzado la noción de las funciones esenciales y especializadas de esta proteína en la formación del CG.[168, 169] En primer lugar, Bcl-6 parece ser crucial para que los LB del CG se sometan a las altas tasas de proliferación necesarias para el CSR y la SHM. De hecho, se ha demostrado que Bcl-6 suprime las respuestas de arresto del ciclo celular y apoptosis, ya sea por la supresión de p53 [170] o de p21 [167]. Sería interesante entonces analizar la regulación de p21 y p53 en los pacientes del Grupo 1 ya que su activación conlleva a detención del ciclo celular y muerte por apoptosis de los LB, lo que podría explicar la observación en sangre periférica de los defectos en el CSR y la SHM. En este mismo sentido sería interesante evaluar la vía FOXO1/AKT/PI3K, la cual participa en la regulación de la apoptosis, arresto del ciclo celular, diferenciación y longevidad de LB.[171-173]

Por supuesto no podemos descartar un defecto en alguna molécula aún no caracterizada y común a las vías de reparación del ADN por NHEJ (regiones S en CSR) así como por MMR (regiones V en SHM). O bien en alguna vía alternativa no caracterizada aún fisiológicamente implicada en ambos procesos de la diferenciación tardía del LB. Recientemente se han descripto mutaciones en el gen PMS2 en pacientes con fallas en la reparación de las regiones S del CSR y con un patrón alterado de SHM.[93] El estudio de la secuencia de dicho gen no arrojó presencia de mutaciones en nuestra cohorte de pacientes IDCV (Ver Capítulo 1, sección 1.1).

Los pacientes del Grupo 2 con fallas en el mecanismo de CSR y con leve disminución de la SHM, evocan el fenotipo causado por mutaciones en la región C-terminal de la proteína AICDA.[174, 175] Se ha sugerido también la existencia de un cofactor específico que actúe en esta región C-terminal, que sea requerido específicamente para el desarrollo del CSR y que resulte prescindible para la SHM.[176, 177] Un defecto a este nivel podría mimetizar una mutación en el dominio C-terminal de AICDA y, si bien el cofactor no ha sido específicamente dilucidado, resulta interesante evaluar en este Grupo defectos en las proteínas adaptadoras 14-3-3, ya que se ha descripto que participan del reclutamiento de AICDA a las regiones S ricas en repeticiones 5'-AGCT-3'.[178]

Tampoco podemos descartar en estos pacientes un defecto que involucre específicamente la vía de reparación de ADN en el mecanismo del CSR, río abajo de la escisión de la doble hebra del ADN.

En particular, el paciente 19, presenta además niveles elevados de IgM, lo cual lo asemeja a los fenotipos observados en los síndromes de tipo HIGM. Sin embargo los resultados de la secuenciación de los genes conocidos e implicados en los distintos tipos de HIGM incluyendo AICDA, UNG, CD40, CD40L y PMS2, no mostraron alteraciones compatibles con mutaciones en este paciente. Un caso particular también lo constituye en este Grupo el paciente 24, dado que sus LB resultan capaces de desencadenar todos los eventos moleculares del CSR activado *in vitro* vía TD. Ambos pacientes comparten la presencia de un número bajo de LB de memoria y complicaciones en la clínica y son de género femenino. La molécula ICOS se expresa normalmente en los LT_{HF} en los CGs donde desempeña un papel coestimulatorio y su deficiencia ha sido descripta en pacientes con IDCV[81], donde conlleva a un defecto del CSR debido a fallas en la activación de los LB en el CG.[179] En ambas pacientes fue evaluada la expresión de ICOS mediante citometría de flujo y resultó normal.

Por último, en el Grupo 3 que posee fallas en la SHM pero una reparación correcta de las regiones S, es posible pensar en un defecto en un potencial cofactor de AICDA implicado exclusivamente en la activación o reparación de las regiones V del mecanismo de SHM. La existencia de dicho cofactor en la región N-terminal de

AICDA ha sido previamente postulada, pero aún no se ha dilucidado qué proteína o proteínas juegan ese rol.[176] Sin embargo, si bien 2 de los 4 pacientes que conforman este Grupo (18 y 28) logran activar todos los eventos moleculares evaluados del CSR *in vitro*, los pacientes 4 y 22 sólo logran activar *AICDA* por la vía TD. En estos últimos es posible especular con un defecto molecular que involucre la primera etapa del CSR, en particular la activación de los *GLTs*.

A esta altura es interesante notar que la definición molecular de estas deficiencias del CSR o de la SHM resulta esencial no sólo para la comprensión del desarrollo de la IDCV humana, sino también para colaborar en el conocimiento de los mecanismos complejos implicados en estas vías de diferenciación del LB, los cuales no han sido aún dilucidados completamente.[152, 180]

3. Hallazgo de dos nuevas mutaciones en el receptor TACI

En los últimos años, se han descripto un número muy bajo de defectos genéticos en pacientes con IDCV, tales como mutaciones bialélicas y monoalélicas en *TNFRSF13B*. En estudios anteriores, la proporción de pacientes con IDCV que portan al menos una mutación en *TNFRSF13B* se estimó en un 10%.[85, 131, 133-135] La mayoría de las alteraciones moleculares descriptas hasta el momento en TACI se observaron principalmente en adultos y las mutaciones más frecuentes encontradas fueron C104R y A181E. De hecho, estas últimas fueron las únicas mutaciones evaluadas en un reporte reciente en población pediátrica con IDCV.[107] En el presente

trabajo se evaluó la secuencia codificante, así como las uniones intrón-exón del gen *TNFRSF13B* en la cohorte de 28 pacientes argentinos con IDCV de aparición temprana identificándose dos nuevas mutaciones (7,1%). Sin embargo, ninguno de estos pacientes presentó los cambios C104R o A181E, lo que señala la necesidad de escanear el gen completo para descartar posibles mutaciones en TACI (Ver Figura 16).

Entre las nuevas alteraciones identificadas, S231R, adquiere relevancia si consideramos que un informe reciente muestra que TACI requiere del reclutamiento de MyD88 al motivo THC del receptor para la inducción de CSR. Este sitio de unión a MyD88 abarca los aminoácidos 228-239 en TACI pues se ha observado, en células que portan mutaciones en estos sitios, generadas por mutagénesis dirigida, una atenuación de la unión de MyD88 así como una disminución de la señalización vía NF-κB.[70] Los autores de ese trabajo concluyen que MyD88 controla una vía intrínseca en los LB, previamente desconocida para la diversificación del gen de Igs, TACI-dependiente, TIR-independiente. Este control de MyD88 en el CSR se ejercería de manera específica dado que en los LB de pacientes deficientes en MyD88 no se ve impedida la secreción de IgM.

En este sentido es interesante remarcar que en nuestro paciente 28 IDCV-S231R, se encontraron niveles elevados de IgM en suero al momento del diagnóstico (Ver Tabla II), lo cual había sido señalado en algunos pacientes deficientes en TACI.[82, 85]

Clínicamente el paciente 28, IDCV-S231R, presentó como primera manifestación a los 5 años de edad una púrpura trombocitopénia, desarrollando luego infecciones recurrentes de las vías respiratorias superiores (sinusitis), así como neumonía recurrente y, más tarde esplenomegalia y anemia hemolítica autoinmune. Resulta también interesante destacar que, si bien observamos una diferencia significativa en el porcentaje de LB *memoria sin switch* en nuestro grupo de pacientes con IDCV en comparación con los donantes sanos, particularmente el paciente 28 IDCV-S231R mostró conservada esta subpoblación. La acumulación de LB maduros, así como la presencia de autoinmunidad constituyen dos características que han sido reportadas en estudios previos realizados en ratones deficientes en TACI, a pesar de que este modelo animal no resulte totalmente representativo del cuadro inmunológico observado en humanos.[181-183]

La otra mutación identificada y no descripta previamente, Q57H, se encuentra en el exón 2 del gen *TNFRSF13B* en una secuencia que codifica el primer dominio extracelular rico en cisteínas (CRD1). Sabemos que TACI puede expresarse a través de dos variantes de splicing que contienen uno o dos CRDs, pero aparentemente sólo el CRD2 parece ser funcionalmente relevante.[184] Sin embargo, no podemos descartar un efecto perjudicial de la mutación Q57H en la señalización de TACI, ya que CRD1 podría jugar un papel aún no definido. En efecto, los CRD adicionales pueden ser

importantes en la estabilidad, la regulación[185], o en la formación de mayor número de contactos con el ligando de forma de optimizar la afinidad y la especificidad.

Si bien observamos en el paciente 5, IDCV-Q57H, una reducción significativa de la expresión de la proteína TACI en la superficie celular, la misma podría estar relacionada con la cantidad reducida de LB de memoria total ($CD27^+$) presentes en este paciente, los cuales expresan de manera preferencial este receptor. Además, si bien en este caso el análisis bioinformático mediante PolyPhen reveló un posible efecto perjudicial sobre la estructura de la proteína, la homología limitada de TACI con otros miembros de la superfamilia TNFR, y el hecho de que sólo la estructura tridimensional de CRD2 se encuentre resuelta al día de la fecha, resaltan la importancia de desentrañar la estructura del dominio CRD1 de TACI para poder acercarnos a una especulación fisiopatológica más plausible.

Estas nuevas mutaciones en *TNFRSF13B* podrían considerarse eventos raros y por lo tanto no resulta sorprendente la falta de correlación entre la presencia de estas mutaciones y los parámetros clínicos o inmunológicos de los pacientes 5 y 28 (Ver Tablas I y II). Por ejemplo, el paciente 28, IDCV-S231R, mostró <2% LB de *memoria con switch*, mientras que el paciente 5, IDCV-Q57H, pertenece al subgrupo smB^+. Respecto a los LB de *memoria sin switch*, el paciente 28 (IDCV-S231R) presentó un incremento relativo, mientras que en el paciente 5 (IDCV-Q57H) esta subpoblación se presentó disminuida. Por último, aunque ambos pacientes mostraron

infecciones recurrentes de las vías respiratorias, sólo el paciente 28 (IDCV-S231R) presentó complicaciones no infecciosas como autoinmunidad y esplenomegalia.

El análisis de los miembros familiares no afectados en las familias 5 y 28 reveló que en ambos casos las madres portan la misma mutación identificada en los pacientes (Ver Figura 16). En otras variantes heterocigotas para *TNFRSF13B* ya se había observado una penetrancia incompleta de las mutaciones y una segregación familiar, sugiriéndose que las mutaciones heterocigotas aumentan el riesgo, pero no son suficientes para causar IDCV.[135]

4. Las células B TACI-S231R no conservan la capacidad de realizar correctamente el CSR por vías TI como TACI y TLR9

Como se mencionó anteriormente, la mutación S231R ha sido reportada *in silico* como un cambio que afecta el motivo citoplasmático THC de TACI, el cual resulta crucial para la inducción del CSR desencadenado por este receptor a través de la unión a MyD88.[70] El paciente 28, TACI-S231R, presentado en este estudio constituye el primer caso de IDCV que se asocia con una sustitución en el dominio THC del receptor, por lo cual estudiar en profundidad, molecular y funcionalmente este cambio genético, se nos presentaba como un modelo ideal para comprender mejor la vía de señalización de TACI en los LB. Si bien la cantidad de LB en sangre periférica del paciente 28 se encontraba dentro de los parámetros normales, las características

clínicas e inmunológicas que presentaba resultaban compatibles con una deficiencia del CSR (Ver tablas I y II).

Al analizar más en detalle en el paciente 28 TACI-S231R, el mecanismo de CSR *in vivo* se observa que, a pesar del bajo nivel en suero de IgA, existe un cambio de isotipo residual hacia esta Ig, ya que se lograron obtener 21 secuencias únicas a través del estudio de las uniones switch S -S . Si se comparan las secuencias de nuestro paciente con las obtenidas del grupo control de donantes sanos, se observa una ligera preferencia hacia el uso de microhomología para la reparación de la región switch. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas al aplicar el análisis estadístico de two tailed Student's *t* test (Ver Tabla VI: secuencias con homología perfecta: media 4,09 ± 4,37 nt en el paciente vs 2,28 ± 3,52 nt en los controles; $p = 0.0668$). Esta capacidad de reparar correctamente las uniones switch *in vivo* descarta la posibilidad de que un defecto significativo en la vía de reparación del ADN pueda ser la causa del bajo número de LB de *memoria con switch* observados en este paciente.

Con la finalidad de evaluar la relevancia del cambio TACI-S231R en la inducción de cada paso molecular del CSR, se realizaron activaciones en las células del paciente y de su madre, las cuales portan la mutación en estado heterocigota. A lo largo del capítulo 3 se ha presentado evidencia de que estos LB TACI-S231R con afectación del sitio de unión a MyD88, poseen bloqueada específicamente la capacidad de inducción del CSR a través de este receptor, así como la secreción de IgG cuando se estimula el

TLR9 con CpG. (Ver Figura 19 y 20). Por el contrario, la activación de CSR vía CD40 en condiciones óptimas no muestra ninguna alteración, confirmando que las etapas comunes en el mecanismo de cambio isotípico de Igs se encuentran intactas (ver Figura 20).

Este bloqueo de la inducción del CSR vía TACI, también se observó en células de pacientes con IDCV que portan las mutaciones más frecuentemente descriptas para este receptor, C104R y A181E, las cuales impiden la unión al ligando y la señalización, respectivamente (Ver Figura 19); sin embargo esta vía de inducción del CSR no parece modificada en pacientes con IDCV que presentan mutaciones polimórficas en TACI, como ser V220A.[70]

5. Las células B portadoras de la proteína TACI-S231R no logran reclutar MyD88 para desencadenar el CSR ¿Cuáles son los posibles mecanismos moleculares implicados en la cooperación con otras vías de activación del CSR en los LB? ¿Existe correlación entre el genotipo y el fenotipo clínico?

Por otro lado, también se evidenció una falla en la cooperación entre las vías de TACI y CD40, ya que la unión de APRIL a TACI-S231R en los LB del paciente 28 no logra incrementar la activación generada por la estimulación en condiciones subóptimas de CD40 (Ver Figura 20). La activación de la vía CD40 desencadena el CSR de manera TD, mientras que la activación dual de los receptores TLR-BCR,

TACI-BCR o TACI-TLR inducen el CSR de manera TI. Pero el receptor TACI también juega un rol importante en las primeras etapas de la respuesta de Acs TD.[186]

La inducción del CSR, tanto por vías TD como TI, requiere la activación de *AICDA*, molécula que se expresa en un determinado linaje de LB y en una etapa específica de su diferenciación. La expresión de *AICDA* es prácticamente indetectable en los LB naïve en reposo, pero se expresa en altos niveles en los LB que realizan CSR.

Como se mencionó en la introducción, la transcripción del gen *AICDA* depende de la unión de NF-κB a enhancers específicos; y la translocación de miembros de la familia de NF-κB al núcleo y su posterior dimerización son eventos comunes de las vías TLR9 y TACI, las cuales requieren la unión de MyD88 a dominios TIR-dependientes o independientes, respectivamente.[70]

En este estudio se demuestra que la mutación S231R que afecta el sitio de unión a MyD88, podría impedir la asociación de esta molécula adaptadora con TACI. Este impedimento resulta específico para dicha mutación, ya que el cambio A181E que se encuentra por fuera del dominio THC, no altera la capacidad de unión de TACI a MyD88 (Ver Figura 21). En concordancia con esta interpretación fisiopatológica, la expresión ectópica de TACI-S231R en células 293T mostró una disminución de la unión de MyD88 a TACI y atenuó la señalización tanto de la vía de NF-κB como de AP-1, al compararlo con células 293T con expresión de TACI-WT.[70] Sumado a esto, algunos pacientes con deficiencia de MyD88 o de IRAK4, otra molécula asociada con

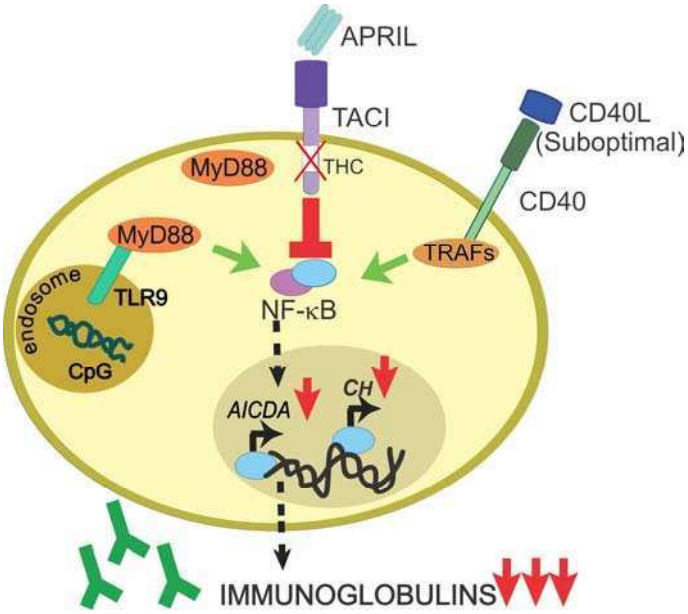
esta vía aguas abajo, generaron respuestas más débiles de IgG frente a Ags TI, así como una alteración en la inducción de *AICDA* y del switch a IgG en LB expuestos a APRIL o ADN-CpG.[70, 187] Sin embargo, MyD88 e IRAK4 no resultan factores críticos para el control de IgG e IgA circulantes *in vivo*[187], pudiendo ser posible que TACI utilice la vía de señalización de TRAF-2 para compensar en estos casos la falta de MyD88 o de IRAK4.

En efecto un sitio de unión a TRAF-2 se encuentra en el dominio citoplasmático de TACI, inmediatamente aguas abajo del sitio de unión a MyD88. Se ha sugerido que ambas moléculas adaptadoras actúan de manera cooperativa, debido a que la señalización vía TACI sólo se manifiesta totalmente dañada cuando ambos sitios de unión resultan afectados.[70] A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se demuestra que los LB naïve que portan TACI-S231R, tampoco logran co-localizar TACI con TRAF-2 luego de la estimulación con APRIL (Ver Figura 21). Este resultado podría sugerir que la mutación impide también la asociación a TRAF-2 debido a la estrecha proximidad a su sitio de unión (el cual se extiende entre los aminoácidos 240 a 244).

Por otro lado, TRAF-2 también forma parte de la vía de señalización del receptor CD40. Trabajos previos han señalado un sinergismo entre las vías de activación de TACI y de CD40[139, 145] , mientras que los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican claramente que los LB TACI-S231R no son capaces de integrar las señales de

estos dos receptores para lograr un aumento en la transcripción de *AICDA* como sí fue posible observar en LB de donantes sanos. Debido a que la activación de CD40 con concentraciones adecuadas de ligando presentó una cascada intacta de eventos del CSR en las células del paciente 28 (Ver Figura 20), es posible especular que en un contexto de activación subóptima de CD40 resulta necesaria la cooperación con una vía de señalización TI, tal como TACI, que permita alcanzar un nivel óptimo de activación de TRAF-2 para desencadenar el proceso de CSR. En el paciente 28 TACI-S231R, esta última cooperación podría verse afectada debido a la falta de asociación entre TACI y TRAF-2.

El siguiente esquema muestra de forma sencilla y resumida la hipótesis planteada, donde los LB TACI-S231R tienen atenuada la señalización vía el receptor TACI y fallan en integrar las señales de TACI con TLR9 o TACI con CD40 para poder producir una cantidad óptima de Igs:



El hecho de que APRIL no logre incrementar la activación de los LB TACI-S231R que han sido inducidos vía CD40 en condiciones subóptimas, así como la clara reducción de los LB *memoria con switch* en sangre periférica del paciente 28, nos permiten especular que este tipo de cooperación podría ser necesaria para la generación de LB $CD27^+$ en los CGs. En estos últimos, los LT_{HF} activados y las DCs son las fuentes de ligandos de CD40 y TACI, respectivamente.[188] Por lo tanto, en una respuesta TD es de esperar que los LB que portan TACI-S231R posean un deterioro en la cooperación entre TACI y CD40.

Pero también resulta posible proponer que, en lugar de prevenir la asociación de proteínas adaptadoras al dominio citoplasmático de TACI, la mutación S231R afecte directamente la estructura terciaria de la proteína logrando deteriorar la asociación intermolecular del receptor. Esta falta de asociación podría interferir con la funcionalidad de TACI al impedir su camino de señalización intracelular.

Como se observa en las Figuras 17 y 18, no se encontraron diferencias significativas al comparar la expresión del receptor TACI en la superficie de los LB de sangre periférica del paciente 28 TACI-S231R con la expresión presente en los donantes sanos.[132] La activación de TACI por APRIL requiere un ligando multimérico, lo que sugiere la necesidad de agrupamientos del receptor en la membrana o bien alcanzar un determinado umbral para desencadenar la señalización.[189] Al activarse, TACI recluta moléculas de TRAF intracelularmente [144, 190], las cuales son intermediarios

triméricos en las vías de señalización de varios miembros de la familia de TNFR.[191] La oligomerización de TRAF2 trimérico es necesaria para activar los eventos de señalización río abajo[192] siendo necesario un ligando trimérico para reunir más de 3 receptores en membrana, que luego reclutarán a los complejos intracelulares de las moléculas TRAF.

En este sentido, en un intento por determinar la estructura citoplasmática del receptor TACI, se produjo y purificó la proteína recombinante correspondiente a la región que abarca los aminoácidos 187 a 292 de TACI-S231R y TACI-wt (ver Anexo 1). Si bien no se logró aún alcanzar una cristalización satisfactoria, la corrida de ambas proteínas purificadas en SDS-PAGE mostró una diferencia de tamaño entre TACI-wt y TACI-S231R. Esta diferencia de peso molecular aparente entre ambas moléculas no se observa al analizarlas a través de espectroscopía de masas, en donde sólo es posible evidenciar la diferencia dada por la sustitución aminoacídica serina por arginina presente en la proteína mutante. Este resultado, podría estar indicando que la mutación presente en el paciente 28, TACI-S231R, cambia la estructura tridimensional de la proteína y modifica, más allá de una falla en la capacidad de unión de MyD88 al THC, la oligomerización del receptor, proceso crítico para la transducción de señales intracelulares luego de la unión del receptor al ligando.

El paciente 28, evaluado en esta tesis, constituye el primer caso reportado de IDCV asociado con una sustitución que afecta el dominio THC de TACI en el sitio de unión

a MyD88. Tras la identificación de TACI como un gen defectuoso en aproximadamente el 10% de los pacientes IDCV, un gran número de estudios han cuestionado su rol en la patogénesis de los defectos humorales observados en estos pacientes.[82, 134, 135] Como ya hemos visto, He y col[70], han demostrado que los ligandos de TACI provocan el CSR mediante la inducción del reclutamiento de MyD88 al dominio citoplasmático THC del receptor. Los datos volcados en esta tesis extienden estos resultados y demuestran que la mutación S231R atenúa la señalización de TACI y el reclutamiento de MyD88, proporcionando una evidencia bioquímica y celular del deterioro del CSR en los LB obtenidos de un paciente portador de esta mutación (P28) y con presentación clínica de IDCV de comienzo pediátrico.

El paciente 28 no presentó desde el punto de vista clínico e inmunológico características más severas que otros pacientes con mutaciones en TACI, si bien hay que tener en cuenta que las manifestaciones clínicas en estos pacientes es amplia y hasta el momento no se han reportado mutaciones *missense* en el dominio THC del receptor. En este aspecto, resulta sorprendente que el deterioro en la inducción del CSR a través de TACI se observó también en los LB de la madre del paciente, que porta la misma mutación S231R pero que no presenta manifestaciones clínicas de ICDV. Como mencionamos anteriormente, se ha sugerido que las mutaciones heterocigotas en TACI aumentarían el riesgo, sin ser suficientes para desencadenar IDCV.[135]

Es importante también tener en cuenta que debido a que TACI se presenta como un trímero o como grandes oligómeros en la membrana, pacientes con mutaciones heterocigotas en TACI capaces de interferir con la función del receptor, podrían ser responsables de un efecto dominante negativo en la señalización de las moléculas TACI-wt. En estos casos, la relación entre el número de proteínas portadoras de mutación y wt expresadas en cada individuo, podría determinar la posibilidad o no de formar un trímero funcionalmente activo. De hecho, es conocido que mutaciones *missense* que afectan el dominio intracelular de *TNFRSF6*, otro miembro de la superfamilia de receptores de tipo TNFR, generan un efecto dominante negativo que lleva a la manifestación del síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS). Sin embargo, Fried y col.[150] sugirieron que las mutaciones heterocigotas que afectan la funcionalidad de TACI no provocan un efecto dominante negativo, sino que causarían disfunción de los LB por haploinsuficiencia. En este sentido, es posible especular que un segundo evento mutacional sea necesario para el desarrollo de la enfermedad en pacientes con mutaciones en TACI, como fue demostrado en pacientes ALPS que portan en un alelo una mutación heredada y en el otro una mutación somática en *TNFRSF6*[193]. En nuestro trabajo, para descartar la posibilidad de que un segundo evento mutacional sea responsable de la variable penetrancia clínica de la mutación S231R, en la paciente 28 IDCV-S231R se realizaron análisis por secuenciación en el ADN obtenido a partir de los LB $CD19^+$ y a partir de LB naïve sorteados, sin encontrarse mutaciones somáticas en el alelo wt de TACI.

Por otro lado, se analizó la función de TACI en células B linfoblastoides de donantes sanos y pacientes adultos con IDCV de tres familias (A, B y C), en las que se presentaron pacientes heterocigotas compuestos u homocigotas para las mutaciones A181E/L171R, C104R/S194X y C104R y familiares con mutaciones heterocigotas.[194] (Ver Anexo 2) La inducción del CSR resultó significativamente afectada en los LB de todos los individuos, con mutaciones homocigotas o heterocigotas, en las tres familias en comparación con los donantes sanos y los individuos que no portan mutación en TACI. Este hallazgo amplía nuestros resultados obtenidos en el paciente 28 y su madre portadores de TACI-S231R, en quienes la vía de señalización de TACI a través de su activación específica *in vitro,* se encuentra alterada incluso en las células provenientes de un individuo sano que porta una mutación en el receptor.

En conjunto, nuestras observaciones señalan que las mutaciones que afectan la función de TACI, incluso cuando se presentan en forma heterocigota, conducen a un defecto dominante en el CSR mediado por TACI, demostrable *in vitro*. Lo cual permite proponer que si bien la penetrancia clínica es claramente incompleta, la penetrancia del defecto molecular a nivel del LB es completa.

Estudios futuros permitirán desentrañar los factores genéticos adicionales y/o medioambientales que en conjunto con las alteraciones genéticas heterocigotas de TACI, darían lugar al desarrollo de IDCV.

Conclusiones.

- ✓ En su mayoría los pacientes pediátricos IDCV evaluados en nuestro estudio presentaron una disminución en el número de LB circulantes de memoria e infecciones del tracto respiratorio como la más frecuente manifestación clínica, ambos parámetros resultaron comparables a lo reportado en un informe reciente en niños y en población adulta.

- ✓ Si bien la SHM mostró resultados heterogéneos en nuestros pacientes este mecanismo se encuentra alterado en la mayoría. El aumento en el uso de la microhomología en la reparación de las DSBs provocadas durante el CSR también señala alteración de este mecanismo de diferenciación tardía del LB.

- ✓ Pudimos distinguir pacientes con fallas en SHM y CSR (Grupo 1), con posible defecto molecular en genes que participan de la diferenciación, en la respuesta al daño en el ADN, en la regulación de la apoptosis, en el arresto del ciclo celular, en la longevidad de LB; o bien la afección de una vía alternativa no caracterizada aún fisiológicamente que resulte implicada en ambos procesos.

- ✓ Algunos pacientes presentaron fallas en CSR específicamente (Grupo 2), es factible evaluar en ellos el reclutamiento de un cofactor específico en el C-terminal de AICDA como las proteínas adaptadoras 14-3-3; o bien una vía exclusiva de reparación de ADN, río abajo de la DSB del ADN en CSR.

- ✓ En aquellos pacientes con defectos sólo en la SHM (Grupo 3) resulta interesante investigar la presencia de algún cofactor implicado exclusivamente en la activación del mecanismo de SHM (por ejemplo en el N-terminal de AICDA) o bien en la reparación de las regiones V.

- ✓ La definición molecular de estas deficiencias de CSR y/o de SHM ayudará a la comprensión de los mecanismos complejos implicados en estas vías así como a un mejor entendimiento fisiopatológico de la enfermedad.

- ✓ La identificación en uno de los pacientes (Paciente 5) de la sustitución Q57H, en un dominio sin rol definido, abre el camino al análisis del mismo en la estabilidad, la regulación del receptor, o en la formación de mayor número de contactos con el ligando, optimizando afinidad y especificidad.

- ✓ Este estudio permitió identificar el primer paciente IDCV con una mutación que afecta el THC de TACI específicamente en el sitio de unión a MyD88 (Paciente 28).

- ✓ Los estudios funcionales realizados en el paciente 28, TACI-S231R, permitieron evaluar en un modelo natural la participación de este dominio funcional de TACI (THC) en los procesos de SHM y CSR.

- ✓ Las células portadoras de TACI-S231R presentan SHM alterada y secreción de IgG afectada al ser desencadenada por ligandos de TACI y/o TLR9. Esto

último en correlación con una menor expresión de los eventos moleculares del CSR, mientras que la inducción por la estimulación TD en condiciones óptimas resultó indistinguible de los controles sanos.

- ✓ La cooperación entre las vías de TACI y TLR9, así como el conocido sinergismo de activación entre las vías TACI y CD40 en condiciones subóptimas requieren un dominio THC intacto en el receptor TACI. De hecho, APRIL no logra inducir colocalización de TACI-S231R con MyD88 ni con TRAF2. Colectivamente, estos resultados ponen de relieve la necesidad de un sitio de unión a MyD88 intacto para desencadenar el CSR mediado por TACI.

- ✓ Se requieren estudios adicionales, para desentrañar los factores genéticos y/o medioambientales que actúan en conjunto con las alteraciones genéticas heterocigotas de TACI para dar lugar al desarrollo de IDCV.

Anexo 1.

Producción de proteína TACI recombinante

Como se desarrolló en el capítulo 3 de esta tesis, la activación de TACI mediante APRIL (o BAFF) promueve el reclutamiento de MyD88 al dominio THC de TACI. Esta interacción induce CSR mediante la activación de NF-κB, la transcripción de *GLTs* y la expresión de *AICDA* a través de una ruta independiente de TIR. Se describen en esta tesis dos nuevas mutaciones en TACI, una de ellas, S231R, afecta el dominio THC de la proteína.

Las células del paciente 28 que portan la mutación TACI-S231R, poseen un defecto en la activación del CSR debido al impedimento de la unión de MyD88 al THC de TACI, interrumpiendo su vía de señalización, así como también su cooperación con las vías TD y TI de activación de los LB.

La proteína TACI posee poca o nula similitud con otras proteínas miembros de la superfamilia de los TNFR, y hasta el momento se ha resuelto la estructura cristalina del CDR2 de la misma.[184] La mutación S231R se localiza en el dominio THC, en la región citoplasmática de la proteína TACI. Esta región no ha sido cristalizada y por lo tanto su estructura no se encuentra aún resuelta.

Además de ayudar en el diagnóstico de IDCV, resolver la estructura del dominio THC de TACI podría contribuir a comprender el mecanismo que subyace en la falla de señalización de TACI para activar el CSR en el paciente 28, TACI-S231R.

Con esta finalidad, se trató de producir como proteína recombinante de elevada concentración y pureza, el dominio THC de TACI de fenotipo salvaje y portador la mutación S231R.

Se clonaron las secuencias del ADNc de TACI de longitud completa, obtenidas a partir del ADNc del paciente 28 (TACI-S231R) y de controles sanos (TACI-wt), en el vector pTARGET (Promega). Luego se subclonaron las secuencias que codifican la región citoplasmática entre los residuos 187 y 292 en los vectores de expresión pQE-TrisSystem y pET29a (Invitrogen), las proteínas recombinantes se expresaron en *E. coli* y se eligió como mejor sistema para la producción de las proteínas al vector pET29a en la cepa TOP 10 F´ de *E.coli* (Ver Figura A.1).

Las bacterias *E.coli* transformadas se cultivaron en medio líquido y se indujo la expresión de las proteínas recombinantes con IPTG. La purificación de TACI-S231R y TACI-wt se realizó mediante el uso consecutivo de las siguientes columnas: HisTrap, filtración en gel, filtración Molecular en S75 16/60. Entre las dos últimas columnas se realizó un tratamiento con DTT e IAM (iodoacetamida) para reducir puentes disulfuro, ya que las proteínas forman multímeros solubles de alto peso molecular que en la columna S75 migran como tres picos encimados en un rango molecular de entre unos 100 kDa hasta 30 kDa (Ver figura A.2). Como puede observarse en la figura A, la producción y purificación de las proteínas recombinantes

TACI-wt y TACI-S231R resultó exitosa, ya que obtenemos un único pico en la columna S75 y su corrida en SDS-PAGE revela una única banda proteica.

Sin embargo, la corrida de ambas proteínas recombinantes en SDS-PAGE muestra una diferencia en el peso molecular entre la TACI-wt vs TACI-S231R (Ver Figura A.3). Para descartar una posible degradación o clivaje de una parte de la proteína mutada durante el proceso de producción y purificación, se realizó espectroscopía de masa a las proteínas purificadas lo que arrojó que la única diferencia de peso molecular entre ellas se debe a la sustitución aminoacídica serina por arginina presente en la proteína mutante (TACI-wt: 15.686 Da; TACI-S231R: 15.758 Da). Este resultado de diferente peso molecular aparente en geles desnaturalizantes con SDS, puede estar indicando que la mutación presente en el paciente 28, TACI-S231R, cambia la estructura tridimensional de la proteína y modifica, más allá de la unión de MyD88 al THC, la oligomerización del receptor crítica para la transducción de señales intracelulares luego de la unión al ligando.

Sobre las proteínas recombinantes purificadas TACI-wt y TACI-S231R se realizaron 300 condiciones de cristalización por el método de gota colgante, pero no se pudieron obtener cristales puros como para resolver por difracción de rayos X la estructura tridimensional de las mismas.

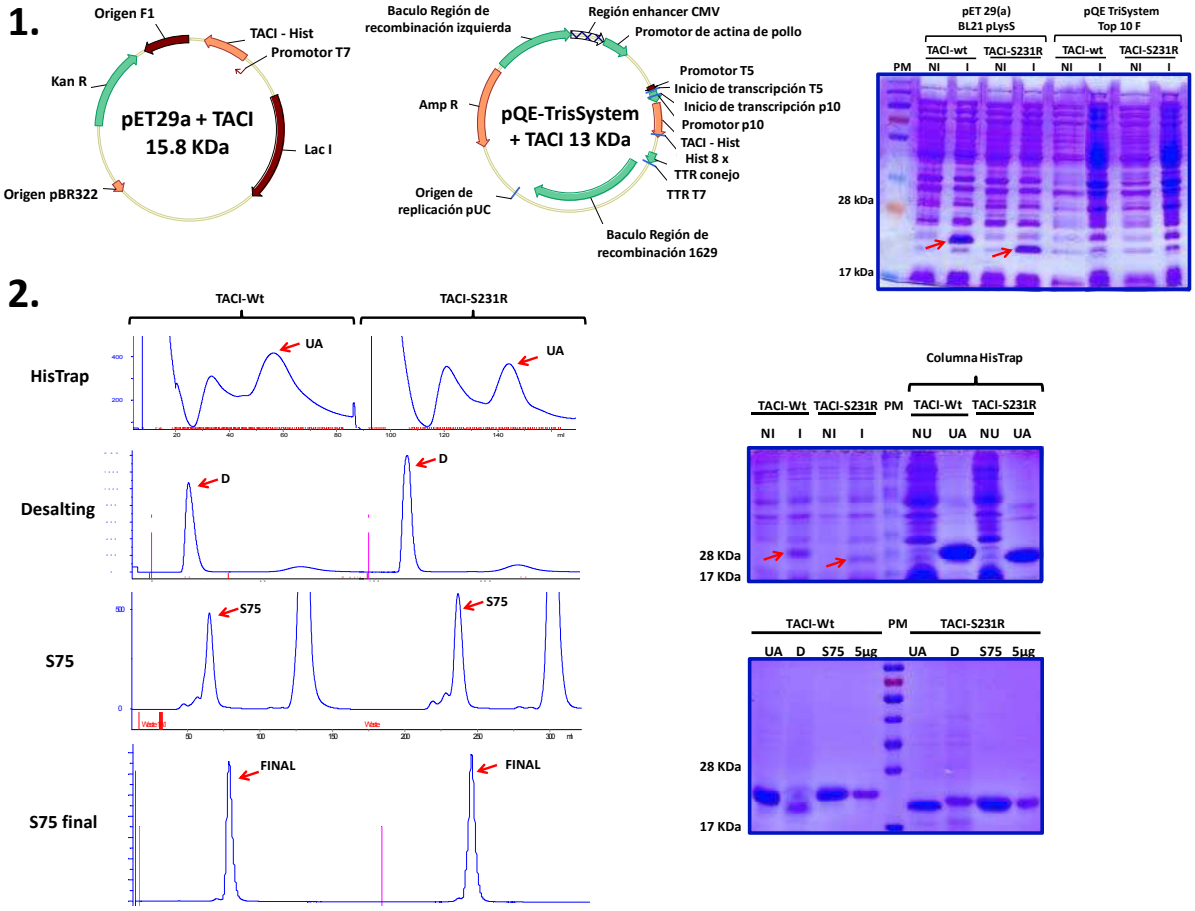


Figura A: Producción de TACI recombinante. 1) Elección del mejor sistema de expresión, a la izquierda los dos vectores utilizados, a la derecha SDS-PAGE para las dos cepas de expresión utilizadas. NI= no inducido, I=inducido, PM= marcador de peso molecular. Con las flechas rojas se señala la proteína TACI **2)** Secuencia utilizada para la purificación de las proteínas recombinantes. A la izuquierda, de arriba hacia abajo se observan los picos de elución de las diferentes columnas de purificación; a la derecha el SDS-PAGE de los picos seleccionados en cada paso de purificación. NI = no inducido, I = inducido, UN = no unido, UA = unido pico A, D = desalting, S75 = columna de tamiz molecular, 5 µg = cantidad de proteína sembrada obtenida del pico de la columna S75, PM = marcador de peso molecular. Con flechas rojas se indican los picos seleccionados de la elución de las distintas columnas así como también las bandas de inducción en el SDS-PAGE

Anexo 2.

Análisis de activación del CSR vía TACI en otras familias con mutaciones en *TNFRSF13B*

Como vimos a lo largo del desarrollo de esta tesis, la activación de TACI en LB humanos conduce al CSR, iniciado por la expresión del ARNm de *AICDA*. Hemos examinado este aspecto de la función TACI en células B linfoblastoides de donantes sanos y pacientes adultos con IDCV de tres familias (A, B y C), en las que se presentaron pacientes homocigotas para las mutaciones A181E/L171R, C104R/S194X y C104R y familiares con mutaciones heterocigotas.[194] (Figuras B.1-3) Después de la estimulación de las células B linfoblastoides en presencia o ausencia de anti-TACI e IL-4 o IL-10, se cuantificó *AICDA*.

Como puede observarse en la Figura B la inducción de *AICDA* resultó significativamente afectada en los LB de todos los individuos, con mutaciones homocigotas o heterocigotas, en las tres familias en comparación con los donantes sanos y los individuos que no portan mutación en TACI. Este resultado revela que la vía de activación TACI a través de su activación específica *in vitro,* se encuentra alterada incluso en células provenientes de individuos sanos que portan una única mutación en el receptor.

Nuestras observaciones sugieren que mientras que el papel del receptor de TACI en la biología los LB humanos es débil, y cuando se encuentra afectado, no se siempre causa el síndrome IDCV, las mutaciones seleccionadas, incluso en forma

heterocigótica, conducen a una herencia dominante en defectos de los LB de la vía del CSR mediada por TACI, que son demostrables *in vitro*.

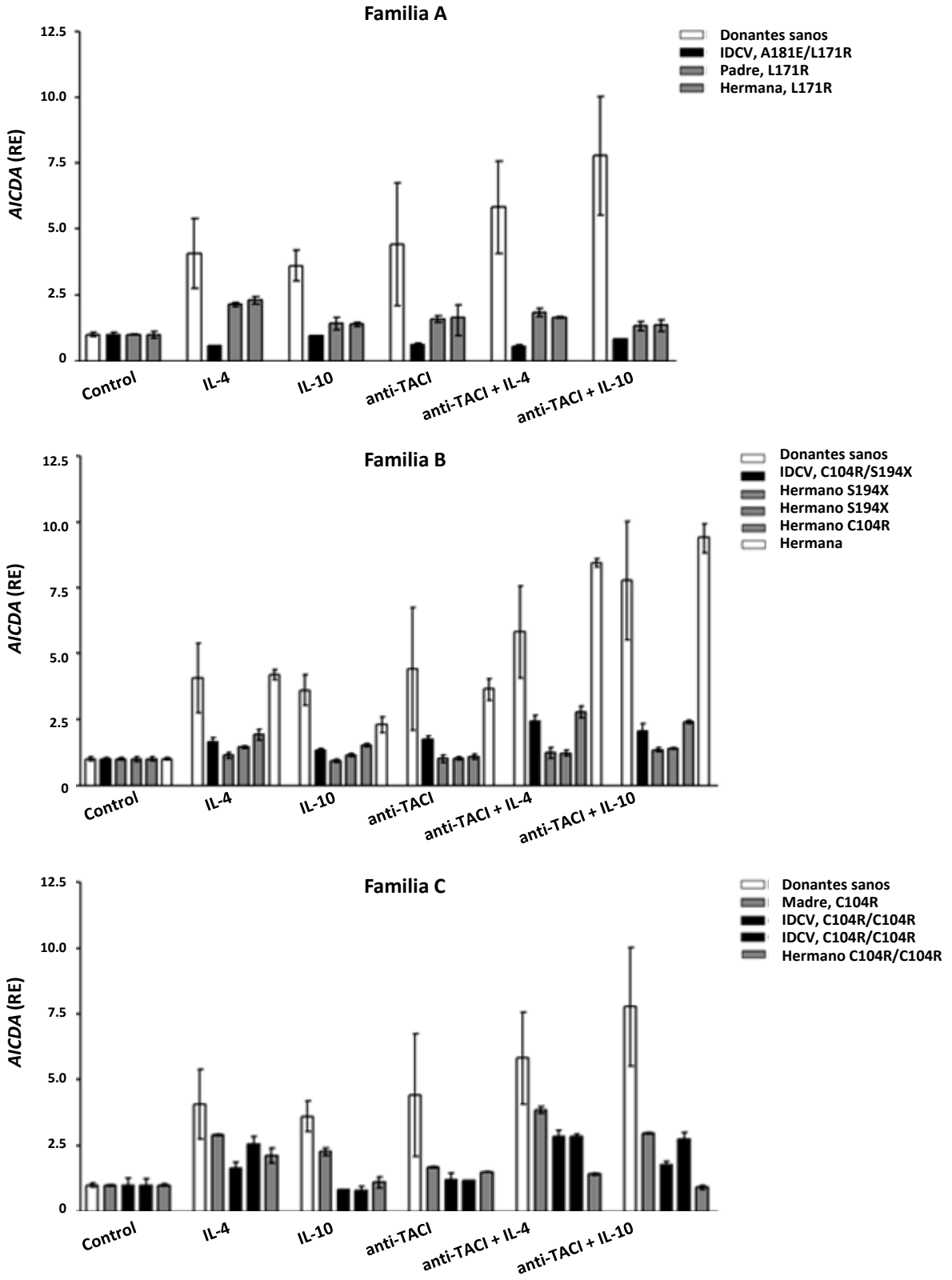


Figura B: Estudio de activación del CSR en familias con mutaciones en TACI. Análisis por qRT-PCR de la activación de *AICDA*, en células de individuos pertenecientes a tres faminilas no relacionadas (A, B y C) con mutaciones en TACI, cultivadas durante 2 días con Ac control de isotipo (Control), IL-4, IL-10 y/o anti-TACI. Las barras representan la media ± DS de tres experimentos independientes.

Bibliografía.

1 **Janeway, C. A., Jr.,** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989. **54 Pt 1**: 1-13.

2 **Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R.,** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002. **20**: 197-216.

3 **Hoebe, K., Janssen, E. and Beutler, B.,** The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004. **5**: 971-974.

4 **Grivennikov, S. I., Greten, F. R. and Karin, M.,** Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* **140**: 883-899.

5 **Gallo, R. L. and Nakatsuji, T.,** Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol.* **131**: 1974-1980.

6 **Medzhitov, R. and Janeway, C. A., Jr.,** Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997. **91**: 295-298.

7 **Palm, N. W. and Medzhitov, R.,** Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009. **227**: 221-233.

8 **Aderem, A. and Ulevitch, R. J.,** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000. **406**: 782-787.

9 **Borregaard, N.,** Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010. **33**: 657-670.

10 **Caligiuri, M. A.,** Human natural killer cells. *Blood* 2008. **112**: 461-469.

11 **Steinman, R. M. and Hemmi, H.,** Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006. **311**: 17-58.

12 **Wedemeyer, J., Tsai, M. and Galli, S. J.,** Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 2000. **12**: 624-631.

13 **Seder, R. A. and Ahmed, R.,** Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 2003. **4**: 835-842.

14 **Williams, M. A. and Bevan, M. J.,** Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 2007. **25**: 171-192.

15 **Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E.,** Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010. **28**: 445-489.

16 **Elgueta, R., de Vries, V. C. and Noelle, R. J.,** The immortality of humoral immunity. *Immunol Rev* 2010. **236**: 139-150.

17 **Orkin, S. H. and Zon, L. I.,** Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 2008. **132**: 631-644.

18 **Randall, T. D., Carragher, D. M. and Rangel-Moreno, J.,** Development of secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2008. **26**: 627-650.

19 **Neyt, K., Perros, F., GeurtsvanKessel, C. H., Hammad, H. and Lambrecht, B. N.,** Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol* 2012. **33**: 297-305.

20 **Mercier, F. E., Ragu, C. and Scadden, D. T.,** The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol* 2012. **12**: 49-60.

21 **Rodewald, H. R.,** Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol* 2008. **26**: 355-388.

22 **MacLennan, I. C.,** Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 1994. **12**: 117-139.

23 **Mebius, R. E. and Kraal, G.,** Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005. **5**: 606-616.

24 **Brandtzaeg, P., Farstad, I. N., Johansen, F. E., Morton, H. C., Norderhaug, I. N. and Yamanaka, T.,** The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev* 1999. **171**: 45-87.

25 **Edelman, G. M.,** Antibody structure and molecular immunology. *Science* 1973. **180**: 830-840.

26 **Schroeder, H. W., Jr. and Cavacini, L.,** Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010. **125**: S41-52.

27 **Alzari, P. M., Lascombe, M. B. and Poljak, R. J.,** Three-dimensional structure of antibodies. *Annu Rev Immunol* 1988. **6**: 555-580.

28 **Sanz, I.,** Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol* 1991. **147**: 1720-1729.

29 **Stavnezer, J.,** Antibody class switching. *Adv Immunol* 1996. **61**: 79-146.

30 **Cooper, M. D., Raymond, D. A., Peterson, R. D., South, M. A. and Good, R. A.,** The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med* 1966. **123**: 75-102.

31 **Busslinger, M.,** Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol* 2004. **22**: 55-79.

32 **LeBien, T. W. and Tedder, T. F.,** B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008. **112**: 1570-1580.

33 **Bassing, C. H., Swat, W. and Alt, F. W.,** The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 2002. **109 Suppl**: S45-55.

34 **Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B. and Winter, G.,** The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops. *J Mol Biol* 1992. **227**: 776-798.

35 **Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. and Baltimore, D.,** RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990. **248**: 1517-1523.

36 **Alt, F. W. and Baltimore, D.,** Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982. **79**: 4118-4122.

37 **Goodnow, C. C., Adelstein, S. and Basten, A.,** The need for central and peripheral tolerance in the B cell repertoire. *Science* 1990. **248**: 1373-1379.

38 **Batista, F. D., Iber, D. and Neuberger, M. S.,** B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 2001. **411**: 489-494.

39 **Crotty, S.,** Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 2011. **29**: 621-663.

40 **Berek, C., Berger, A. and Apel, M.,** Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 1991. **67**: 1121-1129.

41 **Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M. and Forster, R.,** Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 2000. **192**: 1545-1552.

42 **Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. and Honjo, T.,** Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000. **102**: 553 – 563.

43 **Honjo, T., Kinoshita, K. and Muramatsu, M.,** Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 2002. **20**: 165-196.

44 **William, J., Euler, C., Christensen, S. and Shlomchik, M. J.,** Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 2002. **297**: 2066-2070.

45 **Stavnezer , J., Guikema, J. E. and Schrader, C. E.,** Mechanism and regulation of class switch recombination. *Ann Rev Immunology* 2008. **26**: 261-292.

46 **Coffman, R. L., Lebman, D. A. and Rothman, P.,** Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol* 1993. **54**: 229-270.

47 **Wagner, S. D. and Neuberger, M. S.,** Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* 1996. **14**: 441-457.

48 **Odegard, V. H. and Schatz, D. G.,** Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* 2006. **6**: 573-583.

49 **Di Noia, J. M. and Neuberger, M. S.,** Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 2007. **76**: 1-22.

50 **Peled, J. U., Kuang, F. L., Iglesias-Ussel, M. D., Roa, S., Kalis, S. L., Goodman, M. F. and Scharff, M. D.,** The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 2008. **26**: 481-511.

51 **Dilosa, R. M., Maeda, K., Masuda, A., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *J Immunol* 1991. **146**: 4071-4077.

52 **Shapiro-Shelef, M. and Calame, K.,** Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005. **5**: 230-242.

53 **Berkowska, M. A., Driessen, G. J., Bikos, V., Grosserichter-Wagener, C., Stamatopoulos, K., Cerutti, A., He, B.*et al.*,** Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* 2011. **118**: 2150-2158.

54 **Calame, K. L., Lin, K. I. and Tunyaplin, C.,** Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol* 2003. **21**: 205-230.

55 **Litinskiy, M. B., Nardelli, B., Hilbert, D. M., He, B., Schäffer, A. A., Casali, P. and Cerutti, A.,** DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 2002. **3**: 822-829.

56 **Cerutti, A., Puga, I. and Cols, M.,** Innate control of B cell responses. *Trends Immunol* 2011. **32**: 202-211.

57 **Martin, F. and Kearney, J. F.,** Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2002. **2**: 323-335.

58 **Griffin, D. O., Holodick, N. E. and Rothstein, T. L.,** Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med* 2011. **208**: 67-80.

59 **Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W., Jr. and Cyster, J. G.,** Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 2008. **9**: 54-62.

60 **DeFranco, A. L.,** The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Curr Opin Immunol* 1997. **9**: 296-308.

61 **Li, Q. and Verma, I. M.,** NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002. **2**: 725-734.

62 **Grammer, A. C. and Lipsky, P. E.,** CD40-mediated regulation of immune responses by TRAF-dependent and TRAF-independent signaling mechanisms. *Adv Immunol* 2000. **76**: 61-178.

63 **Bishop, G. A., Moore, C. R., Xie, P., Stunz, L. L. and Kraus, Z. J.,** TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol* 2007. **597**: 131-151.

64 **Ferrari, S., Giliani, S., Insalaco, A., Al-Ghonaium, A., Soresina, A. R., Loubser, M., Avanzini, M. A.*et al.*,** Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. **98**: 12614-12619.

65 **Korthauer, U., Graf, D., Mages, H. W., Briere, F., Padayachee, M., Malcolm, S., Ugazio, A. G.*et al.*,** Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993. **361**: 539-541.

66 **Mackay, F. and Schneider, P.,** Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 2009. **9**: 491-502.

67 **Scapini, P., Bazzoni, F. and Cassatella, M. A.,** Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett* 2008. **116**: 1-6.

68 **Mackay, F., Schneider, P., Rennert, P. and Browning, J.,** BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003. **21**: 231-264.

69 **Almejun, M. B., Cols, M., Zelazko, M., Oleastro, M., Cerutti, A., Oppezzo, P., Cunningham-Rundles, C.*et al.*,** A naturally occurring mutation affecting the MyD88-binding site of TNFRSF13B impairs triggering of class switch recombination. *Eur J Immunol.*

70 **He, B., Santamaria, R., Xu, W., Cols, M., Chen, K., Puga, I., Shan, M.*et al.*,** The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nature Immunology* 2010. **11**: 836-845.

71 **Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E.*et al.*,** An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 2001. **293**: 2111-2114.

72 **Shuai, K. and Liu, B.,** Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2003. **3**: 900-911.

73 **Notarangelo, L. D.,** Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010. **125**: S182-194.

74 **Cunningham-Rundles, C. and Ponda, P. P.,** Molecular defects in T- and B-cell primary immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* 2005. **5**: 880-892.

75 **Cunningham-Rundles, C. and Bodian, C.,** Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999. **92**: 34-48.

76 **Wang, J. and Cunningham-Rundles, C.,** Treatment and outcome of autoimmune hematologic disease in common variable immunodeficiency (CVID). *J Autoimmun* 2005. **25**: 57-62.

77 **Conley, M. E., Notarangelo, L. D. and Etzioni, A.,** Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol* 1999. **93**: 190-197.

78 **Chapel, H., Lucas, M., Lee, M., Bjorkander, J., Webster, D., Grimbacher, B., Fieschi, C.*et al.*,** Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood* 2008. **112**: 277-286.

79 **Wehr, C., Peter, H. H. and Warnatz, K.,** Response: Improving classification in CVID. *Blood* 2008. **112**: 446-447.

80 **Mellemkjaer, L., Hammarstrom, L., Andersen, V., Yuen, J., Heilmann, C., Barington, T., Bjorkander, J.*et al.*,** Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin Exp Immunol* 2002. **130**: 495-500.

81 **Grimbacher, B., Hutloff, A., Schlesier, M., Glocker, E., Warnatz, K., Drager, R., Eibel, H.*et al.*,** Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003. **4**: 261-268.

82 **Salzer, U., Chapel, H. M., Webster, A. D., Pan-Hammarstrom, Q., Schmitt-Graeff, A., Schlesier, M., Peter, H. H.*et al.*,** Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005. **37**: 820-828.

83 **Castigli, E., Wilson, S. A., Garibyan, L., Rachid, R., Bonilla, F., Schneider, L. and Geha, R. S.,** TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nature Genetics* 2005. **37**: 829-834.

84 **van Zelm, M. C., Reisli, I., van der Burg, M., Castano, D., van Noesel, C. J., van Tol, M. J., Woellner, C.*et al.*,** An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med* 2006. **354**: 1901-1912.

85 **Warnatz, K., Salzer, U., Rizzi, M., Fischer, B., Gutenberger, S., Bohm, J., Kienzler, A. K.*et al.*,** B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009. **106**: 13945-13950.

86 **van Zelm, M. C., Smet, J., Adams, B., Mascart, F., Schandene, L., Janssen, F., Ferster, A.*et al.*,** CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest* 2010. **120**: 1265-1274.

87 **Kuijpers, T. W., Bende, R. J., Baars, P. A., Grummels, A., Derks, I. A. M., Dolman, K. M., Beaumont, T.*et al.*,** CD20 deficiency in humans results in impaired T cell–independent antibody responses. *The Journal of Clinical Investigation* 2010. **120**: 214-222.

88 **Conley, M. E., Dobbs, A. K., Farmer, D. M., Kilic, S., Paris, K., Grigoriadou, S., Coustan-Smith, E.*et al.*,** Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* 2009. **27**: 199-227.

89 **Tsukada, S., Saffran, D. C., Rawlings, D. J., Parolini, O., Allen, R. C., Klisak, I., Sparkes, R. S.*et al.*,** Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia. *Cell* 1993. **72**: 279-290.

90 **Vetrie, D., Vorechovsky, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., Hammarstrom, L.*et al.*,** The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature* 1993. **361**: 226-233.

91 **Puck, J. M.,** Molecular and genetic basis of X-linked immunodeficiency disorders. *J Clin Immunol* 1994. **14**: 81-89.

92 **Péron, S., Pan-Hammarström, Q., Imai, K., Du, L., Taubenheim, N., Sanal, O., Marodi, L.*et al.*,** A primary immunodefi ciency characterized by defective immunoglobulin class switch recombination and impaired DNA repair. *The Journal of Experimental Medicine* 2007. **204**: 1207-1216.

93 **Péron, S., Metin, A., Gardès, P., Alyanakian, M.-A., Sheridan, E., Kratz, C. P., Fischer, A.*et al.*,** Human PMS2 deficiency is associated with impaired immunoglobulin class switch recombination. *The Journal of Experimental Medicine* 2008.

94 **Durandy, A.,** Immunoglobulin class switch recombination: study through human natural mutants. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2008.

95 **Morra, M., Silander, O., Calpe, S., Choi, M., Oettgen, H., Myers, L., Etzioni, A.*et al.*,** Alterations of the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A in common variable immunodeficiency syndrome. *Blood* 2001. **98**: 1321-1325.

96 **Andersen, P., Permin, H., Andersen, V., Schejbel, L., Garred, P., Svejgaard, A. and Barington, T.,** Deficiency of somatic hypermutation of the antibody light chain is associated with increased frequency of severe

respiratory tract infection in common variable immunodeficiency. *Blood* 2004. **105**: 511-517.

97 **Pan, Q., Petit-Frére, C., Lähdesmäki, A., Gregorek, H., Chrzanowska, K. H. and Hammarström, L.,** Alternative end joining during switch recombination in patients with Ataxia-Telangiectasia. *European Journal of Immunology* 2002. **32**: 1300-1308.

98 **Clendenning, M., Hampel, H., LaJeunesse, J., Lindblom, A., Lockman, J., Nilbert, M., Senter, L.*et al.*,** Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. *Hum Mutat* 2006. **27**: 490-495.

99 **De Vos, M., Hayward, B. E., Picton, S., Sheridan, E. and Bonthron, D. T.,** Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *Am J Hum Genet* 2004. **74**: 954-964.

100 **Lopez Granados, E., Porpiglia, A. S., Hogan, M. B., Matamoros, N., Krasovec, S., Pignata, C., Smith, C. I.*et al.*,** Clinical and molecular analysis of patients with defects in micro heavy chain gene. *J Clin Invest* 2002. **110**: 1029-1035.

101 **Xu, W., Santini, P. A., Matthews, A. J., Chiu, A., Plebani, A., He, B., Chen, K.*et al.*,** Viral double-stranded RNA triggers Ig class switching by activating upper respiratory mucosa B cells through an innate TLR3 pathway involving BAFF. *J Immunol* 2008. **181**: 276-287.

102 **Catalan, N., Selz, F., Imai, K., Revy, P., Fischer, A. and Durandy, A.,** The Block in Immunoglobulin Class Switch Recombination Caused by Activation-Induced Cytidine Deaminase Deficiency Occurs Prior to the Generation of DNA Strand Breaks in Switch Region. *The Journal of Immunology* 2003. **171**: 2504-2509.

103 **Wehr, C., Kivioja, T., Schmitt, C., Ferry, B., Witte, T., Eren, E., Vlkova, M.*et al.*,** The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008. **111**: 77-85.

104 **Warnatz, K., Denz, A., Drager, R., Braun, M., Groth, C., Wolff-Vorbeck, G., Eibel, H.*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**: 1544-1551.

105 **Piqueras, B., Lavenu-Bombled, C., Galicier, L., Bergeron-van der Cruyssen, F., Mouthon, L., Chevret, S., Debre, P.*et al.***, Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol* 2003. **23**: 385-400.

106 **Cunningham-Rundles, C.,** How I treat common variable immune deficiency. *Blood*. **116**: 7-15.

107 **van de Ven, A. A. and van Montfrans, J. M.,** Clinical complications in pediatric CVID are not restricted to patients with severely reduced class-switched memory B cells. *Pediatr Allergy Immunol* 2010. **22**: 347-348.

108 **Warnatz, K. and Schlesier, M.,** Flowcytometric phenotyping of common variable immunodeficiency. *Cytometry B Clin Cytom* 2008. **74**: 261-271.

109 **Busse, P. J., Razvi, S. and Cunningham-Rundles, C.,** Efficacy of intravenous immunoglobulin in the prevention of pneumonia in patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2002. **109**: 1001-1004.

110 **Neuberger, M. S., Ehrenstein, M. R., Rada, C., Sale, J., Batista, F. D., Williams, G. and Milstein, C.,** Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000. **355**: 357-360.

111 **Foster, S. J., Dorner, T. and Lipsky, P. E.,** Targeting and subsequent selection of somatic hypermutations in the human V kappa repertoire. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 3122-3132.

112 **Sale, J. E., Bemark, M., Williams, G. T., Jolly, C. J., Ehrenstein, M. R., Rada, C., Milstein, C.*et al.***, In vivo and in vitro studies of immunoglobulin gene somatic hypermutation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001. **356**: 21-28.

113 **Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. and Honjo, T.,** Specific expression of

activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 1999. **274**: 18470-18476.

114 **Spencer, J., Dunn, M. and Dunn-Walters, D. K.,** Characteristics of sequences around individual nucleotide substitutions in IgVH genes suggest different GC and AT mutators. *J Immunol* 1999. **162**: 6596-6601.

115 **Manz, R. A., Arce, S., Cassese, G., Hauser, A. E., Hiepe, F. and Radbruch, A.,** Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 2002. **14**: 517-521.

116 **Barington, T., Heilmann, C. and Andersen, V.,** Quantitation of antibody-secreting cells in the blood after vaccination with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. *Scand J Immunol* 1990. **31**: 515-522.

117 **Foster, S. J., Brezinschek, H. P., Brezinschek, R. I. and Lipsky, P. E.,** Molecular mechanisms and selective influences that shape the kappa gene repertoire of IgM+ B cells. *J Clin Invest* 1997. **99**: 1614-1627.

118 **Tomlinson, I. M., Cox, J. P., Gherardi, E., Lesk, A. M. and Chothia, C.,** The structural repertoire of the human V kappa domain. *EMBO J* 1995. **14**: 4628-4638.

119 **van Dongen, J. J., Langerak, A. W., Bruggemann, M., Evans, P. A., Hummel, M., Lavender, F. L., Delabesse, E.*et al.*,** Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003. **17**: 2257-2317.

120 **Pan-Hammarstrom, Q., Zhao, Y. and Hammarstrom, L.,** Class switch recombination: a comparison between mouse and human. *Adv Immunol* 2007. **93**: 1-61.

121 **Schrader, C. E., Guikema, J. E., Linehan, E. K., Selsing, E. and Stavnezer, J.,** Activation-induced cytidine deaminase-dependent DNA breaks in class switch recombination occur during G1 phase of the cell cycle and depend upon mismatch repair. *J Immunol* 2007. **179**: 6064-6071.

122 **Lieber, M. R.,** The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 2008. **283**: 1-5.

123 **Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K.,** Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003. **4**: 712-720.

124 **Rolink, A., Melchers, F. and Andersson, J.,** The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S mu-S epsilon heavy chain class switching. *Immunity* 1996. **5**: 319-330.

125 **Manis, J. P., Gu, Y., Lansford, R., Sonoda, E., Ferrini, R., Davidson, L., Rajewsky, K.*et al.*,** Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J Exp Med* 1998. **187**: 2081-2089.

126 **Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., Pelanda, R., Reichlin, A., Suh, H., Qin, X. F.*et al.*,** Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J* 1998. **17**: 2404-2411.

127 **Manis, J. P., Tian, M. and Alt, F. W.,** Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* 2003. **23**: 31-39.

128 **Kotnis, A., Du, L., Liu, C., Popov, S. W. and Pan-Hammarstrom, Q.,** Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009. **364**: 653-665.

129 **Pan-Hammarström, Q., Jones, A.-M., Lähdesmäki, A., Zhou, W., Gatti, R. A., Hammarström, L., Gennery, A. R.*et al.*,** Impact of DNA ligase IV on nonhomologous end join pathways during class switch recombination in human cells. *The Journal of Experimental Medicine* 2005. **201**: 189-194.

130 **Kinoshita, K., Harigai, M., Fagarasan, S., Muramatsu, M. and Honjo, T.,** A hallmark of active class switch recombination: Transcripts directed by I promoters on looped-out circular DNAs. *PNAS* 2001. **98**: 12620-12633.

131 **Pan-Hammarstrom, Q., Salzer, U., Du, L., Bjorkander, J., Cunningham-Rundles, C., Nelson, D. L., Bacchelli, C.*et al.*,**

Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet* 2007. **39**: 429-430.

132 **Almejun, M. B., Sajaroff, E., Galicchio, M., Oleastro, M., Bernasconi, A., Zelazko, M. and Danielian, S.,** Immunological characteristics and two novel mutations in TACI in a cohort of 28 pediatric patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2012. **32**: 89-97.

133 **Mohammadi, J., Liu, C., Aghamohammadi, A., Bergbreiter, A., Du, L., Lu, J., Rezaei, N.*et al.*,** Novel Mutations in TACI (TNFRSF13B) Causing Common Variable Immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2009. **29(6)**: 777-785.

134 **Castigli, E., Wilson, S., Garibyan, L., Rachid, R., Bonilla, F., Schneider, L., Morra, M.*et al.*,** Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet* 2007. **39**: 430-431.

135 **Salzer, U., Bacchelli, C., Buckridge, S., Pan-Hammarström, Q., Jennings, S., Lougaris, V., Bergbreiter, A.*et al.*,** Relevance of biallelic versus monoallelic TNFRSF13B mutations in distinguishing disease-causing from risk-increasing TNFRSF13B variants in antibody deficiency syndromes. *Blood* 2009. **113**: 1967-1976.

136 **Ramensky, V., Bork, P. and Sunyaev, S.,** Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 2002. **30**: 3894-3900.

137 **Ng, P. C. and Henikoff, S.,** Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res* 2002. **12**: 436-446.

138 **Darce, J. R., Arendt, B. K., Wu, X. and Jelinek, D. F.,** Regulated Expression of BAFF-Binding Receptors during Human B Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* 2007. **179**: 7276-7286.

139 **Castigli, E., Wilson, S. A., Elkhal, A., Ozcan, E., Garibyan, L. and Geha, R. S.,** Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor enhances CD40-driven plasma cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 2007. **120**: 885-891.

140 **Ozcan, E., Garibyan, L., Lee, J. J.-Y., Bram, R. J., Lam, K.-P. and Geha, R. S.,** Transmembrane activator, calcium modulator, and cyclophilin ligand interactor drives plasma cell differentiation in LPS-activated B cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009. **123**: 1277-1286.

141 **Fagarasan, S. and Honjo, T.,** T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* 2000. **290**: 89-92.

142 **He, B., Xu, W., Santini, P. A., Polydorides, A. D., Chiu, A., Estrella, J., Shan, M.*et al.*,** Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 2007. **26**: 812-826.

143 **Katsenelson, N., Kanswal, S., Puig, M., Mostowski, H., Verthelyi, D. and Akkoyunlu, M.,** Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion. *Eur J Immunol* 2007. **37**: 1785-1795.

144 **Bossen, C. and Schneider, P.,** BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 2006. **18**: 263-275.

145 **Ozcan, E., Rauter, I., Garibyan, L., Dillon, S. R. and Geha, R. S.,** Toll-like receptor 9, transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor, and CD40 synergize in causing B-cell activation. *J Allergy Clin Immunol* 2011. **128**: 601-609 e601-604.

146 **Cunningham-Rundles, C., Radigan, L., Knight, A. K., Zhang, L., Bauer, L. and Nakazawa, A.,** TLR9 activation is defective in common variable immune deficiency. *J Immunol* 2006. **176**: 1978-1987.

147 **Lee, J. J.-Y., Rauter, I., Garibyan, L., Ozcan, E., Sannikova, T., Dillon, S. R., Cruz, A. C.*et al.*,** The murine equivalent of the A181E TACI mutation associated with CVID severely impairs B cell function. *Blood* 2009.

148 **Siebenlist, U., Brown, K. and Claudio, E.,** Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. *Nat Rev Immunol* 2005. **5**: 435-445.

149 **Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F. W. and Geha, R. S.,** Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4

and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol* 2004. **16**: 395-404.

150 **Fried, A. J., Rauter, I., Dillon, S. R., Jabara, H. and Geha, R. S.,** Functional analysis of transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor (TACI) mutations associated with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2011. **128(1)**: 226-228.

151 **de Miranda, N. F., Bjorkman, A. and Pan-Hammarstrom, Q.,** DNA repair: the link between primary immunodeficiency and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* **1246**: 50-63.

152 **Kracker, S., Gardes, P. and Durandy, A.,** Inherited defects of immunoglobulin class switch recombination. *Adv Exp Med Biol* 2010. **685**: 166-174.

153 **Durandy, A., Taubenheim, N., Peron, S. and Fischer, A.,** Pathophysiology of B-cell intrinsic immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Adv Immunol* 2007. **94**: 275-306.

154 **Durandy, A., Hivroz, C., Mazerolles, F., Schiff, C., Bernard, F., Jouanguy, E., Revy, P.*et al.*,** Abnormal CD40-mediated activation pathway in B lymphocytes from patients with hyper-IgM syndrome and normal CD40 ligand expression. *J Immunol* 1997. **158**: 2576-2584.

155 **Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N.*et al.*,** Activation-induced cytidine deaminase (AID) defi ciency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000. **102**: 565-575.

156 **Imai, K., Catalan, N., Plebani, A., Marodi, L., Sanal, O., Kumaki, S., Nagendran, V.*et al.*,** Hyper-IgM syndrome type 4 with a B lymphocyte-intrinsic selective deficiency in Ig class-switch recombination. *J Clin Invest* 2003. **112**: 136-142.

157 **Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., Reina-San-Martin, B.*et al.*,** Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002. **296**: 922-927.

158 **Theunissen, J. W., Kaplan, M. I., Hunt, P. A., Williams, B. R., Ferguson, D. O., Alt, F. W. and Petrini, J. H.,** Checkpoint failure and chromosomal instability without lymphomagenesis in Mre11(ATLD1/ATLD1) mice. *Mol Cell* 2003. **12**: 1511-1523.

159 **Reina-San-Martin, B., Nussenzweig, M. C., Nussenzweig, A. and Difilippantonio, S.,** Genomic instability, endoreduplication, and diminished Ig class-switch recombination in B cells lacking Nbs1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**: 1590-1595.

160 **Ward, I. M., Minn, K., Jorda, K. G. and Chen, J.,** Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem* 2003. **278**: 19579-19582.

161 **Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M. A., Celeste, A., Manis, J. P.*et al.*,** MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell* 2006. **21**: 187-200.

162 **Pan-Hammarström, Q., Dai, S., Zhao, Y., Dijk-Hard, v., Gatti, R. A., Borresen-Dale, A. L. and Hammarstrom, L.,** ATM is not required in somatic hypermutation of VH, but is involved in the introduction of mutations in the switch mu region. *J Immunol* 2003. **170**: 3707–3716.

163 **Xue, K., Rada, C. and Neuberger, M. S.,** The in vivo pattern of AID targeting to immunoglobulin switch regions deduced from mutation spectra in msh2-/- ung-/- mice. *J Exp Med* 2006. **203**: 2085-2094.

164 **Muto, A., Tashiro, S., Nakajima, O., Hoshino, H., Takahashi, S., Sakoda, E., Ikebe, D.*et al.*,** The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 2004. **429**: 566-571.

165 **Kayagaki, N., Yan, M., Seshasayee, D., Wang, H., Lee, W., French, D. M., Grewal, I. S.*et al.*,** BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2. *Immunity* 2002. **17**: 515-524.

166 **Thompson, J. S., Bixler, S. A., Qian, F., Vora, K., Scott, M. L., Cachero, T. G., Hession, C.*et al.*,** BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 2001. **293**: 2108-2111.

167 **Phan, R. T., Saito, M., Basso, K., Niu, H. and Dalla-Favera, R.,** BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* 2005. **6**: 1054-1060.

168 **Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P. and Staudt, L. M.,** BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 2000. **13**: 199-212.

169 **Niu, H., Cattoretti, G. and Dalla-Favera, R.,** BCL6 controls the expression of the B7-1/CD80 costimulatory receptor in germinal center B cells. *J Exp Med* 2003. **198**: 211-221.

170 **Phan, R. T. and Dalla-Favera, R.,** The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 2004. **432**: 635-639.

171 **Werner, M., Hobeika, E. and Jumaa, H.,** Role of PI3K in the generation and survival of B cells. *Immunol Rev.* **237**: 55-71.

172 **Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J.*et al.*,** Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999. **96**: 857-868.

173 **Dengler, H. S., Baracho, G. V., Omori, S. A., Bruckner, S., Arden, K. C., Castrillon, D. H., DePinho, R. A.*et al.*,** Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nat Immunol* 2008. **9**: 1388-1398.

174 **Shinkura, R., Ito, S., Begum, N. A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y.*et al.*,** Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 2004. **5**: 707-712.

175 **Doi, T., Kato, L., Ito, S., Shinkura, R., Wei, M., Nagaoka, H., Wang, J.*et al.*,** The C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase is responsible for a recombination function other than DNA cleavage in class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009. **106**: 2758-2763.

176 **Durandy, A., Peron, S., Taubenheim, N. and Fischer, A.,** Activation-induced cytidine deaminase: structure-function relationship as based on the study of mutants. *Hum Mutat* 2006. **27**: 1185-1191.

177 **Ta, V. T., Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S.*et al.*,** AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol* 2003. **4**: 843-848.

178 **Xu, Z., Fulop, Z., Wu, G., Pone, E. J., Zhang, J., Mai, T., Thomas, L. M.*et al.*,** 14-3-3 adaptor proteins recruit AID to 5'-AGCT-3'-rich switch regions for class switch recombination. *Nat Struct Mol Biol* 2010. **17**: 1124-1135.

179 **Warnatz, K., Bossaller, L., Salzer, U., Skrabl-Baumgartner, A., Schwinger, W., van der Burg, M., van Dongen, J. J. M.*et al.*,** Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 2006. **107**: 3045-3052.

180 **Kracker, S., Gardes, P., Mazerolles, F. and Durandy, A.,** Immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Clin Immunol* 2010. **135**: 193-203.

181 **von Bülow, G.-U., van Deursen, J. M. and Bram, R. J.,** Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 2001. **14**: 573-582.

182 **Yan, M., Wang, H., Chan, B., Roose-Girma, M., Erickson, S., Baker, T., Tumas, D.*et al.*,** Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol* 2001. **2**: 638-643.

183 **Seshasayee, D., Valdez, P., Yan, M., Dixit, V. M., Tumas, D. and Grewal, I. S.,** Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity* 2003. **18**: 279-288.

184 **Hymowitz, S. G., Patel, D. R., Wallweber, H. J. A., Runyon, S., Yan, M., Yin, J., Shriver, S. K.*et al.*,** Structures of APRIL-Receptor Complexes. *The Journal of Biological Chemestry* 2005. **280**: 7218-7227.

185 **Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L. and Lenardo, M. J.,** A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 2000. **288**: 2351-2354.

186 **Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T. and Casali, P.,** Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* 2012. **12(7)**: 517:531.

187 **Ku, C. L., von Bernuth, H., Picard, C., Zhang, S. Y., Chang, H. H., Yang, K., Chrabieh, M.*et al.*,** Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 2007. **204**: 2407-2422.

188 **Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Goodnow, C. C. and Randall, K. L.,** T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol Rev.* **237**: 72-89.

189 **Bossen, C., Cachero, T. G., Tardivel, A., Ingold, K., Willen, L., Dobles, M., Scott, M. L.*et al.*,** TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts. *Blood* 2008. **111**: 1004-1012.

190 **Xia, X. Z., Treanor, J., Senaldi, G., Khare, S. D., Boone, T., Kelley, M., Theill, L. E.*et al.*,** TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J Exp Med* 2000. **192**: 137-143.

191 **Ye, H. and Wu, H.,** Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. **97**: 8961-8966.

192 **Baud, V., Liu, Z. G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y. and Karin, M.,** Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* 1999. **13**: 1297-1308.

193 **Magerus-Chatinet, A., Neven, B., Stolzenberg, M. C., Daussy, C., Arkwright, P. D., Lanzarotti, N., Schaffner, C.*et al.*,** Onset of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in humans as a consequence of genetic defect accumulation. *J Clin Invest.* **121**: 106-112.

194 **Martinez-Gallo, M., Radigan, L., Almejun, M. B., Martinez-Pomar, N., Matamoros, N. and Cunningham-Rundles, C.,** TACI mutations and impaired B-cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol.* **131**: 468-476.

Nombre de archivo: TESIS final final
Directorio: C:\Documents and Settings\di344366\Escritorio
Plantilla: C:\Archivos de programa\EndNote X1\Product-Support\CWYW\EndNote Cwyw.dot
Título: Title: A naturally occurring mutation affecting MyD88-binding site of TNFRSF13B impairs triggering of class-switch recombination
Asunto:
Autor: msi
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 05/04/2013 11:01:00
Cambio número: 2
Guardado el: 05/04/2013 11:01:00
Guardado por: U-Aula
Tiempo de edición: 1 minuto
Impreso el: 05/04/2013 11:05:00
Última impresión completa
Número de páginas: 240
Número de palabras: 73.143 (aprox.)
Número de caracteres: 402.289 (aprox.)