

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

"Caracterización funcional de LRBA en linfocitos B"

ΤΕSIS

Que presenta

M. en C. NIDIA CAROLINA MORENO CORONA

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de Tesis:

Tutor: Dr. Leopoldo Santos Argumedo Co-tutora: Dra. Gabriela López Herrera

México, D.F.

NOVIEMBRE, 2019

El presente trabajo se realizó en el laboratorio no1 del departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Leopoldo Santos Argumedo y en la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría bajo la dirección de la Dra. Gabriela López Herrera.

Durante el desarrollo de este trabajo la alumna recibió beca CONACYT, con número de registro 425720 y el apoyo del CONACYT con el proyecto # 256471 y 26657.

DEDICATORIAS

A mi **FAMILIA**

A mi Padre **Eduardo Moreno Peñaloza** por su guía, su apoyo incondicional, por su ejemplo de perseverancia.

A mi hermana **Magali Moreno Corona** por ser mi cómplice, mi esperanza, por su ayuda incondicional.

A mi hermana Karina Aylin Moreno Sánchez por su cariño y ánimo todos los días.

A mi hermano Eduardo Moreno Sansores por su cariño y apoyo.

A Rosalina Sánchez Romero por su apoyo y sus consejos cada que los necesite.

A mi Madre...

Por ser mi motivación, mi fuente de inspiración en todo momento, mi ejemplo a seguir a lo largo de todo el camino.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Leopoldo Santos Argumedo por su ejemplo, su paciencia, su guía y sus enseñanzas.

A la **Dra. Gabriela López Herrera** por sus enseñanzas, consejos, su infinita paciencia y su apoyo, por siempre motivarme a seguir adelante.

A la **Dra. Laura Berrón Ruíz** por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A mis asesores: La Dra. Carmen Sánchez Torres, el Dr. Michael Schnoor, el Dr. Vianney Ortiz Navarrete y el Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda por los consejos y comentarios durante la realización de mi proyecto.

Al **Dr. Héctor Romero** quien es el responsable de que todo se encuentre en orden en el laboratorio y quién siempre estuvo dispuesto a colaborar en el proyecto.

Al técnico **Lenin Estudillo y Jesús Guzmán** por apoyar siempre en el funcionamiento del laboratorio y por su amistad.

A mis compañeros de generación: Rosalía, Sandra, Alfredo, Eduardo y Samuel porque sin su apoyo, su histeria y sus consejos no lo hubiera logrado.

A todos mis compañeros del Laboratorio: Daniel, Cesar, Zayda, Daniela y Ale por sus consejos, sus enseñanzas y su apoyo. A Carlos Emilio Miguel Rodríguez por su apoyo y amistad, a David, Diana, Mizael, Erick a por su apoyo.

A Juan Carlos y María por su apoyo, consejos y su amistad.

A Orestes López por todo su ánimo, su comprensión, consejos, regaños, paciencia; porque sin su apoyo no hubiera concluido.

1 CONTENIDO

1	II	NTROD	UCCIÓN	1
	1.1	Inm	nunodeficiencias primarias	1
	1.2	Inm	unodeficiencias primarias con defectos predominantemente de anticuerpos	3
	1.3	Inm	unodeficiencia Común Variable (CVID)	4
	1	.3.1	Manifestaciones clínicas de la CVID	6
	1	.3.2	Defectos genéticos asociados a CVID	7
	1.4	Pro	teína de anclaje tipo beige que responde a LPS (LRBA)	. 10
	1	.4.1	Estructura del gen	. 10
	1	.4.2	Regulación de LRBA	. 12
	1	.4.3	Estructura de la proteína	. 12
	1	.4.4	Manifestaciones clínicas de la deficiencia de LRBA	. 16
	1	.4.5	Función de LRBA en células del sistema inmune	. 17
	1	.4.6	Homólogos de LRBA	. 18
	1.5	Pro	teína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA)	. 19
	1	.5.1	Isoformas de PKA	. 19
	1.6	Pro	teínas de anclaje a PKA (AKAPs)	. 20
	1	.6.1	Participación de PKA en linfocitos	. 21
2	JL	JSTIFIC	ACIÓN	. 23
3	н	lipótesis	S	. 23
4	0	bjetivo	general	. 24
5	0	bjetivo	s Particulares	. 24
6	N	laterial	es y métodos	. 25
	6.1	Célu	ulas y líneas celulares	. 25
	6	.1.1	Obtención de Linfocitos B primarios	. 25
	6	.1.2	Cultivo de líneas celulares de linfoma de linfocitos B y de linfocitos B primar 25	rios.
	6	.1.3	Obtención de fibroblastos primarios de piel	. 26
	6.2	Ens	ayos de inmunoprecipitación	. 27
	6	.2.1	Obtención del extracto proteico	. 27
	6	.2.2	Ensayo de inmunoprecipitación	. 27
	6	.2.3	Evaluación de la actividad de PKA en los Inmunoprecipitados	. 28
	6.3	Inm	unoblots	. 29

	6.4	5.4 Ensayos de competencia de la interacción de PKA con LRBA		30
	6.5 Tinción de inmunofluorescencia		ión de inmunofluorescencia	30
	6.5.	1	Preparación de las muestras	31
	6.6 Microscopía confocal adquisición y análisis		roscopía confocal adquisición y análisis	31
	6.7 Extracción de RNA		acción de RNA	32
	6.8	Sínte	esis de cDNA	32
	6.9	Amp	olificación de LRBA por reacción en cadena de la polimerasa	32
	6.9.	1	Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa	33
	6.10	Clon	ación de productos de PCR	34
	6.10).1	Reacción de corte para extremos romos	34
	6.10).2	Reacción de ligación	34
	6.11	Trar	sformación de los productos de ligación en <i>Escherichia coli</i> DH5 $lpha$	35
	6.11	1	Selección de colonias positivas por PCR	35
	6.11	.2	Purificación de plásmidos a partir de las colonias positivas	36
	6.12	Secu	ienciación y análisis	36
	6.12	2.1	Reacción de secuenciación	36
	6.12	.2	Purificación de los productos de secuenciación	37
	6.12.3		Lectura y análisis	37
	6.13	Clon	ación de dominios de LRBA en un vector de expresión	38
	6.13	8.1	Digestión enzimática de amplificados de los dominios de LRBA	38
	6.13.2		Obtención de los amplificados digeridos de los dominios de LRBA	40
	6.13	.3	Reacción de ligación	40
	6.14	Trar	sfección de AID en fibroblastos humanos	41
	6.15	Dete	erminación de apoptosis en Fibroblastos deficientes de LRBA	42
	6.16	Dete	erminación de proteínas fosforiladas específicas para PKA	43
	6.17	Aná	lisis estadístico	43
7	Resu	ultado	DS	44
	7.1	Líne	as celulares de linfomas de B expresan LRBA y las subunidades de PKA	44
	7.2	LRB	A interactúa con la subunidad reguladora PKA-RIIβ en la línea celular Ramos	46
	7.2.	1	Construcción de proteínas recombinantes de LRBA	46
	7.2.	2	Inmunoprecipitación de LRBA en la línea celular Ramos	48
	7.3	LRB	A colocaliza con la subunidad reguladora PKA-RIIβ en la línea celular Ramos	50
	7.3.: RIIβ	1	El péptido HT31 interfiere con la unión de LRBA con la subunidad reguladora P 52	KA-

7.4 sub	LRB unidade	A es inducida por CD40L e IL-4 en células B primarias e interactúa con es reguladoras de PKA y AID	las 54
7	.4.1	Linfocitos B primarios estimulados con CD40L + IL4 por 72hs expresan LRBA	54
7	.4.2	LRBA interacciona con las subunidades reguladoras de PKA y AID	55
7.5	LRB	A colocaliza con las subunidades reguladoras de PKA	57
7.6	Pac	ientes deficientes de LRBA	60
7	.6.1	Caracterización de fibroblastos deficientes de LRBA	63
7.7	Los	Fibroblastos deficientes de LRBA tienen menos fosforilación basal por PKA	65
8 C	DISCUSIO	ON	70
9 (9 Conclusiones		
10	Perspe	ectivas	78
11	Refere	encias	79

Índice de Figuras

Figura 1 Las líneas celulares Ramos, Daudi y Raji expresan LRBA en condiciones basales 45
Figura 2 Las líneas celulares Ramos, Daudi y Raji expresan las diferentes subunidades de PKA 46
Figura 3 Construcción del dominio BEACH-WD4047
Figura 4 Construcción del dominio AKAP de LRBA48
Figura 5 LRBA interacciona con PKA- RIIβ
Figura 6 Los Inmunoprecipitados de la línea celular Ramos no presentan actividad de
fosforilación. b
Figura 7 LRBA co-localiza con PKA-RIIβ en la línea celular Ramos51
Figura 8 El péptido HT31 compite con LRBA por la unión a las subunidades reguladoras 53
Figura 9 Linfocitos B primarios estimulados con CD40L+ IL4 expresan LRBA, AID y las diferentes
subunidades de PKA 55
Figura 10 LRBA interactúa con PKA-RIIα, PKA-RIIβ y AID56
Figura 11 LRBA co-localiza con PKA-RIIα en linfocitos B primarios estimulados con CD40L +IL4

igura 12 LRBA co-localiza con PKA-RIIβ en linfocitos B primarios estimulados con CD40L +IL4	•••
	9
igura 13 LRBA no co-localiza con PKA-Cα en linfocitos B primarios estimulados con CD40L +IL4	1.
	0
igura 14 Características de paciente deficiente de LRBA6	2
igura 15 Caracterización de Fibroblastos deficientes de LRBA	4
igura 16 Los fibroblastos deficientes de LRBA tienen una menor fosforilación basal por PKA. 6	7
igura 17AID es capaz de llegar a núcleo en fibroblastos	8

Índice de Gráficas

Gráfica 1 Distribución de Inmunodeficiencias primarias en Europa de acuerdo al nuevo regist	ro
de pacientes de la ESID n=23311	. 3
Gráfica 2 Causas Monogénicas de CVID	. 8

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de las Inmunodeficiencias Primarias (IDPs)[3]	2
Tabla 2 Primers para amplificar los diferentes dominios de LRBA para cDNA	38
Tabla 3 Características clínicas de los pacientes deficientes de LRBA	61
Tabla 4 Porcentaje de linfocitos B y T de pacientes con deficiencia de LRBA	61

Resumen

Las inmunodeficiencias primarias (IDP's) se caracterizan por ser defectos congénitos en el desarrollo y función del sistema inmunológico [1,2]. Las deficiencias primarias de anticuerpos son el tipo más común de IDPs, abarcando el 50% del total de estos padecimientos [3,4]; dentro de estas, la inmunodeficiencia común variable (CVID) es la más frecuente. La CVID es una enfermedad con heterogeneidad clínica y alta frecuencia de enfermedades autoinmunes y neoplasias malignas, únicamente se conoce la causa genética del 10% de los casos reportados[5,6]. En el 2012 se describieron defectos genéticos en el gen de LRBA (LPS responsive beige-like anchor protein) en pacientes con CVID[7]. LRBA codifica para una proteína de 319 KDa, compuesta de múltiples dominios[8], entre ellos contiene dos motivos de unión a las subunidades reguladoras de PKA. La proteína dependiente de AMPc (PKA) es un tetrámero compuesto por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas. Las proteínas de anclaje a PKA (AKAPs) se unen a las subunidades reguladoras de PKA por medio de hélices hidrofóbicas y su principal función es localizar a PKA cerca de sus posibles sustratos[9]. Se cree que LRBA tiene función de AKAP, sin embargo la interacción entre estas dos proteínas no ha sido reportado[10].

En este trabajo se exploró la interacción física de LRBA con las subunidades reguladoras de PKA en líneas celulares de linfomas de B, así como en linfocitos B primarios. Co-inmunoprecipitamos LRBA usando la línea celular Ramos, observando que LRBA interactúa con PKA-RIIβ. También inducimos la expresión de LRBA en linfocitos B primarios tras un estímulo con CD40L+IL4 y, de igual forma observamos que LRBA interactúa con PKA-RIIβ, PKA-RIIα y AID. Por otra parte, evaluamos la participación de LRBA en la fosforilación mediada por PKA en fibroblastos deficientes de LRBA; donde encontramos que estos fibroblastos presentaban una menor fosforilación por PKA. Estos experimentos sugieren que LRBA, es una AKAP, ya que interactúa con las subunidades de PKA-RII en células B, como todas los AKAP, esta interacción influye en la activación de sustratos de PKA. Así mismo podemos decir que LRBA es importante para la regulación de la fosforilación en fibroblastos.

Abstract

Primary immunodeficiencies (IDPs) are characterized for being congenital defects that affect innate and acquired immune system[1,2]. Humoral immunodeficiencies are the most commonly IDPs reported, among this, Common variable Immunodeficiency (CVID) is the most frequent[3,4]. CVID has heterogeneous clinical manifestations and present high frequency of malignancies and autoimmune diseases, only 10% of these patients have been associated with a genetic defect[5,6].

In 2012, genetic defects in the LRBA gene (LPS responsive beige-like anchor protein) were described in patients with CVID[7]. *LRBA* encodes a protein of 319 kDa, is composed of multiple domains, it contains two putative binding sites for the regulatory subunits of cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) [8]. PKA is a tetramer composed of two regulatory subunits (R unit) and two catalytic subunits (C unit). cAMP dependent protein kinase anchor proteins (AKAPs) bind PKA by inserting the hydrophobic side of the helix into the hydrophobic pocket formed by the two regulatory subunits of a PKA [9]. It has been reported that LRBA can function as an AKAP, however, the physical interaction for LRBA and PKA has not been proved to date[10].

We co-immunoprecipitated LRBA using the Ramos cell line and observed that LRBA interacts with RII β in these lymphoma cell line. Besides, in primary human B cells, LRBA was induced after CD40L and IL-4 stimulation, and, under this activation we found that LRBA interacts with RII α and RII β and AID. Suggesting that LRBA act as an AKAP and binds RII subunits We also evaluated LRBA participation in PKA mediated phosphorylation, in human fibroblast deficient for LRBA; we found that these fibroblasts had lower phosphorylated proteins than healthy controls. Our results suggest that LRBA act as an AKAP, as it can bind to PKA-RII subunits in B cells, as an AKAP, this interaction bias the activation of PKA substrates. Also, we observed that LRBA is important for regulation PKA phosphorylation in fibroblast.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Inmunodeficiencias primarias.

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) se caracterizan por ser defectos congénitos en el desarrollo y función del sistema inmunológico, como resultado, hay una mayor susceptibilidad a las infecciones. En la mayoría de los casos las IDPs son desordenes monogénicos que siguen una herencia mendeliana, sin embargo, algunas IDPs tienen un origen poligénico complejo [1,2].

Las clasificaciones más recientes, incluyen una creciente cantidad de síndromes que incluyen autoinmunidades y desregulación inmune, como principal características, más que las infecciones recurrentes que solían caracterizarlas[2]. Hasta el 2017 se han reportado 320 mutaciones distintas asociadas a IDPs. Desde 1999 la Unión Internacional de las Sociedades de Inmunología (IUIS, por sus siglas en inglés) se reúne para clasificar a las Inmunodeficiencias primarias; siendo la del 2017 la clasificación actual. Las IDPs se pueden separar en nueve categorías[11], dependiendo de qué componente del sistema inmunológico este afectado, la cual podemos observar en la tabla 1.

Una visión general de la frecuencia de diagnósticos de IDPs en la base de datos de la Sociedad Europea de Inmunodeficiencias (ESID) muestra que las deficiencias primarias de anticuerpos constituyen la mitad de los diagnósticos reportados (Gráfica 1). La prevalencia estimada varía considerablemente en el diagnóstico individual de IDPs, de aproximadamente 1:500 para la deficiencia de IgA, siendo la más frecuente, pero a menudo asintomática hasta > 1:100,000 para las formas muy graves como la inmunodeficiencia combinada severa (SCID)[2,12].

Clasificación de IDPs	Subclasificación
1. Inmunodeficiencias que afectan la inmunidad humoral y celular	 a) Inmunodeficiencias combinadas severas (SCID) b) Inmunodeficiencias combinadas. Suelen ser menos severas que las anteriores.
2. Inmunodeficiencias combinadas (CID) asociadas con síndromes	 Trombocitopenia congénita Defectos en la reparación del DNA Displasias Inmunoseas Defectos tímicos Diskeratosis congénita Defectos en el metabolismo de vitamina 12 y folatos
3. Inmunodéficiencias predominantemente de anticuerpos	a) Hipogammaglobulinemia b) Otras deficiencias de anticuerpos
4. Enfermedades de desregulación inmune	a) Linfocitosis hemofagocitica y susceptibilidad EBV b) Síndromes con autoinmunidad
5 Defectos congénitos por fagocitosis, función o ambos	a) Neutropenia b) Defectos funcionales
6. Defectos en la inmunidad intrínseca y en la inmunidad innata	a) Enfermedades parasitarias y bacterianasb) Susceptibilidad mendeliana a enfermedadescon micobacteria e infecciones virales
7. Desordenes autoinflamatorios	 a) Inflamaciones recurrentes b) Inflamación sistémica con urticaria c) Interferonopatías tipo 1 d) Inflamación estéril
8. Deficiencias del complemento	 a) Infecciones piógenas recurrentes b) Infecciones diseminadas de Neisseria c) Síndrome parecido a Lupus Eritematoso Sistémico d) Síndrome atípico urémico-hemolítica
9. Fenocopias de inmunodeficiencias primarias	a) Asociadas con auto-anticuerpos b) Asociadas con mutaciones somáticas

Tabla 1 Clasificación de las Inmunodeficiencias Primarias (IDPs)[11]

Todas estas formas de IDPs se caracterizan por una susceptibilidad aumentada a infecciones recurrentes, infecciones severas o ambas, con una susceptibilidad distintiva de varios tipos de patógenos, dependiendo de la naturaleza del defecto inmune [1]. Como se mencionó anteriormente, algunas formas de IDPs se presentan con desregulación inmune; en particular se ha visto, que los defectos genéticos que afectan el desarrollo de células B y T, comprometen no solo la habilidad de estas para generar una diversidad de linfocitos capaces de reconocer múltiples patógenos, también afecta mecanismos de tolerancia central y periférica, lo que favorece manifestaciones inflamatorias y autoinmunes[13].



Grafica 1 Distribución de Inmunodeficiencias primarias en Europa de acuerdo al nuevo registro de pacientes de la ESID n=23311 (consultada en <u>https://cci-reporting.uniklinik-freiburg.de/#/</u> 25 de octubre de 2019)

1.2 Inmunodeficiencias primarias con defectos predominantemente de anticuerpos

Como se mencionó, las deficiencias primarias de anticuerpos son el tipo más común de IDPs, abarcando el 50% del total de estos padecimientos. El espectro de las deficiencias de anticuerpos abarca desde pacientes con una reducción severa de todos los tipos de inmunoglobulinas séricas con una ausencia total de células B hasta pacientes con una deficiencia selectiva de anticuerpos con niveles normales de inmunoglobulinas y presencia de linfocitos B en periferia [3,4].

Muchos de estos desórdenes comparten un fenotipo clínico con características comunes como: infecciones recurrentes, inflamación crónica y autoinmunidad. Las enfermedades más claras que caracterizan a enfermedades con defectos de linfocitos B incluyen, enfermedades recurrentes, comúnmente causadas por bacterias encapsuladas. Los pacientes en estas condiciones se encuentran libres de enfermedades infecciosas durante su primer año de vida, debido, a las IgG adquiridas pasivamente de la madre. La mayoría de los pacientes con inmunodeficiencias humorales pueden vivir normalmente si se les da una terapia de reemplazo con gamma-globulina junto con antibióticos profilácticos[14].

Es importante realizar un diagnóstico diferencial dentro del grupo de las inmunodeficiencias primarias con defectos predominantes de anticuerpos, ya que algunas de ellas tienen un pronóstico y un tratamiento diferente. La identificación de los genes relacionados con las inmunodeficiencias predominantes de anticuerpos permite un diagnóstico definitivo, incluyendo un diagnostico parental y un manejo apropiado de los pacientes [3].

1.3 Inmunodeficiencia Común Variable (CVID)

La Inmunodeficiencia Común Variable (CVID) es un conjunto heterogéneo de condiciones, todas ellas caracterizadas por una deficiencia primaria de anticuerpos, de al menos dos isotipos de inmunoglobulinas [15]. Es la más común de las inmunodeficiencias primarias con relevancia, desde el punto de vista clínico, su incidencia se ha calculado alrededor de 1-10,000 a 1-50,000 afectando a hombres y mujeres por igual, estas se pueden establecer en diferentes periodos de la vida, desde la niñez a la etapa adulta, con una distribución bimodal, mostrando dos picos, el primero entre 1 y 5 años de vida y el segundo entre los 18 y 25 años [5,6].

El defecto inmunológico principal es la presencia de niveles bajos de inmunoglobulinas por parte de las células B, aunque se han descrito anormalidades

en los demás compartimentos del sistema inmune, por ejemplo, una disminución de células T. Clínicamente, los individuos con CVID son propensos a infecciones recurrentes, más frecuentemente de las vías respiratorias, pero pueden presentarse otro tipo de infecciones, incluyendo las del sistema gastrointestinal, piel y tejidos blandos. Sin embargo; también presentan complicaciones inflamatorias en diferentes proporciones que incluyen autoinmunidad (ej. citopenias autoinmunes), enfermedad crónica pulmonar, bronquiectasias, enfermedad gastrointestinal con o enfermedad sin malabsorción, granulomatosa sistémica localizada, 0 esplenomegalia, linfadenopatía con o sin linfomas y un mayor riesgo de malignidad [15].

Los criterios diagnósticos de CVID fueron definidos originalmente por la ESID, el criterio actual de CVID de acuerdo con la última versión consultada en: <u>https://esid.org/Working-Parties/Registry-Working-Party/Diagnosis-criteria</u>, del 22 enero 2019 es el que sigue:

Probable (Diagnóstico clínico)

Paciente masculino o femenino que presente al menos uno de los siguientes:

- Mayor susceptibilidad a infecciones
- Manifestaciones autoinmunes
- Enfermedad granulomatosa
- Linfoproliferación policlonal inexplicable
- Familiar afectado con deficiencia de anticuerpos

Además, debe presentar al menos uno de los siguientes:

- Pobre respuesta a vacunas (y/o hemaglutininas ausentes)
- Pocas células de memoria con cambio de isotipo (<70% del valor normal de acuerdo con la edad)

Debe presentar todos los siguientes:

- Una marcada disminución de IgG (al menos 2 desviaciones estándar por debajo de la media para la edad) y una marcada disminución en al menos uno de los isotipos IgM o IgA:
- Inicio de la inmunodeficiencia a una edad mayor a los cuatro años
- Deben excluirse causas secundarias de hipogammaglobulinemia (ej. infecciones, perdida de proteínas, tratamiento, cáncer.)
- Ninguna evidencia de una deficiencia profunda de células T, definida con 2 de los siguientes parámetros:
 - Linfocitos T CD4+/microlitro: 2-6 años <300, 6-12 años <250, mayores de 12 años <200
 - % de células T CD4+ ingenuas 2-6 años <25%, 6-16 años <20%, mayores de 16 años<10%
 - Proliferación de linfocitos T ausente

1.3.1 Manifestaciones clínicas de la CVID

Los pacientes con CVID pueden presentar diversas manifestaciones clínicas las más comunes se pueden dividir en seis categorías principales que incluyen: infecciones, complicaciones pulmonares, enfermedades granulomatosas o infiltraciones policlonales linfocíticas, autoinmunidad, enfermedades gastrointestinales y neoplasias. No todos los pacientes con diagnóstico clínico de CVID presentan todas las manifestaciones. Independientemente de la edad del diagnóstico, las infecciones más frecuentes que presentan estos pacientes son: sinusitis, neumonía, bronquitis, otitis media aguda y herpes. Las bacterias más frecuentemente asociadas con las infecciones en CVID son *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae y Klebsiella pneumoniae*. Algunas infecciones con patógenos más severos incluyen: *Staphylococcus aureus* meticilina-resisitentes, *Enterococcus sp.* vancomicina-resistentes, *Pseudomonas sp., Clostridium difficile* y Aspergillus.[16]

Las infecciones sinopulmonares recurrentes en la CVID, pueden comenzar en cualquier momento después de la edad de dos años, pero con mayor frecuencia son precedidas por un período de tiempo prolongado (por ejemplo, décadas) en el que la frecuencia y severidad de las infecciones son normales o casi normales. Algunas personas con CVID también pueden presentar mayor susceptibilidad a infecciones por micoplasma. Variablemente, los pacientes con CVID pueden también tener meningitis u otras infecciones bacterianas sistémicas, oculares recurrentes, infecciones de la piel o gastrointestinales (GI) síntomas relacionados con homeostasis intestinal, como diarrea crónica, mala absorción, o inflamación[15].

Además de la disfunción inmune humoral, en los individuos con CVID también puede haber síntomas de función anormal de células T y desregulación inmune, incluyendo hiperplasia linfoide, inflamación gastrointestinal, una variedad de fenómenos autoinmunes, y una mayor susceptibilidad al cáncer, especialmente a la generación de linfomas[17]. Mas de un 25% de los individuos con CVID presentan uno o más tipos de fenómenos autoinmunes. La trombocitopenia autoinmune (14%) y la anemia hemolítica autoinmune son los más comúnmente reportadas (7%), cabe mencionar que en más del 60% de los pacientes con CVID el diagnóstico de autoinmunidad precede al de CVID [18].

1.3.2 Defectos genéticos asociados a CVID

Los pacientes con CVID no producen cantidades suficientes de anticuerposantígenos específicos, lo que puede ser causados por defectos en cualquier etapa crítica de la diferenciación y maduración de las células B[19]; por lo que la heterogeneidad inmunológica y clínica de la CVID dificulta el descubrimiento de los mecanismos subyacentes que causan esta enfermedad[12,15,20]. Fue hasta el 2003 que las mutaciones en *ICOS*, fueron identificadas como el primer trastorno genético que resulta en un fenotipo CVID[21].El ritmo de avance en el descubrimiento de la base genética de la CVID ha progresado desde entonces. Se han encontrado mutaciones en genes relacionados con la súper familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF), como son *TNFRSF13B* y *TNFRSF13C* (los cuáles codifican para TACI y BAFFR, respectivamente), así mismo se han encontrado mutaciones en genes relacionados con los miembros del complejo co-receptor del BCR como son: *CD19, CR2 y CD81* y con el antígeno de diferenciación de células B, *MS4A1* (el cual codifica para CD20)[22].

Hasta el momento solo se han encontrado defectos genéticos en el 2 al 10% de los pacientes con CVID, la secuenciación de nueva generación ha acelerado el proceso y ha permitido encontrar más defectos genéticos asociados a CVID, como se observa en la siguiente gráfica[6]:



Grafica 2 Causas Monogénicas de CVID. Gráfica modificada de: Bogaert DJA, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. et al 2016.

Dentro de los casos de CVID en donde se ha determinado la causa genética, el 27%, tienen defectos en la proteína de anclaje tipo beige que responde a LPS (LRBA). El gen que codifica para LRBA fue asociado a CVID en el 2012 [7] donde describieron

mutaciones homocigotas en el gen de LRBA, las cuales causan un síndrome caracterizado por hipogammaglobulinemia temprana con autoinmunidad y enfermedad inflamatoria del intestino. Los individuos afectados mostraban niveles reducidos de al menos dos tipos de inmunoglobulinas (IgM, IgG o IgA) y sufrían de infecciones recurrentes, autoinmunidad y desordenes gastrointestinales. Se identificaron cinco individuos, presentando cuatro mutaciones diferentes en LRBA. Tres de las mutaciones encontradas son probablemente no funcionales, ya que codificaron para un codón de paro prematuro. La primera mutación fue encontrada por medio de estudios de ligamiento genético, seguida de una secuenciación de los genes candidatos. Los portadores heterocigotos no presentaban la enfermedad, mientras que los individuos afectados iniciaron con la enfermedad desde la infancia. Los individuos con deficiencia en LRBA son pertenecientes a familias consanguíneas, provenientes de Arabia, Israel, Bélgica e Irán, presentaban un desarrollo de células B alterado, una deficiente activación in vitro de las células B, formación deficiente de plasmablastos, una baja secreción de inmunoglobulinas y bajas respuestas proliferativas. Se encontró también que dichas células presentaban una alta susceptibilidad a morir por apoptosis, así como una disminución en los niveles de autofagia en condiciones de depleción de nutrientes[7].

Posterior a la descripción de la asociación de LRBA en CVID, se han descrito una serie de casos adicionales. Se describió una deleción de 2pb en LRBA [23], provocando un cambio en el marco de lectura y una nula expresión de la proteína en 5 individuos de una familia consanguínea, estos presentaban un fenotipo caracterizado por una inmunodeficiencia con características de CVID, desregulación inmune o ambas; presentado enfermedad inflamatoria del intestino con diarrea crónica y citopenia autoinmune. En un reporte adicional se reportó una deleción homocigota de los exones 1 al 30 en LRBA, en un paciente proveniente de una familia consanguínea, la paciente presentaba linfadenopatía, esplenomegalia, neutropenia, trombocitopenia y diarrea crónica asociada con enteropatía autoinmune[24].

1.4 Proteína de anclaje tipo beige que responde a LPS (LRBA)

La proteína de anclaje tipo beige que responde a LPS (LRBA por sus siglas en inglés) es una proteína que, como se mencionó anteriormente, su deficiencia fue descrita por primera vez en pacientes con inmunodeficiencia común variable (CVID) [7]. Pacientes con deficiencia de LRBA presentan una hipogamaglobulinemia de IgG acompañada de una disminución de IgM e IgA, así como enfermedades de tipo autoinmune [25]. Algunas anormalidades de pacientes con deficiencia de LRBA, *In vitro*, incluyen una reducción en la proliferación y activación de células T, en las células B estos pacientes son incapaces de realizar cambio de isotipo después de una estimulación con CD40L, BAFF y CPG.

El gen de LRBA pertenece a una familia de genes, conocida como BEACH por el dominio funcional que se encuentra hacia el carboxilo terminal de esta proteína. El dominio BEACH fue originalmente identificado como una región muy conservada dentro de la proteína reguladora del tráfico lisosomal (LYST), la cual se encuentra mutada en el síndrome de Chediak-Higashi (CHS). El nombre BEACH fue tomado a partir de 'Beige y Chediak-Higashi', del cual Beige es el nombre del modelo murino de CHS [26,27]. LRBA fue parcialmente clonada en 1992 [28] y completamente clonada en ratón y humano en el 2001 [10].

En el 2001 por medio una "trampa de gen" encontraron varios genes que se expresan por la activación con lipopolisacárido bacteriano, entre ellos el gen de *Lrba* en ratones. Una búsqueda bioinformática en GeneBank permitió observar que la secuencia encontrada en ratón tenía un alto grado de homología con una secuencia parcial de humano de 7.3kb BGL. A partir de una genoteca de cDNA de pulmón, riñón y cerebro se obtuvo la secuencia completa [10].

1.4.1 Estructura del gen

LRBA en humanos se encuentra en la región cromosómica 4q31.3, tiene 751,292 pares de bases, que comprenden desde la base 150,264,435 hasta la base

151,015,727; el mRNA de *LRBA* se expresa en casi todos los tipos celulares, con una elevada expresión en células del sistema inmune [10]. En humanos, de acuerdo con NCBI gene y con referencia de la base de datos HGNC:HGNC:1742, existen dos isoformas: la primera de 9919 pb con número de acceso de NCBI nucleotide NM_001199282.2 y la isoforma 2 de 9,914 pb con número de acceso NM_006726.4. La variante 1 le falta un exón alterno en marco de lectura, el 39, que comprende las bases 6,291-6323, y usa un sitio alternativo de splicing en el 3' de dicho exón, en comparación con la isoforma 2. La isoforma resultante tiene el mismo amino terminal, y el carboxilo terminal, la proteína resultante no pierde ningún dominio funcional siendo más pequeña por tan solo 12aa (2851 aminoácidos) en comparación con la isoforma 2 (2863 aminoácidos).



Imagen 1 Representación esquemática de las isoformas de LRBA. Las isoformas 1 pierde el exón 39 por splicing alternativo, obteniéndose una proteína de menor tamaño. La imagen se realizo con el programa Bio Render.

LRBA codifica para una proteína con múltiples dominios altamente conservados como se pueden ver en la Imagen 2[10]. Estas características estructurales sugieren que LRBA podría funcionar como proteína de andamiaje [29].



Imagen 2 Representación esquemática de los dominios de LRBA. Imagen a escala de los dominios codificados por el mRNA de *LRBA* de Izquierda a derecha, DHC (cadena pesada de Dineína), Con-A (Concanavalina A) WD (repetidos triptófano W, ácido aspártico D0), WDL(dominio parecido a los repetidos

WD), y el dominio BEACH. Cada cuadro morado corresponde a un exón, representación a escala de los exones de *LRBA*. Imagen realizada en power point con datos obtenidos de Ensembl ENSG00000198589 y NCBI nucleotide NM_006726.4.

1.4.2 Regulación de LRBA

La regulación de la transcripción de *LRBA* no se conoce, sin embargo, algunos estudios del promotor muestran que tiene múltiples sitios de inicio de la transcripción, una isla CpG y varios sitios putativos de unión a factores de transcripción como E2F1, p53 y posiblemente a ER (receptor de estrógenos) [27]. Ensayos de la actividad del promotor, usando a la luciferasa como reportera en células de adenocarcinoma de pulmón, indicaron que la actividad de p53 reprime la actividad y con el factor de transcripción E2F1 el promotor de *LRBA* tiene un aumento en la actividad de la luciferasa, además de que se observó que las células provenientes de cáncer de mama, con expresión positiva del factor de transcripción ER, correlacionan con una mayor expresión de LRBA con respecto a células cancerosas sin expresión de ER [27].

1.4.3 Estructura de la proteína

El gen de *LRBA* codifica para una proteína de 2863 aminoácidos (a.a) con un peso molecular de 319 KDa. LRBA pertenece a la familia de proteínas BEACH.

LRBA está constituida por varios dominios (Imagen 3): comenzando por el amino terminal, se encuentra el dominio homólogo a la cadena pesada 1 de la dineína (DHC_1), el dominio semejante a concanavalina A (Con A-like), seguido de un dominio WD40 (repetidos de triptófano W y ácido aspártico D), dos motivos de unión a la subunidad reguladora RII de PKA (PKA-RII), seguido del dominio WDL (domino semejante al WD40), el dominio BEACH y finalmente otros 5 repetidos de WD40[8].



Imagen 3 Representación esquemática de los dominios de LRBA. De izquierda a derecha, DHC (cadena pesada de Dineína), Con-A (concanavalina A), tiene 1 repetido WD40 (repetidos triptófano W, ácido aspártico D), WDL (dominio parecido a los repetidos WD), el dominio BEACH precedido por otros 5 repetidos WD40. Los puntos azules significan sitios posibles de fosforilación y finalmente el número de aminoácidos donde se localizan los diferentes dominios. Imagen realizada en power point.

El dominio semejante a la cadena pesada de la dineína (DHC-1) de LRBA es un dominio conservado, el cual se ha descrito, interactúa con las cadenas pesadas de la dineína. La dineína 1 actúa como un motor molecular retrogrado para la motilidad de vesículas y organelos a lo largo de los microtúbulos [30].

En el 2009, por medio de herramientas bioinformáticas, predijeron un dominio semejante a Concanavalina A (Con-A like) en LRBA y en otros cuatro parálogos [31]. La función más conocida de las lectinas, como la Concanavalina A, es reconocer carbohidratos, los sitios de unión a estos carbohidratos se pueden localizar en diferentes posiciones de acuerdo al plegamiento de cada molécula, formando bucles de unión a carbohidratos [32]; sin embargo, la localización de los aminoácidos capaces de formar estos bucles por medio de herramientas bioinformática es difícil predecir, no hay evidencias de ningún aminoácido que pueda conferir la conformación necesaria de unión a carbohidratos dentro de las proteínas de las familia BEACH, sin embargo esto no descarta que este dominio pueda funcionar como lectina uniéndose a carbohidratos [31].

Interesantemente, LRBA contiene un motivo de anclaje a PKA, lo cual podría significar que LRBA funciona como una proteína de anclaje a PKA (AKAP), las AKAPs forman hélices hidrofóbicas que tienen gran afinidad por los primeros treinta residuos de las subunidades reguladoras de PKA, especialmente las Isoleucinas 3 y 5 son esenciales para las uniones con AKAPs. Su principal función es compartamentalizar estas moléculas en distintas membranas u organelos y

acercarlas a los sustratos de dichas enzimas [33].

Al dominio WDL de LRBA también se le conoce como dominio homologo a Pleckstrina (PH-like); los dominios PH tienen aproximadamente 120 aminoácidos, así como la capacidad de unirse a fosfolípidos y presentan una conformación de dos betas plegadas antiparalelas. El dominio PH-like presente en LRBA, es de alrededor de 100 aa, igualmente cuenta con la conformación de betas plegadas; sin embargo la estructura de los aminoácidos tiene una homología del 6-12% en comparación con otros dominios PH [34]. Estudios cristalográficos de LRBA sugerían que el dominio PH-like no se une a fosfolípidos debido a que el sitio de unión se encuentra bloqueado por una alfa hélice en la estructura, así mismo no se encuentra cargado negativamente, lo anterior fue confirmado por estudios bioquímicos realizados con un panel de fosfolípidos, donde se demostró que no se une a ellos [35]. Se observo también que este dominio tiene una fuerte interacción con el dominio BEACH[34],por lo que este dominio se denominó dominio parecido a WD40 o WDL (WD40-like, WDL-like) por sus siglas en inglés, precediendo al dominio BEACH[26,29].

El dominio BEACH, como se mencionó anteriormente, se describió por primera vez en la proteína LYST, aunque la función exacta del dominio BEACH aún se desconoce, este dominio sirve para caracterizar un grupo particular de proteínas. El dominio BEACH está conformado por aproximadamente 280 a.a y se encuentra muy conservado entre todos los miembros de la familia de proteínas BEACH; se localiza principalmente en el carboxilo terminal[26]. En LRBA se sabe que este dominio interacciona con el dominio WDL, siendo este un posible mecanismo regulador de la función de andamiaje de esta proteína [34]. Dentro de la familia BEACH, en humanos se conocen 9 proteínas: LRBA, la proteína reguladora del tráfico lisosomal (LYST), la proteína asociada al factor de activación neutral de la esfingomielinasa (NSMAF), la proteína 3 que contiene el dominio WD y el dominio de dedos de zinc FYVE (WDFY3), la proteína 4 que contiene el dominio WD y el dominio de dedos de zinc semejante a neurobeachin 2 (NBEAL2), neurobeachin (NBEA) y la proteína 81 con el dominio WD(WDR81). Estas proteínas, suelen ser de alto peso molecular y estar relacionadas con varias funciones celulares, entre ellas: apoptosis, transito vesicular, señalización de receptores y dinámicas membranales. Esta familia de proteínas es de importancia clínica ya que varias de ellas están relacionadas con enfermedades asociadas al sistema inmunológico[26]. Por ejemplo la proteína LYST, la más estudiada hasta el momento, causa el síndrome de Chediak-Higashi, estos pacientes presenta hipopigmentación de ojos y de piel, sangrados prolongados y síntomas neurológicos; se encuentran vesículas alargadas en todos los tipos celulares incluyendo lisosomas, melanomas, gránulos citolíticos y gránulos densos en plaquetas[36]. Otra proteína importante dentro de esta familia es NBEA, la cual tiene una homología del 75% con LRBA[29]. Está implicada en el tránsito de la membrana al post-golgi y en la vía de secreción de vesículas grandes que contiene factores de crecimiento y hormonas[37].NBEA tiene la capacidad de unirse a las subunidades reguladoras de PKA[38]. Además, se ha reportado que su homólogo en levaduras la proteína homologa 1 a beige (BHP1) es un regulador negativo en la secreción de vesículas[39]. NBEA está relacionada con los patrones sinápticos de las neuronas de la médula espinal. También está relacionada con el autismo, desarrollo de plaquetas y mieloma múltiple en humanos, y obesidad en humanos y ratones[26,29].

Finalmente, el dominio WD40 (también conocido como WD o repetido β transducina) es un dominio estructural corto de alrededor de 40 aminoácidos, terminando frecuentemente en un di-péptido de triptófano y acido aspártico (WD), varios de estos repetidos son combinados para formar un dominio proteico WD[35]. Estructuralmente son caracterizadas por una conformación de propulsor β , compuesto por 4-8 hojas láminas antiparalelas dispuestas alrededor de un eje central, cada una de las hojas generalmente tiene cuatro láminas β antiparalelas dobladas de tal forma que la primera y cuarta lámina son casi perpendiculares entre sí, forman una plataforma en la que ocurren interacciones proteína-proteína o proteína-DNA[40]. Debido a la gran versatilidad de interacciones proteicas son el cuarto dominio más abundante en proteoma humano [41]. La función común de las proteínas con dominios WD40 es funcionar como andamiaje para interacciones proteína-proteína y coordinar eventos rio abajo, como ubiquitinización y metilación de histonas. Las proteínas con dominios WD están implicadas en una variedad de funciones, desde el control del ciclo celular, regulación de la transcripción, transducción de señales, autofagia y apoptosis[42]. Por lo que su función es importante para mantener la homeostasis y una función correcta en el organismo.

1.4.4 Manifestaciones clínicas de la deficiencia de LRBA

Aunque la mayoría de los casos descritos de pacientes con deficiencia de LRBA presentan características clínicas de un fenotipo de CVID y manifestaciones autoinmunes[25], en general estos pacientes son un grupo heterogéneo de manifestaciones clínicas. La heterogeneidad clínica en la deficiencia de LRBA fue confirmada por la descripción de casos adicionales, como lo es un desorden parecido al síndrome de Inmunodesregulación Poliendocrinopatía y enteropatía ligada al X (IPEX-like). En el 2015 se identificaron 3 mutaciones homocigotas en LRBA, en 6 miembros de 3 familias no relacionados, provenientes de familias consanguíneas [43], en dicho reporte, se encontró que los pacientes tenían una disminución de las células T reguladoras CD4⁺, así como varios marcadores de estas: FOXP3, IL2RA y CTLA4. Estudios in vitro demostraron que las células T reguladoras (Treg) de estos pacientes tenían una menor capacidad de suprimir la proliferación en células CD4⁺, así mismo las células T CD4⁺ y las Treg presentan una mayor apoptosis basal en comparación con controles sanos.

Un fenotipo clínico adicional que se ha asociado con las mutaciones en LRBA fue un síndrome parecido al síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPs-like). Revel y cols, reportaron 3 pacientes de dos familias no relacionadas, estos pacientes presentaron esplenomegalia, linfadenopatía, citopenia, una cantidad elevada de células T dobles negativas en sangre periférica, el cuál es un criterio diagnóstico de ALPS. En estos pacientes se encontró una mutación homocigota con pérdida de función; así mismo la apoptosis mediada por la vía de FAS se encontraba afectada; mientras que la apoptosis media por vía intrínseca se encontraba aumentada[44].

Adicionalmente, se describieron 10 pacientes con mutaciones bi-alélicas en *LRBA*, principalmente heterocigotos compuestos, los cuales habían sido diagnosticados con diabetes neonatal en los primeros 15 meses de vida. Nueve eran de diferentes familias y dos eran hermanos; en seis de los nueve pacientes, la diabetes fue la primera característica manifestada. Ocho de ellos presentaron además características autoinmunes entre estas presentaban manifestaciones hematológicas (5/8), enteropatía autoinmune (5/8), hipotiroidismo (1/8). El paciente restante es el resultado de padres consanguíneos presentó diabetes a la edad de 9 meses[45].

El tratamiento clínico de pacientes con deficiencia de LRBA, esta principalmente enfocado a controlar la hipogammaglobulinemia, infecciones, linfoproliferación y autoinmunidad, ya que estas siguen siendo las principales características clínicas en estos pacientes. La hipogammaglobulinemia se trata con un remplazo de IgG junto con antibióticos profilácticos[46]. En el caso de autoinmunidad se utilizan inmunosupresores, incluyendo esteroides. Existe un reporte de doce pacientes que no respondieron al tratamiento inmunosupresor, los cuales han sido sometidos a un trasplante de medula ósea. Dentro de los cuales 4 murieron tres meses después del trasplante debido a las infecciones preexistentes, rechazo del trasplante y por microangiopatía; por otra parte, los otros 8 pacientes presentan una buena, completa o parcial remisión de la inmunodeficiencia. Aunque es necesario evaluar en una cohorte mayor el trasplante de médula ósea, hasta el momento el tratamiento es recomendado[47].

1.4.5 Función de LRBA en células del sistema inmune

En el 2015 encontraron que LRBA regula la expresión de CTLA4. LRBA colocaliza con CTLA4 en vesículas endosomales, y la deficiencia o el knockdown de LRBA disminuye los niveles de expresión de CTLA4 en células T reguladoras FOXP3+ y en células T activadas [48].

Existen varias moléculas que regulan la expresión de CTLA-4, por ejemplo, el complejo vesicular AP-1, el cual se une al motivo YVKM de la cola citoplasmática de CTLA-4 y esto permite el tráfico de estas vesículas a lisosomas para su degradación. En contraste, LRBA permite el reciclaje de CTLA-4 hacia la membrana celular de Tregs uniéndose a el motivo YVKM, a través de los dominios Con A y WDL-BEACH de LRBA, así logra bloquear el sitio de unión con AP-1 y controla la respuesta proinflamatoria y de activación de células T[48]. Este hallazgo permitió considerar un nuevo tratamiento para LRBA, terapia con Abatacept, el cual es una proteína de fusión compuesta por la región Fc humana de la IgG1 y la parte extracelular de CTLA-4.

Este reporte nos permite conocer la función de LRBA en linfocitos T, sin embargo aún no hay evidencias claras con respecto a la función de LRBA en linfocitos B, a pesar de que su mayor fenotipo clínico es la hipogammaglobulinemia, así como una menor cantidad de Linfocitos B[25].

1.4.6 Homólogos de LRBA

La función exacta de LRBA en linfocitos B permanece desconocida, pero se puede obtener información de sus homólogos. Las proteínas BEACH se encuentran conservadas en varios organismos, desde organismos unicelulares como las levaduras, por ejemplo *Saccharomyces cerevisae* hasta células eucariotas [10]. Mutaciones en la proteína Bph1 (beach protein homolog) de S. cerevisae provoca un aumento en la secreción de carboxipeptidasa Y, y una formación aberrante de la pared celular [39]. En organismos multicelulares como *Drosophila melanogaster* se encuentra la proteína Rugose (Rg)/ Dakap550, la cual se sabe, tiene función de proteína de anclaje a PKA, la falta de esta proteína provoca una vida más corta de este organismo debido al aumento en la apoptosis [49]. En humanos, Neurobeachin (NBEA) codifica para una proteína de la familia BEACH ampliamente expresada en cerebro, tiene un 75% de homología con LRBA, se sabe que NBEA tiene varios dominios funcionales, incluyendo un dominio de unión a PKA, el cual se demostró que es capaz de asociarse a la subunidad RII de PKA empleando un ensayo de resonancia de plasmones con una elevada afinidad y especificidad [38].

1.5 Proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA)

La proteína cinasa dependiente de AMP cíclico es una familia de enzimas, de las cuales su actividad celular depende de AMP cíclico (AMPc). En ausencia de AMPc, PKA es una holoenzima tetrámerica inactiva, que está conformada de dos subunidades catalíticas (C), unidas a un dimero de subunidades reguladoras (R). El AMPc se une a dos sitios en cada subunidad reguladora, después de esta unión el tetrámero se disocia y permite que la subunidad catalítica fosforile residuos de Serina/Treonina precedidos del siguiente motivo: (K/R)(K/R)x(S/T)[50].

1.5.1 Isoformas de PKA

En un principio se describieron dos isoenzimas denominadas tipo I y II debido a que se encontró a la subunidad catalítica asociada a dos subunidades reguladoras diferentes RI o RII. Posteriormente se describieron más isoformas, para la subunidad RI, se identificaron dos isoformas denominadas RI α y RI β ; así como dos isoformas para RII: RII α y RII β . Posteriormente se encontraron isoformas de las subunidades catalíticas C α , C β , C γ y PRKX[9].

La subunidad reguladora tiene diferentes afinidades a la unión con AMPc, lo que genera diferentes niveles de activación. Las subunidades RII se unen con una constante de activación de K_{act} de 200-400nM; las subunidades RI tienen una mayor afinidad por AMPc con una K_{act} 50-100Nm. Adicionalmente, las subunidades R se expresan en diferentes tejidos y células, y pueden generar homo y hetero dímeros lo que genera una gran cantidad de combinaciones, lo que contribuye a la diversidad y especificidad de la vía de activación de AMPc[51]

1.6 Proteínas de anclaje a PKA (AKAPs)

La localización subcelular de PKA, está dada principalmente por las Proteínas de anclaje a PKA (AKAPs); estas son definidas con base en su habilidad para unir a PKA a través de sus subunidades reguladoras. PKA-RI se sabe que, clásicamente es soluble y se cree que es citoplásmica, PKA RII esta confinada a estructuras celulares y compartamentalizadas por medio de AKAPs; sin embargo se han descrito algunas AKAPs duales, que tiene la capacidad para unirse a RI o RII, así como algunas AKAPs que se unen específicamente a RI, sin embargo se unen con una afinidad de 10-100 veces menor con respecto a las subunidades RII [51].

Todas las AKAPs comparten ciertas propiedades en común: primero, contienen un dominio de unión a PKA; segundo tienen señales específicas de localización; tres, tienen la capacidad de formar complejos de señalización con otras proteínas[52].

Las AKAPs, incluyendo el dominio de unión a la subunidad R, son funcionalmente mas no estructuralmente relacionadas, y no comparten secuencias homologas entre ellas. El sitio de unión de las AKAPs es una hélice anfipática de 14-18 aa, que se une al dominio de dimerización N-terminal de la subunidad R de PKA. Las AKAPS se unen a PKA insertando el sitio hidrofóbico de la hélice anfipática en una cavidad hidrofóbica formado por las dos subunidades R de PKA[52]. Esto conlleva a una translocación de PKA a una localización específica en el citoplasma, dicha ubicación depende de la AKAP involucrada, en dicha ubicación, PKA es activada por AMPc, lo que libera a la subunidad catalítica para fosforilar a sus sustratos. Las AKAPs están relacionadas con una variedad de estructuras celulares como lo son: centrosomas, dendritas, retículo endoplásmico, mitocondrias, membrana nuclear y diferentes tipos de vesículas [33].

Frecuentemente la función de anclaje a PKA de una proteína se infiere usando péptidos inhibitorios. Péptidos derivados de la hélice anfipática de AKAP-Lbc, también conocida como AKAP de la tiroide humana 31 (HT31), fueron inicialmente

caracterizados por su habilidad para evitar la interacción de PKA con su posible AKAP [53].Estudios bioquímicos demostraron que el residuo de 24 aa, de HT31, se unía las subunidades RII con una afinidad nanomolar. El uso de este péptido o sus derivados (usando péptidos de HT31 solubilizados con estereato o myristolato) se han convertido en un standard para definir el papel de una AKAP, al impedir la unión de PKA con la posible AKAP[54].

En la línea celular HEK 293, se observó por medio de microscopía confocal, que LRBA colocaliza con las subunidades reguladores RIIα y RIIβ, clatrina, RAB4, adaptinaβ y con tubulina[8]. Así mismo se observó en macrófagos de ratón que LRBA se encuentra junto a aparato de Golgi, en lisosomas y vacuolas endocíticas[10].

1.6.1 Participación de PKA en linfocitos

La habilidad de AMPc como segundo mensajero para alterar el balance entre el crecimiento y la apoptosis es dependiente de cada célula. Por ejemplo, en los linfocitos T se sabe, que el AMPc promueve la apoptosis. Estas células dependen del principal efector de cAMP, PKA. Algunos estudios demuestran que la apoptosis inducida por vía cAMP/PKA en células S49 (linfoma de T) incluye la activación por la vía intrínseca de la apoptosis, por medio de la despolarización de la mitocondria y liberación del citocromo c por lo que es independiente de FAS [55].

Por otra parte, se conoce que PKA tiene participación en la señalización del TCR, una vez que este ha sido activado, se produce AMPc, lo que lleva a una disminución de la señalización del TCR, lo que lleva a la inhibición de la proliferación de las células T y de la producción de citocinas[56].

La prostaglandina 2 es otro ligando de linfocitos que aumenta los niveles de AMPc, uniéndose a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), esto inhibe la función del TCR, esto a través de PKA tipo I. Similar a esto PKA I, regula negativamente la activación de células B, a través del BCR[51]. Hay varias AKAPs bien caracterizadas en el sistema inmune, se han descrito varias AKAPs en linfocitos T, asociadas a balsas de lípidos, a células dendríticas y a plaquetas; pero están muy pobremente descritas para linfocitos B. Dentro de las AKAPs en linfocitos T están: Ezrina, AKAP79, D-AKAP1, AKAP450, MTG8, MTG16b, AKAP95 y la AKAP 220[56].

En linfocitos B, los niveles intracelulares de AMPc se incrementan por señales generadas por MHC-II, CD23, receptores de prostaglandina o el BCR[57]. Dentro de las funciones específicas de PKA en linfocitos B, la principal función descrita ha sido la participación en la fosforilación de la proteína citidina desaminasa (AID); la cual es una desaminasa especifica de células B, cuya expresión está restringida a centro germinal, y a células B activadas y se encarga en particular de dos eventos en las células B; la hipermutación somática y el cambio de isotipo. El mecanismo en que AID inicia estas modificaciones es un tema debatible, sin embargo, se sabe que PKA participa en la activación de AID en estos procesos. Se demostró que AID posee dos sitios de fosforilación para PKA la T27 y S38; y se comprobó que en ausencia de estos sitios de fosforilación, AID es incapaz de producir cambios de isotipo[58]. Existen otros reportes que mencionan que un aumento en el AMPc intracelular en linfocitos B aumenta la producción de IgE promoviendo el cambio de isotipo hacia un perfil TH2[59]. Por otra parte, se ha descrito que PKA, es capaz de intervenir en la activación del complejo IKK o con la interacción entre IKK-IkB, suprimiendo selectivamente la vía de NF-kB en, lo que se ha sugerido que AMPc está involucrado en la inducción de un estado anérgico en linfocitos B[57].

2 JUSTIFICACIÓN

La función de LRBA aún no es conocida en linfocitos B, sin embargo, la deficiencia de esta se ha asociado a diversas enfermedades, principalmente a enfermedades relacionadas con el sistema inmune. Se ha visto que pacientes con deficiencia en la expresión de esta proteína, presentan, de manera predominante, autoinmunidad, pocas células B maduras, agammaglobulinemia, así como, aumento en la apoptosis basal e inducida por disminución de nutrientes.

Por lo que es importante entender la función de esta proteína en la regulación de la respuesta inmune mediada por los linfocitos B.

3 HIPÓTESIS

La proteína LRBA tiene una función de andamiaje y está involucrada en la regulación de PKA en linfocitos B.

4 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la función de andamiaje de la proteína LRBA dentro de la regulación de PKA en linfocitos B.

5 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Buscar la expresión de LRBA y las subunidades de PKA en diferentes líneas celulares de linfoma de B.
- Analizar la asociación de las subunidades de PKA con LRBA por medio de coinmunoprecipitaciones en una línea celular de linfocitos B y en linfocitos B primarios.
 - Generar una construcción con los diferentes dominios de LRBA asociados a una bandera.
 - Realizar ensayos de co-inmunoprecipitación usando construcciones y anticuerpos anti LRBA en células Ramos.
 - Evaluar la capacidad de fosforilación de PKA dentro de los inmunoprecipitados anteriores.
- 3. Analizar la localización de LRBA y las subunidades de PKA en una línea celular de linfocitos B.
- 4. Analizar la asociación de LRBA con AID en líneas celulares de linfocitos B y en linfocitos B primarios.
- 5. Caracterizar la mutación de un modelo celular deficiente de LRBA.
- 6. Evaluar la fosforilación de PKA en una línea celular primaria de fibroblastos deficientes de LRBA.
- 7. Buscar la localización de AID en fibroblastos control y deficientes de LRBA
- 8. Transfectar fibroblastos control y deficientes de LRBA con un vector con AID acoplado a DDK.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Células y líneas celulares

6.1.1 Obtención de Linfocitos B primarios

Las muestras de sangre fueron obtenidas de donadores sanos provenientes del Hospital de Zona Ticomán, cada donador firmo un consentimiento informado. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas de un concentrado leucocitario el cual se diluyo 2:1 de sangre en buffer salino de fosfatos (PBS) a través de un gradiente de densidad de sangre heparinizada utilizando Lymphoprep (Axis Shield PoC As, Dundee, Scotland; densidad 1.077g/ml). Los linfocitos B fueron separados de sangre periférica por selección positiva partiendo de PBMCs, los cuales se resuspendieron en un buffer de resuspensión (PBS-EDTA10Mm-SFB 3%) a una densidad de 1.5x107 por cada 100µl de buffer, los PBMCs se incubaron con 10ul por cada 100µl de suspensión celular de anti-CD19 acoplado a biotina, por 20 min a temperatura ambiente, se lavaron con 4ml de buffer de resuspensión a 300xg por 5 min, se resuspendieron a la misma densidad de inicio y se incubaron por 15 min con 10ul de perlas magnéticas asociadas a streptavidina (Magnisort Human CD19 positive selection kit, Invitrogen, Waltham Massachussets). Finalmente se llevaron a un volumen final de 2ml y se incubaron por 10min en un separaciónn (Magnisort, Invitrogen, Waltham imán de Massachussets), decantándose y resuspendiendo de nuevo en 2 ml por triplicado, después del tercer lavado se resuspendieron los linfocitos B en medio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Scientific, Waltham Massachussets).

6.1.2 Cultivo de líneas celulares de linfoma de linfocitos B y de linfocitos B primarios. Las líneas celulares Ramos, Raji y Daudi se obtuvieron del laboratorio del Dr. Santos, laboratorio 1 del departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV. Las tres líneas celulares y los linfocitos B primarios fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB, Thermo Scientific, Waltham Massachussets) al 10%, L-glutamina (Gibco, Thermo Scientific) 1%, penicilinastreptomicina (Gibco, Thermo Scientific) a 37 CO2 5%.

6.1.3 Obtención de fibroblastos primarios de piel.

Los fibroblastos fueron obtenidos de un donador sano y de un paciente a partir de una biopsia de piel, se tomó una biopsia de 3mm del brazo, posteriormente esta fue lavada con PBS para remover todos los remanentes de sangre, para disgregar el tejido, fue incubada con dispasa toda la noche (1mg/ml) (Sigma, Aldrich; St. Louis Missouri, E.U), se colocó con la epidermis viendo hacia a la placa, empleando una placa de 24 pozos. El día siguiente, se removió la epidermis con unas pinzas, y la dermis fue digerida con colagenasa IV (Sigma, Aldrich) a una concentración de 0.5 U/ml durante 3 horas en agitación. La dermis fue lavada con PBS y digerida por 30 minutos en 0.05% EDTA-tripsina, finalmente la dermis fue adherida en una placa de 6 pozos y cultivada en medio DMEM (Gibco, Thermo Scientific) con factor de crecimiento epidermal- β (EGF- β 10ng/ml) por 5 días, hasta que se observó la formación de una monocapa.

Los fibroblastos fueron cultivados en DMEM (Gibco, Thermo Scientific) con SFB 10%, l-glutamina 1%, Pen-strep 1x, Piruvato de sodio 1x (Gibco, Thermo Scientific), aminoácidos no esenciales 1x (Gibco, Thermo Scientific) y se mantuvieron en estufa de cultivo celular a 37° y 5% de CO2.

Todos los estudios realizados en células humanas se realizaron bajo los estándares éticos internacionales de acuerdo con las reglas establecidas en el acuerdo de Helsinki, por otra parte, los estudios realizados en células humanas están avaladas y aprobadas en el proyecto # 015/2015 registrado, revisado y aprobado por los comités de ética y de investigación del Instituto Nacional de Pediatría.
6.2 Ensayos de inmunoprecipitación

6.2.1 Obtención del extracto proteico

Se estimularon un total de 14×10^6 linfocitos B primarios, en placas de 12 pozos, cultivando 5×10^6 linfocitos B por pocillo, en 1.5ml de RPMI 1640, durante 72 h con rhCD40L (100 ng/ml, Cell Signaling, Danvers Massachussets, E.U) más IL-4 (75 ng/ml, Peprotech, Nueva Jersey, E.U), posteriormente fueron cosechadas y resuspendidas en 250µl de buffer de lisis (Cell Signaling Technologies 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM piruvato de sodio, 1 mM beta-glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptina) adicionado con inhibidores de proteasas (cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail, cat# 04693116001, Merck, New Jersey E.U).

La línea celular Ramos se cosechó directamente del cultivo, partiendo de $10x10^6$ células, sin ninguna estimulación previa y se resuspendieron en 250µL del siguiente buffer de lisis (0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich), 50 mM Tris-base (Sigma Aldrich) pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA (Sigma Aldrich), 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml de leupeptina).

Los lisados celulares se incubaron durante 30 minutos a 4 ° C y luego se centrifugaron a 14,000 g durante 10 minutos a 4 ° C. Los sobrenadantes se apartaron y se analizaron para calcular la concentración de proteínas.

6.2.2 Ensayo de inmunoprecipitación

Los extractos proteicos (200 µg) dividiéndose posteriormente en 100 µg para el isotipo y 100 µg para el anticuerpo se pre-aclararon durante toda la noche en agitación a 4 ° C utilizando 50 µl de proteína A-sefarosa (Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, EE. UU.) para anticuerpos hechos en conejo y con proteína G-sefarosa (cat#101241, Thermo Scientific)para anticuerpos hechos en ratón. Para la inmunoprecipitación, los extractos proteicos previamente pre-aclarados se incubaron durante 4 horas a 4°C con cualquiera de los siguientes anticuerpos: IgG de

conejo o ratón se agregó 1µg de anticuerpo por cada 100µg de proteína como controles de isotipo (Jackson-Immunoresearch, West Glove, Pennsylvania, EE. UU.) o con los siguientes anticuerpos específicos: PKA-RIIβ, (BD Biosciences Pharmingen) o anti-hLRBA (Abcam), de igual forma se agregó $1\mu g$ de anticuerpo por cada $100\mu g$ de proteína. Después de la incubación con el anticuerpo, las muestras se incubaron durante toda la noche con 50 µl perlas de proteína A sepharosa. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces centrifugando a 4°C a 12000xG por 10 min con 1 ml de buffer de lisis [0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich), 50 mM Tris base (Sigma Aldrich), pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA (Sigma Aldrich), 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptina] para la línea celular Ramos y con [Cell Signaling #9803s 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na2EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM piruvato de sodio, 1 mM beta-glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptina] para linfocitos B primarios, posteriormente se le adiciono 50ul de buffer laemli (Tris base 1.0M pH 6.8, SDS 10%, Glycerol 20%, β-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.01%) y las muestras se hirvieron por 5 min a 95°C y se analizaron por inmunoblots. Los ensayos de inmunoprecipitación se repitieron al menos por triplicado tanto para las células B primarias como para la línea celular Ramos.

6.2.3 Evaluación de la actividad de PKA en los Inmunoprecipitados.

Para evaluar la fosforilación de los inmunoprecipitados se utilizó el kit Pep-TAG non radioactive Protein kinase assay (Promega, Madison Winsconsin). Brevemente, se incubaron las perlas del inmunoprecipitado junto con un péptido sintético (L-R-R-A-S-L-G) substrato de PKA cargado positivamente, dicho péptido presenta una marca con un colorante fluorescente rosa; se utilizó un control positivo (enzima control PKA-C, 2500 Unidades), un control negativo (agua bidestilada), un extracto total de proteínas de donde se realizó la IP y las Perlas del inmunoprecipitado después de los lavados y se incubaron en la siguiente mezcla de reacción:

Componente	Volumen			
PepTag Buffer reacción 5x	5µl			
PepTag A1 peptide (L-R-R-A-S-L-G)	5 µl			
PKA activator 5x (AMPc 5 μ M)	5 µl			
Muestra (Perlas o controles)	10 µl			
H ₂ O volume final	25 µl			

Esta mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 min y la reacción se inactivo a 95°C por 10 min. Finalmente, el total de la reacción se cargó en un gel de agarosa al 0.8% mezclando previamente con 1 μ l de glicerol al 70% para mantenerlo en los pozos del gel; y se corrió en buffer TBE (Tris-base 40mM, ácido acético 20mM y 1mM de EDTA) en donde el péptido fosforilado migró hacia el cátodo y el no fosforilado hacia el ánodo.

6.3 Inmunoblots

La presencia de LRBA y de las subunidades de PKA en los inmunoprecipitados o en los extractos de proteínas totales se determinaron por western blot. Se cargaron 20 µg de proteínas totales de linfocitos B primarios o de células Ramos; para el caso de los IPs se cargaron 15 µg del Input y 25 µl de perlas del Isotipo y de 25ul de perlas del anticuerpo, en un gel de gradiente (8-15%) de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad, Hercules Califorina, EE.UU). Se transfirió durante 2 horas 30 minutos a 100V en un buffer estándar tris-glicina. Las membranas se incubaron a 4°C en agitación durante la noche con los siguientes anticuerpos: anti-PKA-RIIα clona 40 (dilución 1:1000), anti-PKA-RIIβ clona 45 (dilución 1:1000), anti-PKA RIα clona 20 (dilución 1:1000) y anti-PKA-Cα Clona 5b (dilución 1:1000) (BD Biosciences Pharmigen, New Jersey,E.U) anti-AICDA policlonal 183618 (dilución 1:2000) y anti-LRBA policlonal ab121601 (dilución 1:500) (Abcam, Cambridge,U.K), anti-GAPDH 2275 (dilución 1:5000) (Trevigen, Gaithersburg, EE. UU.). Las membranas se lavaron y se incubaron durante una hora con HRP anti-ratón (dilución 1:7000 o anti-conejo-HRP dilución 1:7500.) (Jackson Immunoresearch, Baltimore, E.U). La detección de la quimioluminiscencia se realizó con el sustrato Super signal West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Scientific, Waltham Massachussets, E.U) en un Chemidoc XRS (Biorad). Las imágenes de analizaron con el software Image Lab 6 de Biorad.

6.4 Ensayos de competencia de la interacción de PKA con LRBA

Se realizo un ensayo de competencia de con el péptido de HT31 (InCELLect[™] AKAP St-Ht31 Inhibitor Peptide, Winsconsin E.U) en la línea celular Ramos, para esto se sembraron 10x10⁶ células en un pozo de una placa de 6 pozos con 2ml de RPMI y se incubaron por media hora a 37°C con el péptido Ht31 a una concentración final 10 µM, posteriormente se lavaron con PBS para quitar el medio y se procedió a realizar los ensayos de inmunoprecipitación, como se encuentran descritos anteriormente.

6.5 Tinción de inmunofluorescencia

Se obtuvieron $1x10^6$ células de la línea celular Ramos o Linfocitos B primarios estimulados como se describió anteriormente, se pasaron a tubos de citometría de flujo, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min con un ml de PBS, se decantó el PBS y posteriormente se fijaron con 100 µl, de para-formaldehído al 4% diluido en PBS a un pH 7.2, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron nuevamente con PBS y luego se permeabilizaron con tritón x-100 al 0.01% en PBS durante 10 min. Después de un lavado final, los linfocitos se incubaron con 30µl de una dilución 1:100 de anti-hLRBA (Abcam, CambridgeU.K), 30µl de una dilución 1:150 anti-PKA-RII α o con 30µl de una dilución 1:150 de anti-PKA-RII β (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, E.U) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con los siguientes anticuerpos secundarios: 30µl de una dilución 1:2000 del anticuerpo policlonal goat-anti rabbit-

IgG-Alexa Fluor® y con 30µl de una dilución 1:400 policlonal goat-anti mouse IgG Alexa Fluor®488 (Thermo Scientific) y con 30µl de una dilución 1:1000 de DAPI (Sigma-Aldrich) durante 1 hora. Finalmente, las células se lavaron y se decantaron.

6.5.1 Preparación de las muestras

Se utilizaron cubreobjetos circulares de 12mm de diámetro (cat #12, CIR-1 Thermo Scientific) los cuales se colocaron en placas de 24 pozos. Los cubreobjetos se incubaron previamente con 200 μ l de una dilución 1:10 de poli-L-lisina (Sigma, Aldrich) en agua, por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se dejaron a 70°C por 30 min hasta que se evaporo por completo el agua. Se agregaron los 100 μ l restantes del tubo de citometría a los cubreobjetos previamente tratados con poli-Llisina (Sigma Aldrich) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se lavaron los cubreobjetos con 1 ml de PBS y después de con 1 ml de agua Mili Q.

Los cubreobjetos se montaron en protaobjetos, usando 2 μ l del medio de montaje Vecta-Shield (Vector Labs, Burlingame, CA.EE.UU); sellando las orillas del cubreobjetos con esmalte transparente.

6.6 Microscopía confocal adquisición y análisis

Las imágenes confocales se obtuvieron con un microscopio confocal Leica TCS SPE (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) o en un microscopio confocal LSM 800 con tecnología de exploración aérea (Zeiss, Oberkochen, Alemania), con un aumento de 60x. La adquisición de imágenes se realizó con el paquete de aplicaciones Leica LAS X (Leica Microsystem) y con el software ZEN Black (Zeiss) respectivamente, el análisis de localización conjunta para muestras con tinción dual se realizó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson de al menos 50 células diferentes, de tres ensayos independientes. El análisis de los datos y el cálculo de las correlaciones de Pearson fueron calculadas con el software FIJI[60].

6.7 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó a partir de 3x10⁶ células mononucleares (PBMCs) de pacientes o de donadores sanos estimulados con PHA por 72hs las cuales se lisaron con 500µl de Trizol. Se adicionaron 100µl de una mezcla de cloroformoalcohol isoamílico en una relación 98:2 y se incubaron por tres minutos, posteriormente se centrifugo por 15min a 12000xg a 4°C; recuperándose aproximadamente 250 µl de la fase acuosa y transfiriéndose a otro tubo, se procedió a precipitar con 250µl isopropanol mezclando por inversión incubándose por 1hr a 4°C; se centrifugo por 10 min a 12000xg a 4°C. Se descarto el sobrenadante conservándose la pastilla de RNA, esta se lavó 3 veces centrifugando a 7500 xg a 4°C con 500 µl de etanol al 70%. Determinando la concentración y pureza de RNA por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

6.8 Síntesis de cDNA

La síntesis de DNA complementario se realizó a partir del RNA extraído utilizando la siguiente mezcla: Oligo (dT), dNTPs, RNA (adquiridos de Thermo Scientific) y agua inyectable c.b.p. en un volumen final de 17 μ l, esta mezcla se sometió a una temperatura de 70 grados celsius durante 5 minutos para después ponerla en hielo y adicionar la enzima (Transcriptasa reversa MulV, New Englands BioLabs, County Road Ipswich, MA) y el buffer de esta enzima. Se utilizó en el termociclador Veriti 96 well termal cycle de Applied Biosystems con un ciclo de 42°C por 60 min y después 90°C 10 min.

6.9 Amplificación de LRBA por reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación de LRBA se llevó a cabo a partir de las muestras de cDNA, con las siguientes con la siguiente mezcla de reacción, en un volumen final de 25µl:

Componente	Volumen					
Buffer de reacción 10x	2.5 µl					
MgCl ₂ 25mM	1.5µL					
dNTPs 10mM	0.5 µl					
Primer Fw 25µM	0.2 µl					
Primer Rv 25µM	0.2 µl					
cDNA	1 µl					
Taq pol (New England biolabs)	0.125 µl					
H ₂ 0 inyectable	19.225 µl					

Se utilizaron 16 pares de primers que sobrelapan entre si abarcando todo el cDNA de LRBA, los primers fueron diseñados por López-Herrera et al y se emplearon en las condiciones especificadas por el autor [7].

6.9.1 Electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa

Los productos de PCR se mezclaron con regulador de carga para DNA y se cargaron 5 μ L de cada muestra en un gel de agarosa al 1% preparado en TAE 1x (Tris-ácido acético-EDTA) y conteniendo de 0.1 a 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 100V durante 45 minutos, se visualizaron los productos amplificados en un transiluminador de luz ultravioleta (Kodak). Se determino el tamaño de los amplificados obtenidos por medio del uso de un marcador de DNA.

6.10 Clonación de productos de PCR

6.10.1 Reacción de corte para extremos romos

Los productos de PCR generados por la polimerasa contenían un extremo 3'dA, el cual fue cortado con la enzima DNA Blunting Enzyme del kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific) para obtener productos de extremos romos usando las siguientes condiciones:

Componente	Volumen
Buffer reacción 2x	10 µl
Producto de PCR	1µL o 0.15pmol
Agua libre de nucleasas	Aforar a 17 µl
Enzima DNA blunting	1 µl
Volumen total	18 µl

Estas reacciones se mezclaron por 3-5 segundos en vortex, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente para después inactivar la enzima a 70°C por 5 minutos, y mantener finalmente en hielo.

6.10.2 Reacción de ligación

El producto de la reacción anterior se ligó con el vector pJET de acuerdo con la siguiente reacción:

Componente	Volumen			
Vector de clonación pJET 1.2	1 µl			
Ligasa T4	1µL			
Volumen total	20 µ1			

Las reacciones de ligación se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubo a 16°C por 30 min.

6.11 Transformación de los productos de ligación en Escherichia coli DH5 α

La transformación se realizó utilizando 5 μ L del producto de ligación con 100-200 μ l de bacterias competentes, se incubó por 30 minutos a 4ºC, seguido por un choque térmico a 42ºC por un minuto y a 4ºC por un minuto más.

Las bacterias transformadas se cultivaron por una hora en 1 mL de medio Luria-Bertani (LB) a 37°C en agitación, finalmente se sembraron en una placa de agar LB conteniendo 150 μ g/ml de ampicilina recién preparada. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

6.11.1 Selección de colonias positivas por PCR

Se seleccionaron un promedio de 10 colonias por placa, y se resembraron en una placa de LB-ampicilina, así mismo, se resuspendieron en 6 µl de agua inyectable y se realizó una reacción de PCR utilizando los iniciadores pJET (ver apéndice del kit de clonación CloneJET PCR) que reconocen una secuencia del vector pJET. La reacción de PCR se llevó bajo las siguientes condiciones:

Componente	Volumen
Buffer 10x	1 µl
MgCl ₂	0.6 µL
dNTPs	0.2 µl
Primer Fw 25 μm	0.08 µ1
Primer Rv 25 μ m	0.08 µ1
Taq	0.05 µl
H ₂ 0	1.99 µl
Bacteria	6.0 µl

Se tomaron como colonias positivas aquellas que dieron un producto de PCR del tamaño del inserto.

6.11.2 Purificación de plásmidos a partir de las colonias positivas

Las colonias seleccionadas se resembraron en 5 mL de medio LB + 150 µg de ampicilina a 37°C durante toda la noche. La purificación del vector bacteriano se realizó siguiendo el protocolo establecido para el kit QIAprep spin miniprep (#Cat27104, Qiagen, Hilden Alemania). Brevemente: se centrifugaron las bacterias a 3500rpm por 10 min, y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió el pellet de bacterias en 250 µl de buffer de resuspensión P1 y se transfirió la suspensión a un tubo de 1.5ml, se añadieron 250 µl de buffer de lisis P2 a la suspensión bacteriana y se mezcló por inversión 4-6 veces; a la mezcla anterior se le añadieron 350 µl de buffer de neutralización N3 y se mezcló por inversión 4-6 veces, se centrifugo por 10 min a 13000 rpm, se tomaron 800 μ l del sobrenadante anterior y se transfirieron a una columna (QIAprep 2.0 soin columna); se centrifugaron por 1 min a 13000 rpm y se tiro el filtrado, posteriormente se lavó la columna agregando 750 µl del buffer de lavado PE y se centrifugo por 1 min, se tiro el filtrado y se volvió a centrifugar por 1 min. Finalmente, la columna se pasó a un tubo d e1.5ml y se eluyó el DNA usando 50 µl de buffer de elución EB, el cual se incubo por 1 min en la columna y después esta se centrifugó obteniendo el plásmido en el tubo de 1.5ml.

6.12 Secuenciación y análisis

6.12.1 Reacción de secuenciación

La secuenciación se realizó a partir de los vectores purificados. La reacción de secuenciación se llevó bajo las siguientes condiciones:

Componente	Volumen
Buffer 5x	1.5 µl
Muestra	1 µL o 100ng
Big Dye	0.8 µ1
Primer 25 µm	0.4 µ1
H ₂ O inyectable	10 µ1

Se utilizó la temperatura de alineación del primer correspondiente a la región del cDNA que se está secuenciando, con una extensión de 4 min.

6.12.2 Purificación de los productos de secuenciación

La purificación de los productos de secuenciación se hizo con el kit BigDye XTerminator™Purification Kit. La reacción se llevó bajos las siguientes condiciones:

Componente	Volumen
Solución Sam	45 µl
XTerminator	10 µL
Producto de secuenciación	10 µl

Posteriormente se agito en vortex por 45 min a TA. Se centrifugó 1 min a 13000xg y el sobrenadante se llevó a otro tubo.

6.12.3 Lectura y análisis

La lectura de los productos de secuenciación se realizó en la unidad de secuenciación de la UACM.

Los resultados de la secuencia se analizaron usando el programa Clustal Omega comparando el resultado de la secuenciación con las secuencias reportadas en la página electrónica del GeneBank con el número de acceso NM-006726.

6.13 Clonación de dominios de LRBA en un vector de expresión

Para realizar las construcciones de los dominios de LRBA, primero se llevó a cabo la amplificación de dominio correspondiente, a partir del cDNA de PBMCs estimulados con PHA por 72hs, el cual se obtuvo como se describió anteriormente. Se diseñaron primers específicos para amplificar los dominios de LRBA (tabla 2) a estos primers se les agrego los sitios de restricción para las enzimas de restricción Kpn1 y Xho 1.

Dominio	Primers Fwd KpnI	Tamaño Pb	pb	тм°С	
Dineina	5'ggtaccatgggtTTGGTTGAAGTT GGAGAAGTA-3'	5'-ctcgagTCCCAACATGTCAAC CAAAAGATC-3	314	157- 471	60
Concanavalina A	5'-ggtaccatgGCCAAATGGCCAT ACCAGAATGGT-3'	5'-ctcgagGTAAACTGCAGTCA TCTGACCACAG-3'	428	670- 1098	60
АКАР	5'- ggtaccatgGGCCTTTCAATAGAA GCCTCTGTG-3'	5'-ctcgagTGGTTTCAAGGCTT TATCTCCCCTA-3'	215	4207- 4422	65
WDL-BEACH	5'- ggtaccatgGGCGATGATGATAC TCTGTCATCC-3'	5'-CTCGAGAGAAGGAGTCTGTCC AAAACTTCGG-3'	1263	6172- 7437	60
BEACH-WD40	5'-ggtaccatgGCTAGTCCACG TCAGCTTTTTAAGG-3'	5'-ctcgagaatGCTTCCTGAAG CCATGCCAGA-3'	1937	6597- 8534	60

Tabla 2 Primers para amplificar los diferentes dominios de LRBA para cDNA

Una vez obtenido el producto de PCR se clono en el plásmido pJET, con la misma metodología descrita arriba.

6.13.1 Digestión enzimática de amplificados de los dominios de LRBA.

Para obtener el inserto de los diferentes dominios de *LRBA*, clonado en el pJet se realizó una digestión con las enzimas Xho1 (Cat#R30146s, New Englands Biolabs) y Kpn1 HF (Cat#R3142s, New Englands Biolabs). De igual forma el plásmido de expresión pCDNA3.1 myc/his A (Cat. # V80020, Thermo Scientific.) para generar extremos adherentes.



Imagen 4 Mapa del plásmido de expresión pcDNA myc-His

La reacción de digestión enzimática se llevó bajo las siguientes condiciones:

Componente	Volumen
DNA	1µg
10x cut smart buffer (Cat# B7204S, NEB)	5 μL
Xho1	$1\mu l$ o 10 unidades
Kpn1 HF	1µl o 10 unidades
Agua inyectable	Llevar a un volumen de 50µl

Se incubaron toda la noche a 37°C, como ambas enzimas tienen una eficiencia del 100% en el buffer cut Smart, se realizó una digestión doble. Para verificar que se liberó el inserto se corrieron 2μ l de la digestión en un gel de agarosa al 0.8%.

6.13.2 Obtención de los amplificados digeridos de los dominios de LRBA

Una vez corroborado que la digestión se realizó correctamente, se procedió a purificar el fragmento liberado del plásmido pJET por medio de las enzimas de restricción, para esto se corrieron los 48µl restantes de la digestión enzimática, en un gel de agarosa al 0.8%, se preparó el gel únicamente con 10ml de agarosa, se observó en un transiluminador (Kodak) y se realizó el corte de la banda de cDNA, que corresponde al tamaño del inserto liberado. Se extrajo el DNA con el kit QIAquick gel extraction kit (Cat# 28115, Qiagen). Brevemente el gel de agarosa con el inserto se pasó a un tubo de 1.5 ml y se centrifugo por 2 min a 14000 xg, se agregó el buffer QB en una relación 3:1, es decir si el volumen aproximado de la agarosa fue de 150 µl se agregaron 450 µl del buffer, y se incubo a 50°C por 10 min, vortexeando la muestra cada 2 min. Una vez disuelta la agarosa se le añadió un volumen igual de isopropanol a la muestra y mezclo por inversión. Posteriormente se transfirió la mezcla anterior a una columna (QIAquick spin column), máximo 800 µl y se centrifugo a 13000xg por 1 min, se decantó el filtrado y se pasó a la columna el resto de la mezcla anterior. Posteriormente se agregaron 500 µl del buffer QG y se centrifugó por 1 min a 13000xg. Después se lavó con el buffer PE y se volvió a centrifugar por 1 min a 13000xg. Finalmente, se eluyó en 50 µl del buffer EB, se incubo por 1 min y se centrifugo a 13000xg por 1 min. Se realizó lo mismo para el pcDNA 3.1. Se cuantifico el DNA obtenido midiendo la absorbancia a 260nm en un nanodrop 1000 (Thermo scientific).

6.13.3 Reacción de ligación

Una vez obtenido el pcDNA purificado con los extremos adherentes y el amplificado del dominio de LRBA, se realizó una reacción de ligación, con la siguiente mezcla de reacción:

Componente	Volumen
Vector	1 parte
Inserto	3 partes
Buffer 10x (Cat #B0202S, NEB)	2 µl
T4 DNA ligasa (Cat#M0202S,NEB)	1 μl
H ₂ 0 inyectable	Llevar el volumen a 20 μ l

Se utilizó una parte del vector por 3 de inserto. Se dejo la reacción de ligación toda la noche a 22°C.

Al día siguiente se utilizaron 5 μ l del producto de la reacción de ligación y se transformaron en *E. coli* DH5 α , se obtuvieron colonias y se obtuvo el plásmido el cual se mandó a secuenciar para corroborar que no hubiera mutaciones en la construcción, como se describió anteriormente.

6.14 Transfección de AID en fibroblastos humanos

Los fibroblastos se transfectarón con el vector de clonación pCMV6-de entrada (Cat#: PS100001, Origene) o en el vector con AICDA humano acoplado a MYC-DDK (Cat#: RC202949 con número de acceso NM_020661) de Origene (Imagen 5). Brevemente, se sembraron fibroblastos en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 6x10⁴ por pocillo en un ml de medio DMEM suplementado como se mencionó anteriormente un día antes de la transfección, al día siguiente se transfectarón con Lipofectamine® 2000, siguiendo el protocolo especificado por el fabricante, para lo cual por cada pocillo se diluyeron 0.8 µg de DNA (plásmido vacío o plásmido con AICDA)en 50µl de DMEM base; así como 2µl de lipofectamina en 50 µl de DMEM base y ambas diluciones se dejaron incubar por 5 min. En lo que se realizaba la incubación anterior se cambió el medio de los fibroblastos por 500µl de

medio base. Posteriormente se mezcló el DNA diluido con la lipofectamina diluida y se incubó por 20min. Finalmente se agregaron los 100µl a cada pozo por goteo y se agito la placa suavemente 6 horas después se retiró el medio y se cambió por DMEM suplementado, los ensayos se realizaron 72hs después.



Imagen 5 Mapa de los plásmidos utilizados. Imágenes obtenidas de www.origene.com

6.15 Determinación de apoptosis en Fibroblastos deficientes de LRBA

Se realizaron ensayos de apoptosis en los fibroblastos obtenidos del donador sano y del paciente deficiente de LRBA. Se sembraron 5x10⁵ fibroblastos en un pocillo de una placa de 6 pozos el día anterior, en 2ml de DMEM suplementado. Al día siguiente se cambió por DMEM base para inducir la apoptosis por deprivación de nutrientes, se incubaron por seis horas. Posteriormente se quitó el medio y se agregó 1ml de PBS a la placa, los fibroblastos se despegaron usando un raspador de células (cell scraper, Corning cat# 353086) se pasaron a un tubo de citometría y se centrifugaron a 1000rpm por 5 min. Los niveles de apoptosis se midieron por medio de una tinción de anexina V e Ioduro de propidio con el kit eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (cat# 88-8005-72, Thermo Scientfic), para esto, los fibroblastos se volvieron a lavar con el buffer de unión del kit, se resuspendieron en 300µl de buffer de unión y se agregaron 3.5 µl de anexina V FITC por 15 min a TA, se lavaron las células en el buffer de unión y se resuspendieron en 300µl, se agregaron 2 µl de

yoduro de propidio y se procedieron a leer las muestras dentro de la siguiente media hora. Se leyeron 10,000 eventos en el citómetro de flujo BD Fortessa (BD Bioscience). Los datos se analizaron con el software Flow Jo 7(BD Bioscience).

6.16 Determinación de proteínas fosforiladas específicas para PKA

Un día antes se sembraron 2x10⁵ fibroblastos en un pocillo de una placa de 12 pozos. Al día siguiente se dejaron los fibroblastos en un ml medio base por 4 horas y posteriormente se estimularon con FSK 30µM durante 5 min a 37°C. Inmediatamente se les dio un lavado con PBS frio y se mantuvieron a 4°C. Se retiro todo el PBS y se agregaron 100µl de buffer de lisis Cell Signaling #9803s directo en el pocillo y se incubaron en hielo por media hora, posteriormente con el raspador de células se recuperaron las células y se traspasaron a un tubo de 1.5ml y se centrifugaron a 14000 xg por 10 min, se procedió a realizar el wb como se describió anteriormente. La cantidad de proteínas fosforilada se evaluó usando el anticuerpo policlonal Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrate Antibody (#9621 cell signaling).

6.17 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm de desviación estándar. Se utilizó una prueba U no paramétrica de Mann-Whitney para el análisis estadístico, los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron significativos. Los resultados se analizaron con el software Prism V6 (Graph Pad, San Diego, California).

7 RESULTADOS

7.1 Líneas celulares de linfomas de B expresan LRBA y las subunidades de PKA

Se comenzó por buscar un modelo para el estudio de LRBA en linfocitos B por lo que se procedió a analizar la expresión de LRBA y de las subunidades de PKA en varias líneas celulares de linfocitos B. Para ello se trabajó con tres líneas celulares de linfomas de Burkitt: Ramos, Daudi y Raji, a las cuales se les realizaron ensayos de western blot, para buscar la expresión de LRBA, encontrando que las tres líneas celulares expresan de forma endógena LRBA y las diferentes subunidades de PKA (RI α , RII α , RII β y C α) (Figura 1 y 2). Debido a que todas las líneas celulares expresaron todas las proteínas así como las subunidades en diferente medida se procedió a trabajar con la línea celular Ramos, ya que esta presentó una buena expresión de todas las subunidades reguladoras de PKA y de todas las subunidades catalíticas (Figura 2) además, al ser el linfoma con características más parecidas a un linfocito B primario, ya que es negativo al virus de Epstein Bar, tiene una etapa temprana de diferenciación de células B periféricas, expresa IgM y es capaz de realizar hipermutación somática [61]; mientras que la línea celular Raji y Daudi son linfomas más agresivos, con una menor expresión de moléculas de superficie como CD20 y menor susceptibilidad a apoptosis[62]. A diferencia de los linfocitos B primarios que expresan LRBA después de diferentes estímulos[7]; la línea celular Ramos expresa LRBA de forma endógena, como ha sido reportado previamente las líneas celulares de cáncer sobre expresaron LRBA[27].



Figura 1 Las líneas celulares Ramos, Daudi y Raji expresan LRBA en condiciones basales. a) Se obtuvieron extractos proteicos de las líneas celulares: Ramos, Raji y Daudi y se realizó un Blot para LRBA y GAPDH. b) Se realizo una densitometría de LRBA normalizando su expresión usando GAPDH. Las imágenes se analizaron utilizando el software Image Lab. Se muestra una imagen representativa de tres diferentes experimentos.



45

Figura 2 Las líneas celulares Ramos, Daudi y Raji expresan las diferentes subunidades de PKA. a) Se obtuvieron extractos proteicos de las líneas celulares: Ramos, Raji y Daudi y se realizó un Blot para PKA-RIQ, PKA-RIIQ- RIIB, PKA- C y GAPDH. b) Se realizo una densitometría de LRBA normalizando su expresión usando GAPDH, Las imágenes se analizaron utilizando el software Image Lab. Se muestra una imagen representativa de tres diferentes experimentos

7.2 LRBA interactúa con la subunidad reguladora PKA-RIIβ en la línea celular Ramos

7.2.1 Construcción de proteínas recombinantes de LRBA

Posteriormente se exploró la interacción LRBA con las subunidades PKA. Para lograr esto, se realizaron proteínas recombinantes de los diferentes dominios de LRBA, se clonó el dominio correspondiente a la región BEACH-WD40 en un vector de expresión acoplado a una cola de myc-histidinas. El vector con la proteína recombinante se secuenció, encontrándose que se encontraba en marco de lectura y expresaba la cola de myc-histidinas (figura 3) sin embargo nunca se logró expresar esta proteína en una célula eucariota.



Figura 3 Construcción del dominio BEACH-WD40. a) Esquema del dominio amplificado de LRBA. b) Mapa del vector de expresión con las banderas myc-His. c) Gel de agarosa al 0.8% con los amplificados del dominio BEACH-WD40 y el pcDNA 3.1 digeridos con las enzimas de restricción kpn1 y xho1. d) Secuencia del vector con el dominio BEACH-WD40 más la cola de myc-his, con una predicción del peso molecular de la proteína recombinante.

Posteriormente se intentó generar la proteína recombinante correspondiente al dominio de AKAP de LRBA (fig. 4a), para esto, por ser una región muy pequeña se insertó primero en un vector de clonación, el pJET 1.2(fig. 4b); lo cual se logró hacer (fig. 3c); sin embargo, no se logró clonar en el vector de expresión.



Figura 4 Construcción del dominio AKAP de LRBA. a) Representación esquemática de la región de anclaje a PKA. b) Mapa del pJET1.2 c) Gel de agarosa al 0.8% del vector pJET con la AKAP, se liberó el inserto usando las enzimas de restricción Xho1 y Kpn1.

7.2.2 Inmunoprecipitación de LRBA en la línea celular Ramos

Al no lograrse las construcciones de los dominios de LRBA se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación usando anti-LRBA en extractos proteicos de la línea celular Ramos como se indica en la sección de materiales y métodos. Como se puede ver en la figura 5 en el inmunoprecipitado de LRBA, se detectó una banda para PKA-RII β , sin embargo, no pudimos detectar ninguna de las otras subunidades reguladores (PKA-RII α , PKA-RI α) ni la subunidad catalítica, lo que sugiere que, en esta línea celular, LRBA interactúa específicamente con PKA-RII β , además de que existe la predicción de que el motivo de unión a PKA en LRBA une a las subunidades reguladores reguladoras RII y no a RI.

Para confirmar la interacción entre LRBA y PKA-RIIβ, realizamos la coinmunoprecipitación inversa, empleando anti-PKA-RIIβ en extractos de proteína de la línea celular Ramos, observando la presencia de LRBA y PKA-C como se muestra en la figura 5b, lo que indica que el complejo PKA está presente en las células Ramos, pero LRBA interactúa solo con la subunidad reguladora RIIβ.



Figura 5 LRBA interacciona con PKA- RIIβ Los extractos proteicos de la línea celular Ramos se inmunoprecipitaron utilizando anti-LRBA, posteriormente se realizó un western blot para PKA-RIα, PKA-RIIα- RIIβ, PKA- C. b) Los extractos proteicos de la línea celular Ramos se inmunoprecipitaron utilizando anti-PKA-RIIβ, posteriormente se realizó un western Blot para LRBA, PKA- RIIβ y PKA- C. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos diferentes

Para evaluar si dentro del complejo inmunoprecipitado se encontraba la subunidad catalítica, también se realizó un ensayo para medir la capacidad de fosforilar a sustratos de PKA, se incubaron los inmunoprecipitados obtenidos usando el anti-LRBA con el sustrato de PKA por media hora, finalmente se corrió la muestra en un gel de agarosa (figura 6) donde podemos observar que estos inmunoprecipitados no presentan actividad de fosforilación, lo que concuerda con lo obtenido en los ensayos obtenidos en las figura 5 a, donde no observamos la presencia de la subunidad catalítica.



Figura 6 Los Inmunoprecipitados de LRBA obtenidos de extractos proteicos de la línea celular Ramos no presentan actividad de fosforilación. b) Gel de agarosa con los inmunoprecipitados y controles. Se muestra una imagen representativa de tres diferentes experimentos.

7.3 LRBA colocaliza con la subunidad reguladora PKA-RIIβ en la línea celular Ramos

Posteriormente, realizamos un análisis confocal para determinar la ubicación y la distribución celular de LRBA y PKA-RIIß en la línea celular Ramos. Como se puede observar en la figura 7, LRBA colocaliza con RIIß obteniendo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.42 (fig.7c). En observaciones más detalladas, encontramos que RIIß estaba ubicado en una región perinuclear. La ubicación subcelular para esta interacción se observó en el citoplasma, con una fuerte intensidad de fluorescencia de las señales LRBA y RIIß, como se muestra en los histogramas de la Figura 7b posiblemente cerca de Golgi; adicionalmente LRBA también se puede observar con una distribución de vesículas, sin embargo, PKA-RIIß también se expresó distribuido en todo el citoplasma.



Figura 7 LRBA co-localiza con PKA-RIIß en la línea celular Ramos. a) La línea celular Ramos fue teñida LRBA (Rojo) y PKA-RIIß en verde, Imagen general de la línea celular Ramos. b) Zoom óptico de células específicas de la imagen panorámica, debajo se muestran histogramas que muestran la distribución y la intensidad de pixeles. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal ZEISS LSM800. c) El coeficiente de correlación de Pearson fue calculado con el software fiji con una media de 0.42 para 120 células de tres experimentos independientes.

7.3.1 El péptido HT31 interfiere con la unión de LRBA con la subunidad reguladora PKA-RII β

Los datos presentados en las figuras 5 y 7 indican que LRBA puede actuar como AKAP ya que puede interactuar con PKA-RIIß y, como se esperaba, RIIß interactúa con la subunidad catalítica para PKA; sin embargo, no se encontró interacción entre LRBA y todo el tetrámero de PKA, lo que sugiere que LRBA actúa solo secuestrando las subunidades reguladoras.

Para corroborar su función como AKAP, se realizó un ensayo de competencia, usando el péptido HT31; el cual tiene una afinidad nanomolar por las subunidades reguladoras de PKA, por lo que en presencia de este péptido LRBA no se uniría a PKA, se incubó a la línea celular Ramos por 30 min con el péptido a una concentración de 10µm y después se procedió a realizar la IP, encontrando que en la presencia del péptido, LRBA ya no se une a la subunidad RIIB a los 30 min como se muestra en la figura 8a. De igual forma se realizó la IP inversa usando el anticuerpo RIIβ donde podemos corroborar, aunque de manera menos clara que LRBA no se une a esta subunidad reguladora (fig 8b).



Figura 8 El péptido HT31 compite con LRBA por la unión a las subunidades reguladoras. a) Los extractos proteicos de la línea celular Ramos se inmunoprecipitaron usando anti-LRBA después de ser incubada o no con el péptido HT31 y después se realizó un WB para LRBA y PKA-RIIβ. b) Se inmunoprecipitó PKA-RIIβ en extractos proteícos de células Ramos, después de ser incubada o no con el péptido HT31 y después se realizó un wb para LRBA y PKA-RIIβ. b) Se inmunoprecipitó Se realizó un wb para LRBA y PKA-RIIβ. Se muestra una imagen representativa de tres repeticiones.

7.4 LRBA es inducida por CD40L e IL-4 en células B primarias e interactúa con las subunidades reguladoras de PKA y AID

7.4.1 Linfocitos B primarios estimulados con CD40L + IL4 por 72hs expresan LRBA

Una vez que hemos demostrado que LRBA puede actuar como una proteína de andamiaje en la línea celular Ramos, se quiso corroborar si esto también es cierto para los linfocitos B primarios. Para lograr esto, se procedió a purificar linfocitos B de paquetes leucocitarios obtenidos de donadores sanos de bancos de sangre. Para esto, las células B se purificaron utilizando perlas magnéticas como se especifica en materiales y métodos. A diferencia de las líneas celulares de linfoma de B, LRBA no se expresa constitutivamente por los linfocitos B primarios [7,10]. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los pacientes con deficiencia de LRBA muestran defectos en la producción de anticuerpos, y los linfocitos B deficientes en LRBA no lograron producir IgG e IgA después de estimulación in vitro CD40L e IL-4 [7], debido a esto, procedimos a estimular los linfocitos B primarios; cómo se puede ver en la figura 9, se obtuvo la mayor expresión de LRBA después de 72 horas de estímulo; la expresión de PKA-RIα, RIIα, RIIβ y Cα se observó en células B no estimuladas y estimuladas con CD40L / IL-4 sin diferencias significativas como se muestra en la figura 9b. Debido a que el estímulo con CD40 induce la expresión de AID [63], también buscamos la expresión de esta proteína, encontrando una expresión positiva después de 72 horas de estímulo, figura 9a.



Figura 9 Linfocitos B primarios estimulados con CD40L+ IL4 expresan LRBA, AID y las diferentes subunidades de PKA. a) Los linfocitos B primarios fueron purificados con perlas magnéticas acopladas a CD19⁺ posteriormente se mantuvieron 72h en cultivo sin estimulo o con CD40L+IL4, se obtuvieron los extractos proteicos y se realizó un WB para las siguientes proteínas LRBA, PKA-RIα, PKA-RIIα- RIIβ, PKA- C, AID y GAPDH. b) Se realizo una densitometría de LRBA normalizando su expresión usando GAPDH, Las imágenes se analizaron utilizando el software Image Lab. Se muestra una imagen representativa de cuatro diferentes experimentos.

7.4.2 LRBA interacciona con las subunidades reguladoras de PKA y AID

Dado que los linfocitos B primarios expresaron apropiadamente las subunidades de PKA y LRBA, se procedió a realizar los experimentos de co-inmunoprecipitación para determinar la interacción entre las subunidades reguladoras y LRBA; para esto, se obtuvieron extractos de proteínas de los linfocitos B primarias estimuladas con rhCD40L y rhIL-4 durante 72 horas, posteriormente se realizó la inmunoprecipitación con LRBA como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos; en tales inmunoprecipitados, se evaluó la asociación con las diferentes subunidades de PKA, encontrando que, de manera similar a la línea celular Ramos, LRBA puede interactuar con PKA-RIIβ, pero también se observó PKA-RIIα. Además, en los inmunoprecipitados de LRBA también se encontró AID (Figura 10a). De manera similar, para las células Ramos, los inmunoprecipitados no presentaron actividad catalítica como se observó en la figura 8b, así mismo la subunidad catalítica para PKA no se observó en los inmunoprecipitados de las células B primarias estimuladas con rhCD40L / rhIL-4, lo que podría implicar que la PKA podría activarse en puntos de tiempo más tempranos después de la activación, perdiendo la subunidad catalítica en el complejo proteico.



Figura 10 LRBA interactúa con PKA-RIIα, PKA-RIIβ y AID. a) Se obtuvieron extractos proteicos de los linfocitos B primarios tras un estímulo con CD40L+IL4 por 72 y se inmunoprecipitaron utilizando anti-LRBA, posteriormente se realizó un western blot para LRBA, PKA-RIα, PKA-RIIα- RIIβ, PKA- C y AID. b) Gel de agarosa con los inmunoprecipitados. Se muestra una imagen representativa de tres diferentes experimentos.

7.5 LRBA colocaliza con las subunidades reguladoras de PKA

Se realizaron experimentos de inmunolocalización para confirmar la interacción entre LRBA y PKA-RII, de manera similar a las células Ramos observamos una colocalización positiva en células B estimuladas con rhCD40L más IL4 con la subunidad PKA-RIIα (figura 11B) y PKA-RIIβ (figura 12b) encontrando que PKA-RIIα tiene un valor medio de correlación de Pearson de 0.3 y para PKA-RIIβ un valor de correlación de Pearson de 0.34, observándose para ambas subunidades una correlación de Pearson similar (figura 11c y 12c). En las células B no estimuladas, se observó una distribución citoplasmática de PKA RIIα (figura 11a) y PKA-RIIβ (figura 12b), sin embargo, no se observó la expresión de LRBA. Al igual que en la línea celular Ramos, podemos encontrar que LRBA tiene una ubicación vesicular en el citoplasma en las células B primarias estimuladas; sin embargo, en contraste con las células Ramos, ambas subunidades RII también mostraron una distribución vesicular. Los datos presentados en las figuras 10,11 y 12 sugieren que LRBA actúa como una proteína de andamiaje en las células B primarias estimuladas con rhCD40L más IL-4, ya que puede interactuar específicamente con las subunidades RII de PKA.



CD40L + IL4

Figura 11 LRBA co-localiza con PKA-RIIα en linfocitos B primarios estimulados con CD40L +IL4. a) Los linfocitos B primarios sin estimulo fueron teñidos con LRBA (Rojo) y RIIα (verde)a la derecha se muestra una imagen general de los Linfocitos, y a la izquierda un zoom óptico de una sola célula b) Linfocitos B estimulados con CD40L+ IL-4 fueron teñidos con LRBA (Rojo) y RIIα (verde) se muestra una imagen general a la derecha un zoom óptico de una sola célula a un lado se encuentran histogramas que muestran la distribución y la intensidad de pixeles. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal LEICA TCS SPE. c) El coeficiente de correlación de pearson fue calculado con el software fiji con una media de 0.3 para 80 células de tres experimentos independientes. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal LEICA TCS SPE.



Figura 12 LRBA co-localiza con PKA-RIIß en linfocitos B primarios estimulados con CD40L +IL4. a) Linfocitos B primarios sin estimulo fueron teñidos con LRBA (Rojo) y PKA-RIIß (verde)a la derecha se muestra una imagen general de los Linfocitos, y a la izquierda un zoom óptico de una sola célula. b) Linfocitos B estimulados con CD40L+ IL-4 fueron teñidos con LRBA (Rojo) y PKA-RIIß (verde) se muestra una imagen general a la derecha un zoom óptico de una sola célula a un lado se encuentran histogramas que muestran la distribución y la intensidad de pixeles. c) El coeficiente de correlación de pearson fue calculado con el software fiji con una media de 0.34 para 80 células de tres experimentos independientes. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal LEICA TCS SPE.

Los estímulos anteriores se realizaron a las 72hs, porque fue el tiempo en el que mejor vimos la expresión de LRBA, sin embargo nos preguntamos si la subunidad catalítica de PKA, no se uniría a tiempos más tempranos a LRBA, por lo que se realizó una tinción de confocal a las 36h, donde se buscó la asociación de LRBA con las subunidad C α de PKA como se observa en la figura 13, sin embargo aunque se encontraron algunas células que co-localizaba, en la mayoría de los casos no fue así, se obtuvo un coeficiente de Pearson de 0.22 (Fig 13c). Se observo que PKA C α se encontraba principalmente en núcleo mientras que LRBA, presenta

una localización perinuclear como se mencionó antes, muy probablemente, cerca del aparato de Golgi.



Figura 13 La mayoria de los linfocitos B primarios estimulados con CD40L+IL4 no presentan co-localización de LRBA con PKA-Cα en linfocitos B primarios estimulados con CD40L +IL4. a)) Linfocitos B estimulados con CD40L+ IL-4 por 36h fueron teñidos con LRBA (Rojo) y PKA-Cα (verde) se muestra una imagen general b) Se observa un zoom óptico de una sola célula a un lado se encuentran histogramas que muestran la distribución y la intensidad de pixeles. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal LEICA TCS SPE. c) El coeficiente de correlación de pearson fue calculado con el software fiji con una media de 0.25 para 64 células de tres experimentos independientes. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio confocal LEICA TCS SPE

7.6 Pacientes deficientes de LRBA

Para buscar una posible función de LRBA, buscamos un modelo celular deficiente de esta proteína. Para esto durante el trabajo de maestría se analizaron 17

pacientes con CVID, dentro de ellos se encontraron 5 pacientes deficientes de LRBA. En la tabla 3 podemos observar las características clínicas de estos pacientes; todos presentan características clínicas asociadas a CVID, además 4 de 5 presentan problemas autoinmunes y uno de ellos vienen de padres consanguíneos. En la tabla 4 podemos observar los porcentajes de células T y B al momento del diagnóstico.

No Paciente	Edad	Genero	Consanguineidad	Esplenomegalia	Linfadenopatía	Neumonías	Otitis	Sinusitis	Bronquiectasias	Diarrea Crónica	Enfermedades vías urinarias	Granulomas	Autoinmunidad	РТІ
1	19	F	No	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
2	19	F	Si	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
9	50	F	No	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
11	47	М	No	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
13	23	М	No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

PTI (Purpura trombocitopenica idiopática)

No.	Sexo	Edad	% Células T	% Células B	% Células B de
Paciente			V.R>18a(48-84)	V.R<18a (9-23)	memoria total
			V.R<18a(50-90)	V.R >18a(7-23)	V.R <18a (13-48)
					V.R >18a (18-47)
1	F	19	62	12	10
2	F	19	90	3	5
9	F	50	46	33	4
11	М	47	54	19	19
13	M	23	69	8	5

Tabla 4 Porcentaje de linfocitos B	y T de	pacientes con	deficiencia	de LRBA
------------------------------------	--------	---------------	-------------	---------

Como la consanguineidad y los problemas autoinmunes son una característica clara de la deficiencia de LRBA; se procedió a caracterizar la mutación en la paciente 2, para esto se obtuvo cDNA a partir de PBMCs obtenidos de sangre periférica y que fueron estimuladas con PHA 72h, posteriormente se realizó una reacción de secuenciación para todo el mensajero, como esta descrito en materiales y métodos y se procedió a analizar la secuencia. Encontrando que la paciente presentaba una inserción de 15 pb correspondientes al exón 50-51 figura 14c, proviene de una familia consanguínea y presentaba pocas células B al momento del diagnóstico figura 14 a y b.



- e) CLUSTAL 0(1.2.4) multiple sequence alignment
 - P2
 AGCTCAAATCCGAAGTTTTGGACAGACTCCTTCTCAACTACTCATAGAGCCCCATCCTCC

 LRBA
 AGCTCAAATCCGAAGTTTTGGACAGACTCCTTCTCAACTACTCATAGAGCCCCATCCCC

 P2
 CAGAGGTTCTGCCATGCAAGTGTATCTCCTCCTGCAGAGTCCATTGATGTTCACAGACAA

 LRBA
 CAGAGGTTCTGCCATGCAAGTGTATCTCCTCCTGCAGAGTCCATTGATGTTCACAGACAA
 - P2 AGCCCAGCAGGATGTTATCATGGTCCTCAAGTTTCCCTCCAACTCCCCTGTTACTCACGT LRBA AGCCCAGCAGGATGTTATCATGGTCCTCAAGTTTCCCTCCAACTCCCCTGTTACTCACGT

Figura 14 Características de paciente deficiente de LRBA. a) Mapa genealógico del paciente. b) Histograma de linfocitos b de memoria de un control sano y del paciente. c) Electroferograma de la secuencia del exón 50-51 donde aparece la inserción. d) Western Blot de LRBA, PKA-RIα, PKA-RIIα- RIIβ, PKA- C y AID de EBV de un testigo sano y de la paciente. e) Alineamiento de la secuencia reportada en NCBI y la secuencia de la paciente.

Actualmente la paciente 2 no cuenta con linfocitos B, debido a la deficiencia de LRBA, tampoco logramos obtener células B inmortalizadas de ninguno de los pacientes descritos en la tabla 4. Por lo que para obtener un modelo deficiente de
LRBA procedimos a utilizar fibroblastos obtenidos de una microbiopsia de la paciente 2.

7.6.1 Caracterización de fibroblastos deficientes de LRBA

Una vez obtenidos los fibroblastos se procedió a caracterizarlos. Donde podemos observar por medio de una tinción confocal en la figura 15 a y un western blot (figura 15b) la ausencia de LRBA en los fibroblastos. Así mismo observamos una disminución aparente en las subunidades reguladoras de PKA en comparación con el control sano. Por otro lado, los fibroblastos del paciente presentaron una mayor susceptibilidad a apoptosis cuando se disminuyen los nutrientes del medio de cultivo, dicha susceptibilidad a la muerte por apoptosis se ha reportado en otros tipos celulares en otros pacientes con esta deficiencia [7], figura 15c y 15d. Otra observación que se hizo fue que los fibroblastos deficientes tenían una menor proliferación, en comparación con los controles; por lo que no en todos los casos se pudieron hacer las repeticiones necesarias para obtener un valor significativo.



Figura 15 Caracterización de Fibroblastos deficientes de LRBA. a) Los fibroblastos control y deficientes fueron teñidos con LRBA en rojo. b) Se obtuvo un extracto proteico directamente de los fibroblastos en cultivo y se les realizo un WB para LRBA, PKA-RII α y RII β . c) Se realizo una tinción con ioduro de propidio y anexina v a los fibroblastos después de 6 horas de disminución de nutrientes. d) Se midieron los niveles de apoptosis en los fibroblastos control y deficientes, los resultados se analizaron con Prism obteniendo una p> 0.05

7.7 Los Fibroblastos deficientes de LRBA tienen menos fosforilación basal por PKA

Para evaluar la participación de LRBA en la regulación de la fosforilación por PKA, se procedió a evaluar la fosforilación total de los sustratos de PKA en condiciones basales y con un agonista de PKA (Forskolina); se encontró que los fibroblastos carentes de LRBA en condiciones basales presentan un patrón de fosforilación dependiente de PKA disminuido (figura 16a), esto se observó por medio de un western blot de extractos proteicos totales, utilizando un anticuerpo específico para los sitios de fosforilación por PKA, que reconoce el motivo especifico RXXS*/T*; sin embargo, al inducir el aumento del cAMP intracelular por medio de forskolina (FSK), podemos observar que los niveles de fosforilación tanto en controles como en pacientes son similares. Esto sugiere que LRBA podría estar participando en la fosforilación basal de los fibroblastos; ya que a diferencia de los linfocitos B primarios, los fibroblastos expresan LRBA de forma basal.

Para determinar si la ausencia de LRBA afectaba la fosforilación de uno de los sustratos más importantes de PKA en las células B, se procedió a realizar una transfección con la proteína AID, la cual no se expresa de forma endógena en los fibroblastos; en la construcción empleada, la proteína se encuentra acoplada a una bandera DDK (FLAG). Los fibroblastos se transfectaron por medio de lipofectamina con un plásmido vacío y un plásmido que expresa la proteína AID, posteriormente se realizó un western blot para evaluar la expresión de AID en los fibroblastos utilizando un anti-Flag y un anti-AID figura 16c.

Posteriormente procedimos a buscar la fosforilación en los fibroblastos transfectados, tanto en los controles como en los deficientes de LRBA; para esto primero se volvió a evaluar la fosforilación de proteínas dependiente de PKA. En la figura 16 b podemos observar el western blot de las proteínas fosforiladas por PKA. En los primeros dos carriles del blot se encuentran los fibroblastos control, tanto en

los transfectados con el vector vació y con el vector con AID, podemos observar varias proteínas fosforiladas de diferentes pesos moleculares. En los siguientes dos carriles observamos a los fibroblastos deficientes de LRBA, en donde podemos observar que los fibroblastos transfectados con el vector vació al igual que los fibroblastos deficientes de LRBA sin transfectar, presentan una menor cantidad de proteínas fosforiladas por PKA; inesperadamente los fibroblastos carentes de LRBA transfectados con AID, parecen presentar un patrón de fosforilación muy similar al de los fibroblastos control. Esto sugiere una recuperación de los niveles de fosforilación dependientes de PKA por la presencia de AID en los fibroblastos. En el blot podemos observar que tanto en los fibroblastos control como en los carentes de LRBA se observa una banda en un peso de 25kDA, lo cual está en un peso muy cercano a AID, sin embargo, no se demostró que esta proteína estuviera fosforilada.



Figura 16 Los fibroblastos deficientes de LRBA tienen una menor fosforilación basal por PKA. a) Loa extractos proteicos de los fibroblastos fueron obtenidos tras un estímulo con FSK por 5 min o sin estimulación previa y se realizó un WB con un anti-pPKA. b) Los fibroblastos control o deficientes de LRBA se transfectaron con un plásmido vacío o con un plásmido que contiene AID, tras esto se obtuvieron extractos proteicos tras un estímulo con FSK por 5 min o sin estimulación previa y se realizó un WB con un anticuerpo que reconoce el motivo especifico de fosforilación de PKA RRXS*/T* . c) Los fibroblastos control o deficientes de LRBA se transfectaron con un vector vacío o con AID, a las 72hs tras transfección se buscó la expresión de AID y flag en los extractos proteicos de estos fibroblastos.

Finalmente quisimos evaluar si la deficiencia de LRBA impedía que AID pudiera llegar a núcleo, por lo que se procedió a realizar una tinción por microscopía confocal de los fibroblastos control y deficientes de LRBA, figura 17.

a) Fibroblastos Control AID



b) Fibroblastos LRBA -/- AID



c) Fibroblastos Control AID



Figura 17 AID es capaz de llegar a núcleo en fibroblastos. a) En la imagen podemos observar fibroblastos control tansfectados con AID teñidos con LRBA (Rojo) y AID-flag(verde), debajo se encuentra un zoom óptico de zonas específicas de las células, e histogramas que representan la intensidad de pixeles y la distribución. b) En la imagen

se encuentran los fibroblastos deficientes de LRBA tansfectados con AID teñidos con LRBA (Rojo) y AID-flag(verde), debajo se encuentra un zoom óptico de zonas específicas de las células, e histogramas que representan la intensidad de pixeles y la distribución. c)Se encuentran fibroblastos transfectados con el vector vacío teñidos con LRBA (Rojo) y AID-flag(verde), debajo se encuentra un zoom óptico de zonas específicas de las células, e histogramas que representan la intensidad de pixeles y la distribución. Las imágenes fueron adquiridas en un confocal LEICA TCS SPE, se muestra una imagen representativa de dos experimentos diferentes

Podemos observar que en los fibroblastos control, AID se encuentra tanto en núcleo en una zona perinuclear, al realizar un zoom óptico de la zona donde se encuentra AID podemos observar que LRBA se encuentra en las zonas adyacentes a AID, cuando este se encuentra en una zona cercana a núcleo, el análisis de los histogramas sugiere que LRBA se encuentra rodeando a AID.

Al analizar la tinción de los fibroblastos deficientes podemos observar que al igual que en el control se encuentra AID en núcleo y en la zona perinuclear, observándose una menor cantidad de AID en núcleo. Lo que sugiere que LRBA podría estar secuestrando a AID en el citoplasma, sin embargo, por problemas en la proliferación de los fibroblastos deficientes solo logramos repetir el ensayo dos veces.

8 **DISCUSION**

Desde la identificación de LRBA en ratones en 2001, se han sugerido varias hipótesis sobre su función [10,25,26,29,64]. Sin embargo, la función de LRBA se ha descrito solo para células Treg donde es importante para el reciclaje de CTLA-4; sin embargo, aún continúa siendo desconocida la función de LRBA en otros tipos celulares.

LRBA se expresa de forma ubicua; el transcrito de LRBA se expresa en varios tejidos [7,10], sin embargo, los pacientes con deficiencia de LRBA muestran un fenotipo clínico inmunológico, lo que indica que LRBA es crucial para las funciones inmunológicas. En este trabajo, exploramos la posibilidad de que LRBA pueda actuar como AKAP, pudiendo posicionar a PKA en ubicaciones subcelulares específicas que faciliten el acceso a los sustratos de PKA. Las AKAP dentro del sistema inmune se encuentran ampliamente descritas para las células T, donde se han identificado al menos siete AKAP diferentes, aunque se desconoce su papel exacto en las células T [56]. Dentro de las células presentadoras de antígeno se ha descrito la presencia de AKAPs en células dendríticas, donde hay tres proteínas relevantes para la presentación de antígeno [65]. Para las células B, sin embargo, no hay información disponible sobre AKAPs, a pesar de que, de manera general, se acepta que las AKAP son relevantes para todos los tipos celulares. La compartimentación de PKA por AKAPs es importante ya que proporciona una regulación espacio-temporal y acceso a sustratos de PKA, por lo que se maneja que las AKAPs, además de interactuar con PKA, también podrían interactuar con sustratos de esta enzima [9,51]. La información disponible hasta ahora que sugiere que LRBA puede funcionar como AKAP es: primero, que otros miembros de la familia de proteínas como dAKAP550 y Neurobeachin (ambos ortólogos de LRBA) tienen función de AKAP [38]; segundo, los dos motivos AKAP presentes en la secuencia de aminoácidos LRBA[10]; y tercero, que LRBA y PKA colocalizan en células epiteliales[8].

Podemos observar en este trabajo, que LRBA tiene una interacción física con las subunidades reguladoras de PKA; para esto, primero se analizó una línea celular de linfoma de linaje B, la línea celular Ramos, donde podemos apreciar la expresión de todas las subunidades reguladoras de PKA analizadas en este trabajo, siendo PKA-RIIβ la subunidad con más expresión en la línea celular de Ramos como se muestra en la figura 2a así como la única isoforma que co-inmunoprecipitó con LRBA (Figura 5a), sin embargo, no se encontró la subunidad catalítica en el complejo, creemos que, debido al estado activado de estas células, PKA-C es constitutivamente activa y separada de las subunidades reguladoras lo que hace imposible su detección en el complejo. La asociación entre LRBA y PKA se confirmó por co-inmunoprecipitación de PKA-RII^β, en esos inmunoprecipitados, estaban presentes PKA-C_α y LRBA, lo que nos indica que en la línea celular Ramos, PKA existe en su forma tetramérica donde dos subunidades reguladoras se unen a dos catalíticas (Figura 5b), sin embargo, la forma tetramérica de PKA no está unida a LRBA; lo cual se confirmó al no encontrar actividad de fosforilación en los inmunoprecipitados (figura 6). El complejo LRBA-PKARIIβ se exploró aún más mediante experimentos de co-localización, como se puede ver en la Figura 7, se observó una fuerte co-localización entre ambas proteínas en las células Ramos en un área perinuclear, posiblemente cerca del complejo de Golgi, de hecho, se ha informado previamente que una proteína de fusión que contiene LRBA y el dominio WD40 de LRBA co-localiza con este orgánelo [10], se ha descrito que las proteínas PKA-RII se localizan en la red trans-Golgi y el área centrosomal [51]. Finalmente, en las células Ramos, la co-localización entre LRBA y PKA-RIIβ no es homogénea en todas las células, como se puede observar en la figura 7, hay alrededor del 50% de células con un valor de correlación bajo, esto puede indicar que la interacción entre ambas proteínas puede depender de la activación o del estado del ciclo celular o incluso, del estadio de diferenciación.

Adicionalmente observamos en la figura 8 que el péptido Ht31, que comprende los aa(493–513), el cual fue sintetizado a partir del sitio de unión a la subunidades reguladoras RII de la AKAP de la tiroides humana [66] compitió eficientemente con LRBA por los sitios de unión a RIIβ, ya que como se observa en la figura 8a cuando el péptido está presente, LRBA no se une a RIIβ, o hay una unión con una eficiencia muy reducida, esto indica que el mismo sitio de RII se une a HT31 y a LRBA; lo que corrobora la especificidad de LRBA para los sitios de unión a RII.

Como la línea celular Ramos son células B provenientes de un linfoma que no pueden diferenciarse, estas se encuentran activa constitutivamente[67], por lo que se realizaron experimentos en células B primarias, en estas células, solo se observa la presencia de LRBA en condiciones de activación, siendo la estimulación con rhCD40L y rhIL-4 un potente inductor de la expresión de LRBA, las subunidades reguladoras y catalíticas de PKA se expresan en células B primarias humanas no activadas y activadas, pero, a diferencia de la línea celular Ramos, la expresión de RIIa se enriquece en células B primarias en comparación con RII β y RI α (Figura 9a, b). El estímulo de linfocitos B con las proteínas recombinantes CD40L e IL-4 también es un potente inductor de AID [68], que se expresó adecuadamente en células B primarias estimuladas (Figura 9a, b), cuando se realizaron experimentos de coinmunoprecipitación, observamos que ambas isoformas de RII están interactuando con LRBA, pero de manera similar a las células Ramos, la subunidad catalítica no se encontró en los complejos, esto puede deberse al estado de activación de las células B, posiblemente, la asociación y la disociación de las subunidades catalíticas con las reguladoras ocurre de manera muy rápida, evitando su detección en los inmunoprecipitados. De manera interesante, también se encontró AID en los inmunoprecipitados de LRBA (Figura 10a), lo que indica que LRBA puede interactuar con las proteínas RII y AID. Sugerimos que LRBA puede estar involucrado en la unión de PKA y AID para facilitar su fosforilación y su función durante el cambio de isotipo de inmunoglobulina (CSR) y la hipermutación somática (HSM), siendo un posible mecanismo que puede explicar el fenotipo de hipogammaglobulinemia de pacientes con deficiencia de LRBA; es importante señalar, que PKA es capaz de fosforilar AID en residuos de serina y treonina y este evento induce el CSR y la HSM [33].

También se realizaron experimentos de co-localización para linfocitos B primarios, la distribución celular para RII y LRBA se comportó de manera diferente a la observada para la línea celular Ramos, en el caso de los linfocitos B primarios, se observó una expresión puntuada para LRBA y ambas isoformas RII (figura 11 y 12), sugiriendo que los complejos LRBA-PKA pueden estar asociados con vesículas citoplasmáticas y pueden estar involucrados con el tráfico intracelular. La colocalización entre LRBA y PKA-RII tampoco es homogénea en todas las células, esto puede deberse a diferentes estados de activación entre las células o tal vez a una etapa de diferenciación diferente, ya que las células B periféricas humanas se distribuyen principalmente entre células B "naive" y de memoria [69]. Por otra parte LRBA podría servir no solo para acercar la subunidad catalítica a sus blancos, podría tener una función de reciclamiento como se ha reportado ya para los linfocitos T[48]. Debido a que tras 72hs de estímulo nunca se encontró a la subunidad catalítica asociada a el complejo LRBA-PKA RII, la buscamos a tiempos más tempranos, para esto comenzamos buscando a PKA-C a las 36hs (figura 13), observando que la subunidad catalítica se encontraba en el citoplasma, cerca del núcleo y en vesículas; en la mayoría de los casos no encontramos a LRBA colocalizando con PKA-C, parecían encontrarse en vesículas diferentes. Lo que sugiere que LRBA no interacciona con el tetrámero completo, e interacciona únicamente con las subunidades reguladoras, secuestrándolas y permitiendo que PKA-C, realice su función de fosforilación.

Posteriormente buscamos un modelo de linfocitos B deficiente de LRBA, para esto contamos con una cohorte de pacientes con diagnóstico clínico de CVID (Tabla3 y 4), de los cuales se intentó generar una línea celular primaria, con linfocitos transformados con el virus de Epstein Barr (EBV), sin embargo, no logramos inmortalizar a estos linfocitos, ya que como se ha descrito tienen problemas de apoptosis y no sobrevivieron a la infección con EBV. Por lo que procedimos a aislar fibroblastos primarios de una paciente con deficiencia de esta proteína. La paciente cuenta con las características reportadas previamente en paciente con diagnóstico de CVID[25] y deficiencia de LRBA, como son autoinmunidad, proviene de una familia consanguínea, al momento del diagnóstico presentaba linfocitos B de memoria reducidos, como se observa en la figura 14. Al secuenciar el cDNA de esta paciente encontramos que tiene una inserción de 15 pares de bases

correspondientes al intrón 50-51, provocando que no se exprese la proteína; al ser una mutación casi al final de la proteína suponemos que la proteína podría estarse sintetizando y siendo degrada, ya que existen reportes previos de otras proteínas, como la proteína FAN, otra proteína de la familia BEACH, en la cual observan que los dominios WD-BEACH son indispensables para el correcto funcionamiento de esta proteína[34], son los dominios que no se estarían expresado en la paciente, sin embargo el Western-Blot presentado en la figura 14d muestra que no se detectaron isoformas de menor peso molecular, el anticuerpo utilizado reconoce a los aminoácidos 907-1038, que corresponden a una región anterior a los sitios de unión a PKA; por lo que podría existir una proteína de un tamaño menor a los primeros 907aa.

Se busco la localización de LRBA en los fibroblastos ya que no existen reportes previos de la localización de LRBA en estas células, observándose una localización perinuclear, posiblemente cerca del Golgi al igual que en la línea celular Ramos y en la línea celular HEK 293[8], en los fibroblastos deficientes no encontramos la expresión de la proteína (figura 15). Así mismo encontramos que los fibroblastos deficientes de LRBA presentan menor expresión de las subunidades reguladores de PKA, lo que sugiere una posible función de LRBA en la regulación de la degradación de estas subunidades como ya se reportó en la células Treg con la proteína CTLA-4[48].Finalmente estos fibroblastos tenían un aumento de apoptosis y en cultivo se observó una baja tasa de proliferación como se ha reportado para pacientes deficientes de LRBA[7,27].

Se buscaron los niveles basales de fosforilación mediada por PKA en los fibroblastos control y los deficientes de LRBA (figura 16a), donde observamos que los fibroblastos deficientes de LRBA tienen una menor fosforilación mediada por PKA, lo que sugiere que LRBA podría estar regulando la unión de las subunidades reguladoras de PKA a las subunidades catalíticas, y en ausencia de LRBA las subunidades reguladoras podrían estar unidas a las catalíticas, impidiendo así la fosforilación de algunos blancos de PKA, o bien, es posible también que en ausencia

de LRBA PKA no encuentre de manera efectiva a sus sustratos evitando su fosforilación; se han descrito varias funciones en fibroblastos dependientes de PKA, entre ellas la síntesis de colágeno, así como la proliferación de estas células a través de la fosforilación de la proteína ERK[70], lo que podría de alguna manera explicar la disminución en la proliferación de los fibroblastos deficientes de LRBA, sin embargo faltan varios estudios para poder asociar a LRBA con alguno de estos procesos en fibroblastos. Por otro lado, el aumento de AMPc, mediado por FSK genera que las subunidades catalíticas de PKA se disocien de las reguladoras, generando un aumento en la fosforilación de los fibroblastos tanto control como deficientes de LRBA, lo que genera que se recuperen los niveles de fosforilación por PKA en los fibroblastos deficientes de LRBA, como se observa en la figura 17a.

Lo anterior pone de manifiesto la participación de LRBA en la regulación de PKA, como se observó en linfocitos B, LRBA se une a las subunidades reguladoras y a AID, por otro lado, en los fibroblastos hay una disminución en la fosforilación; por lo que quisimos averiguar si LRBA tiene participación en la fosforilación de AID. Basándonos en reportes previos donde se observó que la expresión ectópica de AID en fibroblastos era suficiente para generar el cambio de isotipo e hipermutación somática[71] procedimos a transfectar los fibroblastos control y deficientes de LRBA con un plásmido vacío y otro con AID acoplado a una cola de DDK(Flag), figura 16c, posterior a eso observamos que los fibroblastos deficientes de LRBA tienen una recuperación en los patrones de fosforilación mediada por PKA posterior a la transfección con AID, lo que podría ser causada por una actividad promiscua de AID en los fibroblastos al no encontrar sus blancos específicos, se han reportado previamente distintos blancos de AID, generalmente asociados con cáncer que también son expresados en fibroblastos, como la proteína BRCA 1; o blancos asociados a fosforilación por PKA como Notch [72].

Finalmente buscamos si AID es capaz de llegar a núcleo en los fibroblastos deficientes de LRBA; por lo que se realizó una tinción para LRBA y AID-flag en los fibroblastos transfectados; en la figura 17 podemos observar que en las células

deficientes en LRBA, AID es capaz de llegar al núcleo, con un 10% de reducción con respecto a los fibroblastos control, estos datos necesitan ser corroborados ya que, en el presente trabajo no fue posible realizar más de dos ensayos debido a los problemas de crecimiento de las células deficientes de LRBA. Aunque se observó que AID fue capaz de llegar a núcleo en los fibroblastos deficientes de LRBA, no se evaluó la capacidad de AID de unirse a la proteína RPA en el núcleo [73], que como se ha reportado es la encargada de permitir que AID, desamine a la citidina, cuando el DNA se encuentra en una cadena doble, así mismo ha sido reportado que esta unión es dependiente de la fosforilación por PKA, lo que podría explicar porque AID, llega al núcleo en ausencia de LRBA, sin embargo los pacientes son incapaces de generar el cambio de isotipo.

9 CONCLUSIONES

Los resultados presentados aquí sugieren que LRBA es un AKAP, ya que puede interactuar con las subunidades PKA-RII en las células B, como todos los AKAP, esta interacción debería influir en la activación de los sustratos PKA.

Así mismo podemos decir que LRBA es importante para la regulación de la fosforilación de los fibroblastos y que la ausencia de LRBA no impide que AID sea traslocada al núcleo.



10 PERSPECTIVAS

- ✓ Evaluar la fosforilación de AID en la ser 38 en un modelo celular deficiente de LRBA
- ✓ Evaluar la asociación de AID a la proteína RPA
- ✓ Buscar el dominio de LBRA al que se une AID
- ✓ Analizar la participación de LRBA en la actividad catalítica de los diferentes blancos de PKA C

11 REFERENCIAS

1. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: An update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. Front Immunol. 2011;2:1–26.

2. McCusker C, Upton J, Warrington R. Primary immunodeficiency. Allergy Asthma Clin Immunol [Internet]. 2018;14:61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30275850%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/artic lerender.fcgi?artid=PMC6157160

3. Abolhassani H, Parvaneh N, Rezaei N, Hammarström L, Aghamohammadi A. Genetic Defects in B-Cell Development and Their Clinical Consequences. 2014;

4. Fried AJ, Bonilla FA. Pathogenesis , Diagnosis , and Management of Primary Antibody Deficiencies and Infections. 2009;22:396–414.

5. H A, BT S, T S, B M, N R, A A. A review on guidelines for management and treatment of common variable immunodeficiency. Expert Rev Clin Immunol. 2013;9:561–74.

6. Bogaert DJA, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: One diagnosis to rule them all? J Med Genet. 2016;53:575–90.

7. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarström Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. Am J Hum Genet. 2012;90:986–1001.

8. Reiser M, Li K, Lockey RF, Wang J. Lipopolysaccharide Responsive Beige-Like Anchor Subcellular Localization Involving in Vesicle Trafficking Responsive to Lipopolysaccharide. Austin J Clin Immunol. 2014;1:1–8.

9. Lorton D, Bellinger DL, Mucignat-Caretta C, Cavaggioni A, Redaelli M, Malatesta M, et al. AKAPs : from structure to function. Adv Exp Med Biol [Internet]. Elsevier Inc.; 2002;5:395–400. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0509969103

10. Wang J-W, Howson J, Haller E, Kerr WG. Identification of a Novel Lipopolysaccharide-Inducible Gene with Key Features of Both a Kinase Anchor Proteins and chs1/beige Proteins. JImmunol[Internet].2001;166:4586–95.Availablehttp://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.166.7.4586

11. Crow YJ, Oksenhendler E, Jeddane L, Tangye SG, Etzioni A, Bousfiha A, et al. The 2017 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. J Clin Immunol [Internet]. 2017;38:129–43. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s10875-017-0465-8

12. De Vries E, Driessen G. Educational paper: Primary immunodeficiencies in children: A diagnostic challenge. Eur J Pediatr. 2011;170:169–77.

13. Bacchetta R, Notarangelo LD. Immunodeficiency with autoimmunity: Beyond the paradox.

Front Immunol. 2013;4:3389.

14. Smith T, Cunningham-rundles C. Human Immunology Primary B-cell immunode fi ciencies. 2018;

15. Yong PFK, Thaventhiran JED, Grimbacher B. "A Rose is a Rose is a Rose," but CVID is Not CVID. Common Variable Immune Deficiency (CVID), What do we Know in 2011? [Internet]. 1st ed. Adv. Immunol. Elsevier Inc.; 2011. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385991-4.00002-7

16. Baloh C, Reddy A, Henson M, Prince K, Buckley R, Lugar P. 30-Year Review of Pediatric- and Adult-Onset CVID: Clinical Correlates and Prognostic Indicators. J Clin Immunol. Journal of Clinical Immunology; 2019;39:678–87.

17. Warnatz K, Voll RE. Pathogenesis of autoimmunity in common variable immunodeficiency. Front Immunol. 2012;3:1–6.

18. Baldovino S, Montin D, Martino S, Sciascia S, Menegatti E, Roccatello D. Common variable immunodeficiency: Crossroads between infections, inflammation and autoimmunity. Autoimmun Rev [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;12:796–801. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2012.11.003

19. Warris A, van der Burg M, de Vries E, Hartwig NG, van Dongen JJM, van Zelm MC, et al. B-cell replication history and somatic hypermutation status identify distinct pathophysiologic backgrounds in common variable immunodeficiency. Blood. 2011;118:6814–23.

20. Chang C, Gershwin ME, Ma X, Miao Q, Xiao X. Common variable immunodeficiency and autoimmunity – an inconvenient truth. Autoimmun Rev [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;13:858–64. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2014.04.006

21. Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. Nat Genet. 2005;37:829–34.

22. Park JH, Resnick ES, Cunningham-Rundles C. Perspectives on common variable immune deficiency. Ann N Y Acad Sci. 2011;1246:41–9.

23. Abdullah Alangari Md, , Abdulrahman Alsultan Md, , Nouran Adly Bs, Massaad, PhDd, Iram Shakir Kiani Md, , Abdulrahman Aljebreen Md, MDd, Abdul-Kareem Almomen Md, et al. LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. J Allergy Clin Immunol. 2013;130:1–16.

24. Burns SO, Zenner HL, Plagnol V, Mok K, Eisenhut M, Kumararatne D, et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia. 2014;130:1428–32.

25. Gámez-Díaz L, August D, Stepensky P, Revel-Vilk S, Seidel MG, Noriko M, et al. The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. J Allergy Clin Immunol. 2016;137:223–30.

26. Cullinane AR, Schäffer AA, Huizing M. The BEACH Is Hot: A LYST of Emerging Roles for BEACH-Domain Containing Proteins in Human Disease. Traffic. 2013;14:749–66.

27. Wang JW, Gamsby JJ, Highfill SL, Mora LB, Bloom GC, Yeatman TJ, et al. Deregulated

expression of LRBA facilitates cancer cell growth. Oncogene. 2004;23:4089–97.

28. Feuchter AE, Freeman JD, Mager DL. Strategy for detecting cellular transcripts promoted by human endogenous long terminal repeats: Identification of a novel gene (CDC4L) with homology to yeast CDC4. Genomics. 1992;13:1237–46.

29. Wang J, Lockey RF. Lipopolysaccharide-Responsive Beige-like Anchor (LRBA), a Novel Regulator of Human Immune Disorders. Austin J Clin Immunol. 2014;1:1–9.

30. Habura A, Tikhonenko I, Chisholm RL, Koonce MP. Interaction mapping of a dynein heavy chain. Identification of dimerization and intermediate-chain binding domains. J Biol Chem. 1999;274:15447–53.

31. Burgess A, Mornon JP, De saint-basile G, Callebaut I. A concanavalin A-like lectin domain in the CHS1/LYST protein, shared by members of the BEACH family. Bioinformatics. 2009;25:1219–22.

32. Chandra NR, Prabu MM, Suguna K, Vijayan M. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. 2001;14:857–66.

33. Colledge M, Scott JD, Road P. AKAPs : from structure to function. 1999;9:216–21.

34. Jogl G, Shen Y, Gebauer D, Li J, Wiegmann K, Kashkar H, et al. Crystal structure of the BEACH domain reveals an unusual fold and extensive association with a novel PH domain. EMBO J. 2002;21:4785–95.

35. Gebauer D, Li J, Jogl G, Shen Y, Myszka DG, Tong L. Articles Crystal Structure of the PH - BEACH Domains of Human LRBA / BGL ⁺. 2004;43.

36. Kaplan J, Domenico I De, Ward DM. Chediak-Higashi syndrome. 2008;

37. Nair R, Lauks J, Jung SY, Cooke NE, de Wit H, Brose N, et al. Neurobeachin regulates neurotransmitter receptor trafficking to synapses. J Cell Biol. 2013;200:61–80.

38. Wang X, Herberg FW, Laue MM, Wullner C, Hu B, Petrasch-Parwez E, et al. Neurobeachin: A protein kinase A-anchoring, beige/Chediak-higashi protein homolog implicated in neuronal membrane traffic. J Neurosci. 2000;20:8551–65.

39. Shiflett SL, Vaughn MB, Huynh D, Kaplan J, Ward DMV. Bph1p, the Saccharomyces cerevisiae homologue of CHS1/Beige, functions in cell wall formation and protein sorting. Traffic. 2004;5:700–10.

40. Jain BP, Pandey S. WD40 Repeat Proteins: Signalling Scaffold with Diverse Functions. Protein J [Internet]. Springer US; 2018;37:391–406. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/s10930-018-9785-7

41. Schapira M, Tyers M, Torrent M, Arrowsmith CH. WD40 repeat domain proteins: A novel target class? Nat Rev Drug Discov [Internet]. Nature Publishing Group; 2017;16:773–86. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.179

42. Xu C, Min J. Structure and function of WD40 domain proteins. Protein Cell. 2011;2:202–14.

43. Charbonnier LM, Janssen E, Chou J, Ohsumi TK, Keles S, Hsu JT, et al. Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like disorder

caused by loss-of-function mutations in LRBA. J Allergy Clin Immunol [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;135:217–27. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.019

44. Revel-Vilk S, Fischer U, Keller B, Nabhani S, Gámez-Díaz L, Rensing-Ehl A, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease in patients with LRBA mutation. Clin Immunol [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;159:84–92. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2015.04.007

45. Johnson MB, De Franco E, Allen HL, Al Senani A, Elbarbary N, Siklar Z, et al. Recessively inherited LRBA mutations cause autoimmunity presenting as neonatal diabetes. Diabetes. 2017;66:2316–22.

46. Alkhairy OK, Abolhassani H, Rezaei N, Fang M, Andersen KK, Chavoshzadeh Z, et al. Spectrum of Phenotypes Associated with Mutations in LRBA. J Clin Immunol. 2016;36:33–45.

47. Seidel MG, Hirschmugl T, Gamez-Diaz L, Schwinger W, Serwas N, Deutschmann A, et al. Longterm remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in LPS-responsive beigelike anchor (LRBA) deficiency. J Allergy Clin Immunol. 2015;135:1384-1390e8.

48. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. Science (80-). 2015;349:436–40.

49. Han J, Baker NE, Rubin CS. Molecular Characterization of a Novel A Kinase Anchor Protein from Drosophila melanogaster *. 1997;272:26611–9.

50. Skalhegg BS. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. Front Biosci [Internet]. 2000;5:d678. Available from: http://www.bioscience.org/2000/v5/d/skalhegg/list.htm

51. TASKEN K. Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. PhysiolRev[Internet].2004;84:137–67.Availablefrom:http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00021.2003From:From:From:

52. Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: Focal points in space and time. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5:959–70.

53. Welch EJ, Jones BW, Scott JD. Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. Mol Interv [Internet]. 2010;10:86–97. Available from: http://doi.org/10.1124/mi.10.2.6%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368369%5Cnh ttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895371/pdf/0100086.pdf

54. Carnegie GK, Means CK, Scott JD. A-kinase anchoring proteins: From protein complexes to physiology and disease. IUBMB Life. 2009;61:394–406.

55. Zhang L, Zambon AC, Vranizan K, Pothula K, Conklin BR, Insel PA. Gene expression signatures of cAMP/protein kinase A (PKA)-promoted, mitochondrial-dependent apoptosis: Comparative analysis of wild-type and cAMP-deathless S49 lymphoma cells. J Biol Chem. 2008;283:4304–13.

56. Wehbi VL, Taskén K. Molecular mechanisms for cAMP-mediated immunoregulation in T cells - role of anchored protein kinase a signaling units. Front Immunol. 2016;7:1–19.

57. Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WWA, Reth M, Brummer T. Adenosine and cAMP

are potent inhibitors of the NF-κB pathway downstream of immunoreceptors. Eur J Immunol. 2005;35:31–41.

58. Pasqualucci L, Kitaura Y, Gu H, Dalla-Favera R. From The Cover: PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2006;103:395–400. Available from: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0509969103

59. Raker VK, Becker C, Steinbrink K. The cAMP pathway as therapeutic target in autoimmune and inflammatory diseases. Front Immunol. 2016;7:1–11.

60. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An opensource platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012;9:676–82.

61. Pasqualucci L, Guglielmino R, Houldsworth J, Mohr J, Aoufouchi S, Chaganti RSK, et al. Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. 2010;104:3318–25.

62. Acosta CM De. Expression and biological characterization of anti-CD20 biosimilar candidate antibody. MAbs. 2012;4:488–96.

63. He B, Santamaria R, Xu W, Cols M, Chen K, Puga I, et al. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. Nat Immunol [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;11:836–45. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ni.1914

64. Berrón-Ruiz L, López-Herrera G, Vargas-Hernández A, Mogica-Martínez D, García-Latorre E, Blancas-Galicia L, et al. Lymphocytes and B-cell abnormalities in patients with common variable immunodeficiency (CVID). Allergol Immunopathol (Madr). 2014;42:35–43.

65. Schillace R V., Miller CL, Carr DW. AKAPs in lipid rafts are required for optimal antigen presentation by dendritic cells. Immunol Cell Biol [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;89:650–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/icb.2010.148

66. Carr DW, Hausken ZE, Fraser IDC, Stofko-Hahn RE, Scott JD. Association of the type II cAMPdependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein: Cloning and characterization of the RII-binding domain. J Biol Chem. 1992;267:13376–82.

67. Cumbers SJ, Williams GT, Davies SL, Grenfell RL, Takeda S, Batista FD, et al. Generation and iterative affinity maturation of antibodies in vitro using hypermutating B-cell lines. Nat Biotechnol. 2002;20:1129–34.

68. Bret C, Orfao A, Klein B, Paiva B, Perez-Andres M, Johnsen HE, et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. Haematologica. 2010;95:1016–20.

69. De Boeck K, Bossuyt X, Moens L, Meyts I, Wuyts M. Human Memory B Lymphocyte Subsets Fulfill Distinct Roles in the Anti-Polysaccharide and Anti-Protein Immune Response. J Immunol. 2014;181:5306–12.

70. Huang SK, Wettlaufer SH, Chung J, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits specific lung fibroblast functions via selective actions of PKA and Epac-1. Am J Respir Cell Mol Biol. 2008;39:482–9.

71. Yoshikawa K, Okazaki I mi, Eto T, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, et al. AID enzymeinduced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. Science (80-). 2002;296:2033–6.

72. Yamane A, Resch W, Kuo N, Kuchen S, Li Z, Sun H, et al. Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. Nat Publ Gr [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;12:62–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/ni.1964

73. Basu U, Wang Y, Alt FW. Evolution of Phosphorylation-Dependent Regulation of Activation Induced Cytidine Deaminase. 2008;32:285–91.