

Tesis Doctoral

# Papel de la proteína eritrocitaria Banda 3 en la biología de las células de leucemia linfática crónica

Morande, Pablo Elías

2012

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

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

Cita tipo APA:

Morande, Pablo Elías. (2012). Papel de la proteína eritrocitaria Banda 3 en la biología de las células de leucemia linfática crónica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Morande, Pablo Elías. "Papel de la proteína eritrocitaria Banda 3 en la biología de las células de leucemia linfática crónica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Papel de la proteína eritrocitaria Banda 3 en la  
biología de las células de leucemia linfática crónica**

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

**Pablo Elías Morande**

Director de tesis: **Dra. Mirta Giordano**

Consejero de Estudios: Dr. Alberto Kornhblitt

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunología Oncológica. Instituto de Medicina  
Experimental (IMEX) - CONICET. Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires, 2012

---

AGRADECIMIENTOS .....	4
ABREVIATURAS .....	5
RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	8
INTRODUCCIÓN .....	10
1. Leucemia Linfática Crónica de células B (LLC): características generales. ....	11
2. Células B leucémicas en LLC: expresión de marcadores de activación y su relación con el microambiente en los centros de proliferación. ....	15
3. Anemia hemolítica autoinmune y leucemia linfática crónica .....	20
a) Anemia hemolítica autoinmune .....	20
b) Inmunodeficiencia y AHA en LLC .....	21
c) Células LLC como presentadoras de antígenos: el modelo de Banda 3 .....	23
4. Banda 3 .....	25
a) Estructura y función .....	25
b) Receptores celulares para Banda 3 .....	29
OBJETIVOS .....	32
MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
1. Reactivos generales y anticuerpos. ....	35
2. Pacientes LLC .....	36
3. Proteínas. ....	37
4. Cultivos celulares .....	43
5. Ensayos de unión de proteína a poblaciones celulares. ....	43
6. Identificación de sitios de unión mediante solubilización por detergentes .....	44
7. Identificación de sitios de unión removibles a pH=2,5 .....	45
8. ELISA para detectar interacción entre B3N y HMG2 .....	47
9. Desplazamiento de la unión de B3N a células DAUDI .....	47

10. Obtención de vesículas eritrocitarias y ensayo de unión a células leucémicas.	48
11. Citometría de flujo .....	48
12. Microscopía de fluorescencia. ....	49
13. Ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real.....	50
14. Análisis estadísticos .....	51
RESULTADOS .....	52
PARTE 1: Identificación del sitio de unión de Banda 3	
en células B leucémicas.....	53
1. Primer protocolo diseñado para la identificación del sitio de unión de B3	
en células B leucémicas .....	54
2. Papel de proteínas no integrales de membrana en la unión de B3	
a células leucémicas .....	58
3. Segundo protocolo diseñado para la identificación del sitio de unión de B3	
en células B leucémicas.....	61
4. Identificación de HMGN2 como proteína de unión a B3N .....	63
5. Expresión de HMGN2 en la membrana plasmática de células leucémicas.....	67
6. Interacción B3N-HMGN2 en la membrana de las células B leucémicas.....	71
PARTE 2: Interacción de B3 con la célula leucémica.	
Modulación de su sitio de unión .....	74
1. B3 aumenta la expresión de CD69 en células LLC .....	75
2. B3 no modifica la expresión de CD69 inducida por IFN- $\alpha$ o CpG .....	79
3. B3 particulada induce mayor expresión de CD69 que B3 soluble.....	80
4. Efecto de B3 en la expresión de CD25 y CD86.....	81
5. Modulación de la unión de B3 a células leucémicas.....	82
6. INF- $\alpha$ incrementa la unión de vesículas eritrocitarias a las células LLC.....	84
7. Modulación de la expresión de HMGN2 por IFN- $\alpha$ .....	87
DISCUSIÓN.....	90

BIBLIOGRAFÍA ..... 102

## **AGRADECIMIENTOS**

---

a Mirta

a Sam, Mer, Pau, Jere y Romi

a Pablo Oppezzo

a Martín Isturiz y a Jorge Geffner

y a tod@s mis compañeros de trabajo del laboratorio del IMEX y del IPMONT

Gracias.

## ABREVIATURAS

---

- AHA:** anemia hemolítica autoinmune
- ANOVA:** análisis de varianza
- B3:** banda 3
- B3N:** dominio N-terminal de banda 3
- BCR:** receptor para el antígeno de las células B
- BSA:** Seroalbúmina bovina
- CFDA:** Carboxyfluorescein diacetato
- CMT:** Células mononucleares totales
- CpG:** ácido nucleico enriquecido en citosina-fosfato-guanina
- ELISA:** ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
- ES:** error standard
- FITC:** isotiocianato de fluoresceína
- Ig:** Inmunoglobulina
- IL-6:** interleuquina 6
- IFN- $\alpha$ :** interferón alfa
- LLC:** Leucemia Linfática Crónica de células B
- MALDI:** Desorción/ionización láser asistida por matriz (Matrix-assisted laser desorption/ionization)
- MHC-II:** complejo de histocompatibilidad de clase II
- MIF:** media de intensidad de fluorescencia
- NLC:** nurse like cells, células tipo nodriza
- PBS:** Tampón fosfato salino
- PE:** ficoeritrina
- PerCP:** complejo proteico peridina-clorofila
- PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PVDF:** polifluoruro de vinilideno
- SFB:** Suero Fetal Bovino
- SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia del detergente SDS
- TCR:** receptor para el antígeno de las células T
- TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta
- VPI:** vesículas eritrocitarias de polaridad invertida
- VPO:** vesículas eritrocitarias de polaridad original

## **RESUMEN**

---



## **Papel de la proteína eritrocitaria Banda 3 en la biología de las células de leucemia linfática crónica.**

Los pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) suelen desarrollar anemia hemolítica autoinmune (AHA). Nuestro grupo demostró que la proteína Banda 3, la más abundante en la membrana del eritrocito y blanco frecuente de los autoanticuerpos en AHA, se une a la superficie de células LLC a través de su porción N-terminal. Esta tesis tuvo como objetivos centrales identificar el sitio de unión de Banda 3 y estudiar el impacto que dicha unión tiene para la célula leucémica.

Los resultados demostraron que el principal sitio de unión de Banda 3 en la membrana de la célula leucémica es una proteína que se eluye a pH 2,5 y que se identificó como high mobility group N2 (HMGN2), proteína de nucleosomas que no había sido descrita en la membrana hasta el momento. La expresión de HMGN2 en la superficie de células LLC fue corroborada por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. El cultivo con IFN- $\alpha$  incrementó la expresión de HMGN2 y la capacidad de unir Banda 3 de las células LLC. Asimismo, la unión de Banda 3 tuvo como consecuencia el aumento en la expresión de marcadores de activación de las células leucémicas. Proponemos que Banda 3 a través de HMGN2 podría favorecer la iniciación de la AHA en LLC.

Palabras clave: LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B; BANDA 3; HMGN2; CD69; MICROAMBIENTE TUMORAL

## **ABSTRACT**

---

## **Role of the erythrocyte protein Band 3 in chronic lymphocytic leukemia cell biology**

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) patients often develop autoimmune hemolytic anemia (AHA). Our group previously showed that Band 3, the most abundant protein in the outer membrane of red blood cells and a frequent target of autoantibodies in AHA, specifically binds the surface of CLL cells through its N-terminal domain. The main objectives of the present thesis work were to identify the binding site of Band 3 and to study the impact of such interaction in the leukemic cells.

The results demonstrate that the major binding site of Band 3 on leukemic B cell membrane is a protein eluted at pH=2,5 that was identified as high mobility group N2 (HMGN2), a nucleosome-interacting protein which has not been previously reported as a membrane protein. Expression of HMGN2 at the surface of CLL cells was corroborated by flow cytometry and fluorescence microscopy. Cell cultures in the presence of IFN- $\alpha$  increased the expression of HMGN2 and the binding capacity of Band 3 to CLL cells. Additionally, binding of Band 3 resulted in an increased expression of activation markers on the leukemic cells. We propose that Band 3, through HMGN2, might favor the ignition of AHA in CLL.

Keywords: CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA, BAND 3, HMGN2, CD69,  
TUMOR MICROENVIRONMENT

# **INTRODUCCIÓN**

---

## 1. Leucemia linfática crónica de células B (LLC): características generales

La leucemia linfática crónica de células B (LLC) es la leucemia de mayor prevalencia en adultos a nivel mundial, y su frecuencia en el Hemisferio Occidental llega al 25% del total de leucemias diagnosticadas [1]. El pico de incidencia de esta enfermedad se sitúa en el rango de 60 a 70 años, en una relación aproximada de 2:1 en el hombre respecto de la mujer. Si bien existen evidencias sobre la importancia del factor genético asociado a esta neoplasia -como su baja frecuencia en países orientales o su fuerte asociación en ciertos grupos familiares- éste es a la fecha un tema no claramente dilucidado.

La LLC se caracteriza por la acumulación progresiva de linfocitos B monoclonales pequeños que presentan un fenotipo particular, con expresión de ciertos antígenos que no son frecuentes en los linfocitos B circulantes, como CD5 y CD23 [2-3]. Otra característica de las células LLC es la baja expresión de inmunoglobulina (Ig) en la superficie, que suele ser de isotipo IgM [4]. En efecto, el diagnóstico de esta neoplasia se define como una linfocitosis absoluta mayor de  $5 \times 10^9$  células/L dada por linfocitos de aspecto maduro e inmunofenotipo  $CD19^+ CD5^+ CD23^+ CD20^+ CD22^-$ , con baja expresión de Ig de superficie [5]. Su curso clínico es altamente heterogéneo, con pacientes que presentan una enfermedad indolente y estable durante muchos años, y otros en los que la enfermedad progresa relativamente rápido y requieren terapia anti-neoplásica en forma repetida [5-7]. Expresado en frecuencias, aproximadamente un tercio de los pacientes nunca requerirá tratamiento, otro tercio progresará lentamente hacia una enfermedad más agresiva, y el tercio restante será tratado al momento mismo del diagnóstico. A partir de estas observaciones se construyeron los dos sistemas de clasificación de la LLC más usados y conocidos mundialmente: los estadios de Rai [8] y Binet [9] (**Tabla 1**). Los mismos influyen directamente sobre el esquema de tratamiento

de la enfermedad. Así, fue posible dividir a los pacientes en los tres grupos pronóstico conocidos: bueno (Rai 0 y I, Binet A), intermedio (Rai II y III, Binet B) y malo (Rai IV, Binet C).

Clasificación	Características	Sobrevida
<b><u>Rai</u></b>		
<b>Estadio O</b>	-Linfocitosis en sangre y MO únicamente	12 años
<b>Estadio I</b>	-Linfocitosis y linfadenopatía	
<b>Estadio II</b>	-Linfocitosis y esplenomegalia o hepatomegalia	7 años
<b>Estadio III</b>	-Linfocitosis y anemia (Hb<110 g/L)	
<b>Estadio IV</b>	-Linfocitosis y trombocitopenia (plaquetas<100.10 <sup>9</sup> /L)	< 1 año
<b><u>Binet</u></b>		
<b>Estadio A</b>	-Menos de 3 sitios infiltrados <sup>1</sup> , Hb>100 g/L, plaquetas>100.10 <sup>9</sup> /L	9 años
<b>Estadio B</b>	-3 o más sitios infiltrados, Hb>100 g/L, plaquetas>100.10 <sup>9</sup> /L	5 años
<b>Estadio C</b>	-Hb<100 g/L o plaquetas < 100.10 <sup>9</sup> /L	2 años

**Tabla 1. Sistemas Rai y Binet de clasificación para los estadios de pacientes LLC.** Rai y Binet son los sistemas de clasificación basados en parámetros clínicos y de laboratorio más difundidos. Hb: Hemoglobina, MO: médula ósea. <sup>1</sup>sitios infiltrados pueden ser: hígado, bazo y ganglios linfáticos inguinales, axilares y cervicales.

Esta clasificación, sin embargo, no permite pronosticar si un paciente del grupo bueno o intermedio va a progresar, ni de qué forma [10]. En este sentido, estudios realizados en los últimos años han demostrado que la heterogeneidad de la LLC a nivel clínico se correlaciona con heterogeneidad a nivel de la célula leucémica. Son numerosos los marcadores biológicos que se expresan en forma diferencial en las células leucémicas de pacientes de buen o mal pronóstico. Entre ellos se destaca la presencia o no de mutaciones somáticas en la porción variable de la cadena pesada de la Ig clonal (IgVH) [7, 11]. Los pacientes con IgVH mutados corresponden al grupo estable, mientras que los pacientes con IgVH no mutados presentan una enfermedad

más agresiva. Las frecuencias estudiadas indican que la falta de mutaciones en los genes VH de la Ig del clon leucémico conduce a la muerte del 50% de los pacientes 6 a 8 años después del diagnóstico, aún bajo tratamiento quimioterapéutico; mientras que los enfermos con IgVH mutadas presentan una enfermedad indolente con una media de supervivencia superior a los 20 años [12].

Otros marcadores con valor pronóstico en LLC son la expresión de la proteína intracelular ZAP-70 y del antígeno de membrana CD38 en las células leucémicas del grupo de mayor riesgo [6-7]. ZAP-70 es una proteína quinasa normalmente presente en linfocitos T y células NK, que participa en la transducción de señales a través de receptores de activación, como el receptor antigénico de linfocitos T (TCR). La molécula CD38 es una ectoenzima que sintetiza componentes claves para la regulación de los niveles intracitoplasmáticos de calcio [13]. Su entrecruzamiento luego de interactuar con su ligando natural, el CD31[14], o con anticuerpos específicos, induce la transducción de señales y la activación celular en linfocitos T [15], células NK [16], linfocitos B normales [17] y las propias células LLC [18]. Ambos marcadores se evalúan en la actualidad mediante la técnica de citometría de flujo, que puede ser llevada a cabo en un laboratorio de menos complejidad que la determinación del “estatus mutacional” de la IgVH.

A diferencia de lo que ocurre en otros tumores, no se ha identificado ninguna mutación o aberración cromosómica responsable de la transformación del clon LLC. No obstante, son frecuentes las lesiones citogenéticas que aparecen a medida que progresa la enfermedad. La más común es la delección 13q14.3, que ocurre en más del 50% de los casos [19-20]. Recientemente se ha demostrado que esta región cromosómica contiene 2 genes micro-ARN, pero hasta el momento se desconoce la función regulatoria que podrían cumplir [21-22]. También se ha encontrado como aberración a nivel del ADN la

deleción 11q22.3, de aparición tardía y observada principalmente en pacientes menores de 55 años. Si bien la frecuencia es relativamente baja -afectando aproximadamente al 10-20% de los pacientes LLC- su relevancia es clara ya que aquellos pacientes que la portan presentan un cuadro clínico con extensas adenopatías, enfermedad progresiva y corta sobrevida. Esto se debe, entre otros factores, a que en la región alterada se halla el gen ATM (ataxia telangiectasia mutated). La disminución de la expresión de ATM determina pérdida del control del ciclo celular y disfunción de p53 [23]. Particularmente en LLC, datos recientes revelan que aquellos pacientes con deleción en heterocigocis para el cromosoma 11q presentan una mayor tendencia a mutar el alelo restante, con la consecuente progresión de la enfermedad [24-25]. La otra anomalía importante en LLC es aquella que implica la pérdida del gen TP53, la deleción 17p13.1. TP53 regula los mecanismos de estrés extracelular, activación oncogénica y daño al ADN, y permite que la célula reaccione adecuadamente frente a estos estímulos controlando el ciclo celular o mediante la inducción de apoptosis [24]. La deleción 17p13.1 se observa en el 5-7% de pacientes LLC con estadios iniciales y en el 25-40% de los casos con enfermedad avanzada o refractaria. Su detección resulta de gran importancia clínica dada su asociación con mala evolución de la enfermedad, la corta sobrevida y la resistencia al tratamiento [26].

Cualquiera sea el grupo de riesgo al que pertenezcan, los pacientes con LLC suelen presentar hipogammaglobulinemia y anemia a medida que progresa la enfermedad [3, 27]. La hipogammaglobulinemia es el principal factor predisponente a las infecciones, las que constituyen la primera causa de morbi/mortalidad de los pacientes LLC [28]. Se desconoce cuál es el origen de los bajos niveles en la producción de Igs, pero es posible que esté relacionado con la desregulación de la funcionalidad del sistema inmune, en particular con la colaboración necesaria entre linfocitos TCD4<sup>+</sup> y



células B para que estas últimas se diferencien en plasmocitos secretores de Igs [29]. Varios estudios realizados in vitro han demostrado que las células leucémicas son capaces de interferir con la cooperación T-B. Por ejemplo, las células LLC secretan TGF- $\beta$  [30], que es un potente inhibidor de la proliferación de linfocitos B normales, como así también secretan altos niveles del receptor para IL-2 soluble que podría disminuir sensiblemente la disponibilidad de IL-2 necesaria para activar a los linfocitos T [31].

En relación a la anemia en los pacientes LLC, ésta puede deberse a la disminución de la hematopoyesis por infiltración de la médula ósea por parte de las células leucémicas [3, 27], o puede tener una causa autoinmune [32-33]. Entre el 9% y el 29% de los pacientes LLC presentan anemia no inmune entre moderada y severa, que se asocia a una mala respuesta a la quimioterapia y es considerada un factor de mal pronóstico. Con respecto a la anemia hemolítica autoinmune (AHA) en los pacientes LLC, cabe señalar que esta leucemia es la causa más común de AHA en el adulto, con una incidencia que va del 4% al 37%, variación que depende de la cohorte de pacientes LLC estudiados, siendo más frecuente en los estadios avanzados de la enfermedad [32-36].

## **2. Células B leucémicas en LLC: expresión de marcadores de activación y su relación con el microambiente en los centros de proliferación**

Por muchos años se ha considerado a la LLC como una enfermedad relativamente indolente, atribuyéndose la acumulación de los linfocitos malignos a defectos en el proceso apoptótico, originados en parte por la expresión aumentada de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 [27, 37]. A su vez, se conoce que las células LLC obtenidas de sangre periférica están en fase G<sub>0</sub> del ciclo celular y tienen

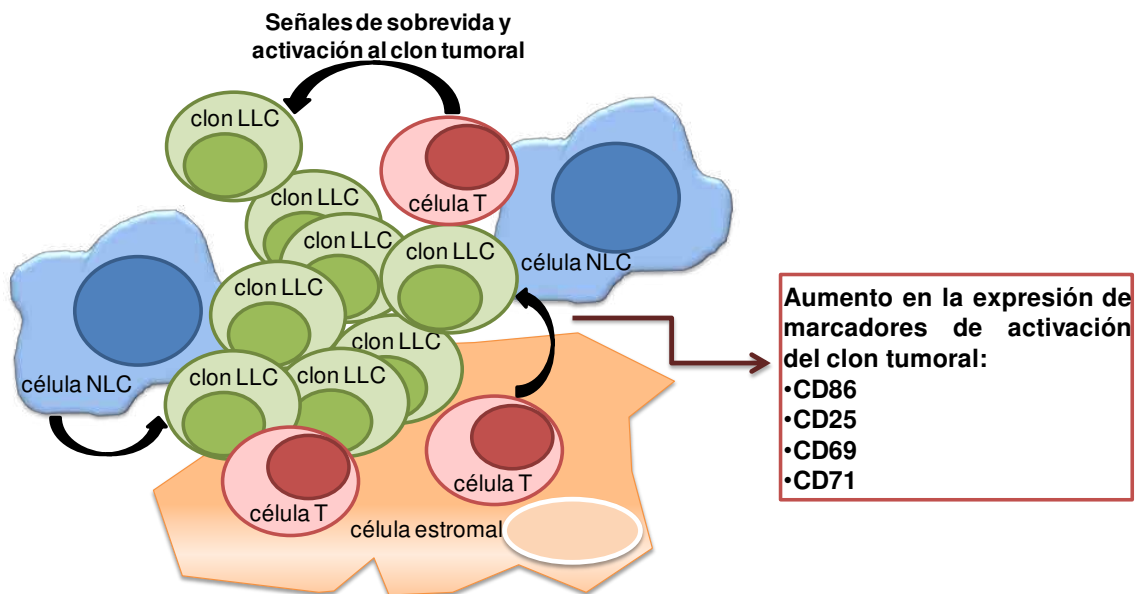
disminuida su capacidad de responder in vitro frente a estímulos mitogénicos linfocitarios [38-39].

Sin embargo, trabajos recientes demuestran que la biología de esta neoplasia es mucho más compleja de lo que se pensaba hasta hace unos años; y es por eso que se reconsideró esta visión clásica de la LLC. En este sentido es oportuno señalar, por un lado, que las células LLC expresan marcadores de activación similares a las células B normales que contactaron a su antígeno [40-41] y presentan menor longitud telomérica que linfocitos B normales [42], indicativo de haber pasado por varios ciclos de replicación. Por otra parte, quizá la evidencia más fuerte de que el clon leucémico es capaz de proliferar in vivo proviene de un estudio realizado en pacientes LLC a los que se les hizo beber agua pesada durante varias semanas para evaluar la incorporación de deuterio ( $^3\text{H}$ ) al ADN [43]. Mediante esta estrategia se pudo cuantificar que aproximadamente entre  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{12}$  células leucémicas nacen por día en cada paciente estudiado, mientras que los valores de muerte diario de células leucémicas se encuentran entre 0 y  $1 \times 10^{12}$ . De esto se desprende que la progresión de la enfermedad va a depender, a diferencia de lo que se pensaba tiempo atrás, del balance entre la tasa de proliferación celular y la tasa de muerte que el clon leucémico sufra.

Pero, ¿dónde proliferan las células leucémicas? Se propone que las células LLC que circulan en sangre periférica y se encuentran arrestadas en  $G_0$  son “abastecidas” por nuevas generaciones de células leucémicas que proliferan principalmente en los nódulos linfáticos, puntualmente en estructuras que fueron llamadas “centros proliferantes” o “pseudofolículos”. Estos pueden también hallarse en médula ósea y en el bazo de los pacientes, y no son más que agrupamientos de células leucémicas en estrecho contacto con células T y células mieloides de tipo nodriza (Nurse Like Cells-NLC). Ambos tipos

celulares modifican dinámicamente el microambiente y esto repercute en la activación y proliferación del clon tumoral (**Figura 1**).

Las células LLC expresan varios marcadores de activación, en particular las que se encuentran en los centros proliferantes. Uno de ellos es la sub-unidad  $\alpha$  del receptor de la citoquina IL-2, llamado CD25 [44]. La afinidad de IL-2 por su receptor depende de la expresión de CD25, por lo que las células CD25<sup>+</sup> serán más sensibles a los efectos de esta citoquina, de importante función en la proliferación celular [45]. En particular, en LLC está descrito que IL-2 cumple un rol importante en rescatar de la apoptosis a las células neoplásicas activadas, que expresan altos niveles de CD25 [46], y ha sido descartado como marcador de progresión de la enfermedad [47]. Otros marcadores de activación importantes son las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, de rol relevante en la colaboración T-B al modular la activación de las células T interactuando con las moléculas CD28 y CTLA-4 [48]. En LLC, está descrito que su expresión es anómala y puede inducirse por estímulos como IFN- $\gamma$  u oligonucleótidos CpG [49-50]. Por su parte, la molécula CD69 es una glicoproteína integral de membrana de tipo 2 con dominio de unión a lectina de tipo C, e inicialmente se la describió como marcador de activación temprana en linfocitos T y B, células NK, neutrófilos y eosinófilos [51]. Si bien a la fecha no se ha identificado un ligando natural para CD69, en los últimos años ha crecido considerablemente la información sobre esta molécula atribuyéndole participación relevante en fenómenos como autoinmunidad y cáncer [52].



**Figura 1. Efecto del microambiente de los centros proliferantes en la activación del clon leucémico.** Los factores liberados por células T y células de tipo nodriza (NLC) aumentan la expresión de marcadores de activación como CD86, CD25, CD69 y CD71 en las células tumorales de pacientes LLC.

También en ese período fueron publicados dos trabajos que remarcan la importancia del estudio de CD69 en LLC, ya que lo postulan como marcador pronóstico de progresión para esta neoplasia. En el primero, del 2001, se estudió la expresión de CD69 en 92 pacientes, y se encontró que 48 de ellos expresaron este marcador que correlacionó positivamente con los valores de estadio clínico, linfocitosis e infiltración de células tumorales en médula ósea [53]. El segundo trabajo, del 2012 y que abarcó a 417 pacientes, muestra que CD69 correlaciona fuertemente también con los factores pronóstico usados en la actualidad en la clínica: CD38, ZAP-70 y estado mutacional de la IgVH [54]. Con este trabajo se confirma que CD69 es una molécula de activación linfocitaria cuyo estudio tiene relevancia clínica en la LLC.

Por otra parte, en el contexto del microambiente tumoral de los centros proliferantes, se pueden encontrar distintas citoquinas liberadas por el propio clon tumoral. Tal es el caso de IL-6, que se expresa y secreta al entrecruzarse el receptor antigénico (Ig) o el marcador CD160, ambas moléculas presentes en la membrana

plasmática de la célula LLC [55]. En células B normales la IL-6 funciona como factor de crecimiento y favorece la diferenciación celular [56]. En pacientes LLC, por su parte, está reportado que la IL-6 sérica se encuentra aumentada respecto de las concentraciones detectadas en dadores sanos, y que correlaciona con un mal pronóstico de la enfermedad [57-58]. Otra de las citoquinas secretadas por el clon LLC es el TGF- $\beta$ . Como fuera mencionado, esta citoquina interfiere en la colaboración T-B; pero también inhibe parcialmente la proliferación del clon LLC y es capaz de regular negativamente señales pro apoptóticas del microambiente, aunque con menor intensidad que en linfocitos B de dadores sanos [30].

Entre las citoquinas presentes en el microambiente tumoral que son inducidas como consecuencia de las frecuentes infecciones que sufren los pacientes LLC, se encuentra el INF- $\alpha$ . Esta citoquina puede ser producida por una amplia variedad de células y tiene particular relevancia en las infecciones virales ya que cumple funciones antivirales. Por tal motivo, el IFN- $\alpha$  también es utilizado para el tratamiento terapéutico de ciertos pacientes que sufren infecciones virales mediante administración por vía exógena [59-60], situación donde está reportado un aumento en el riesgo de contraer AHA [61]. En pacientes LLC, por su parte, se encontró que la frecuencia de células T de memoria secretoras de INF- $\alpha$  capaces de reconocer antígenos provenientes de citomegalovirus se encuentra aumentada respecto de la población sana, y que prácticamente definen el repertorio de memoria T para el caso de pacientes LLC progresores [62]. Sumado a esto, es interesante mencionar que el IFN- $\alpha$  es también utilizado como tratamiento para ciertos desordenes hematológicos y fue probado en pacientes LLC. Durante dicho tratamiento, según está reportado, aumenta la incidencia de AHA [63].

### **3. Anemia hemolítica autoinmune y leucemia linfática crónica**

Como se señalara anteriormente, una proporción de los pacientes LLC que padecen una enfermedad progresora desarrollan en paralelo a su neoplasia complicaciones autoinmunes, siendo la AHA la más frecuente. Es interés de nuestro grupo de trabajo indagar sobre los mecanismos que relacionan estas dos patologías, que a la fecha no están claramente dilucidados. Para ello es necesario, en primer lugar, definir qué es la AHA y cómo se desarrolla en los pacientes LLC.

#### **a) Anemia hemolítica autoinmune**

La AHA se define como la destrucción de los glóbulos rojos provocada por anticuerpos específicos [64]. Puede presentarse como una condición patológica primaria (idiopática) o ser secundaria a una enfermedad de base, como es el caso de la AHA asociada a la LLC [64-65]. El isotipo del autoanticuerpo que provoca la anemia es importante ya que determina los mecanismos de destrucción de los glóbulos rojos. En el caso de la IgG, la eliminación de los eritrocitos sensibilizados se produce mediante el proceso de fagocitosis mediada por los macrófagos esplénicos y hepáticos, que expresan receptores para el fragmento Fc de la IgG (RFc $\gamma$ ) [66-67]. Por el contrario, los fagocitos no presentan receptores para la IgM y la destrucción en la AHA provocada por anticuerpos de este isotipo se produce por activación de la vía clásica del complemento [68-69].

Por otra parte, para que se desarrollen los fenómenos autoinmunes debe haber ruptura de los mecanismos de tolerancia hacia los antígenos propios. La llamada tolerancia central ocurre durante la maduración de los linfocitos en los tejidos linfáticos primarios, es decir, en el timo para el caso de los linfocitos T, o en la médula ósea y el bazo para los linfocitos B [70]. Por este proceso, la mayoría de los linfocitos que

generaron receptores capaces de reconocer antígenos propios son eliminados por delección clonal o inactivados por anergia clonal. Los que por distintos motivos pueden alcanzar la periferia serán tolerizados a través de diversos mecanismos, conocidos como mecanismos de tolerancia periférica. En muchos casos la falta de respuesta periférica se debe a que el autoantígeno no está disponible para ser procesado y presentado a los linfocitos T, o bien porque se encuentra en muy bajas concentraciones o porque está secuestrado en sitios inmunológicamente privilegiados. Es evidente que no es esto lo que ocurre en la AHA, ya que las proteínas eritrocitarias se encuentran en gran abundancia y accesibles a las células presentadoras de antígeno (CPA). Sin duda, las células T regulatorias  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  juegan un rol central en los mecanismos de tolerancia periférica. En el caso concreto de la AHA, se ha demostrado que las células T  $CD4^+CD25^+$  son críticas para el control de la inducción de la anemia murina [71]. Es así que, utilizando un modelo de inducción de AHA por inoculación repetida de eritrocitos xenogéneos, se encontró que la eliminación de las células  $CD25^+$  aumenta la incidencia de AHA, mientras que la transferencia adoptiva de linfocitos  $CD4^+CD25^+$  la previene. Por el momento, no se sabe si lo mismo ocurre en seres humanos.

## **b) Inmunodeficiencia y AHA en LLC**

Los mecanismos de tolerancia central y periférica actúan con gran eficiencia, ya que las enfermedades autoinmunes son patologías poco frecuentes. ¿Qué fallas ocurren entonces en la LLC que conduzcan a la producción de autoanticuerpos contra eritrocitos en una proporción importante de los pacientes? El modelo más aceptado para explicar la asociación entre AHA y LLC propone que la aparición del fenómeno autoinmune sería una consecuencia de la inmunodeficiencia característica de esta enfermedad. La desregulación de la respuesta inmune en LLC ha sido ampliamente estudiada e

involucra a los linfocitos T, B, células NK, como así también a las células de estirpe mieloide [72-73]. Los pacientes presentan hipogamaglobulinemia, escasa o nula respuesta frente a la inmunización con neoantígenos, reversión en la relación entre linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , deficiente respuesta de células NK, entre otros defectos inmunes [74-75]. Las células leucémicas son en parte responsables por estos defectos en la respuesta inmune. En un interesante estudio realizado por el grupo de J. Gribben [76] se demostró que los linfocitos T de los pacientes LLC presentan un perfil génico global diferente de los linfocitos T de dadores sanos, y que el contacto directo con las células LLC induce cambios similares en los linfocitos T normales.

Por otra parte, es un hecho conocido que el tratamiento quimioterapéutico de los pacientes con análogos de nucleósidos, como la fludarabina, favorece la aparición o agravamiento de la AHA [77]. Teniendo en cuenta que la fludarabina es un potente inmunosupresor que no sólo afecta a las células LLC sino también a los linfocitos T, se atribuye la mayor incidencia de AHA post-fludarabina a la eliminación preferencial de las células T regulatorias. En este sentido, Beyer y col [78] han reportado que la fludarabina disminuye la frecuencia y actividad de los linfocitos T  $CD4^+CD25^+$  en pacientes LLC.

El modelo que adjudica a la inmunosupresión típica de la LLC un papel preponderante en la inducción de la AHA deja, sin embargo, una pregunta clave sin responder: ¿Por qué se inducen preferentemente autoanticuerpos contra proteínas eritrocitarias y no contra otros blancos antigénicos? Para intentar responder a esta pregunta es necesario tener en cuenta que los glóbulos rojos se destruyen normalmente en el bazo dando lugar a altas concentraciones de proteínas eritrocitarias de membrana e intracelulares. En los pacientes LLC el bazo suele estar infiltrado por células leucémicas, especialmente en los estadios más avanzados de la enfermedad, cuando la



aparición de la AHA es más frecuente. En este microambiente esplénico enriquecido en productos de degradación de los eritrocitos, las células LLC podrían actuar como células presentadoras de antígenos eritrocitarios. En base a esta hipótesis nuestro grupo de trabajo inició años atrás su línea de investigación.

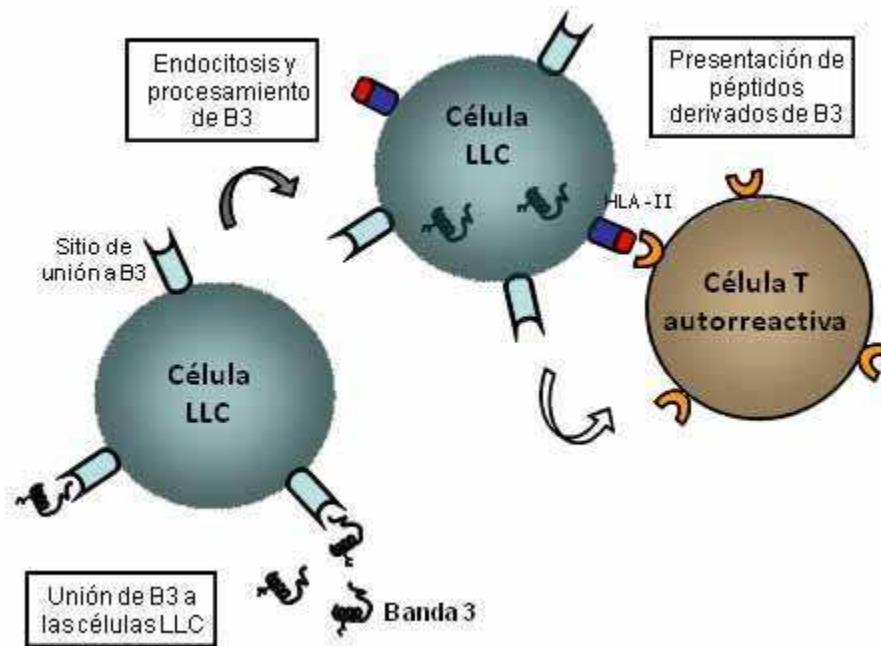
### **c) Células LLC como presentadoras de antígenos: el modelo de Banda 3**

Las células LLC, como todo linfocito B, son potencialmente capaces de actuar como células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales, ya que expresan moléculas de histocompatibilidad de clase II. El primer trabajo que demuestra la capacidad para presentar antígenos de las células LLC fue publicado en 1988 por Yasukawa y col [79], quienes evaluaron la respuesta de líneas T específicas frente a células LLC pulsadas con PPD (antígeno de *M. tuberculosis*) o HSV (antígenos de virus *H. simplex*). Los autores encontraron que, si bien las células LLC en reposo eran capaces de estimular la respuesta T, el tratamiento con el activador de proteína quinasa C, ácido forbol mirístico (PMA) incrementaba sustancialmente el nivel de respuesta, sobre todo a bajas concentraciones de antígeno. En este sentido, la bibliografía consecuente demostró que la capacidad de las células LLC de actuar como CPA se ve aumentada en los órganos linfáticos secundarios, ya que en ese microambiente están siendo constantemente activadas. En particular, la interacción CD40-CD40L con los linfocitos T de los centros proliferantes tendría un papel relevante en la activación de la célula LLC, y por lo tanto, en su capacidad de actuar como CPA.

Respecto de las células LLC como presentadoras de antígenos eritrocitarios, Hall y col. [80] encontraron que todos los pacientes LLC con AHA presentan en circulación linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos contra el antígeno Rh. Más importante aún, encontraron que las células LLC resultaron más eficientes para procesar y presentar Rh a linfocitos T

que los monocitos y células dendríticas. La principal limitación de este trabajo es que no queda claro cómo hacen las células LLC para reconocer y endocitar a la proteína Rh ya que no se han descrito receptores para esta molécula y los linfocitos B no poseen un mecanismo del tipo macropinocitosis como las células dendríticas que permitiría la incorporación de moléculas en solución.

Para investigar el papel potencial de las células LLC como CPA de antígenos eritrocitarios, nosotros buscamos una proteína del glóbulo rojo hacia la cual se hubieran descrito receptores presentes en los leucocitos. Esta proteína es el intercambiador aniónico  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ , que recibe el nombre de Banda 3 (B3). Demostramos que efectivamente las células leucémicas unen B3, pero no a través de los receptores leucocitarios conocidos que, como se describirá más adelante en esta introducción, interactúan con su glicano o su dominio transmembrana. Por el contrario, las células LLC unen B3 a través de reconocer la porción citoplasmática N-terminal de la proteína eritrocitaria. Encontramos también que, luego de su unión, las células LLC son capaces de endocitar B3, así como de procesarla y presentarla induciendo la proliferación de linfocitos T autorreactivos [81]. En la **Figura 2** se muestran esquemáticamente los resultados que obtuvimos.



**Figura 2. Esquema que describe la unión de B3 a células leucémicas de pacientes LLC y la activación de la respuesta T autorreactiva.** En el bazo, las células LLC reconocen la proteína eritrocitaria B3. Luego de su endocitosis y procesamiento, péptidos derivados de B3 son presentados a linfocitos T CD4+ junto con moléculas HLA de clase II. La activación y proliferación de las células T autorreactivas constituyen el mecanismo de iniciación de la AHA en pacientes LLC.

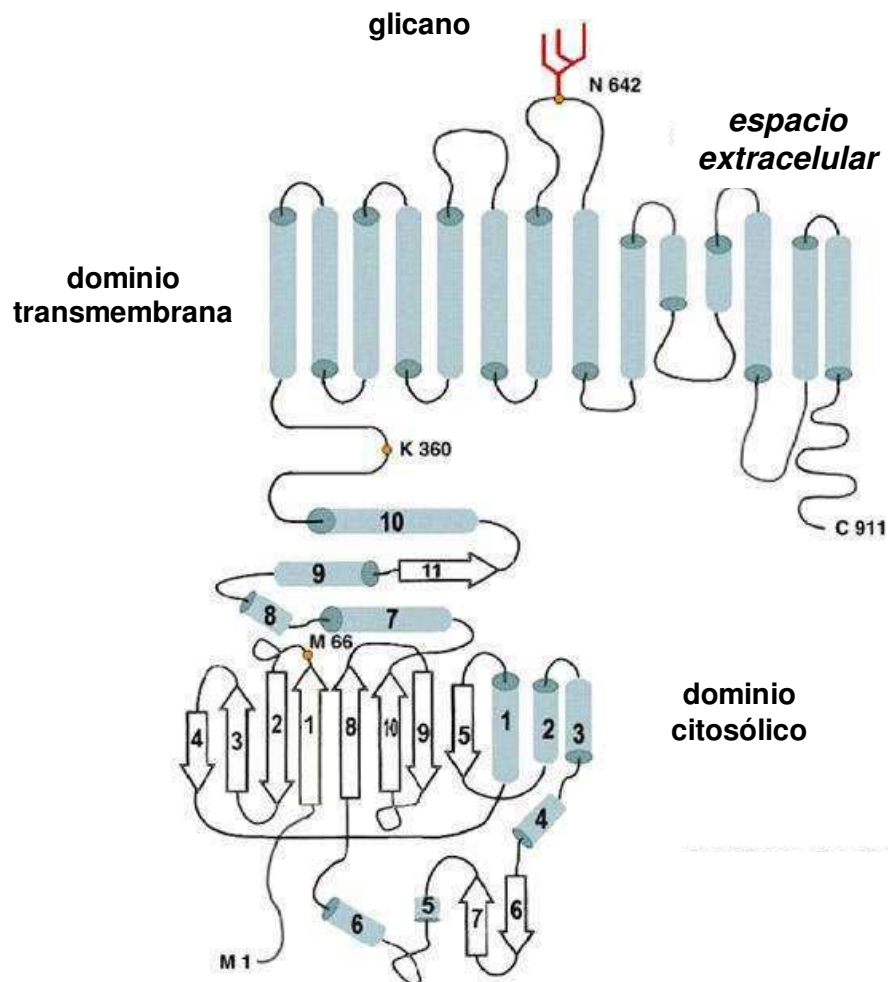
## 4. Banda 3

### a. Estructura y función

B3 es el intercambiador aniónico  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y cumple importantes funciones estructurales, siendo la proteína de membrana más abundante del glóbulo rojo [82]. Aunque en la mayoría de los trabajos se la sigue llamando Banda 3, la denominación actual de esta molécula es AE1 (anion exchanger 1) y pertenece al cluster de diferenciación CD233.

Se trata de una proteína multifuncional que posee 3 dominios: un dominio que atraviesa la membrana 14 veces y que posee la función de intercambiador cloruro/bicarbonato, un corto dominio carboxi-terminal intracitoplasmático, de unión a la enzima anhidrasa carbónica II y un largo dominio amino-terminal intracitoplasmático

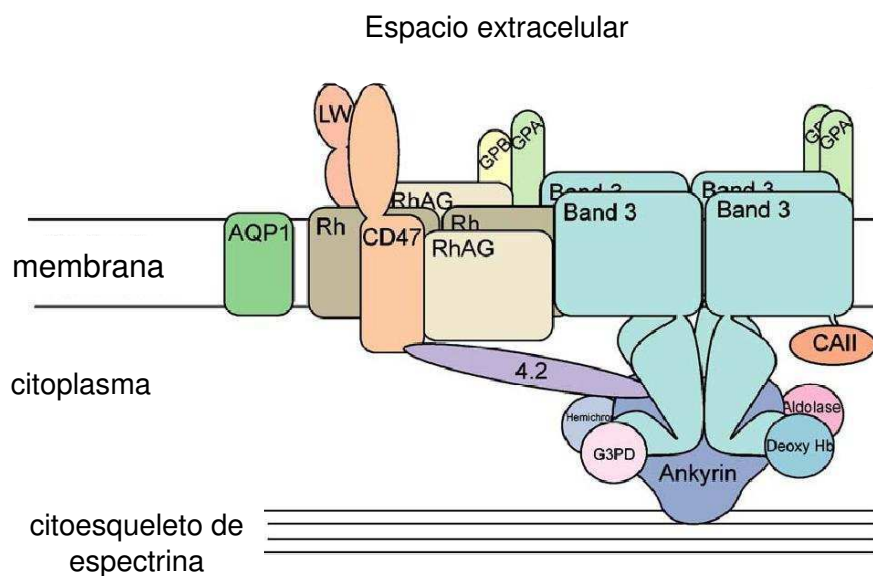
que cumple varias funciones, entre otras la fijación de la membrana del eritrocito al citoesqueleto [82-85] .



**Figura 3. Representación esquemática de la proteína B3.** La proteína de membrana eritrocitaria B3 es una glicoproteína de 14 pasos transmembrana, que cuenta con 3 dominios: el dominio citosólico del extremo N-terminal; el dominio transmembrana y el dominio citosólico del extremo C-terminal. Su único glicano, de tipo N-acetil-lactosamina, está unido al aminoácido Asparagina 642, situada en el cuarto rulo extracelular.

B3 forma, junto con varias proteínas que incluyen además de las nombradas a las glicoforinas A y C, anquirina, hemoglobina y proteína 4.2, el denominado complejo B3, fundamental para la organización estructural del eritrocito [86-87]. Asimismo el

complejo B3 está asociado al complejo Rh, constituyendo entre ambos un macrocomplejo molecular esencial para el intercambio  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ , principal función de los glóbulos rojos [87] (**Figura 4**). La estructura molecular de B3 se completa con la presencia de un N-glicano complejo, unido a una asparagina (aa 642) en el cuarto bucle [85-88]. Este glicano del tipo poli N-acetil-lactosamina es heterogéneo en tamaño debido a la variabilidad en el número de N-acetil-lactosaminas que incorpora [89]. Es por ello que el peso molecular de B3 varía entre 90 y 110 kDa. Una forma truncada de B3 que carece del dominio N-terminal se expresa en la membrana basolateral de una subpoblación celular del riñón. Su función es intercambiar bicarbonato por cloruro colaborando con el mantenimiento del pH del organismo [90].



**Figura 4. Esquema representativo del macrocomplejo molecular que forman el complejo B3 y el complejo Rh en la membrana eritrocitaria.** La proteína B3, junto a las proteínas Anhidrasa Carbónica II, Glicoforinas A y C, Anquirina, Hemoglobina y proteína 4.2, forman el llamado complejo molecular B3. Su función es fundamental para mantener la estructura del eritrocito. A su vez, el complejo B3 está unido al complejo molecular Rh, resultando en un macrocomplejo necesario para el intercambio gaseoso  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ , principal función del glóbulo rojo.

La deficiencia absoluta de B3 tiene consecuencias diferentes dependiendo de la especie animal en la que ocurra. Por ejemplo, los ratones knockout para B3 presentan una anemia hemolítica severa que es mortal en un porcentaje elevado de individuos [91]. Llamativamente, se ha logrado criar con éxito terneros que no pueden expresar B3, si bien padecen de una anemia importante [92]. En el hombre, sólo se ha reportado un caso con ausencia total de B3. Este niño cursa con anemia severa y nefrocalcinosis y debe ser mantenido con transfusiones sanguíneas regulares y suplemento de bicarbonato. Al momento de la descripción del caso en el año 2000 el pronóstico era incierto [93].

B3 es también el principal antígeno de senescencia de los glóbulos rojos [94-95]. Es un hecho conocido que los eritrocitos envejecidos o dañados son removidos de la circulación sanguínea por el sistema mononuclear fagocítico constituido por los macrófagos esplénicos y hepáticos [66]. Estos macrófagos reconocen anticuerpos naturales de isotipo IgG unidos a los eritrocitos. Varios estudios han demostrado que los anticuerpos están dirigidos contra B3 modificada, aunque no hay acuerdo sobre si reconocen el glicano o la parte proteica. Es así que el grupo de Beppu y col. [74-75, 96] encontraron que la deglicosilación de B3 inhibe el pegado de Igs reactivas en los glóbulos rojos, mientras que trabajos realizados por los grupos de Kay [82] y Lutz [95] reportaron que los determinantes antigénicos se hallan presentes en la porción proteica de B3. Analizando la fracción IgG obtenida de suero de dadores normales estos autores encontraron que los autoanticuerpos estaban dirigidos contra regiones de B3 que son crípticas o de baja accesibilidad, y que están presentes tanto de eritrocitos jóvenes como envejecidos. Por tanto, las porciones extracelulares proteicas de B3 deben sufrir un cambio conformacional en los glóbulos rojos senescentes que posibilite su opsonización por parte de las Igs naturales.

Es importante señalar que estos anticuerpos fisiológicos difieren de los autoanticuerpos patogénicos encontrados en AHA, que reconocen epitopes presentes en la forma nativa de B3 de los eritrocitos jóvenes y lo hacen con alta afinidad.

#### **b. Receptores celulares para B3**

Independientemente de la interacción de B3 con los leucocitos a través de los anticuerpos naturales, se han descrito receptores celulares capaces de reconocer a la proteína en forma directa. Uno de estos receptores es CD36, una glicoproteína de 88kDa que fue identificada inicialmente en monocitos mediante el empleo del anticuerpo monoclonal OKM5. CD36 es un miembro de la familia de receptores scavenger de clase B y está expresado en muchos tipos celulares además de los monocitos, como por ejemplo, en células de la microvasculatura endotelial y en células del músculo liso [97]. Trabajos realizados por Barnwell y col. demostraron que OKM5 inhibe la unión de eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum* a monocitos [98]. Posteriormente, este mismo grupo encontró que el anticuerpo está dirigido contra CD36, lo que implica que la unión de los eritrocitos infectados con *P. falciparum* a monocitos involucra a este receptor scavenger [99]. Cabe señalar que los eritrocitos no infectados no son reconocidos por los monocitos, es decir que la adherencia se debe a una modificación que ocurre en la membrana como consecuencia de la infección. Fue recién en 1993 cuando Crandall y col. pudieron demostrar que la molécula eritrocitaria con la que interactúa CD36 es B3 [100]. Para ello utilizaron péptidos sintéticos homólogos de secuencias correspondientes a dos regiones extracelulares de B3 con los que lograron inhibir la unión de los eritrocitos infectados a los monocitos. El dominio de adhesión de B3 a CD36 incluye los residuos 534 a 547 y se basa en una modificación en el residuo de lisina 539. En los eritrocitos no infectados, este dominio es críptico, es decir,

inaccesible a ligandos extracelulares. La infección con el parásito expone el dominio y permite que el eritrocito infectado pueda ser reconocido por CD36 presente en el endotelio y otras células, como los macrófagos [101-102]. La exposición del dominio de interacción de B3 con CD36 no sólo se logra por infección con *P. falciparum*. Se ha demostrado que la oxidación de B3 con agentes como el ácido diisothiocianostilbene sulfónico (DIDS) también inducen su reconocimiento por CD36 [103]. Este dominio crítico de B3 es diferente del dominio de unión de las Igs naturales mencionado anteriormente.

No sólo CD36 es capaz de reconocer en forma directa a B3. En un trabajo más reciente del grupo de Beppu se reportó que la Nucleolina, una proteína multifuncional conservada filogenéticamente, es reactiva contra el glicano de B3[104]. Estos autores habían demostrado que los eritrocitos modificados por oxidación son fagocitados por los macrófagos a través del reconocimiento del glicano de B3 modificado, en este caso en ausencia de los autoanticuerpos naturales [75]. El mecanismo sugerido para este proceso involucra la formación de agregados de B3 sobre la membrana eritrocitaria como resultado de su oxidación. De esta forma, B3 expone ligandos multivalentes de alta afinidad hacia receptores celulares, que están constituidos por los azúcares oxidados. Mediante el empleo de un anticuerpo específico dirigido contra Nucleolina y utilizando una forma recombinante de la proteína, los autores demostraron que es éste el receptor macrofágico para B3 oxidada. Es interesante señalar que el tratamiento de los eritrocitos con inhibidores de caspasas disminuye significativamente su reconocimiento por parte de los macrófagos a través de Nucleolina. Este resultado sugiere que el estrés oxidativo mediante la activación de la vía de las caspasas posibilita la depuración de los glóbulos rojos a través de la agregación de B3.



En conclusión, distintos trabajos realizados a lo largo de los últimos 30 años han demostrado que la proteína B3 es importante para el reconocimiento, por parte del sistema mononuclear fagocítico, de los eritrocitos dañados y/o envejecidos, ya sea en forma directa a través de CD36 y Nucleolina, o indirectamente mediante los RFc $\gamma$  que interactúan con los autoanticuerpos naturales. Este proceso de reconocimiento y depuración forma parte del ciclo de vida de los eritrocitos, siendo por lo tanto un proceso fisiológico. Por el contrario, la destrucción de los glóbulos rojos en la AHA depende de la producción de Igs patogénicas que pueden o no estar dirigidas contra los mismos epitopes antigénicos que las Igs naturales. Sabemos que ninguno de los receptores descritos son los responsables de la unión de B3 a las células leucémicas, así como tampoco lo es la Ig de la membrana del clon neoplásico [81].

## **OBJETIVOS**

---

Según lo expuesto anteriormente, queda claro que la proteína eritrocitaria Banda 3 se une específicamente a las células LLC, que puede ser internalizada y activar vía presentación antigénica a células T autorreactivas. Sin embargo, desconocemos cuál es el o los sitios de unión de Banda 3 en la membrana de la célula leucémica y si su expresión puede ser regulada por señales del microambiente. Por otra parte, resta por estudiar si la interacción de Banda 3 con la célula B leucémica modifica su estado de activación. Es por ello que los objetivos de este trabajo de tesis fueron:

- 1) Identificar el sitio de unión de Banda 3 en las células B leucémicas.
- 2) Estudiar la regulación de la unión de Banda 3 a las células LLC y las consecuencias que dicha unión tiene para la célula leucémica.

## **MATERIALES y MÉTODOS**

---

## **1) Reactivos generales y anticuerpos**

### **a. Tampón fosfato salino (PBS)**

Solución preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,078M y KHPO<sub>4</sub> 0,015M; pH=7,4. Las marcaciones de células con anticuerpos para evaluación por citometría de flujo se realizaron con PBS con 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA) de Weiner Laboratorios (Santa Fé, Argentina).

### **b. Solución de Turk para el recuento de células**

La solución se prepara con violeta de genciana (100mg), ácido acético glacial (31,25ml) y agua destilada (c.s.p. 500ml). Para el recuento de células se realizaron diluciones de esta solución y se contó en cámara de Neubauer.

### **c. Medio de cultivo**

Se utilizó medio RPMI 1640 de Life Technologies (Grand Island, NY, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% para el medio completo, con 100 U/ml penicilina o 100 µg/ml estreptomicina, todos de GIBCO Laboratories (Grand Island, USA).

### **d. Solución de Ficoll-Triyosom**

Para la purificación de células mononucleares de sangre periférica se utilizó una solución isotónica de Ficoll 400 de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA) y Triyosom 50 (aminotriozato sódico 50%) de Justesa Imagen Argentina S.A (Bs.As. Argentina), densidad 1,077 g/l.

### **e. Anticuerpos, citoquinas, ácidos nucleicos y microesferas de poliestireno**

Para los estudios de citometría se utilizaron los siguientes anticuerpos específicos contra: CD5, CD3, CD56, CD19, CD69, CD25 y CD86 marcados con Isotiocianato de Fluoreseína (FITC)-, Ficoeritrina (PE)- o Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP-Cy™5.5) todos obtenidos de BD Biosciences, Pharmigen (CA, USA).

El anticuerpo anti-B3 fue obtenido de Gene-Tex (San Antonio, TX, USA); clon BIII-136, IgG2a murina. El anticuerpo policlonal anti-HMGN2 y la mezcla irrelevante de IgG, ambos desarrollados en cabra, fueron obtenidos de la empresa Santa Cruz Biotechnology, USA. Las citoquinas TGF- $\beta$ , IL-6 e IFN- $\alpha$  fueron obtenidas de R&D Systems. El ácido nucleico de 24 nucleótidos enriquecido en citosina-guanina unidas por un enlace fosfato “CpG” fue comprado a la compañía IDT, USA. Las microesferas de poliestireno utilizadas fueron obtenidas de Polysciences, USA.

#### **f. Detergentes**

Los detergentes Triton X-100, NP-40, deoxicolato de sodio y CHAPS fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, USA.

## **2) Pacientes LLC**

El estudio se llevó a cabo con muestras de sangre periférica de pacientes LLC evaluados al diagnóstico y durante el curso de la enfermedad, quienes son atendidos en la Sección de Clínica Médica del Instituto de Investigaciones Hematológicas (Academia Nacional de Medicina), el Servicio de Hematología del Hospital Policlínico Bancario y el Servicio de Hematología del Hospital de Agudos Dr. Teodoro Álvarez. Los pacientes con los que se trabajó no mostraron evidencias bioquímicas de anemia hemolítica ni evidencia clínica relevante de complicaciones por infecciones. Los pacientes LLC fueron informados acerca de los objetivos del estudio y dieron su consentimiento por escrito. Los estudios realizados para esta tesis doctoral forman parte de un proyecto de investigación que cuenta con el aval del comité de Ética de la Academia Nacional de Medicina.

#### **a. Obtención de células mononucleares y criopreservación de las muestras**

Las células mononucleares totales (CMT) fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica recogidas sobre heparina. La sangre entera se diluyó a la mitad en solución fisiológica y fue sembrada sobre una solución de Ficoll-Triyosom. Este sistema bifásico fue centrifugado a 1500 rpm durante 30 minutos a 5°C. Luego se recogió la interfase conteniendo a las CMT y se las lavó dos veces con solución fisiológica centrifugando por 10 minutos, una vez a 1500 rpm y otra a 800 rpm. Las CMT fueron finalmente re-suspendidas en medio RPMI 10% SFB.

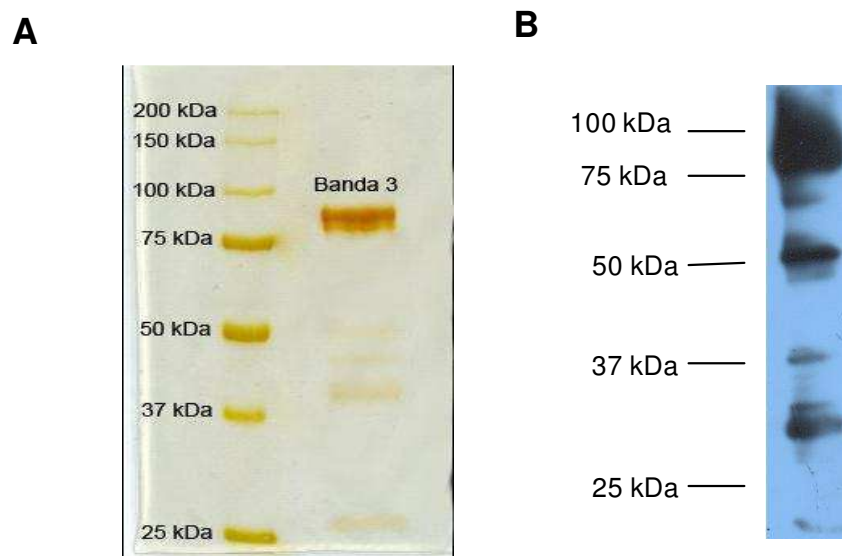
Las muestras de CMT fueron utilizadas en el mismo día o re-suspendidas en SFB 10% DMSO y criopreservadas en tanque de nitrógeno líquido. La viabilidad de las muestras utilizadas luego de la criopreservación se evaluó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el colorante ioduro de propidio-naranja de acridina, las muestras con porcentajes de necrosis y apoptosis mayores a 10 fueron descartadas.

### **3) Proteínas**

#### **a. Purificación de B3**

Para la purificación de la proteína B3 se ensayó una modificación sobre el método de Casey [105]. Muestras de sangre periférica de dadores sanos obtenidas en la Sección de Clínica Médica del Instituto de Investigaciones Hematológicas (Academia Nacional de Medicina), fueron centrifugadas para la remoción del plasma, y luego lavadas sucesivas veces con Solución Fisiológica, quitando la capa de glóbulos blancos cada vez. La suspensión celular (en su gran mayoría formada por eritrocitos) fue lavada tres veces con PBS y luego los eritrocitos se lisaron en tampón Fosfato 5mM pH=8, conteniendo EDTA 2mM,  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM y PMSF 1mM hasta obtener un color blanco en el fondo del tubo luego de centrifugar. Las membranas eritrocitarias fueron despojadas de proteínas accesorias con EDTA 2mM pH=12, lavadas nuevamente con PBS para continuar con la remoción de proteínas periféricas de membrana, y luego

solubilizadas con Deoxi-colato 1% m/v o con Tritón X-100 1% m/v, ambos disueltos en tampón Fosfato 5mM pH=8. La suspensión se centrifugó durante 45 minutos a 20000 g en frío. El sobrenadante así obtenido se encuentra altamente enriquecido en B3 [106]. El detergente se removió mediante extensas rondas de diálisis contra PBS. La solución fue liofilizada y reconstituida en PBS.



**Figura 5. Purificación de B3 de eritrocitos humanos.** A partir de muestras de sangre periférica de donadores sanos se obtuvieron glóbulos rojos altamente enriquecidos. Estos fueron lisados sucesivas veces en tampón Fosfato 5mM pH=8 para la obtención de preparaciones de membrana plasmática eritrocitaria, que fueron despojadas de proteínas accesorias con alto pH y solubilizadas selectivamente mediante detergentes. Panel (A) Foto representativa de los resultados obtenidos al ensayar las purificaciones de B3. Se muestra un gel teñido con Plata de una purificación de B3 mediante solubilización utilizando el detergente Deoxi-colato al 1%. Panel (B) Autorradiografía de Western blot usando anti-B3 monoclonal para verificar la identidad de la banda detectada en los geles teñidos para proteína total. A menor PM se observan los fragmentos de proteólisis característicos en la obtención de B3 [105].

### b. Dominio intracitoplasmático de B3

El vector pET21a con el dominio N-terminal de Banda 3 (B3N) fue gentilmente cedido por el Dr. Z. Zhang de la Universidad Fudan en Shanghai, China. Con dicho vector fue transformada la cepa BL21-D3-pLys (E. coli) para posteriormente inducir un cultivo de 4 lt de LB con el antibiótico correspondiente. Cuando el cultivo bacteriano



llego a 0.6 D.O. (Abs600nm), éste fue inducido con 1 mM de IPTG durante 3 horas a 30°C, obteniéndose finalmente un pellet correspondiente a 18 gramos (peso húmedo).

Pasaje por columna de afinidad al níquel (iMAC HisTrap HP)

El pellet se resuspendió en solución tampón de lisis a pH=8 conteniendo 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol e inhibidores de proteasas. Luego de agregar la enzima lisozima para romper la pared celular bacteriana, se sonicó el extracto durante 20 min con macro-tip realizando pulsos de 30 seg a una amplitud de 40 %. Se diluyó el preparado hasta alcanzar los 150 mM de NaCl y se centrifugó a 18.000 rpm durante 30 min a 4°C para obtener la fracción soluble (sobrenadante). Éste se filtró a través de una membrana de 0,45 µm de poro y se inyectó en una columna de afinidad HisTrap HP 5 ml (LG Amersham). Se procedió entonces al lavado de la columna con 10 volúmenes (50 ml) de tampón conteniendo 50 mM Tris, 150 mM NaCl y 20 mM imidazol. Finalmente la proteína es eluída mediante un gradiente lineal de 0 a 40 % de tampón con imidazol a 0,5 M (Solución B). La proteína sale a 15 % de Solución B en 14 ml de eluato.

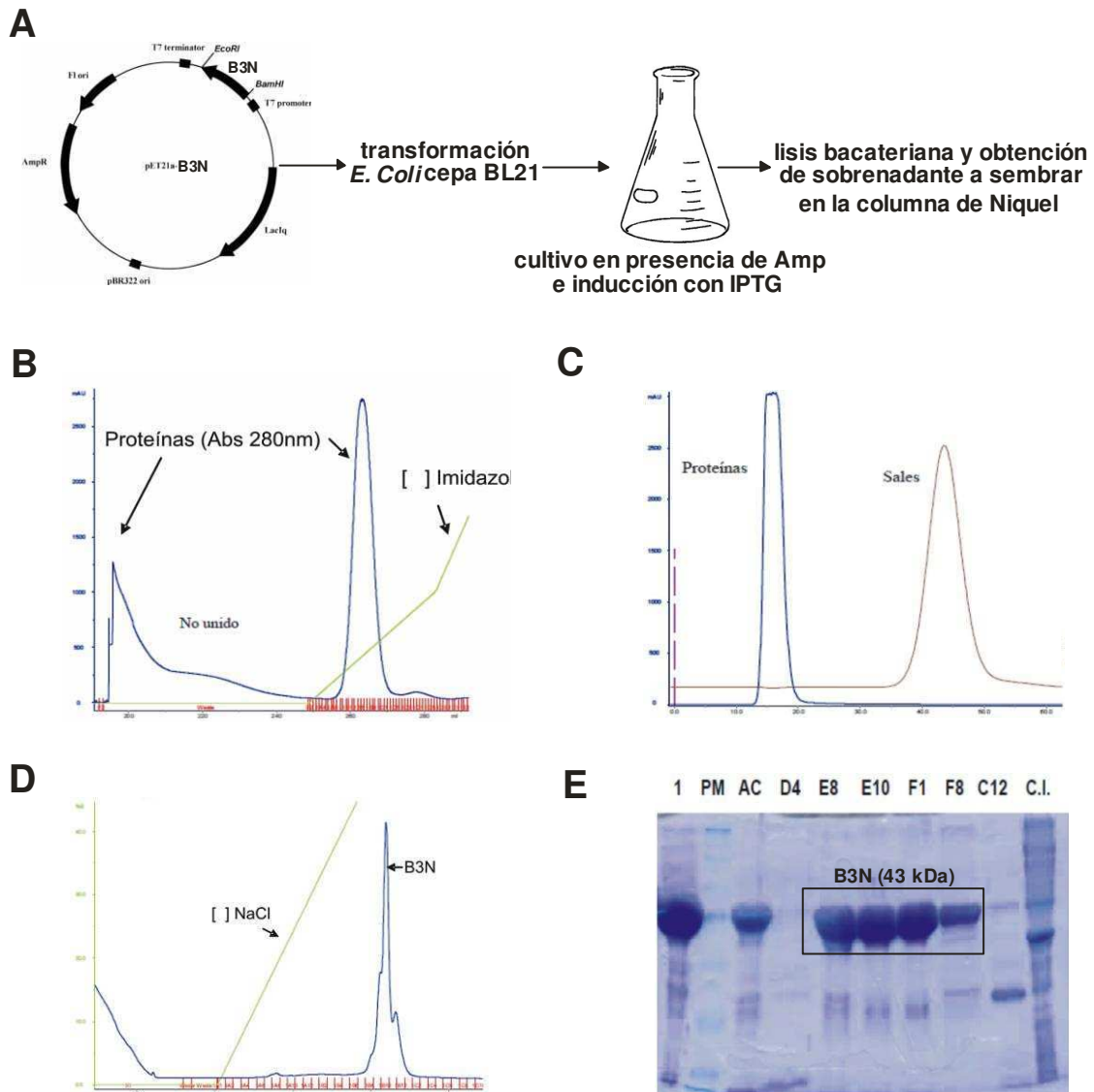
Desalado del pico obtenido por iMAC

El eluato fue concentrado utilizando ultracentrifugación tangencial (Vivaspin 6 cut-off 10.000 MW PES) de 14 ml a 2 ml. Para poder purificar a la proteína recombinante en una columna de intercambio aniónico se procedió a inyectar la fracción concentrada en una columna “HiPrep desalting” 16/60 a un flujo de 5 ml/min equilibrada con solución tampón 20 mM Tris pH 7.5. El objetivo de ello es que la muestra quede a una concentración salina inferior a 50 mM para permitir así la unión a la columna de intercambio iónico.

### Purificación de B3N por intercambio iónico

La fracción obtenida del desalado (11 ml) fue inyectada en una columna de intercambio aniónico ResourceQ 1ml (LG Amersham) equilibrada con solución tampón 20 mM Tris pH 7.5. La elución se realizó a 1 ml/minuto con solución tampón B (20 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl) en un gradiente discontinuo utilizando: 1ro) gradiente de 0-20 % B en 5 ml y 2do) gradiente de 20-75 % B en 20 ml. Se corrieron diferentes alícuotas de los picos obtenidos en la iMAC, en el desalado y en el intercambio iónico en SDS-PAGE al 12% para verificar el estado de expresión y purificación de la proteína B3N.

En la **Figura 6** se muestra un resumen de los pasos realizados y los cromatogramas obtenidos en las distintas columnas usadas para el protocolo de purificación de B3N.



**Figura 6. Obtención de B3N recombinante mediante expresión en sistema procarionta.** Panel (A) Izquierda, vector pET21a con el dominio B3N. Se muestra un esquema de los distintos pasos realizados desde la transformación bacteriana hasta la obtención del sobrenadante de lisis a sembrar en la primera columna de purificación. Panel (B) Cromatograma obtenido de la iMAC HisTrap HP. Interacción: Níquel de la resina con cola de Histidina en B3N. Panel (C) Cromatograma obtenido del desalado de B3N en HiPrep desalting. Fundamento: columna de exclusión por tamaño (desalado de la muestra). Panel (D) Cromatograma obtenido de la elución de B3N mediante concentraciones crecientes de NaCl en una columna Resource Q. Fundamento: columna de intercambio aniónico. Panel (E) SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras teñido con Coomassie Blue. **1)** “Pool” obtenido de la purificación por iMAC; **PM)** marcador de peso molecular, **AC)** B3N luego del desalado, **D4, E8, E10, F1, F8 y C12)** Fracciones eluidas de la columna de intercambio aniónico Resource Q; **C.I.)** Cuerpos de inclusión bacterianos.

### c. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para las electroforesis en geles de poliacrilamida, se prepararon geles al 10-18% y se sembraron las muestras proteicas en tampón de siembra, conteniendo 33 mM NaCl, 70

mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, SDS 2% m/v, bromofenol blue 0.01% m/v, glicerol 10%, pH 6.8. Las corridas electroforéticas se realizaron en un tampón conteniendo Tris base 3.25 mg/ml, glicina 14,4 mg/ml, SDS 0.1% disueltos en agua bidestilada, a voltaje constante = 85 Volts, hasta caer el frente de corrida. Los geles obtenidos fueron eventualmente teñidos con Coomassie Blue durante toda la noche o con plata. Para desteñir los geles coloreados con el reactivo Coomassie Blue se utilizó una solución conteniendo 45% agua, 45% Metanol y 10% de Ácido Acético. Para la tinción con plata, en primer lugar se fijaron los geles con una solución 5% de ácido acético y 50% de metanol, luego se sensibilizaron los geles con tiosulfato de sodio al 0,01% para la posterior tinción con nitrato de plata al 0,1% durante 20 minutos a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo utilizando una solución de carbonato de sodio al 2% en formalina.

#### **d. Western Blot**

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de PVDF, utilizando los casetes y cubas correspondientes, durante 2 horas a amperaje constante= 320 mA. La membrana fue bloqueada utilizando una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 2,5 % m/v en PBS durante 2 horas. Se incubó la membrana durante toda la noche con una solución de PBS 0,5% BSA conteniendo una dilución 1/5000 del anticuerpo primario anti-B3 (IgG murina) o anti-HMGN2 (IgG de cabra). Luego de lavar tres veces la membrana con tampón de lavado, se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG murina o anti-IgG de cabra conjugado a la enzima peroxidasa, usando una dilución 1/5000 del mismo. Las bandas específicas fueron reveladas usando el kit de quimioluminiscencia ECL (Luminol 1,25 mM; Tris 0,1M; Ácido P Cumárcio 0,2 mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre films de autorradiografía.

### **e. Preparación de B3 acoplada a microesferas de poliestireno**

Para acoplar B3 a microesferas de poliestireno, se incubó a las mismas en presencia de B3 o BSA durante 18 horas en medio Borato 0,1M pH=8,5. Luego de tres lavados, se resuspendieron en medio suplementado con SFB al 10% y se verificó mediante citometría de flujo la presencia de la proteína acoplada.

### **4) Cultivos celulares**

Para los experimentos que requirieron células en cultivo, las mismas fueron resuspendidas utilizando el medio detallado en **1c**, a una concentración de  $1-1,25 \times 10^6$  células/ml. Todos los cultivos se llevaron a cabo en estufa de 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

La línea celular Daudi (CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> IgMs<sup>+</sup>, kappa<sup>+</sup>) fue obtenida del Laboratorio de Inmunopatología del Instituto Pasteur, París. Esta línea fue establecida a partir de un linfoma de Burkitt humano. Se mantuvo en cultivo en suspensión con medio RPMI 1640 suplementado con glutamina 2mM, suero fetal bovino 10% y antibióticos. Las células se cultivaron a una concentración de  $0,5-1 \times 10^6$  células/ml, realizándose 2 pasajes semanales.

### **5) Ensayos de unión de proteína a poblaciones celulares**

#### **a. Unión de Banda 3 a células leucémicas**

Los ensayos de unión de B3N soluble a las células leucémicas, tanto de la línea DAUDI como de pacientes LLC, se llevaron a cabo incubando  $5 \times 10^5$  células con distintas concentraciones de la proteína durante 30 minutos, a una temperatura de 4°C.

El volumen final de la reacción fue de 50  $\mu$ l y se llevo a cabo en PBS suplementado con 0,5 % m/v de BSA. Luego de la incubación, se realizaron tres lavados con el mismo medio, y las células se incubaron con un suero policlonal anti-B3N desarrollado en nuestro laboratorio usando el modelo murino, durante 30 minutos a 4°C. Luego de lavar tres veces nuevamente la preparación, ésta se incubó con un anticuerpo secundario que reconoce IgG murina marcado con FITC. Con el objetivo de discriminar la unión de B3N a las distintas poblaciones celulares, se utilizaron anticuerpos marcados con PE o Cy específicos para CD3, CD56 y CD19. Estas marcaciones se realizaron después de hacer los ensayos de unión. Las preparaciones celulares, luego de las marcaciones, se lavaron tres veces con PBS-BSA 5% y fueron resuspendidas en tampón comercial Isoflow para ser analizadas en el citómetro de flujo o montadas sobre porta objetos utilizando el líquido de contraste Fluoromont cuando fueron evaluadas por microscopia de fluorescencia.

#### **b. Incubación con citoquinas para posterior ensayo de unión de B3N**

Para los ensayos de modulación de la unión de B3N por citoquinas se incubó a las células LLC durante 48 h con las citoquinas IL-6 (40 ng/mL), TGF- $\beta$  (40 ng/mL) o IFN- $\alpha$  (450 U/mL) en medio RPMI suplementado con 10% de SFB. Luego se usaron  $0,5 \cdot 10^6$  células LLC incubadas en frío con distintas concentraciones de B3N para el ensayo de unión, desarrollado tal como se describió en el punto **5a**.

#### **6) Identificación de sitios de unión a B3N mediante solubilización con detergentes**

Para detectar posibles sitios de unión a B3N en la membrana plasmática celular que sean removibles por detergentes, el primer paso implicó la biotilación de las proteínas de superficie. A tal fin se incubaron entre 20 y 50 millones de células con

biotina siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). Luego implementamos dos variantes para el próximo paso: primero hacer el ensayo de unión de B3N y luego solubilizar las células, o desarrollar estos puntos de forma inversa. Para ambos casos se controló estrictamente la temperatura a 4°C y se utilizaron inhibidores de proteasas. Las incubaciones con los detergentes probados a distintas concentraciones se hicieron durante 1 hora en agitación en hielo, para luego centrifugar y trabajar con los sobrenadantes, que se incubaron con el IgG policlonal anti-B3N y con proteína A acoplada a sefarosa en forma sucesiva, durante 30 minutos en frío. Como control se agregó proteína A:sefarosa en ausencia del antisuero anti-B3N. Se centrifugó para precipitar los complejos proteicos acoplados a la sefarosa, se lavaron las muestras 3 veces en PBS frío y se hirvieron las muestras en tampón de siembra previamente detallado. Luego de la última centrifugación para separar la parte proteica de la glucosídica, se sembraron los sobrenadantes en geles al 10% de acrilamida. Se realizó la corrida electroforética y transferencia a membranas de PVDF, y se reveló mediante autorradiografía utilizando el sistema de Avidina acoplada a la enzima peroxidasa y luego reactivo ECL, tal como fuera previamente detallado en los puntos **3c** y **3d**.

## **7) Identificación de sitios de unión a B3N removibles a pH 2,5**

### **a. Ensayo de eluciones ácidas y remoción de proteínas periféricas de membrana plasmática**

Alícuotas de  $1 \times 10^6$  células DAUDI se trataron con tampón de elución a pH 2,5, conteniendo fosfato de potasio 0,1M y citrato de sodio 0,05M, durante 30 segundos a temperatura ambiente, y luego se neutralizó con tampón Tris 50mM a pH=8 en solución fisiológica. Las células se lavaron tres veces con PBS y luego se realizaron los ensayos de unión de B3N. Para la obtención de los sobrenadantes ácidos neutralizados se trabajó

con  $100 \times 10^6$  células de la línea DAUDI o  $300 \times 10^6$  células B-LLC obtenidas de tres pacientes que se trataron según lo previamente explicado. Se obtuvieron los sobrenadantes neutralizados, que se sembraron en la columna de afinidad agarosa-B3N para detectar las proteínas que interactúan con B3N.

#### **b. Unión de B3N a resina de agarosa**

Se utilizó el Kit de Pierce AminoLink (número de catálogo 44894) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubó a la resina de agarosa virgen con 11,6 mg de B3N purificada en el medio adecuado durante 4 horas a temperatura ambiente. Se recolectó la fracción no unida para el cálculo de eficiencia del armado de la columna. Luego se fijó la unión usando Cianoborohidruro de Sodio y se bloquearon los sitios activos remanentes usando Tris HCl. Se realizaron exhaustivos lavados, para obtener la columna Agarosa-B3N en PBS lista para ser usada.

#### **c. Inyección de muestras en la columna Agarosa-B3N. Obtención de la proteína receptora candidato**

Los sobrenadantes ácidos neutralizados obtenidos a partir de células DAUDI fueron sembrados en la columna Agarosa-B3N. Para la carga de las muestras se utilizó un flujo de 0,5 ml/min y el volumen total sembrado fue de 5 ml. Cuando dejó de detectarse la fracción no unida, se llevó a cabo primero una elución mediante fuerza iónica, usando solución de PBS con NaCl 1M. La curva practicada fue hasta 0,5 M de NaCl en 0 minutos con flujo de 1 ml/min, y luego hasta 1 M en 0 minutos con igual flujo. Luego se llevó en 0 minutos a pH=2,7 utilizando una solución ácida de glicina 0,1M. Las alícuotas recogidas fueron de 400  $\mu$ L. Los picos de aumento de UV a 280 nm a lo largo de la elución por fuerza iónica fueron concentrados o corridos en geles de



agarosa al 15%. Las muestras se evaluaron por espectrometría de masa (Maldi-Tof MS/MS).

### **8) ELISA para detectar interacción entre B3N y HMG2**

Alícuotas de 0,5 µg de HMG2 o albúmina se hicieron adherir a placas de ELISA incubando durante 18 horas. Al final de la incubación, se lavó con PBS suplementado con 0,5% de BSA y 0,05% de Tween y luego se bloqueó por dos horas a temperatura ambiente en PBS suplementado con 3% BSA. Se lavó el bloqueo y se agregó B3N (1-45 µg/ml) por triplicado. La unión se detectó utilizando un suero policlonal anti-B3N hecho en ratón diluido 1:500, y luego agregando IgG anti-ratón acoplada a peroxidasa diluida 1:5000. Como sustrato se utilizó 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) y luego de frenar la reacción con ácido sulfúrico se cuantificó la señal emitida usando un lector de ELISA con filtro a 450 nm.

### **9) Desplazamiento de la unión de B3N a células DAUDI**

Para los ensayos de desplazamiento de B3N con HMG2 recombinante, se preincubaron ambas proteínas a las concentraciones indicadas en las figuras durante 20 minutos a temperatura ambiente, y luego la mezcla fue agregada a  $5 \times 10^6$  células DAUDI en 10 µl. Las células se incubaron en presencia de B3N o la mezcla durante 30 minutos, a 4°C en PBS BSA 0,5%. Luego, las células se lavaron tres veces y se incubaron con el suero policlonal anti-B3N durante 30 minutos a 4°C. Se lavó tres veces nuevamente la preparación, y se reveló la unión usando un anticuerpo secundario que reconoce IgG murina marcado con FITC. Se evaluó la unión mediante citometría de flujo.

## 10) Obtención de vesículas eritrocitarias y ensayo de unión a células leucémicas

Para la obtención de vesículas de eritrocitos se marcó una suspensión pura de glóbulos rojos con el colorante CFDA (Sigma-Aldrich,USA) derivado de la fluoresceína, siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego de los lavados se lisó usando tampón Fosfato 5 mM a pH=8 para la obtención de membranas eritrocitarias, que fueron pasadas por una aguja hipodérmica de calibre 27G repetidas veces, según un protocolo previamente descrito [107]. Las membranas que se conservaron en el tampón original durante el pasaje por la aguja resultaron en vesículas de polaridad original (VPO), mientras que al incubar 1 hora a 37°C en tampón EDTA 0.1 mM pH=8, se obtuvieron vesículas de polaridad invertida (VPI). La marca de fluorescencia en las vesículas fue evaluada por citometría de flujo y comparada con su contrapartida de vesículas obtenidas a partir de glóbulos rojos no marcados con CFDA.

Los ensayos de unión de vesículas se realizaron incubando células LLC en presencia de VPI durante 2 horas a 37°C. Luego se lavó 3 veces con tampón frío de PBS suplementado con BSA al 0,5%. Se trabajó con vesículas marcadas y como control se incubó a las células con vesículas de la correspondiente orientación pero no marcadas. Para el caso de evaluar la unión en células previamente activadas por IFN- $\alpha$ , se siguió el mismo protocolo de cultivo descrito en el punto **5b**. Se utilizó el citómetro de flujo para la cuantificación de la unión en la célula. Las células T fueron discriminadas utilizando un anticuerpo para CD3 marcado con Per-CP.

## 11) Citometría de flujo

Los estudios de citometría de flujo se realizaron utilizando un citómetro de flujo FACScan de Becton Dickinson Immunocytometry System (San Jose, CA, USA). Los

datos fueron analizados empleando el programa CellQuest de Becton Dickinson y el programa Summit de Dako Inc.

#### **a. Determinación de la expresión de CD38, CD69, CD25 y CD86 en células leucémicas por Citometría de flujo**

Para determinar la expresión del marcador con valor pronóstico CD38 sobre las células leucémicas de los pacientes LLC se marcaron a las CMT con anticuerpos específicos para CD19 PerCP y para CD38 PE o el correspondiente control de isotipo durante 30 minutos a 4°C. Se lavó tres veces en PBS BSA 0,5% y se resuspendieron las muestras en Isoflow para adquirir en el citómetro. El mismo procedimiento se desarrolló para evaluar la expresión de CD69, CD25 y CD86 en células leucémicas, discriminadas mediante marcación positiva con anti-CD19 y anti-CD5 PerCp o negativa con anti-CD3 y anti-CD56 PerCp.

#### **b. Expresión de HMGN2 por Citometría de flujo**

Para determinar la expresión de HMGN2 en membrana celular de células leucémicas, se trabajó con CMT de pacientes o células DAUDI frescas incubadas en presencia del anticuerpo anti-HMGN2 en frío, usado a 20 µg/ml, o frente a la misma concentración de la mezcla irrelevante de Ig de la misma especie (cabra). Luego de lavar en PBS BSA 0,5%, se incubaron las células con IgG anti-cabra marcado con FITC, se lavó tres veces y se resuspendió para adquirir en el citómetro.

### **12) Microscopía de fluorescencia**

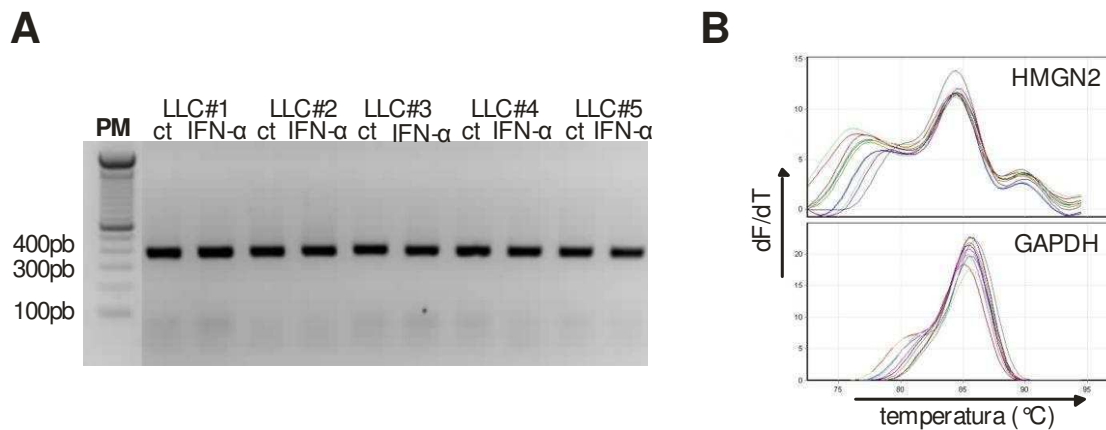
Se desarrolló el protocolo de unión de B3N detallado en el punto **5a** o la marcación para evaluar la expresión de HMGN2 tal como se describe en el punto **11b**, y

luego del último lavado correspondiente a cada protocolo las muestras fueron re-suspendidas en Fluoromont. Se montaron cubreobjetos sobre portaobjetos conteniendo las suspensiones celulares. Para la adquisición de imágenes se utilizó el microscopio confocal FluoView FV1000 (Olympus, Tokyo, Japan) equipado de un objetivo de inmersión en aceite Plapon 603/1.42 y se analizaron las imágenes utilizando el programa de Olympus FV10-ASW.

### 13) Ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

Para cuantificar los niveles de ARN de HMGN2 en células leucémicas, como primer paso se diseñaron los primers de HMGN2 utilizando el software Gene Runner. Las secuencias elegidas fueron 5'-GAAGAGGCGAGAACGACCCC para el primer Forward y 5'-GGCATCTCCAGCACCTTCAG para el primer Reverse, las que fueron sintetizadas por la compañía IDT. El fragmento a obtener se calculó en 362 pares de bases, verificando su pureza y peso molecular mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 2% tal como se muestra en la **Figura 7A**. Experimentalmente, luego del tratamiento de  $1 \times 10^6$  células LLC con IFN- $\alpha$  o vehículo (solución fisiológica), se extrajo el ARN mediante un protocolo estándar utilizando el reactivo TRIzol de la compañía Invitrogen y se obtuvo el cADN utilizando el kit comercial de Promega que contiene la enzima transcriptasa reversa M-MLV, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el ensayo de PCR en tiempo real se utilizó el kit "Power SYBR Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems) desarrollando 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C en el equipo Rotor-Gene 6000 de Qiagen. Previo al ciclado se incubó durante 10 minutos a 95°C, y luego de finalizar los ciclos se incubó durante 7 minutos a 72°C. Se evaluó la expresión del gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) utilizando los primers 5'-

GGTGCTGAGTATGTCGTGGA como forward y 5'-ATGCCAGTGAGCTTCCGTT como reverse. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el programa asociado al equipo, aplicando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , usando GAPDH como gen de referencia. Los valores obtenidos en las distintas condiciones fueron comparados al valor correspondiente a células de la línea linfóide T Jurkat, utilizada como control positivo.



**Figura 7. Verificación de primers y curvas de fusión obtenidas para evaluar niveles de expresión de HMG2 mediante PCR en tiempo real en muestras LLC tratadas o no con IFN- $\alpha$ .** Panel (A) Células LLC de cinco pacientes fueron tratadas con IFN- $\alpha$  o vehículo durante 24 horas, luego se extrajo el ARN total para posteriormente obtener el cADN de las muestras. Se desarrolló una amplificación mediante PCR utilizando los primers previamente diseñados para HMG2. Se verificó el peso y la pureza del fragmento obtenido mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 2% embebido en Bromuro de Etidio. Se observó una única banda entre los 300 y 400 pares de base al someter el gel a luz Ultravioleta. Panel (B) Curvas de fusión obtenidas para HMG2 y GAPDH en los ensayos de PCR en tiempo real.

#### 14) Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software). La significancia estadística se determinó utilizando los test no paramétricos: Wilcoxon signed rank test o Mann Whitney test para comparar entre muestras pareadas o no pareadas respectivamente. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## **RESULTADOS**

---

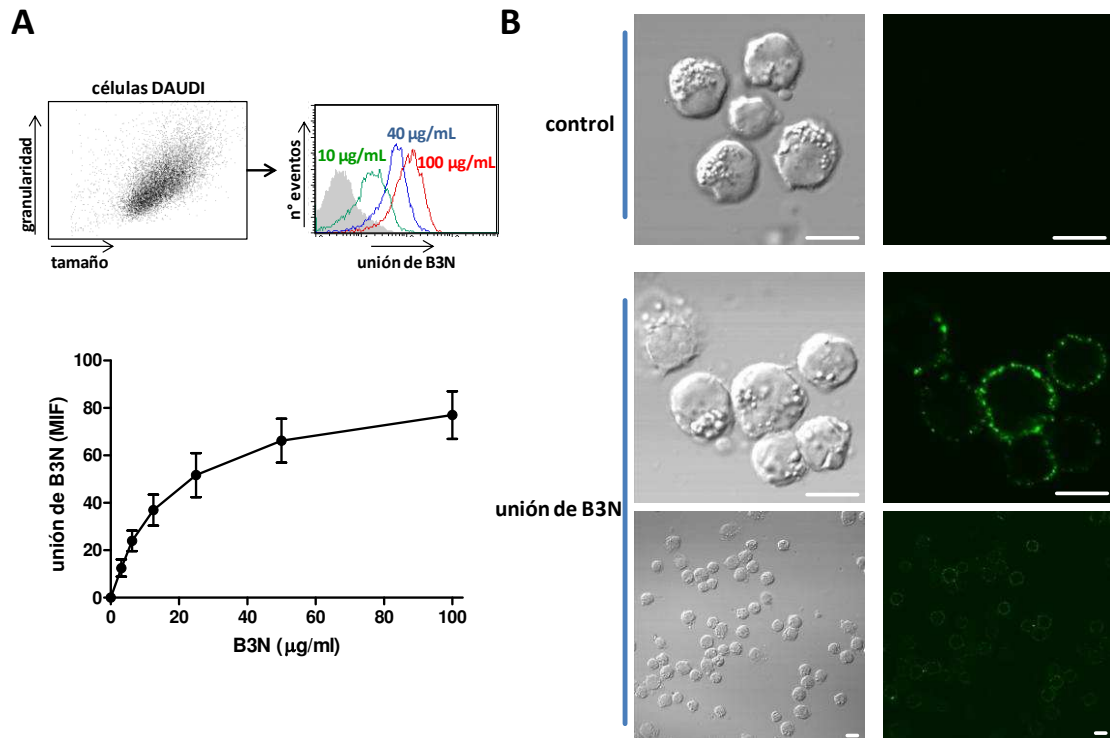
## **PARTE 1**

### **Identificación del sitio de unión de Banda 3 en células B leucémicas**

## **1. Primer protocolo diseñado para la identificación del sitio de unión de B3 en células B leucémicas**

Como ya hemos mencionado, nuestro grupo de trabajo demostró que las células B leucémicas de pacientes LLC tienen la capacidad de unir a la proteína eritrocitaria B3 mediante su dominio N-terminal [81]. En la presente tesis confirmamos los resultados de unión de B3 en células B leucémicas humanas utilizando las técnicas de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Como puede verse en la **Figura 8**, las células de la línea B linfoblastoide DAUDI fueron capaces de unir el fragmento N-terminal de B3 (B3N), mostrando una curva con evidencias de saturabilidad al aumentar la concentración del ligando. La unión fue revelada usando un suero policlonal anti-B3N preparado en nuestro laboratorio mediante la inmunización de ratones BALB/c con B3N recombinante.





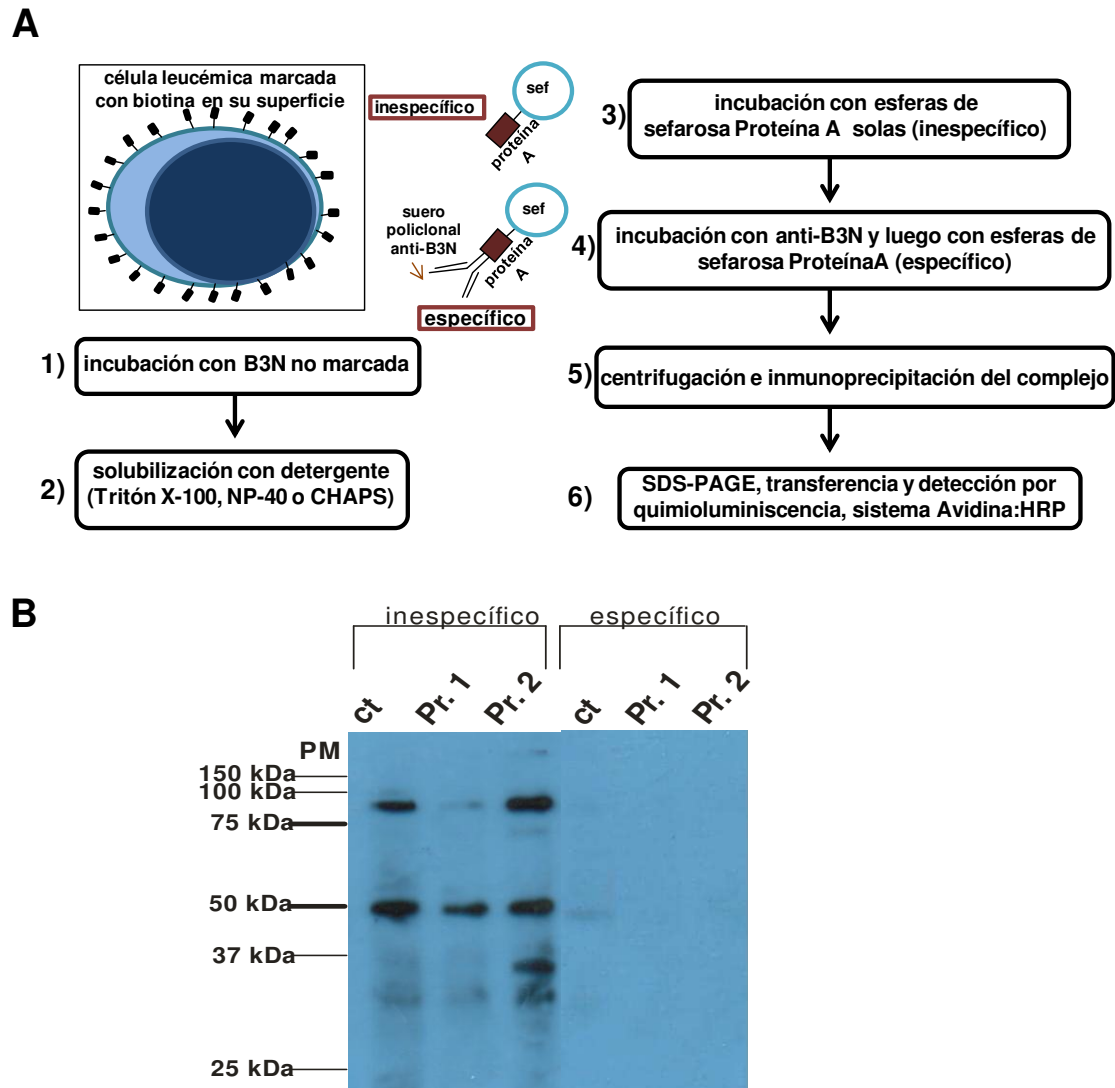
**Figura 8. Unión de B3N a células de la línea DAUDI.** Panel (A) Las células DAUDI ( $5 \times 10^5$ /tubo) fueron incubadas a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos con B3N en un rango de concentraciones de 0-100  $\mu\text{g/ml}$ . La unión se reveló con anti-B3N (50  $\mu\text{g/ml}$ ) seguido de anti-IgG de ratón FITC y análisis por citometría de flujo. Se muestra un ejemplo representativo ( $n=5$ ) de gráfico de puntos (izquierda) e histograma de fluorescencia (derecha). En gris se muestra la fluorescencia del control de isotipo, donde se agregaron los anticuerpos primario y secundario sin incubar previamente con B3N. Debajo, la curva de unión expresada en medias de intensidad de fluorescencia (MIF) versus concentración del ligando usado, mostrando evidencias de saturabilidad. Los resultados se muestran como media  $\pm$  ES ( $n=5$ ). Panel (B) Micrografías obtenidas usando microscopía de fluorescencia confocal que muestran la unión de B3N a células DAUDI. En este ensayo, el ligando fue usado a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  (barras=10  $\mu\text{m}$ ).

Nuestros resultados previos demostraron que el tratamiento de las células con proteínasa K en una concentración suficiente para degradar las proteínas de la superficie reducía drásticamente la capacidad de unión de B3, sugiriendo que el sitio de unión es de carácter proteico. También encontramos que el sitio de unión a B3 no es la Ig de membrana de las células leucémicas ni ningún receptor descrito para B3 [81]. Con el objetivo de identificar la(s) molécula(s) que posibilita(n) la unión de B3 a la superficie celular, diseñamos el protocolo experimental que se muestra en la **Figura 9**. Estos experimentos se llevaron a cabo con células DAUDI o con células B leucémicas

purificadas de sangre periférica de pacientes LLC. Como ligando se utilizó el fragmento B3N recombinante.

El primer paso de estos ensayos consistió en marcar con biotina las proteínas de la membrana celular para facilitar la posterior identificación del sitio de unión de B3N. Luego se incubó con el ligando en concentraciones saturantes y se solubilizaron las proteínas utilizando Triton X-100 como detergente. Se intentaron dos protocolos alternativos. En ambos casos se utilizó Triton X-100 para tratar de aislar la molécula de unión a B3N, pero en un caso las células se expusieron al detergente antes de la incubación con B3N, mientras que en el otro caso las células se incubaron con B3N y luego se agregó el detergente.

Con la intención de separar el complejo B3N-receptor del resto de la preparación, se desarrolló la técnica de co-inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo específico contra B3N y esferas de sefarosa acopladas a proteína A. Como paso previo, la preparación proteica se incubó con las esferas de sefarosa proteína A en ausencia de anticuerpos a fin de eliminar las proteínas que se pegan inespecíficamente a las mismas. Por último, las proteínas unidas al complejo sefarosa-proteína A se eluyeron y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).



**Figura 9. Protocolo desarrollado para la identificación de potenciales moléculas receptoras de B3 mediante solubilización con detergentes.** Panel (A) En el esquema de pasos expuesto, se muestran los tres detergentes utilizados, tanto para células de la línea linfóide B DAUDI como para células LLC obtenidas de sangre periférica de pacientes. En la parte central se aclara en qué se basa el pasaje específico e inespecífico. Panel (B) Los complejos que co-immunoprecipitaron se transfirieron a membranas de PVDF y mediante el sistema de detección avidina:peroxidasa (HRP) se obtuvo la autorradiografía mostrada (ct= sin agregar B3N; Pr. 1 o 2= Protocolos alternativos según lo explicado en el texto). Se muestra un ejemplo representativo de los resultados obtenidos en esta serie de experimentos (n=3). En el caso mostrado se trabajó con células de la línea DAUDI solubilizadas con Tritón X-100 al 1%.

Una radiografía representativa de los resultados obtenidos en estos experimentos se muestra en el Panel (B) de la **Figura 9**. Al revelar con avidina acoplada a peroxidasa, sólo pudimos observar bandas inespecíficas indicativas de proteínas biotiniladas que se pegan a las esferas de sefarosa-proteína A en ausencia de anticuerpo. Se realizaron

distintas modificaciones a este protocolo inicial con la intención de obtener resultados positivos. Las modificaciones realizadas fueron: 1) utilización de otros dos detergentes distintos del Tritón X-100: el detergente no iónico NP-40 y el zwitteriónico CHAPS, a distintas concentraciones (1-2,5% m/v) y 2) purificación de la membrana y solubilización de las proteínas con la posterior remoción del detergente mediante diálisis o dilución hasta la concentración micelar crítica antes de la incubación con el ligando. Ninguno de estos laboriosos ensayos tuvo resultados positivos. Pensamos que un punto crítico es la presencia del detergente. Muchas proteínas integrales de membrana sólo pueden ser solubilizadas por concentraciones altas de detergente. Sin embargo, la interacción de B3N con su receptor podría verse afectada en presencia del detergente [108-109]. Es muy difícil resolver estos dos inconvenientes antagónicos ya que a mayor concentración del detergente se podrán solubilizar más fracciones de proteínas integrales de membrana, pero es más probable que se afecte la unión del ligando a su receptor. Remover el detergente luego de la solubilización podría implicar que se vuelvan insolubles y precipiten las proteínas integrales previamente solubilizadas [110].

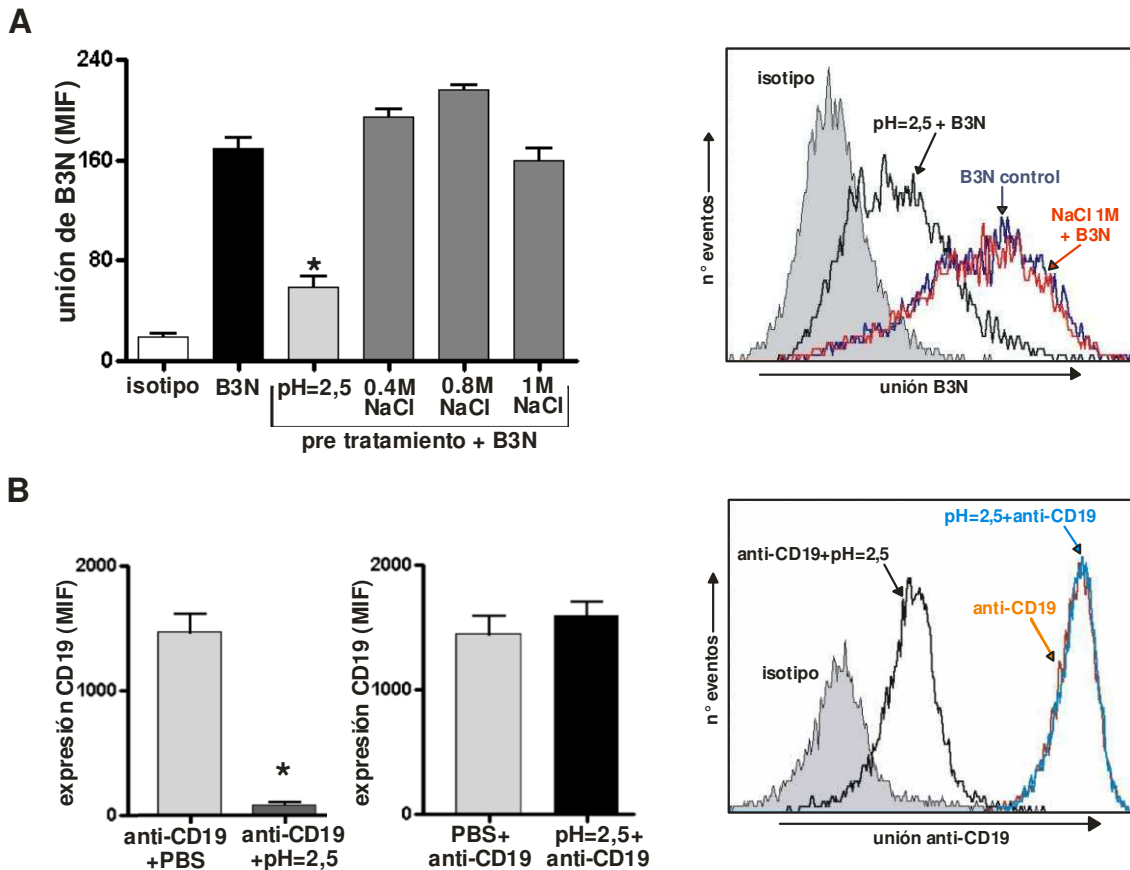
Por todo lo expuesto, fue necesario buscar otra estrategia para la identificación del sitio de unión de B3N que no involucrara la utilización de detergentes. A tal fin decidimos explorar el papel de las proteínas no integrales de la membrana plasmática en la unión de B3N a las células leucémicas.

## **2. Papel de proteínas no integrales de membrana en la unión de B3 a células B leucémicas**

Con el objetivo de determinar si la unión de B3 a las células leucémicas depende de proteínas periféricas de la membrana plasmática, se decidió eluir las de dos maneras

diferentes: 1) por tratamiento de las células a pH ácido o 2) por exposición de las células a alta fuerza iónica [111]. En el primer caso, las células fueron expuestas a una solución tampón a pH=2,5 durante 30 segundos y luego se lavaron extensivamente en PBS pH=7, tal como se detalla en Materiales y Métodos. En el segundo caso, las células se incubaron con concentraciones crecientes de cloruro de sodio hasta 1M. La capacidad de las células B leucémicas de unir B3 se evaluó por citometría de flujo usando como ligando la molécula B3N.

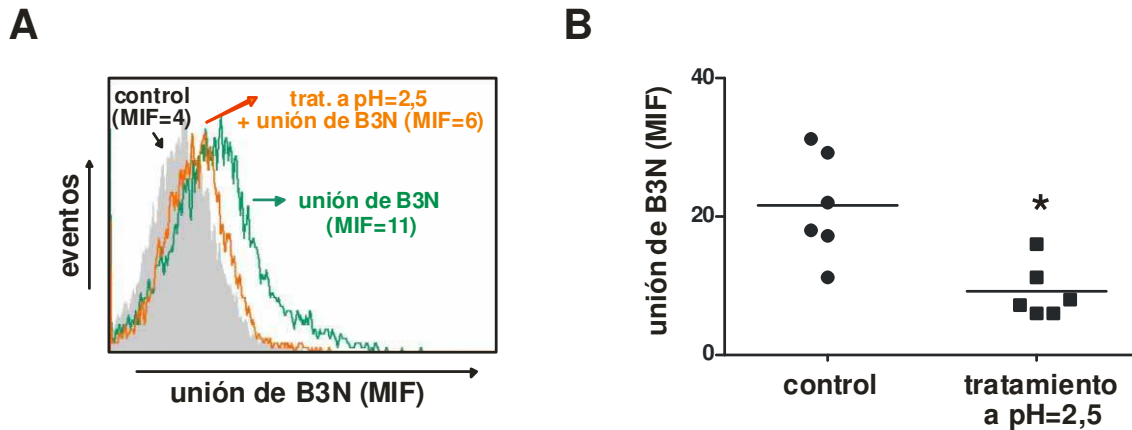
Como se muestra en la **Figura 10A**, encontramos que la elución ácida de las proteínas de membrana en células DAUDI disminuye significativamente la unión de B3N. Esto no se observó al pre-tratar con alta fuerza iónica usando una solución de NaCl en concentraciones crecientes hasta 1M. Para descartar que la disminución en la unión de B3N por el tratamiento ácido se debiera a un efecto deletéreo sobre toda la membrana plasmática, se evaluó la expresión de proteínas integrales de membrana como CD19 (**Figura 10B**) e IgM (no mostrado). Como puede observarse, el pre-tratamiento a pH 2,5 no afectó el reconocimiento de CD19 por un anticuerpo específico. Sin embargo, y como era de esperar, el tratamiento ácido removió casi por completo al anticuerpo IgG anti-CD19 que se encontraba unido a su antígeno en la membrana. Estos resultados demuestran que la unión de B3N depende, en gran parte, de moléculas que se eluyen de la membrana celular a pH 2,5.



**Figura 10. Efecto del tratamiento de células DAUDI con pH=2,5 o alta fuerza iónica en la unión de B3N a la superficie celular.** Panel (A) Alícuotas de  $1 \times 10^6$  células DAUDI/ml fueron expuestas a pH 2,5 durante 30 segundos, o concentraciones crecientes de NaCl por el mismo tiempo, e inmediatamente lavadas 3 veces con PBS antes de los ensayos de unión de B3N (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). La unión de B3N a las células se evaluó como se indica en la leyenda de la **Figura 8**. Los resultados se muestran como media de intensidad de fluorescencia (MIF) y se grafica la media  $\pm$  ES de 5 experimentos independientes. (\*  $p < 0,05$  tratamiento ácido versus control, Wilcoxon signed rank test). Panel (B)  $5 \times 10^5$  células DAUDI fueron marcadas con el anticuerpo específico para CD19, de isotipo IgG, y luego expuestas a pH 2,5 o PBS durante 30 segundos (barras de la izquierda). Como control de integridad de membrana las células DAUDI se trataron a pH=2,5 o con PBS, y luego se agregó el anticuerpo anti-CD19 (barras del centro). Los resultados se muestran como MIF de CD19 y se grafica la media  $\pm$  ES de 5 experimentos independientes. A la derecha de los paneles A y B se muestran histogramas representativos (\*  $p < 0,01$  tratamiento ácido de células marcadas con IgG anti-CD19 versus control sin tratar, Wilcoxon signed rank test).

Resultados similares se obtuvieron con células B de pacientes con LLC (**Figura**

**11**).



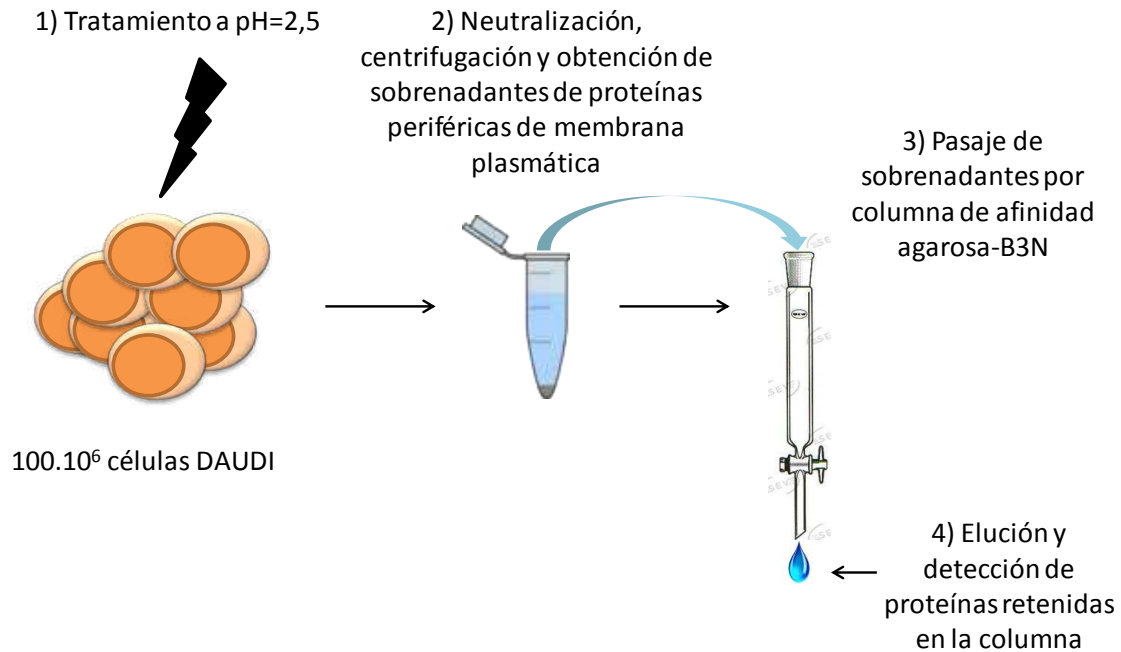
**Figura 11. Tratamiento de células LLC a pH=2,5 y unión de B3N a la superficie celular.** Se desarrolló el ensayo de unión de B3N a 50  $\mu\text{g/ml}$  sobre CMT de pacientes LLC ( $5 \times 10^5/\text{tubo}$ ), previamente tratadas con la solución a pH=2,5 o con PBS como control. Se evaluó la unión mediante citometría de flujo. Panel (A) Se muestra un histograma representativo de los resultados obtenidos analizando la región correspondiente a células leucémicas CD19<sup>+</sup> de un paciente LLC. Panel (B) Los resultados se muestran como media de intensidad de fluorescencia (MIF) donde cada punto corresponde a un paciente. Las diferencias entre control versus tratamiento a pH=2,5 resultaron significativas (\* $p < 0,05$ ,  $n=6$ , Wilcoxon signed rank test).

Estos resultados nos aportaron una herramienta valiosísima para intentar la identificación del sitio de unión de B3 en las células leucémicas ya que en los sobrenadantes del tratamiento a pH=2,5 (es decir, en los eluidos ácidos neutralizados) deberían encontrarse una o más moléculas que interactúen con la porción N-terminal de B3 y, más importante aún, en ausencia de detergente que pudiera interferir en la interacción. Si bien la disminución de la unión no fue total (aproximadamente 70% en células DAUDI y 60% en células LLC), aquellas proteínas presentes en los eluidos neutralizados que interactúen con B3N son candidatos a funcionar como receptores en la unión de B3 a las células leucémicas.

### 3. Segundo protocolo diseñado para la identificación del sitio de unión de B3 en células B leucémicas

Para tratar de identificar moléculas en los eluidos del tratamiento ácido que puedan unir B3 decidimos utilizar la técnica de cromatografía de afinidad con una

resina de agarosa acoplada a B3N. El diseño experimental desarrollado se esquematiza en la **Figura 12**.



**Figura 12. Protocolo de obtención de moléculas eluidas a pH=2,5 que interactúan con B3N.** Cien millones de células DAUDI se sometieron a pH 2,5 y se recuperó el sobrenadante de la elución una vez neutralizado. Se preparó una columna de afinidad de agarosa-B3N en la que se inyectó el sobrenadante. Las proteínas retenidas en la columna por su capacidad para interactuar con B3N se eluyeron inicialmente por fuerza iónica mediante un gradiente de concentración de NaCl hasta 1M, y luego se sometió la columna a medio ácido utilizando glicina 0,1M pH=2,7.

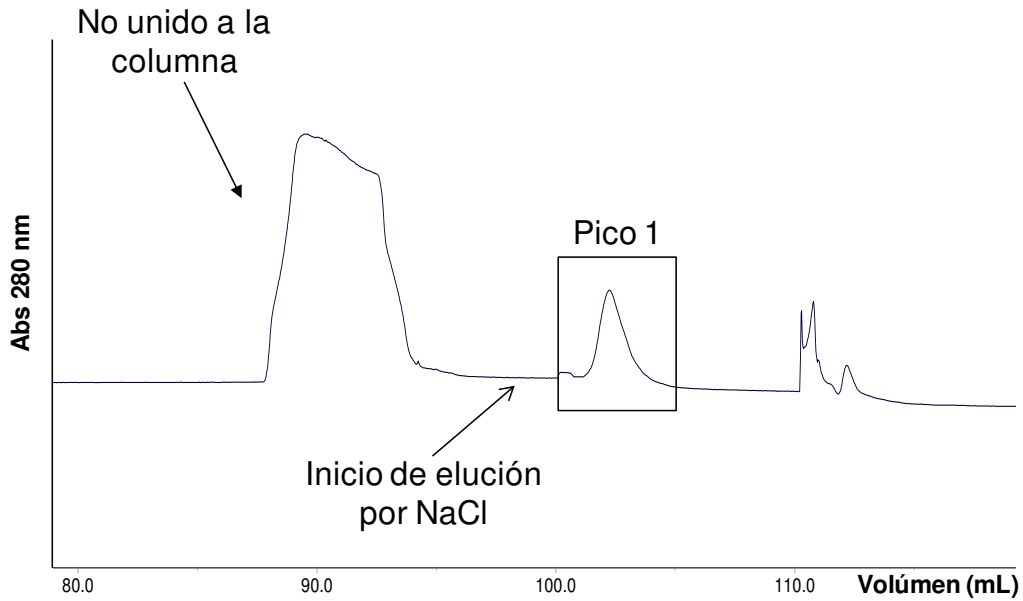
Para la preparación de la columna de afinidad deben obtenerse cantidades importantes de la proteína de unión (al menos 10 mg) con una gran pureza. La producción de B3N recombinante la realicé en la Unidad de Proteínas Recombinantes del Instituto Pasteur de Montevideo, bajo la supervisión del Dr. Pablo Oppezzo. El procedimiento y los resultados obtenidos de la expresión de B3N se detallan en la sección de Materiales y Métodos. Obtuvimos 11,6 mg de B3N pura, que se utilizaron para acoplar a la resina virgen de agarosa. Se usó como solución de unión fosfato de sodio 0,1M, cloruro de sodio 0,15M a pH 7,2. Se utilizó cianoborohidruro de sodio para fijar la unión de B3N a la agarosa y se bloquearon los sitios activos remanentes con Tris



HCl tal como se detalla en Materiales y Métodos. La eficiencia de la unión de B3N a la resina de agarosa fue de 95.5%, calculada como  $100 - (\text{proteína no unida a la resina/proteína total cargada} \times 100)$ . Como el volumen de la resina inicial fue de 1,5 ml, la concentración de B3N acoplada fue aproximadamente de 7 mg/ml.

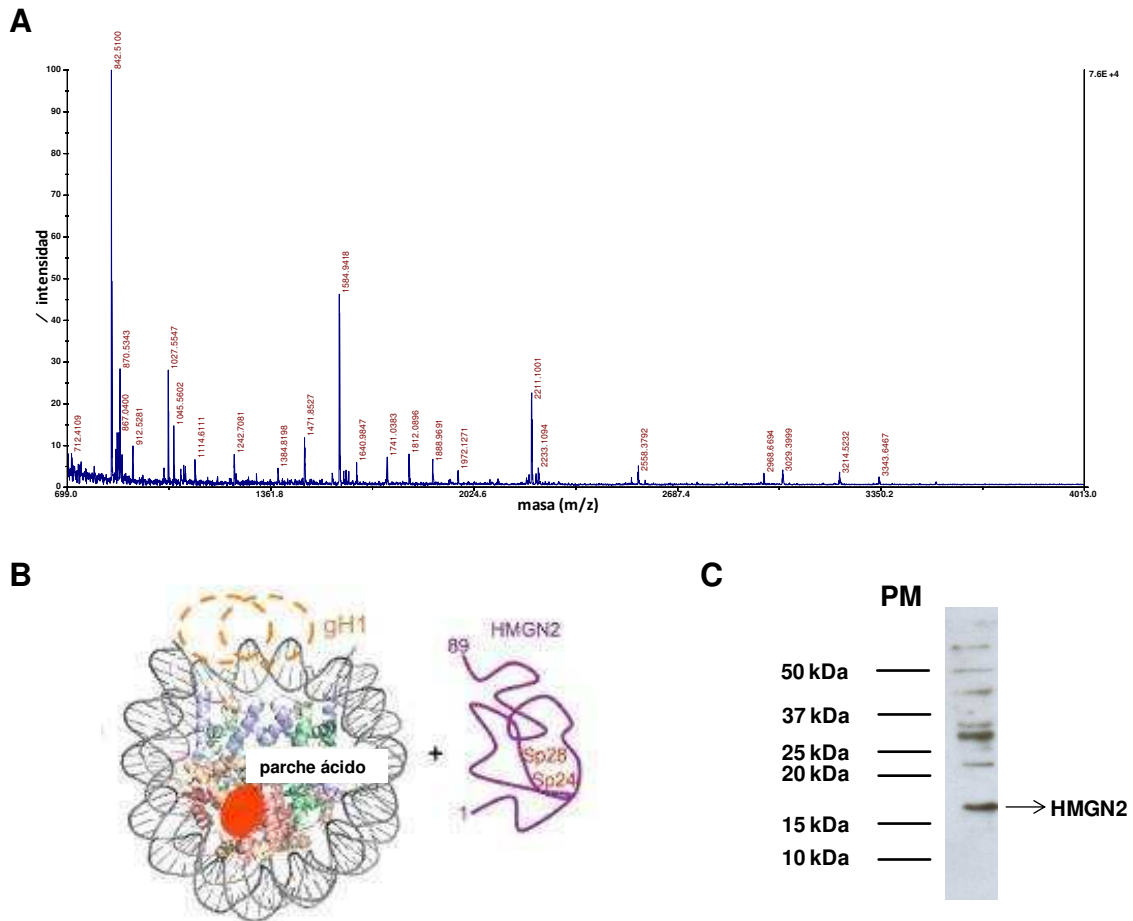
#### **4. Identificación de HMGN2 como proteína de unión a B3N**

Una vez preparada la columna de agarosa-B3N, obtuvimos el sobrenadante de elución ácida a partir de un número grande de células leucémicas B para asegurarnos la mayor cantidad posible de proteínas eluidas. Para ello se expandió la línea linfoblastoide DAUDI hasta obtener  $100 \times 10^6$  de células, tal como se muestra en la **Figura 12**. El sobrenadante de la elución neutralizado se sembró en la columna de afinidad montada en un equipo ÄKTA™purifier, que permite realizar gradientes de sales o pH para la elución de lo que se une específicamente a la columna y puede medir de forma constante la concentración proteica, la conductividad y el pH del líquido que se recoge de la misma. En la **Figura 13** se muestra el cromatograma obtenido al correr la muestra y ensayar la posterior elución por NaCl detallada en Materiales y Métodos. El Pico 1 corresponde a una o más proteínas que se unieron a B3N quedando retenida(s) en la columna y que luego fueron eluidas con NaCl 0,5M. No detectamos ningún pico al continuar con la elución hasta NaCl 1M ni al someter, posteriormente, la columna a pH=2,7 utilizando glicina 0,1M.



**Figura 13. Cromatograma obtenido al inyectar en la columna de afinidad de agarosa-B3N los sobrenadantes neutralizados del tratamiento de células DAUDI con solución a pH=2,5.** Las alícuotas fueron recogidas en un volumen de 400  $\mu$ l y aquellas en donde se detectaron picos de absorbancia a 280 nm fueron concentradas para la identificación de las proteínas por espectrometría de masa. El Pico 1 se eluyó a una concentración de NaCl de 0,5M.

La fracción correspondiente al Pico 1 fue concentrada 5 veces por centrifugación usando un filtro Centricon cuyo tamaño de poro retiene proteínas de hasta 3 kDa y enviada a la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur para su identificación por MALDI-TOF-TOF. En dicha muestra se identificó de manera estadísticamente significativa a la proteína “high-mobility group nucleosomal binding domain 2” (HMGN2) de Homo sapiens (**Figura 14**). HMGN2 es una proteína de 9 kDa, originalmente llamada HMG-17. Pertenece a la familia de las HMG, que comprende proteínas nucleares de unión a la cromatina no pertenecientes al grupo de las Histonas [112]. La función principal de las proteínas HMG es la de regular los procesos de transcripción, replicación y reparación del ADN [113-114].



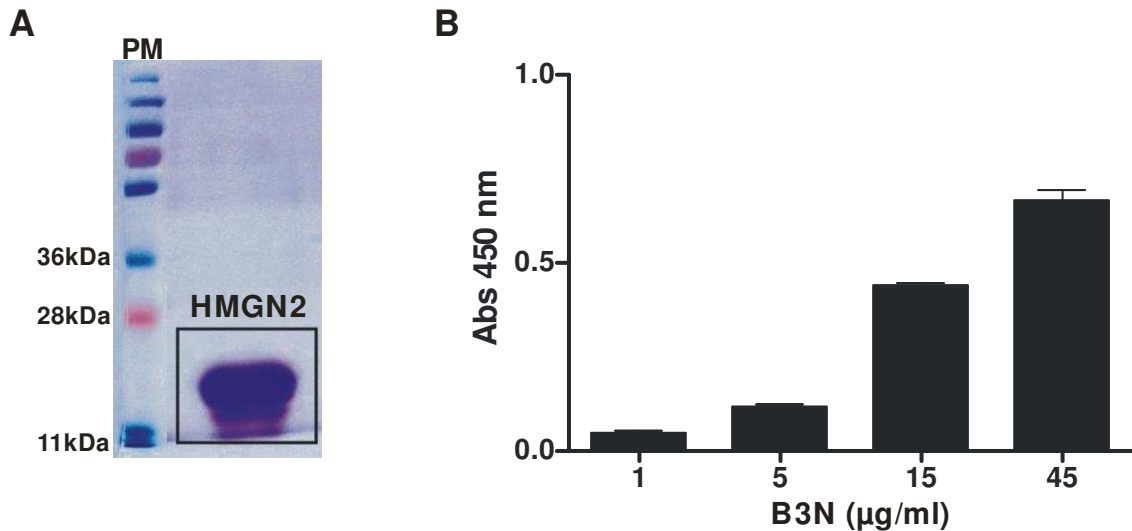
**Figura 14. Identificación de HMGN2 mediante la técnica de Maldi-Tof-Tof.** Panel (A) Espectro de masa obtenido al pasar por el espectrómetro el Pico 1 mostrado en la **Figura 12**. En el análisis de los datos utilizando el motor de búsqueda Mascot se identificó la proteína HMGN2 de Homo Sapiens de manera estadísticamente significativa. (link al resultado: [http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=../data/20090508/FtiorzcnT.dat](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20090508/FtiorzcnT.dat)) Panel (B) Esquema de la proteína HMGN2 mostrando su tamaño y función clásica. HMGN2 ha sido descrita típicamente como una proteína nuclear de unión a los dominios globulares de Histona 1 (gH1) y al parche ácido de nucleosomas, con función de regulación de la transcripción. La fosforilación en sus residuos Serina 24 y Serina 28 (Sp28 y Sp24) pertenecientes al “dominio de unión al nucleosoma (NBD)” lleva a su disociación del mismo Panel (C) Células leucémicas ( $1 \times 10^6$ ) fueron lisadas en tampón de siembra, corridas en SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF. Se realizó un ensayo de Western-Blot para HMGN2. Se muestra una autorradiografía obtenida donde se muestra que la banda correspondiente a HMGN2 corresponde al peso molecular de 17 kDa, por eso originalmente se la denominó HMG-17.

HMGN2 está compuesta por 89 aminoácidos y posee su punto isoeléctrico a  $\text{pH}=10$ , es decir, tiene carga neta positiva a  $\text{pH}$  fisiológico. Sus cargas positivas se neutralizan al fosforilarse el dominio de unión a nucleosoma, proceso en el que HMGN2 se disocia de la cromatina durante la mitosis [115-116].

Es relevante señalar que la distribución celular de HMGN2 no se limita al núcleo. En células del sistema inmune puede encontrarse en el citoplasma, y también secretarse hacia el espacio extracelular cuando los leucocitos son activados por IL-2, cumpliendo funciones antimicrobianas [117-118].

Dado que HMGN2 se identificó como proteína de unión a B3N en células de la línea DAUDI, era necesario demostrar que también se encontraba como proteína no integral de la membrana de células B de pacientes LLC. A tal fin, se obtuvieron sobrenadantes de elución ácida de 3 pacientes LLC que fueron tratados de la misma forma descrita para los sobrenadantes de células DAUDI, identificándose nuevamente HMGN2 como proteína de unión a B3N en la columna de afinidad. En conjunto, estos resultados señalaron a HMGN2 como candidato a ser el principal sitio de unión de B3 en células B leucémicas.

Para corroborar la interacción de B3N con HMGN2 se desarrolló un ensayo de ELISA, para lo cual se utilizó HMGN2 recombinante gentilmente cedida por el Dr James Kadonaga de la Universidad de San Diego en California (**Figura 15A**). Para este ensayo se sembraron alícuotas de HMGN2 (10 µg/ml) a microplacas de 96 pocillos y se incubó durante 18 hs a temperatura ambiente para permitir que la proteína se pegue al plástico. Luego de lavar la fracción no adherida y bloquear con albúmina bovina se agregaron concentraciones crecientes de B3N. La unión de B3N se reveló con un antisuero IgG policlonal específico para la proteína. Los detalles del protocolo se encuentran en la sección de Materiales y Métodos.



**Figura 15. Interacción de B3N con HMGN2 recombinante.** Panel (A) Electroforesis en gel de SDS-PAGE de HMGN2 recombinante y tinción con azul de coomassie. Panel (B) Interacción B3N-HMGN2 evidenciada por la técnica de ELISA. Se incubaron alícuotas de HMGN2 (10 µg/ml) o albúmina como control en microplacas de alta absorción (50 µl/pocillo) durante 24 hs a temperatura ambiente. Luego de lavar extensivamente y bloquear con albumina 3%, se agregaron alícuotas de B3N a las concentraciones indicadas. Se restaron los valores de pegado inespecífico para cada concentración de B3N usada. Los resultados de un experimento representativo se muestran como media  $\pm$  ES, n=3.

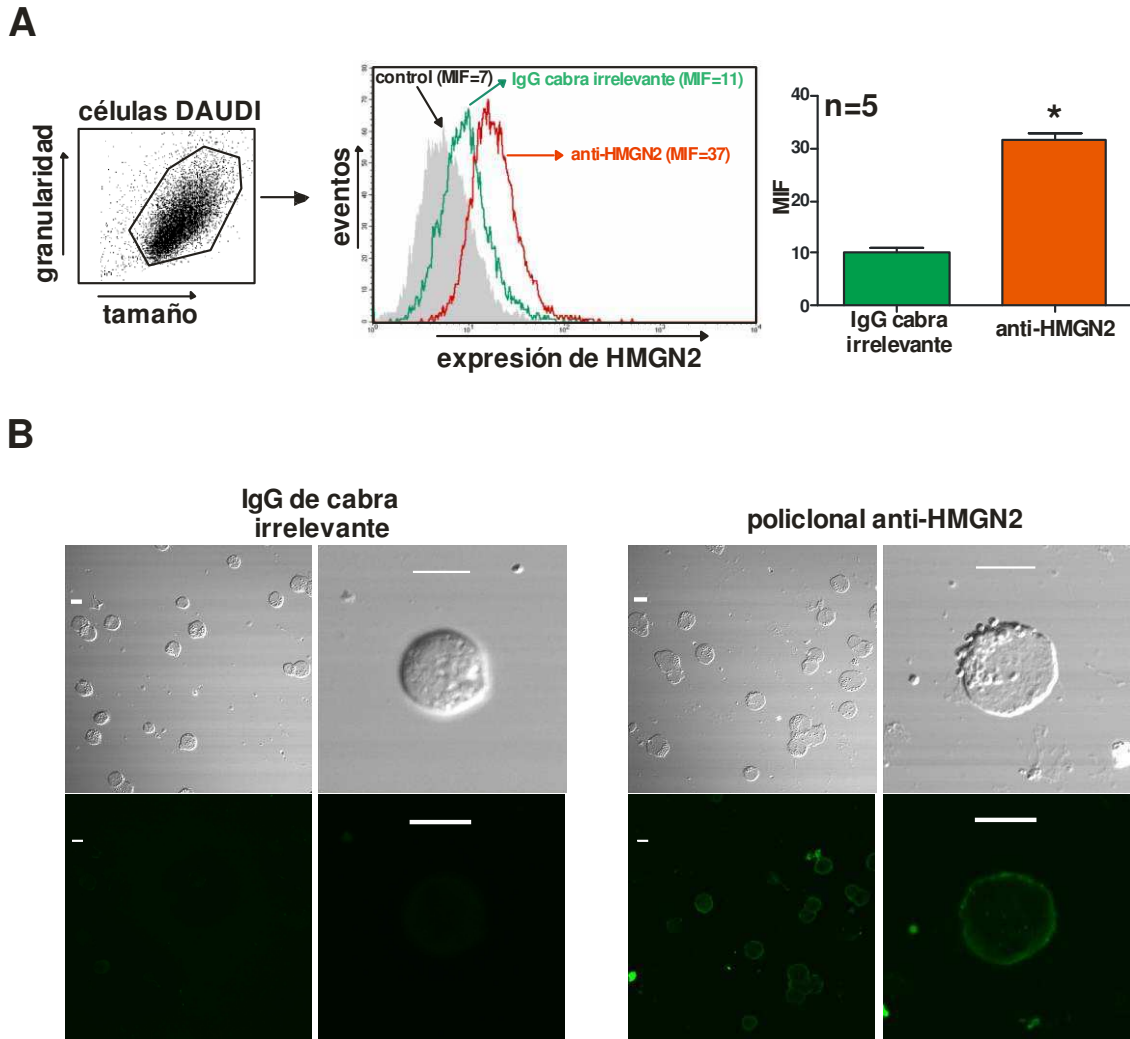
Como puede verse en la **Figura 15B**, B3N y HMGN2 son capaces de interactuar en las condiciones ensayadas.

## 5. Expresión de HMGN2 en la membrana plasmática de células leucémicas

Dado que la presencia de HMGN2 en la superficie celular no ha sido reportada hasta el momento, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la expresión de esta proteína en células B leucémicas utilizando un anticuerpo comercial de isotipo IgG producido en cabra. La determinación la realizamos por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia. Como control de isotipo elegimos una preparación de IgG de cabra de especificidad irrelevante. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 16**.

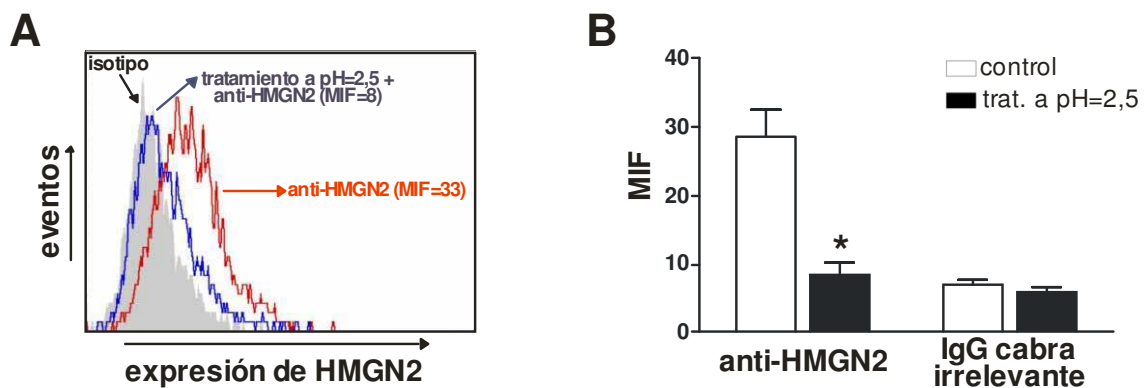
En las condiciones de marcación ensayadas y detalladas en Materiales y Métodos, detectamos mediante citometría de flujo que las células de la línea DAUDI frescas y sin permeabilizar expresan HMGN2 en su membrana plasmática (Panel A).

Puede corroborarse en las micrografías obtenidas mediante microscopía de fluorescencia que la marca detectada proviene de la membrana plasmática celular (Panel B).



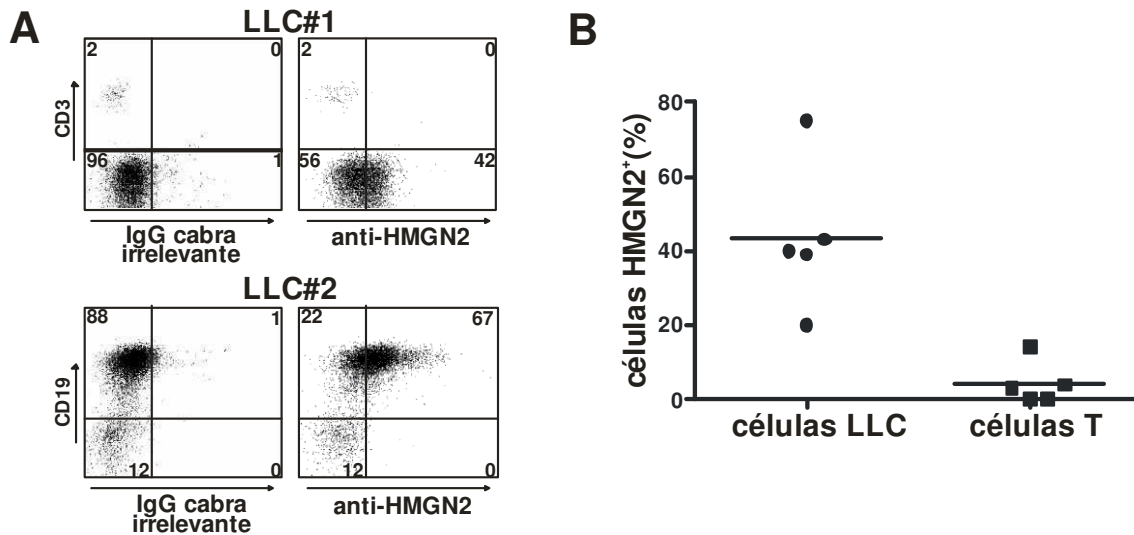
**Figura 16. Expresión de HMGN2 en membrana plasmática de células DAUDI.** Panel (A)  $3 \times 10^5$  células DAUDI fueron incubadas a  $4^\circ\text{C}$  en presencia de un anticuerpo comercial anti-HMGN2 desarrollado en cabra, o una mezcla irrelevante de IgG hecho en la misma especie a igual concentración. Luego de los lavados, se agregó un anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a FITC y se adquirió en el citómetro de flujo. Se muestran gráficos representativos de tamaño versus granularidad e histograma. Para el histograma gris (control) no se agregó ningún anticuerpo primario. En el gráfico de barras mostrado a la derecha se sometieron los datos obtenidos a análisis estadístico. Los resultados se muestran como media  $\pm$  ES ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ , Wilcoxon signed rank test). Panel (B) Micrografías representativas de lo observado al evaluar esta marcación mediante microscopía de fluorescencia (barras=10  $\mu\text{m}$ ).

Por otra parte, como se muestra en la **Figura 17**, la expresión de HMGN2 en la membrana se inhibe casi por completo al exponer a las células a la elución ácida (solución a pH 2,5), tratamiento que, como vimos, disminuye la unión de B3N. Este experimento fue muy importante a nuestro entender, ya que confirmó de forma directa lo que previamente hipotetizamos sobre HMGN2: que es una proteína periférica de la membrana plasmática de células leucémicas removible por pH=2,5.



**Figura 17. Expresión de HMGN2 en la membrana plasmática luego del tratamiento a pH=2,5.** Panel (A)  $5 \times 10^5$  células DAUDI fueron expuestas a pH=2,5 durante 30 segundos o PBS como control, y luego se desarrolló la marcación para HMGN2 tal como se detalla en la **Figura 15**. Se muestra un histograma representativo de citometría de flujo. La expresión de HMGN2 en células DAUDI (color rojo) disminuye cuando estas son previamente sometidas a pH=2,5 (en azul). En gris se muestra el control de isotipo. Panel (B) Se muestra la estadística correspondiente a media de intensidad de fluorescencia (MIF) para el anti-HMGN2 o para la IgG irrelevante tratados o no a pH=2,5. Los resultados se muestran como media  $\pm$  ES ( $p < 0,05$ ;  $n=3$ , Mann Withney test)

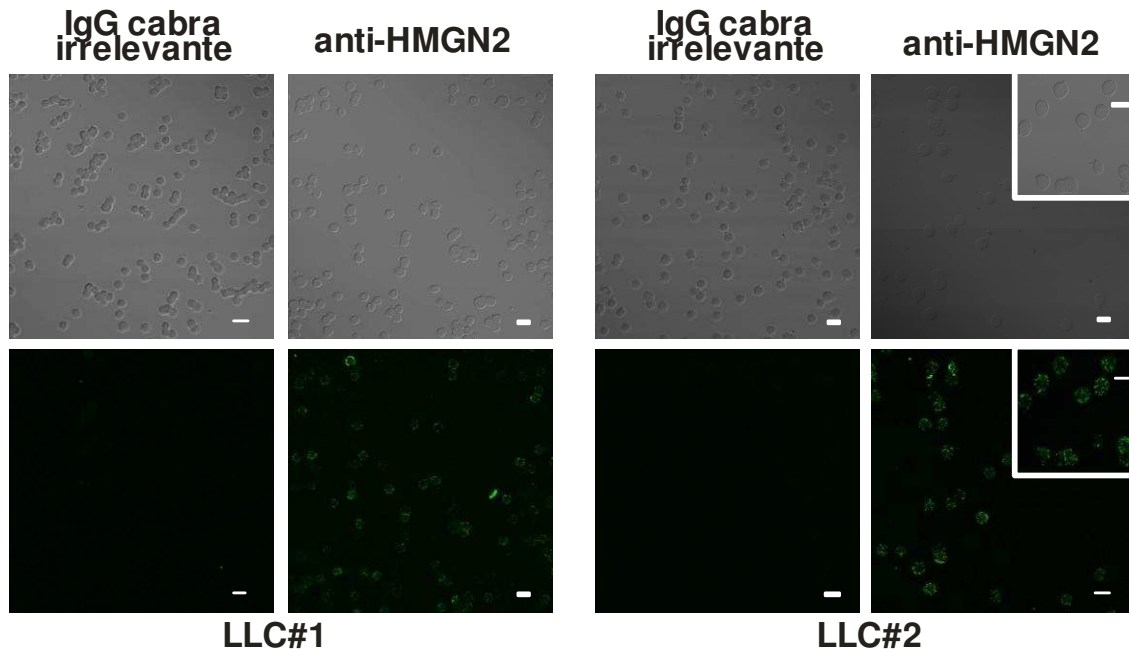
Al evaluar la expresión de HMGN2 como proteína de membrana celular en pacientes LLC mediante citometría de flujo, obtuvimos los resultados que se muestran en la **Figura 18**. Puede observarse que HMGN2 se expresa en las células B leucémicas de los pacientes LLC, pero no en sus linfocitos T. Teniendo en cuenta que los linfocitos T no son capaces de unir B3 [81], estos resultados apoyan fuertemente que HMGN2 constituye el principal sitio de unión de B3 en las células B leucémicas.



**Figura 18. Expresión de HMGN2 en membrana plasmática de células leucémicas de pacientes LLC.** Panel (A)  $3 \times 10^5$  CMT de pacientes LLC fueron marcadas para evaluar expresión de HMGN2 en superficie tal como se detalla para el caso de las células DAUDI en la **Figura 15**. Se muestran los gráficos de puntos obtenidos a partir del análisis por citometría de flujo correspondientes a 2 pacientes LLC con distinta proporción de células leucémicas. El paciente LLC#1 fue marcado para evaluar la expresión de HMGN2 y se agregó el anticuerpo anti-CD3 para discriminar sus células T. En el paciente LLC#2, en cambio, se discriminaron las células neoplásicas con un anticuerpo anti-CD19. En ambos casos se observa un corrimiento indicativo de expresión de HMGN2 para las células leucémicas y no para los linfocitos T. Panel (B) Valores de proporción de células B tumorales y células T que expresan HMGN2 en el grupo de muestras evaluadas, donde cada punto representa a un paciente LLC (n=5).

Para confirmar que la fluorescencia detectada en células LLC frescas marcadas con el anticuerpo específico para HMGN2 proviene de la membrana plasmática celular, utilizamos la técnica de microscopía de fluorescencia confocal. Desarrollamos el mismo protocolo de marcación para HMGN2 previamente descrito en células DAUDI, trabajando con CMT de dos pacientes LLC de alto porcentaje de células leucémicas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 19**.





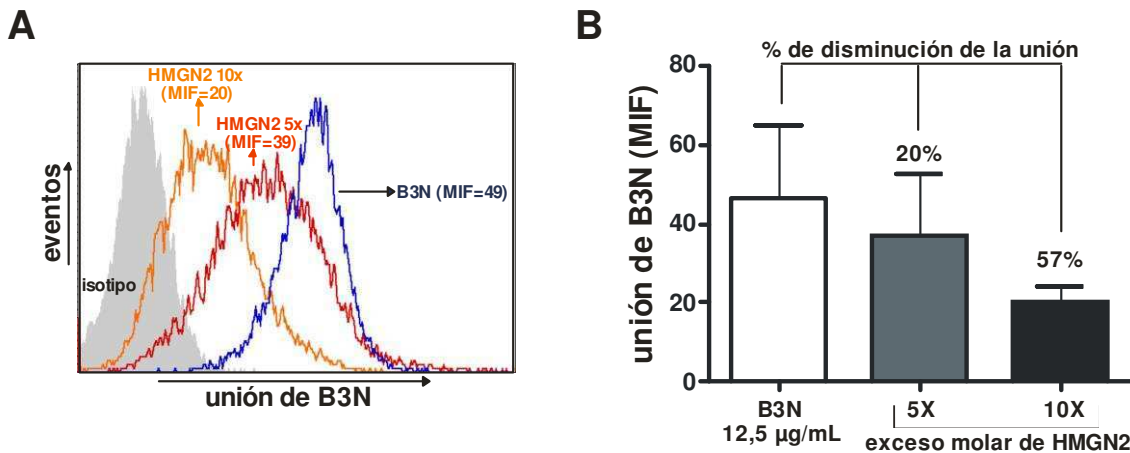
**Figura 19. Expresión de HMGN2 en membrana plasmática de células LLC.** CMT (> 95% células leucémicas) provenientes de pacientes LLC fueron marcadas para detectar la presencia de HMGN2 en membrana plasmática, siguiendo el protocolo descrito en la **Figura 16**. Los paneles superiores muestran las micrografías obtenidas por contraste de fase y los paneles inferiores muestran la expresión de HMGN2 por microscopía de fluorescencia (barras=10  $\mu$ m). Se muestran los resultados obtenidos con muestras de dos pacientes LLC.

Este conjunto de resultados demuestra la presencia de HMGN2 en la membrana externa de las células B leucémicas de los pacientes LLC.

## 6. Interacción B3N-HMGN2 en la membrana de las células B leucémicas

Una vez confirmada la expresión de HMGN2 en la membrana de las células B leucémicas y con el objetivo de demostrar que se trata del sitio de unión de B3N a la membrana, evaluamos si HMGN2 soluble es capaz de desplazar la unión de B3N. A tal fin utilizamos B3N a una concentración de 12,5  $\mu$ g/ml y HMGN2 a una molaridad 5 o 10 veces en exceso. La incubación de ambas proteínas se llevó a cabo durante 20 minutos a temperatura ambiente y luego la mezcla proteica se agregó a las células de la línea DAUDI. Como se observa en la **Figura 20**, la preincubación de B3N con HMGN2 en exceso disminuyó los niveles de unión, medida como media de intensidad de

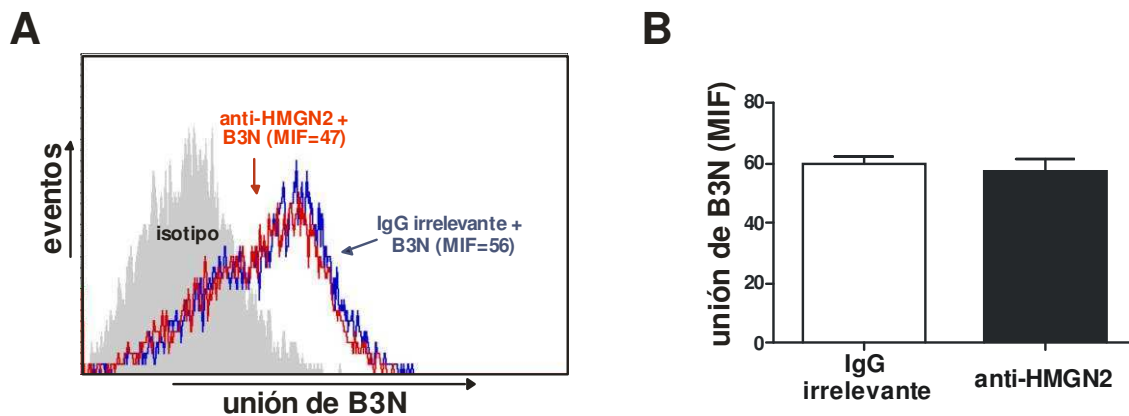
fluorescencia, de B3N a las células DAUDI. Como era de esperarse, la disminución fue más evidente a mayor concentración de HMGN2.



**Figura 20. Modificación de la unión de B3N a células de la línea DAUDI en ensayos de desplazamiento por HMGN2 soluble.** Se preincubó B3N con HMGN2 en exceso molar de 5X o 10X, durante 20 minutos a temperatura ambiente, para luego agregar la mezcla proteica a las células DAUDI ( $5 \times 10^5/50 \mu\text{l}$  de PBS). Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la unión de B3N se reveló usando un anticuerpo específico hecho en ratón y anti-IgG de ratón marcada con FITC. Los datos se analizaron por citometría de flujo. Panel (A) Se muestran histogramas representativos, indicando la media de intensidad de fluorescencia (MIF) para cada caso. Panel (B) Se grafica la unión de B3N como MIF y se indica el porcentaje de disminución de la MIF en exceso de HMGN2. Los resultados se muestran como media  $\pm$  ES ( $n=2$ ).

Por otro lado, intentamos bloquear la unión de B3N a la membrana utilizando un anticuerpo IgG anti-HMGN2, el mismo con el que demostramos la expresión de esta proteína en la superficie celular. Para ello, las células DAUDI se preincubaron con el anticuerpo anti-HMGN2 o IgG de cabra como control, se lavaron 2 veces y se agregó B3N a una concentración de  $25 \mu\text{g/ml}$ . La unión se reveló utilizando el suero policlonal anti-B3N y luego el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a FITC, verificando previamente que no interfirieran reaccionando de forma cruzada los distintos anticuerpos usados en el protocolo (datos no mostrados). Como se muestra en la **Figura 21**, la preincubación con este anticuerpo anti-HMGN2 no logró bloquear la unión de B3N a la

membrana. Según las especificaciones del proveedor, este anticuerpo policlonal reconoce un epítopo de la porción C-terminal de HMGN2. Será necesario evaluar otros anticuerpos dirigidos contra porciones diferentes de HMGN2 (por ejemplo, el comercializado por LSBio, Ac LS-B5250 dirigido contra el fragmento N-terminal) para determinar si es o no posible bloquear la unión de B3N a la membrana de la célula LLC.



**Figura 21. Efecto del anticuerpo anti-HMGN2 sobre la unión de B3N.** Células DAUDI ( $3 \times 10^5$ /tubo) fueron expuestas al anticuerpo policlonal anti-HMGN2 desarrollado en cabra, a una mezcla de IgG irrelevante de la misma especie o PBS durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Luego de lavar en PBS BSA 0,5%, se realizó el ensayo de unión de B3N y se pasaron las muestras por el citómetro de flujo. Panel (A) Se muestra un histograma representativo de los resultados obtenidos en estos ensayos donde se aclara la media de intensidad de fluorescencia (MIF) indicativo de unión de B3N para cada caso. La unión de B3N al pre incubar en PBS fue la misma que para el caso de ambos anticuerpos (datos no mostrados). Panel (B) Se muestran los datos del conjunto de experimentos realizados como media de las  $\text{MIF} \pm \text{ES}$  ( $n=5$ ).

En su conjunto, los resultados obtenidos en esta primera parte demuestran que la unión de B3 a las células B leucémicas a través de su porción N-terminal dependen, en gran parte, de la expresión la proteína HMGN2.

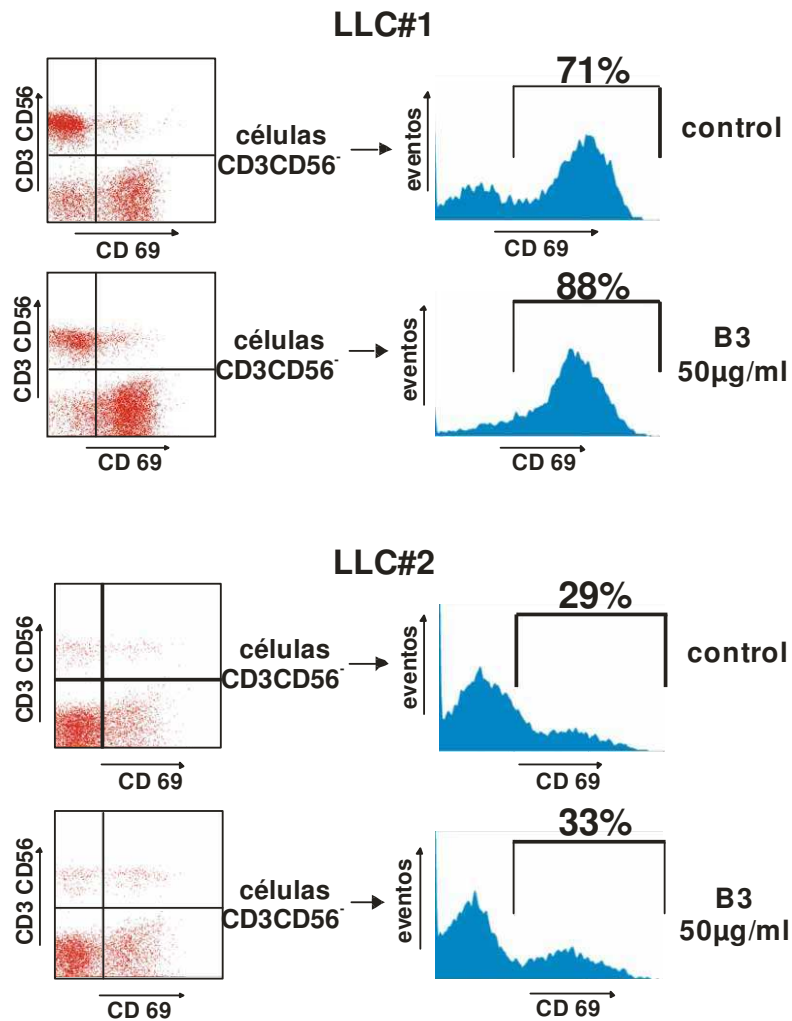
## **PARTE 2**

**Interacción de B3 con la célula leucémica. Modulación de su  
sitio de unión**

### 1. B3 aumenta la expresión de CD69 en células LLC

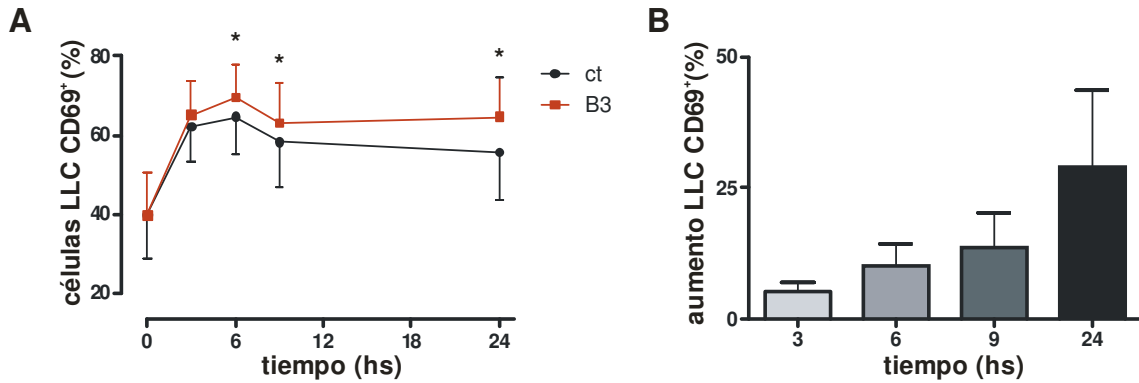
Como se señalara en la Introducción, nuestro grupo demostró que la unión de B3 a las células leucémicas conduce a su posterior endocitosis, procesamiento y presentación a linfocitos T autorreactivos. Sin embargo, desconocemos si la unión de B3 es capaz de modificar el estado de activación de las células LLC. Para evaluar esta posibilidad decidimos investigar si B3 modula la expresión del antígeno de membrana CD69. Esta molécula es particularmente interesante porque, además de ser un marcador de activación temprano de distintas poblaciones leucocitarias, se ha propuesto como marcador de progresión de la LLC[53-54]. En esta serie de experimentos usamos como ligando la molécula completa de B3 en lugar de B3N recombinante, para descartar cualquier potencial contaminación de la proteína con LPS u otros patrones moleculares de las bacterias empleadas en la producción de B3, lo que podría repercutir en el aumento de los marcadores de activación que evaluamos.

Para la obtención de B3 en forma soluble se desarrolló un protocolo de purificación previamente descrito [105] que se detalla en Materiales y Métodos. Luego de verificar la pureza del ligando y la ausencia de citotoxicidad por posibles remanentes del detergente empleado, incubamos células mononucleares totales de pacientes LLC con B3 durante 24 horas y evaluamos la expresión de CD69 en las células leucémicas (población linfocitaria CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>). Dado que la expresión de CD69 en células LLC es muy heterogénea [53], decidimos realizar este primer ensayo con muestras de dos pacientes que presentaran porcentajes iniciales de células leucémicas CD69<sup>+</sup> bien diferenciados. Como puede verse en la **Figura 22**, B3 aumentó el porcentaje de células LLC que expresan CD69 en ambos casos.



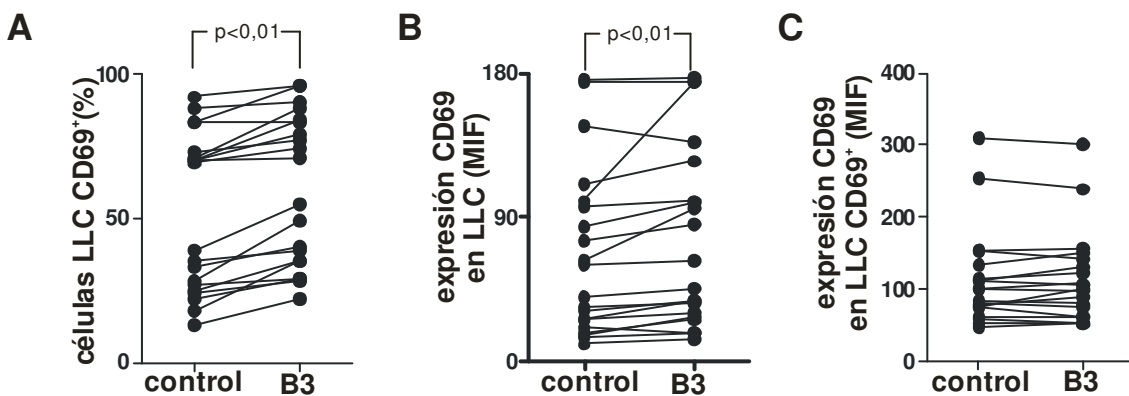
**Figura 22. Aumento de la proporción de células LLC CD69<sup>+</sup> por B3.** CMT ( $3 \times 10^6$ /ml) de pacientes LLC se cultivaron en presencia o no de B3 (50µg/ml) durante 24 hs. La expresión de CD69 en células leucémicas se determinó por citometría de flujo, considerando las células negativas para CD3 y CD56. Se muestran resultados de dos pacientes con niveles de expresión basal de CD69 diferentes en sus células leucémicas (71% vs 29%).

Cuando analizamos la cinética de expresión de CD69 en cultivo en ausencia de B3, observamos que hay un aumento marcado durante las primeras 3 horas que luego se estabiliza y desciende levemente a las 24 horas (**Figura 23A**). Cuando las células son expuestas a B3, el porcentaje de células LLC positivas para CD69 es mayor estadísticamente a las 6 horas de cultivo y se mantiene por encima de los niveles controles de ahí en más (**Figura 23**).



**Figura 23. Cinética del efecto de B3 sobre la expresión de CD69.** Panel (A) Las CMT de pacientes LLC ( $3 \times 10^6/\text{ml}$ ) se cultivaron en presencia o no de B3 ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) por los tiempos indicados en la figura y se determinó mediante citometría de flujo la expresión de CD69 en las células leucémicas. Las diferencias encontradas fueron significativas a partir de las 6 hs (\*  $p < 0,05$ ; Wilcoxon signed rank test,  $n=6$ ). Panel (B) Gráfico de barras mostrando el porcentaje de aumento inducido por B3 a los distintos tiempos ensayados, donde se evidencia que a 24 hs las diferencias son mayores. Los resultados se muestran como media  $\pm$  ES ( $n=6$ ).

Teniendo en cuenta la inducción espontánea de CD69 en el cultivo y la variación en los niveles de expresión entre pacientes, decidimos determinar el efecto de B3 en veinte nuevas muestras LLC a fin de corroborar nuestras observaciones iniciales. En la **Figura 24** se muestran los resultados obtenidos al evaluar el porcentaje de células LLC CD69<sup>+</sup> y la media de intensidad de fluorescencia de CD69 en las células leucémicas luego del cultivo por 24 horas en presencia o no de B3.



**Figura 24. Efecto de B3 en la expresión de CD69 evaluado para una cohorte de 20 pacientes LLC.** Las CMT de los pacientes ( $3 \times 10^6/\text{ml}$ ) fueron incubadas en presencia de B3 a  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  durante 24 horas y se evaluó mediante citometría de flujo la expresión de CD69. Cada punto corresponde a un paciente unido con una línea para cada condición. Panel (A) B3 aumenta el porcentaje de células leucémicas que expresan CD69 al tiempo estudiado ( $n=20$ ,  $p < 0,01$ ; Wilcoxon signed rank test). Panel (B) B3 aumenta la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de CD69 en las células leucémicas ( $n=20$ ;  $p < 0,01$ ; Wilcoxon signed rank test). Panel (C) B3 no incrementa aún más la expresión de CD69 en las células LLC basalmente positivas.

En primer lugar puede observarse la enorme heterogeneidad en la expresión de CD69 entre las muestras analizadas. Los datos de la **Tabla 2** muestran que la mayor expresión de CD69 en las células controles tiende a observarse en los pacientes en estadios más avanzados de la enfermedad (Binet B o C), mayor linfocitosis y expresión del marcador de mal pronóstico, CD38. El cultivo con B3 aumentó la expresión de CD69 en la gran mayoría de los casos evaluados, siendo más evidente cuando los porcentajes de expresión son más bajos (Pacientes 1 a 10). Es decir que el grueso de los pacientes LLC con baja expresión de CD69 y mayor respuesta a B3 son pacientes con enfermedad indolente y de buen pronóstico.

Pt	Sexo	Edad	Leucocitos x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	Estadio Binet	CD5CD19 <sup>+</sup> (%)	CD38 <sup>+</sup> (%)	CD19CD69 <sup>+</sup> control	CD19CD69 <sup>+</sup> B3	% aumento
1	F	82	13	A	54	11	13	22	70
2	M	79	26	A	86	2	18	35	95
3	M	77	27	A	94	5	22	29	32
4	F	73	53	A	84	1	24	28	17
5	F	76	21	A	66	3	25	35	40
6	F	81	27	A	82	1	29	33	13
7	M	70	13	A	66	88	28	49	75
8	M	83	78	A	91	1	33	40	21
9	M	80	37	B	96	1	35	39	11
10	F	75	22	A	59	8	39	55	41
11	M	74	180	B	98	0,2	69	74	7
12	M	78	97	C	92	50	70	79	13
13	F	64	45	A	79	99	70	71	1
14	M	83	60	B	89	99	70	84	20
15	F	76	50	B	89	0	73	77	5
16	M	67	17	A	94	1	83	96	16
17	M	55	53	A	75	80	83	83	0
18	F	57	125	C	77	40	88	90	2
19	F	82	23	A	76	1	92	96	5
20	F	81	172	C	94	1	95	96	1

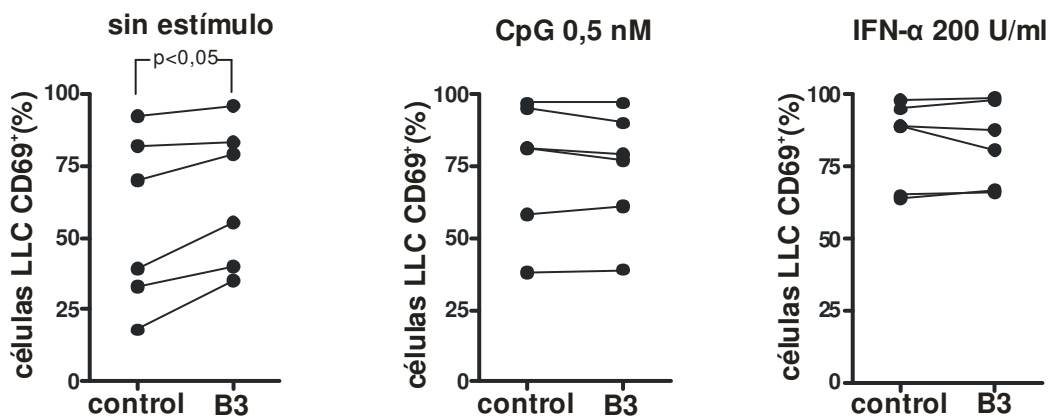
**Tabla 2. Características clínicas y biológicas de los pacientes LLC evaluados.**



Queda por corroborar en una cohorte mayor de pacientes si B3 aumenta el porcentaje de células que expresan CD69 preferentemente en pacientes de enfermedad indolente, o si lo hace en pacientes que presentan porcentajes bajos de células LLC CD69<sup>+</sup> cualquiera sea el estadio de la enfermedad.

## 2. B3 no modifica la expresión de CD69 inducida por IFN- $\alpha$ o CpG

La expresión de CD69 puede ser inducida en linfocitos B normales por diferentes estímulos [119-122]. Nosotros encontramos que el IFN- $\alpha$  y los oligonucleótidos CpG aumentan los niveles basales de CD69 en células LLC. Para determinar si B3 puede incrementar la expresión de CD69 inducida por concentraciones subóptimas de estos estímulos, incubamos células LLC durante 24 horas con IFN- $\alpha$  (200 U/ml), CpG (0,5 nM) solos o agregando simultáneamente B3 a 50  $\mu$ g/ml. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 25**.

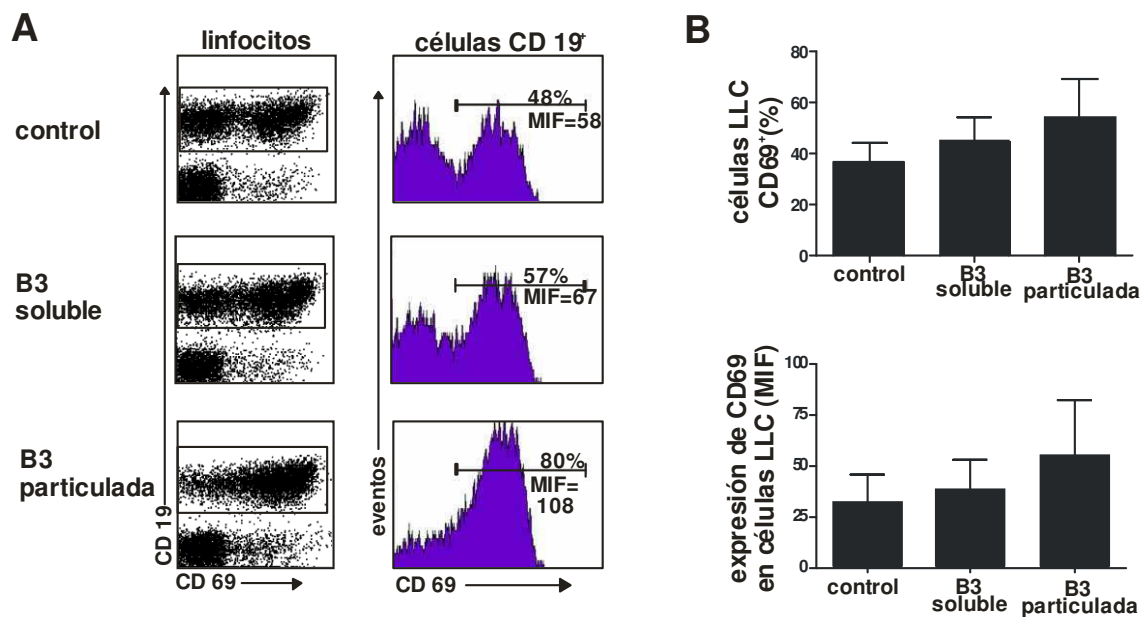


**Figura 25. Efecto de B3 sobre la expresión de CD69 en presencia de IFN- $\alpha$  o CpG.**  $5 \times 10^5$  CMT de pacientes LLC fueron incubadas durante 24 horas con concentraciones sub-óptimas de CpG (0,5 nM) e IFN- $\alpha$  (200 U/ml) en presencia o no de B3 (50  $\mu$ g/ml). Se evaluó la expresión de CD69 en las células leucémicas mediante citometría de flujo. Se muestran los porcentajes de células leucémicas positivas para CD69. Cada punto corresponde a un paciente unido con una línea para cada condición (n=6).

Como se observa en la **Figura 25**, B3 no mostró efectos aditivos sobre la expresión de CD69 inducida por cualquiera de los dos estímulos estudiados.

### 3. B3 particulada induce mayor expresión de CD69 que B3 soluble

La activación de los linfocitos, tanto T como B, depende del nivel de entrecruzamiento de los receptores de membrana. Así por ejemplo, los antígenos monovalentes en solución son incapaces de activar a los linfocitos B, aún cuando interaccionen con las porciones Fab de la Ig de membrana. Dado que B3 en forma soluble sólo induce niveles bajos de CD69 en las células LLC, decidimos acoplarla a microesferas de poliestireno tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos para convertirla en un estímulo particulado que, en teoría, fuese capaz de inducir mayor entrecruzamiento de su sitio de unión sobre la membrana. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 26**.



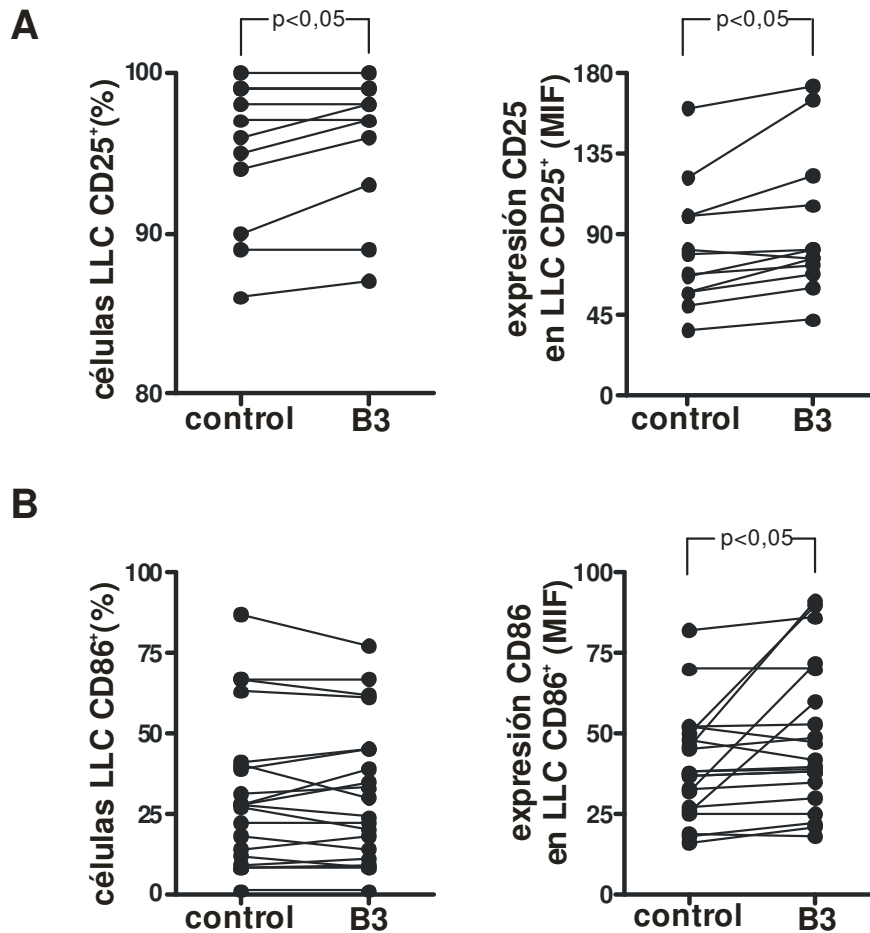
**Figura 26. Aumento en la expresión de CD69 al incubar con B3 particulada.** CMT ( $5 \times 10^5$ ) de pacientes LLC fueron incubadas durante 24 horas en presencia de B3 soluble (50  $\mu\text{g/ml}$ ) o B3 particulada acoplada a microesferas de poliestireno, agregadas en relación aproximada de 10 microesferas/célula. Como control se agregó albúmina acoplada a microesferas en la misma cantidad que para el caso de aquellas acopladas a B3. Se evaluó la expresión de CD69 en las células leucémicas mediante citometría de flujo. Panel (A) Gráficos de puntos e histogramas de fluorescencia mostrando la expresión de CD69 en las células leucémicas de un paciente representativo. Panel (B) Porcentaje de células leucémicas CD69<sup>+</sup> y media de intensidad de fluorescencia de CD69. Los resultados se muestran como media  $\pm$  ES, n=3.

Como puede observarse en los tres pacientes evaluados, la incubación con B3 particulada aumentó el porcentaje de células leucémicas que expresan CD69 como así también la media de intensidad de fluorescencia.

#### **4. Efecto de B3 en la expresión de CD25 y CD86**

Por último, evaluamos la capacidad de B3 de inducir la expresión de dos moléculas claves en la activación de las células LLC: CD25, receptor de alta afinidad para IL-2 y CD86, molécula coestimuladora necesaria para la presentación antigénica. En estos experimentos las células leucémicas se cultivaron durante 48 horas con B3 (50 µg/ml) en lugar de 24 horas ya que la inducción de estos marcadores es más tardía en comparación con CD69.

Como puede verse en la **Figura 27**, encontramos que B3 incrementa de manera significativa el porcentaje de células leucémicas que expresan CD25 como así también el nivel de expresión evaluado como media de intensidad de fluorescencia, tanto en el conjunto de células leucémicas (no mostrado) como en la población CD25<sup>+</sup>. En relación a CD86, no encontramos diferencias significativas en los porcentajes de células LLC que expresan este marcador, pero sí en el nivel de expresión de las células leucémicas que expresan CD86<sup>+</sup>.



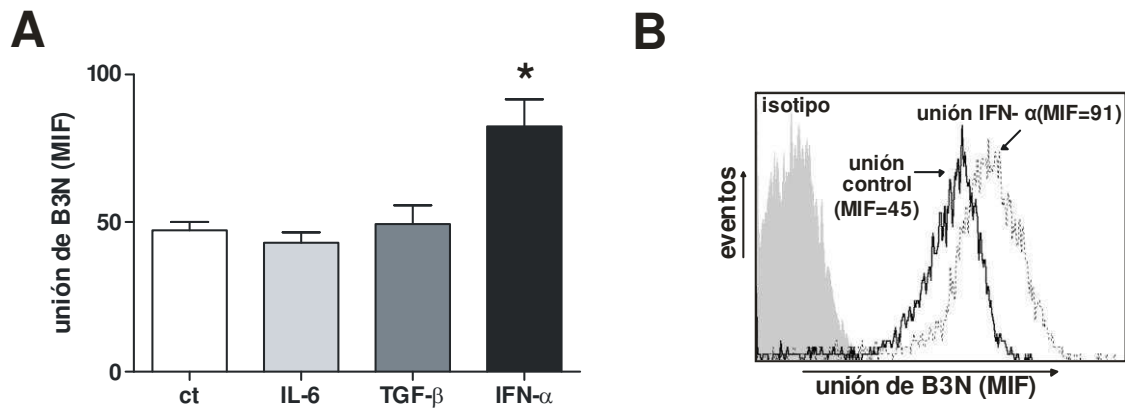
**Figura 27. Aumento en la expresión de CD25 y CD86 inducido por B3.** Se incubaron  $3 \times 10^6$  CMT/ml de pacientes LLC con B3 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 48 horas y se evaluó la expresión de ambos marcadores en las células leucémicas por citometría de flujo. Cada punto corresponde a un paciente unido con una línea para cada condición. Panel (A) Porcentaje de células leucémicas CD25<sup>+</sup> y expresión de CD25 como media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador en células LLC CD25<sup>+</sup> incubadas o no con B3 (n=12; \*  $p < 0,05$ ; Wilcoxon signed rank test). Panel (B) Porcentaje de células leucémicas CD86<sup>+</sup> y expresión de CD86 como media de intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador en células LLC CD86<sup>+</sup> incubadas o no con B3 (n=20; \*  $p < 0,05$ ; Wilcoxon signed rank test).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que B3 es capaz de aumentar, de manera modesta pero consistente, la expresión de marcadores de activación de las células LLC. Queda por evaluarse en futuros experimentos el papel de HMGN2 en los efectos activadores de B3 sobre las células leucémicas.

## 5. Modulación de la unión de B3 a células leucémicas

Como siguiente objetivo nos propusimos investigar si la unión de B3 a las células leucémicas puede ser modulada por factores potencialmente presentes en el microambiente esplénico, sitio de encuentro entre las células LLC y los antígenos eritrocitarios. Entre las distintas citoquinas capaces de modular la funcionalidad de las células LLC, decidimos evaluar el efecto de IL-6, TGF- $\beta$  e Interferón- $\alpha$ . IL-6 y TGF- $\beta$  son citoquinas que se encuentran elevadas en el plasma de los pacientes LLC y que pueden ser secretadas por las propias células leucémicas [30, 55, 123]. En células B normales IL-6 induce la estimulación y diferenciación, mientras que TGF- $\beta$  es una citoquina que, en general, disminuye la activación celular [56, 124]. En relación al IFN- $\alpha$ , nuestra elección se debió fundamentalmente a dos motivos. Por un lado el IFN- $\alpha$  se produce en altos niveles durante las infecciones virales, las que son frecuentes en los pacientes LLC debido a la inmunosupresión que los caracteriza y que empeora con los tratamientos quimioterápicos [28, 30-31]. Por otro lado, se ha reportado la aparición de AHA asociada al tratamiento con IFN- $\alpha$ , ya sea en pacientes con desórdenes oncohematológicos o infectados con el virus de la hepatitis C [61, 63].

Para determinar si la exposición a IL-6, TGF- $\beta$  o IFN- $\alpha$  regula la capacidad de las células LLC de unir B3, se llevaron a cabo cultivos por 48 horas de células mononucleares de sangre periférica con cada una de las citoquinas a concentraciones con las que se habían reportado efectos in vitro. Al término del cultivo, se evaluó la capacidad de las células LLC para unir B3, utilizando en este caso B3N recombinante.



**Figura 28. Efecto de las citoquinas IL-6, TGF-β e IFN-α en la capacidad de las células B leucémicas para unir B3N.** CMT de pacientes LLC ( $3 \times 10^6/\text{ml}$ ) fueron incubadas durante 48 hs con las citoquinas IL-6 o TGF-β usadas a 40 ng/ml, o IFN-α a 450 U/ml. Luego se evaluó la unión de B3N (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) expresada como media de intensidad de fluorescencia (MIF). Panel (A) Se detectó un aumento estadísticamente significativo en la unión para el tratamiento con IFN-α, respecto de la unión control sin tratamiento. Los resultados se muestran como media de las MIF  $\pm$  ES (\* $p < 0,05$ ;  $n = 8$ , Friedman test, Dunns multiple comparison). Panel (B) Se muestran histogramas representativos de la unión de B3N a células leucémicas tratadas o no con con IFN-α.

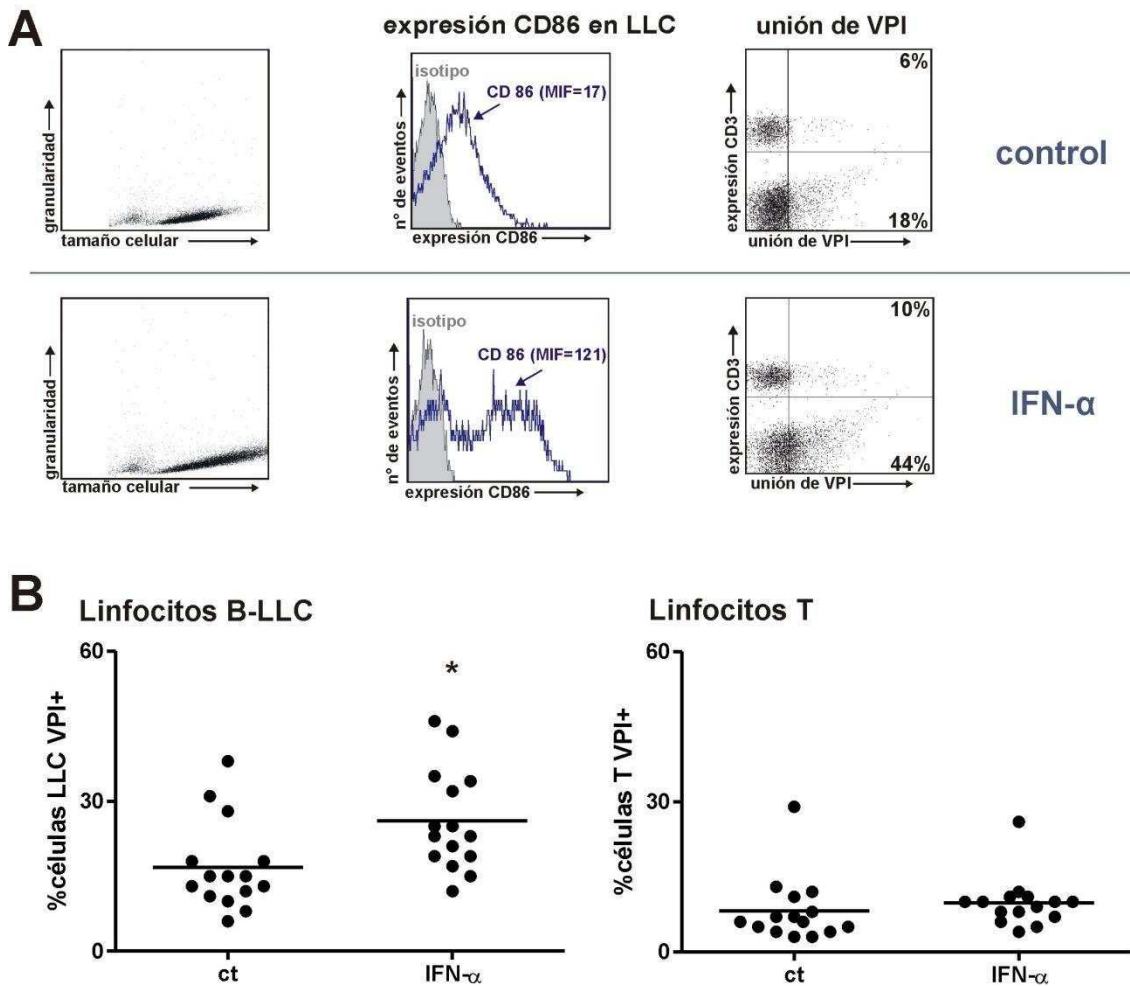
Los resultados de la **Figura 28** muestran que no se encontraron diferencias en los niveles de unión de B3N entre las células LLC incubadas o no con IL-6 o TGF-β. Sin embargo, las células que fueron cultivadas con IFN-α mostraron un incremento significativo en su capacidad para unir el ligando, lo que indica que el sitio de unión de B3 en la membrana de la célula LLC puede ser regulado por señales del microambiente celular.

## 6. INF-α incrementa la unión de vesículas eritrocitarias a las células LLC

El aumento de la unión de B3 soluble inducido por el IFN-α nos alentó a investigar si esta citoquina también era capaz de incrementar la capacidad de las células LLC para unir vesículas eritrocitarias. Como fuera señalado anteriormente, nosotros describimos que las células leucémicas unen vesículas (también llamadas exosomas) eritrocitarias de polaridad invertida (VPI) a través del dominio N-terminal de B3 [81]. Estas vesículas que se encuentran normalmente en la circulación constituyen la forma

más probable de interacción de B3 con las células LLC in vivo, ya que por tratarse de una proteína integral de membrana, B3 se mantiene unida a la bicapa lipídica. De hecho, se ha demostrado que B3 es uno de los principales componentes de las VPI [125-127].

Para evaluar si el cultivo con IFN- $\alpha$  aumenta la unión de las VPI a las células LLC, se marcaron glóbulos rojos humanos con el colorante fluorescente CFDA y posteriormente se obtuvieron las VPI mediante el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Una vez verificada la correcta polaridad de las VPI y su nivel de fluorescencia, se incubaron durante 2 horas con células mononucleares de pacientes LLC que habían sido cultivadas por 48 horas con o sin INF- $\alpha$ . El aumento en el tamaño celular y en los niveles de expresión de CD86 inducido por la citoquina indicaron que las células leucémicas fueron capaces de responder a la estimulación (**Figura 29A**). Finalmente se midió la incorporación de fluorescencia en las células T (no malignas) y en las células B leucémicas, discriminando ambas poblaciones mediante marcación con un anticuerpo anti-CD3. Para este estudio se trabajó con un total de 15 pacientes LLC.



**Figura 29. Unión de vesículas eritrocitarias a células leucémicas pretratadas con IFN- $\alpha$ .** CMT ( $5 \times 10^5$ ) de pacientes LLC fueron incubadas con IFN- $\alpha$  a 450 U/ml durante 48 horas, y luego expuestas frente a VPI marcadas durante 2 horas a 37°C. Luego de los lavados en PBS BSA 0,5%, se marcaron las CMT con CD19 y CD5 para discriminar las células leucémicas y con CD3 para estudiar las células T. Se evaluó mediante citometría de flujo. Panel (A) Verificación de la activación de las células LLC utilizando IFN- $\alpha$  mediante aumento en el tamaño celular y en la expresión de CD86. A la derecha, gráfico de puntos representativo de citometría de flujo mostrando un paciente donde sus células B-LLC unen mayor cantidad de VPI que sus células T. Panel (B) Gráficos de porcentaje de células que unen las VPI incluyendo los 15 pacientes utilizados para este estudio, donde cada punto representa a un paciente. Sólo en las células leucémicas hay un aumento significativo en la unión de VPI al tratar con IFN- $\alpha$  ( $n=15$ ;  $p<0,01$ ; Wilcoxon signed rank test).

Los resultados de la **Figura 29** muestran, en primer lugar, que las células LLC presentan mayor capacidad de unir VPI que los linfocitos T de los pacientes, los cuales son incapaces de reconocer a B3 (Panel A). Más importante aún, sólo el clon leucémico fue capaz de responder a la estimulación por IFN- $\alpha$  incrementando su capacidad para unir a las VPI (Panel B). Por otra parte, las células LLC provenientes de los 15

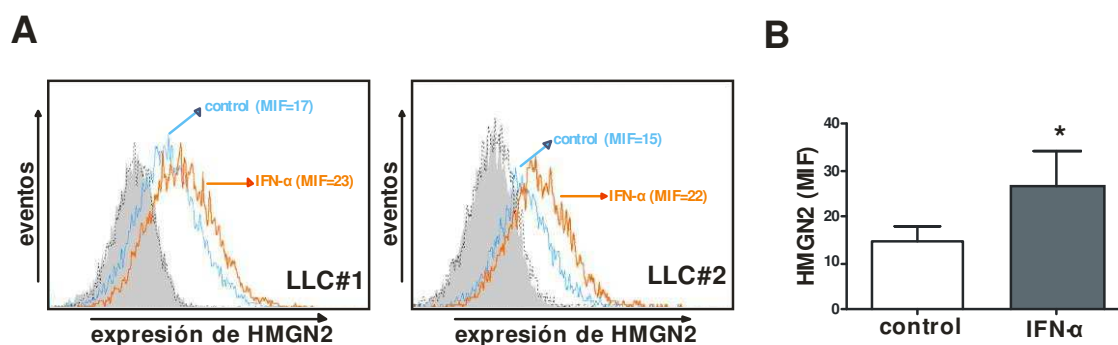


pacientes evaluados en el estudio mostraron distinta capacidad de unir VPI. Sin embargo, no encontramos evidencias de correlación entre una mayor capacidad de unión a las vesículas con estadios más avanzados de la enfermedad ni con expresión de marcadores de mal pronóstico (datos no mostrados). Vale mencionar que ninguno de estos pacientes había cursado con AHA hasta el momento del estudio.

## 7. Modulación de la expresión de HMGN2 por IFN- $\alpha$

Teniendo en cuenta los resultados de la primera parte de la tesis que mostraron que HMGN2 es el principal sitio de unión de B3, decidimos evaluar si el tratamiento de las células LLC con IFN- $\alpha$  era capaz de incrementar la expresión de HMGN2. Para ello trabajamos con células mononucleares totales de 5 pacientes LLC, que fueron incubadas durante 48 horas con IFN- $\alpha$  (450 U/ml). Respetamos así las condiciones utilizadas para los experimentos de regulación de la unión de B3 soluble y de las VPI a las células leucémicas. Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo se muestran en la

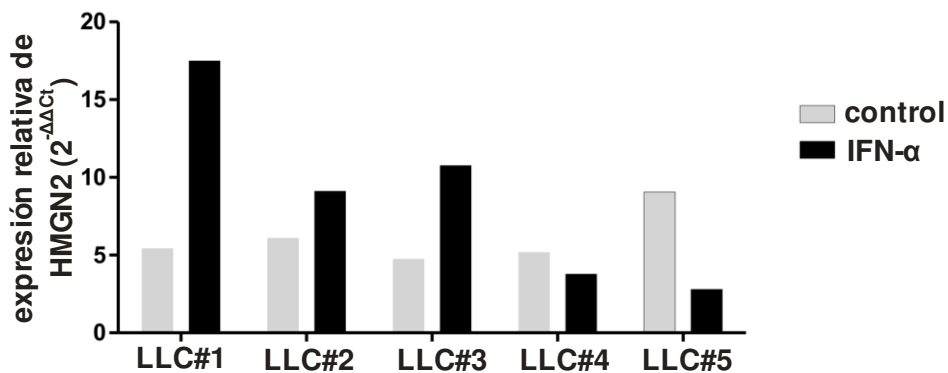
**Figura 30.**



**Figura 30. Aumento en la expresión de HMGN2 por estimulación con IFN- $\alpha$ .** CMT ( $5 \times 10^5$ ) de pacientes LLC fueron incubadas con IFN- $\alpha$  a 450 U/ml durante 48 horas, y luego se realizó la marcación para evaluar la expresión de HMGN2 en la superficie celular tal como se describió para la **Figura 18**. Panel (A) Se presentan histogramas representativos mostrando la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de expresión de HMGN2 en dos pacientes. En gris, el control de isotipo para la incubación control; y en línea punteada el control de isotipo para la incubación en presencia de IFN- $\alpha$ . En celeste y naranja la expresión de HMGN2, en ausencia o presencia de la citoquina respectivamente. Panel (B) Expresión de HMGN2 en células LLC incubadas con o sin IFN- $\alpha$ . Los resultados se muestran como media de las MIF  $\pm$  ES, n=5. (\* $p < 0,05$ ; Wilcoxon signed rank test).

Como puede verse, la exposición a IFN- $\alpha$  incrementó la expresión de HMGN2 en la membrana plasmática de las células LLC. Si bien el aumento fue moderado, las diferencias resultaron significativas al ser consistentes para el conjunto de pacientes analizados. Consideramos que estos datos son importantes ya que nos siguen aportando evidencias para confirmar que HMGN2 es el sitio de unión para Banda 3 en las células leucémicas.

Por último, investigamos si el IFN- $\alpha$  induce la síntesis de HMGN2 evaluando la expresión del ARNm por PCR cuantitativa. En este caso las muestras celulares altamente enriquecidas en células LLC se cultivaron con o sin IFN- $\alpha$  durante 24 horas, se extrajo el ARN total y se cuantificaron los niveles de expresión de HMGN2 como se detalla en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 31**.



**Figura 31. PCR cuantitativa evaluando la expresión de HMGN2 en células LLC estimuladas con IFN- $\alpha$ .** CMT ( $1 \times 10^6$ ) de 5 pacientes LLC fueron incubadas con IFN- $\alpha$  a 450 U/ml o control (solución fisiológica) durante 24 horas, se extrajo el ARN y luego se cuantificó mediante PCR los niveles de HMGN2 empleando el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  tal como se detalla en la sección de Materiales y Métodos. Se muestra la expresión relativa de HMGN2 para cada condición en los 5 pacientes estudiados.

Como puede verse, 3 de las 5 muestras evaluadas respondieron al IFN- $\alpha$  aumentando la expresión de HMGN2 (LLC#1-3), mientras que en una de las muestras (LLC#5) el IFN- $\alpha$  disminuyó la expresión de HMGN2. No tenemos una explicación

para estas diferencias entre pacientes y será necesario realizar el análisis en un número mayor de muestras. Asimismo, dado que no existen hasta el momento reportes sobre regulación de la transcripción de HMGN2, es nuestra intención ampliar el estudio a otras citoquinas relevantes en LLC.

## **DISCUSIÓN**

---

La asociación entre leucemia linfática crónica y anemia hemolítica autoinmune se conoce desde hace más de 50 años, pero hasta el momento no están claros cuáles son los mecanismos celulares responsables de esta asociación. Nuestro grupo de trabajo demostró que las células LLC pueden unir a la proteína eritrocitaria B3, endocitarla y activar linfocitos T específicos, proceso capaz de desencadenar la respuesta autoinmune [81]. La unión de B3 a las células leucémicas no ocurre a través de los receptores descritos para esta proteína: el receptor scavenger CD36 y la fosfoproteína nucleolina. Nosotros encontramos que las células B leucémicas reconocen la porción N-terminal de B3. El objetivo principal del proyecto de esta tesis fue identificar el sitio de unión de B3 en la membrana de las células LLC.

Nuestros intentos iniciales de co-inmunoprecipitación de las proteínas integrales de la membrana eritrocitaria no dieron los resultados esperados debido, probablemente, a la necesidad de usar detergentes. Si bien éstos representan una de las herramientas más útiles para solubilizar proteínas integrales de membrana [128], los detergentes exhiben un comportamiento complejo que depende no sólo de sus propiedades físicoquímicas, sino también de su concentración, y de la presencia y tipo de proteínas y lípidos que se encuentren en el medio [110]. En ciertos casos los detergentes pueden causar modificaciones en la estructura terciaria de las proteínas que alteran su capacidad de interacción con otras moléculas [108]. Cambios conformacionales inducidos por el detergente podrían explicar la imposibilidad de co-inmunoprecipitar el sitio de unión de B3N en la membrana de las células B leucémicas. Por otra parte, nuestros intentos para remover el detergente, ya sea mediante diálisis o dilución hasta alcanzar la concentración micelar crítica antes de la incubación con el ligando tampoco dieron resultados positivos, posiblemente porque las proteínas extraídas se hayan vuelto insolubles al disminuir la concentración del detergente.

Ante el fracaso de los intentos de co-inmunoprecipitar B3 con su receptor, buscamos una estrategia alternativa que no involucrara la utilización de detergentes. Fuimos afortunados al observar que la elución de las proteínas no integrales de la membrana plasmática mediante una breve exposición a pH 2,5 disminuye significativamente la unión de B3 a las células LLC. Gracias a estas observaciones pudimos contar con una herramienta valiosísima para intentar la identificación del sitio de unión de B3 en el eluido ácido. Es así que luego de la inyección de los eluidos neutralizados en una columna de afinidad y el posterior análisis por MALDI-TOF de las moléculas retenidas, se identificó a HMGN2 como la proteína no integral presente en la membrana de las células B leucémicas que une la porción N-terminal de B3. Estos resultados fueron corroborados en experimentos adicionales que mostraron la expresión de HMGN2 en la superficie celular mediante la utilización de un anticuerpo específico y su desaparición luego de la elución ácida. Es decir que el tratamiento a pH 2,5 no sólo inhibe la unión de B3 a las células B leucémicas, sino que también reduce marcadamente la expresión de HMGN2 sin afectar la de otros antígenos de membrana como CD19 o la IgM de superficie. Es importante señalar que los linfocitos T, que son incapaces de unir B3, no mostraron expresión de HMGN2 en la membrana a diferencia de las células leucémicas. Por último, demostramos que el cultivo de células LLC con IFN- $\alpha$  aumenta la unión de B3 en forma paralela a la expresión de HMGN2. Este conjunto de resultados nos permite concluir que HMGN2 es el principal sitio de unión de B3 en las células B leucémicas.

La familia de las HMGN está formada por 5 miembros que actúan como elementos arquitectónicos de la cromatina y afectan múltiples procesos dependientes del ADN [114-115]. Se caracterizan por presentar un dominio cargado positivamente, el dominio de unión a nucleosomas, y un fragmento C-terminal ácido, que se despega de la

cromatina. Todos los miembros de la familia HMGN presentan una estructura secundaria desordenada, lo que les permite interactuar con numerosas proteínas y formar complejos moleculares [129]. Entre los importantes procesos en los que están involucradas las HMGN se encuentra la regulación de la transcripción génica, que es el resultado, en gran parte, de la capacidad que tienen estas moléculas de unirse a múltiples reguladores, formando complejos moleculares. En resumen, las HMGN al reducir la compactación de la cromatina y gracias a sus características estructurales facilitan el acceso de los factores de transcripción al ADN.

Además de su función clave como parte de los nucleosomas, dos miembros de la familia de las HMGN presentan actividades por fuera del núcleo celular. En 2005, Feng y col [117-118] encontraron que los leucocitos mononucleares secretan HMGN2 cuando son estimulados con IL-2. Asimismo, demostraron que la molécula tiene efectos antimicrobianos ya que es capaz de inhibir el crecimiento en agar de *E. coli* y *P. aeruginosa*, pero no de *C. albicans*. Es interesante señalar que la actividad antimicrobiana descrita por estos autores no reside ni en el dominio de unión a nucleosomas ni en el fragmento C-terminal ácido, sino en la región comprendida entre los aminoácidos 18 a 48 que presenta una conformación de  $\alpha$ -hélice. Trabajos posteriores del mismo grupo extienden la actividad protectora de HMGN2 a la inhibición de la expresión y replicación del virus de hepatitis B [130]. También relacionado con la actividad anti-infecciosa, Cao y col [131] reportaron que HMGN2 es capaz de inhibir la infección de células epiteliales de vejiga por *K. pneumoniae* pero no a través de un efecto lítico directo, si no bloqueando el ingreso de la bacteria al impedir la polimerización del citoesqueleto.

Recientemente, Yang y col [132] utilizando un modelo en ratones, demostraron que otro miembro de la misma familia, HMGN1, puede encontrarse soluble en la

cavidad peritoneal y funcionar como una señal de alarma, induciendo la maduración de células dendríticas al interactuar con el receptor de tipo toll 4 (TLR4). Los ratones knock-out para HMGN1 presentan una menor respuesta antígeno-específica debido a defectos en la activación y reclutamiento de las células dendríticas. Resulta interesante que HMGN2, utilizada como control en el trabajo de dicho grupo, no fue capaz de activar a las células dendríticas ni de interactuar con TLR4. Por último, es necesario señalar que la primera descripción de una proteína del nucleosoma con actividad inmune corresponde a HMGB1. Numerosos trabajos han demostrado su importancia en la activación de la respuesta inflamatoria y autoinmune [133-134]. HMGB1 es liberada al medio extracelular de dos formas: como producto de secreción de células de la inmunidad innata o como consecuencia de la necrosis celular. En ambos casos, HMGB1 actúa induciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias [135]. Como ocurre con HMGN2, las características estructurales de esta proteína facilitan su asociación con diferentes moléculas, entre las que destacan IL-1 $\beta$ , LPS, CXCL12, RAGE en la membrana plasmática celular, y por supuesto ADN [136-137].

HMGN2 también ha sido investigada como una potencial herramienta terapéutica. Es así que durante la búsqueda de factores inhibitorios de las metástasis tumorales se identificó, en extractos de hígado bovino, un péptido de 21 aminoácidos que se corresponde con el fragmento carboxi-terminal de HMGN2 [138]. Este péptido inhibe la migración de distintas líneas celulares *in vitro*, sin afectar mayormente el crecimiento. Es interesante que la inoculación de este péptido en ratones reduce el desarrollo de metástasis de cáncer de pulmón en más del 50%.

El dominio amino-terminal de HMGN2, por su parte, también se ha estudiado como potencial herramienta terapéutica. Se reportó que este fragmento de 31 aminoácidos se une a células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* y, una vez unido, es



internalizado acumulándose en el núcleo [139]. Acoplado a una toxina, este péptido de HMGN2 logró inhibir el crecimiento de células tumorales humanas transplantadas en ratones inmunodeficientes. Estudios posteriores del mismo grupo posicionaron a nucleolina como su receptor en la superficie celular [140]. En conjunto, estos resultados muestran que 2 dominios diferentes de la proteína HMGN2 podrían ser empleados en la terapia antitumoral.

En concordancia a lo descrito para HMGB1, la presencia de HMGN2 en la membrana de las células LLC puede deberse a la secreción activa por parte de las células leucémicas u otras células de la sangre, como lo descrito para leucocitos estimulados con IL-2, o a la adsorción pasiva de la proteína translocada al medio externo como resultado de la muerte celular. La existencia de nucleosomas circulantes con presencia de HMGN2 no ha sido, a nuestro conocimiento, formalmente demostrada. Sin embargo, cabe mencionar que se han descrito anticuerpos dirigidos contra HMGN2 en distintas enfermedades autoinmunes, como por ejemplo lupus eritematoso sistémico, enfermedad del tejido conectivo mixto [141], artritis reumatoidea [142-143] y escleroderma [144]. La presencia de autoanticuerpos indica la disponibilidad de epitopes antigénicos a ser reconocidos por los linfocitos B. Dado que los niveles de nucleosomas son mayores en los pacientes con cáncer [145] y teniendo en cuenta el gran número de células leucémicas positivas para HMGN2 en los pacientes LLC, uno de nuestros objetivos futuros será evaluar los niveles de HMGN2, complejada o no a nucleosomas, en el suero de los pacientes y determinar si hay asociación con el desarrollo de AHA.

En la segunda parte del presente trabajo de tesis nos propusimos como objetivo evaluar si la unión de B3 a las células LLC tiene la capacidad de activarlas. Los

resultados previos de nuestro grupo habían demostrado que el reconocimiento de B3 por parte de las células leucémicas conduce a su endocitosis y posterior procesamiento y presentación de péptidos junto con moléculas HLA-II, pero desconocíamos si puede modificar su estado de activación. Encontramos que efectivamente B3 aumenta la expresión de los marcadores de activación de células B: CD69, CD25 y CD86. Aunque los niveles de incremento son bajos, es posible que en el tejido esplénico, donde la concentración de eritrocitos y vesículas eritrocitarias es elevada, el reconocimiento de B3 por parte de las células leucémicas colabore en su activación. Recordemos que B3 es la molécula más abundante de la membrana del glóbulo rojo y parte fundamental de los exosomas o vesículas eritrocitarias. Estas vesículas se originan mayormente en el estroma esplénico durante el pasaje de los eritrocitos a través de las paredes de los sinusoides, y presentan una polaridad de membrana igual a la de los glóbulos rojos (con las porciones intracelulares de las proteínas hacia el interior de las vesículas) o invertida (con las porciones originalmente intracelulares hacia afuera) [125-127]. Proponemos que la interacción de la porción N-terminal de B3 y las células LLC ocurre en el tejido esplénico y favorece la estimulación de las células leucémicas.

Entre los marcadores de activación evaluados, CD69 es quizás el más interesante ya que se trata de un marcador pronóstico en LLC [53-54]. En la cohorte de 20 pacientes estudiados, vimos que el aumento en la expresión de CD69 inducido por B3 fue mayor en aquellos pacientes con menor proporción de células leucémicas CD69<sup>+</sup>, de enfermedad indolente y con bajo riesgo de progresión. Esto podría deberse simplemente a que B3 tiene más chance de incrementar la expresión de CD69 cuando los niveles son bajos. Sin embargo, los resultados de la Tabla 2 muestran que la respuesta es bastante heterogénea, en particular dentro del grupo de mayor riesgo. Será necesario evaluar el

efecto de B3 sobre la expresión de CD69 en un número mayor de pacientes para poder realizar un análisis de correlación.

Dado que el receptor que describimos para B3, es decir HMGN2, es una molécula no integral de membrana, cabe preguntarse sobre el mecanismo mediante el cual se transducen las señales de activación que llevan al aumento en la expresión de los marcadores descriptos. Como se señalara anteriormente, por su conformación estructural HMGN2 tiene la capacidad potencial de unirse a múltiples moléculas. En este sentido es importante considerar que la capacidad de moléculas no integrales de membrana de transducir señales depende de su potencial para formar clusters o agrupaciones con moléculas lipídicas y/o proteicas [146]. A su vez, numerosas proteínas unidas a la membrana plasmática mediante enlaces glicofosfatidilinositol (GPI) son capaces de transducir señales de activación en células inmunitarias y otras [144,145]. Si bien sabemos que éste no es el caso de HMGN2 al ser una proteína no lipídada, podría estar unida a la superficie celular a través de su dominio  $\alpha$ -hélice mediante anclajes aplanados sobre la membrana (*“in plane membrane anchor”*), forma estructural capaz de modular diversas funciones celulares [147-149]. Por otra parte, aunque no hay reportes sobre HMGN2 en membrana celular, sí los hay con HMGB1, proteína capaz de unirse a distintos glicolípidos y fosfolípidos [136]. Como fuera mencionado, HMGB1 es capaz de unirse a RAGE expresado en la superficie celular [137], y está reportado que un fragmento de HMGN2 es capaz de unirse a nucleolina en la superficie de células endoteliales, activando mecanismos de endocitosis [140]. Se requieren estudios adicionales en nuestro sistema para determinar cuál es la señalización iniciada por B3, como así también para estudiar el rol de HMGN2 en la misma.

En este trabajo de tesis también evaluamos si la capacidad que presentan las células LLC de unir B3 puede ser modificada por algunas de las citoquinas claves en la

biología de la LLC. Previamente habíamos reportado que la capacidad de unión de B3 no se ve alterada por el cultivo de las células leucémicas con fibroblastos transfectados con CD40 ligando [81], aún cuando las señales inducidas a través de CD40 resultan en una fuerte activación de las células LLC. En el presente trabajo encontramos que la capacidad para unir B3 aumenta si las células son cultivadas con IFN- $\alpha$ , pero no se modifica en presencia de IL-6 o TGF- $\beta$ . El IFN- $\alpha$  no sólo aumenta la unión de B3 soluble sino también la de vesículas eritrocitarias, que constituyen la fuente probable de B3 en el organismo.

La actividad del IFN- $\alpha$  sobre las células LLC ha sido investigada por más de 3 décadas, encontrándose efectos paradójicos que sólo en años recientes pudieron ser comprendidos. Es así que el efecto inicial del IFN- $\alpha$  es estimular la transcripción de STAT3 promoviendo la activación y el crecimiento celular, pero a tiempos más prolongados induce la transcripción de STAT1, que lleva a la muerte celular [150]. La respuesta inicial exhibe una gran variabilidad entre pacientes LLC y es de mayor duración en los de peor pronóstico, como aquellos con delección del 17p o mutación de p53 [150]. Estos efectos paradójicos hicieron que la terapia de la LLC con IFN- $\alpha$  se dejara de lado hacia finales del siglo pasado. Independientemente de la utilización de IFN- $\alpha$  para el tratamiento de la LLC, no debemos olvidar que la producción de esta citoquina se induce durante las infecciones virales [151]. Como se señalara en la Introducción, los pacientes LLC son particularmente susceptibles a las infecciones por presentar múltiples alteraciones del sistema inmune [30-31]. La inmunosupresión característica de la LLC se agrava con los tratamientos quimioterápicos [28], lo que favorece la aparición de infecciones oportunistas, incluidas infecciones virales por Herpes Zoster o reactivación de citomegalovirus, que se acompañan de alta producción de IFN- $\alpha$  [62]. Las infecciones por citomegalovirus son especialmente relevantes ya que

se ha demostrado que las células estromales del bazo son la principal fuente de producción de IFN- $\alpha$  [152].

En relación a los resultados de esta tesis, es interesante que la exposición a IFN- $\alpha$  favorezca la unión a las células LLC de un autoantígeno prevalente en AHA como B3 ya que se ha reportado la aparición de AHA asociada al tratamiento con IFN- $\alpha$  en pacientes con desórdenes oncohematológicos, incluida la LLC [63]. Si bien las causas que subyacen a esta asociación entre tratamiento con IFN- $\alpha$  y aparición de AHA no han sido dilucidadas hasta el momento, es posible que el aumento en la capacidad de unir y procesar antígenos eritrocitarios por parte de linfocitos B juegue un papel en el inicio de la respuesta autoinmune. En este sentido, nosotros encontramos que no sólo las células LLC si no también los linfocitos B normales son capaces de unir B3 [81]. Queda por demostrar si responden al IFN- $\alpha$  de manera similar a las células B leucémicas.

El mismo tratamiento con IFN- $\alpha$  que incrementó la unión de B3 y de vesículas eritrocitarias a las células LLC indujo la expresión de HMGN2, sin modificar la unión de IgG irrelevante usada como control, lo que descarta pegado inespecífico por activación con IFN- $\alpha$ . Si bien de manera indirecta, estos resultados apoyan el papel de HMGN2 en la unión de B3 a las células leucémicas. Nos preguntamos en esta instancia cuál podría ser el mecanismo que explique este aumento en su expresión. Por tratarse de una proteína periférica de la membrana, la mayor expresión de HMGN2 inducida por IFN- $\alpha$  podría deberse a un aumento en la transcripción del gen y/o a un aumento en la capacidad de la superficie celular para pegar la proteína. En principio, descartamos que la mayor presencia de HMGN2 se debiera a la adsorción pasiva de la proteína liberada al medio externo como resultado de la muerte celular. De hecho, las células LLC tratadas con IFN- $\alpha$  mostraron una profunda inhibición de la muerte celular en concordancia con lo ya reportado [153]. Como dijimos anteriormente, hay un único

reporte sobre la presencia de HMGN2 en el citoplasma celular [117]. En este trabajo se muestra que los leucocitos en reposo expresan HMGN2 mayormente en el núcleo y que la estimulación con IL-2 y el mitógeno fitohemaglutinina induce su expresión en el citoplasma y posterior secreción al medio de cultivo. No se ha analizado si HMGN2 se encuentra en forma libre o dentro de vesículas, que podrían eventualmente fusionarse con la membrana plasmática para descargar su contenido. Los resultados que obtuvimos en cinco pacientes LLC mostraron que en tres de ellos el IFN- $\alpha$  indujo un aumento en la transcripción de HMGN2. Por el momento, se desconoce cuáles son los mecanismos que regulan su expresión. Aunque el IFN- $\alpha$  es capaz de inducir la expresión de más de 300 genes necesarios para conferir resistencia frente a las infecciones virales, no se ha demostrado, a nuestro conocimiento, que HMGN2 sea uno de estos “genes inducibles por IFN”. Nos proponemos próximamente ampliar estos estudios en una cohorte mayor de pacientes para definir si IFN- $\alpha$  induce la transcripción de HMGN2.

En su conjunto, los resultados presentados en este trabajo de tesis demuestran por primera vez la presencia de la proteína de nucleosomas HMGN2 en la membrana plasmática de las células B leucémicas de pacientes LLC. Además las evidencias presentadas sugieren que HMGN2 constituye el principal sitio de unión para B3, blanco frecuente de los autoanticuerpos en AHA, y demuestran que la unión de B3 a las células tiene consecuencias funcionales ya que aumenta la expresión de marcadores de activación.

Futuros experimentos se imponen con el objetivo de estudiar la dinámica y el/los sitio/s de unión de HMGN2 a la superficie celular, así como su capacidad para transducir señales de activación linfocitaria. Por lo pronto, y tal como fuera mencionado, sabemos que los distintos dominios a lo largo de su estructura son capaces de interactuar con una amplia variedad de moléculas de distintas características

bioquímicas. Por otra parte, profundizar los estudios de la cinética de interacción entre B3 y HMGN2, como conocer la constante de afinidad de la unión entre ambos ligandos, aportarían datos relevantes para esta línea de investigación. En este sentido, si bien el dominio N-terminal de Banda 3 se encuentra a la actualidad cristalizado, éste no es el caso para la proteína HMGN2. Esto impide proponer modelos teóricos sobre probables sitios de unión con relativa certeza. Es por eso que, entre otras perspectivas a futuro, consideramos la posibilidad de intentar cristalizar el complejo B3N-HMGN2 en colaboración con los Dres Oppezzo y Buschiazzo del Instituto Pasteur de Montevideo. Nuestras investigaciones actuales están siendo desarrolladas en este sentido.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Dighiero, G. and T.J. Hamblin, *Chronic lymphocytic leukaemia*. Lancet, 2008. **371**(9617): p. 1017-29.
2. Chiorazzi, N. and M. Ferrarini, *B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 841-94.
3. Keating, M.J., et al., *Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003: p. 153-75.
4. Payelle-Brogard, B., et al., *Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2002. **118**(4): p. 976-85.
5. Binet, J.L., et al., *Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2006. **107**(3): p. 859-61.
6. Del Giudice, I., et al., *Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Cancer, 2005. **104**(10): p. 2124-32.
7. Montillo, M., et al., *Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies*. Haematologica, 2005. **90**(3): p. 391-9.
8. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1975. **46**(2): p. 219-34.
9. Binet, J.L., et al., *A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance*. Cancer, 1977. **40**(2): p. 855-64.
10. Dighiero, G., et al., *Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia*. N Engl J Med, 1998. **338**(21): p. 1506-14.
11. Francis, S., et al., *The effect of immunoglobulin VH gene mutation status and other prognostic factors on the incidence of major infections in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Cancer, 2006. **107**(5): p. 1023-33.
12. Hamblin, T.J., et al., *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1848-54.
13. Mehta, K., U. Shahid, and F. Malavasi, *Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions*. FASEB J, 1996. **10**(12): p. 1408-17.
14. Deaglio, S., et al., *Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 727-34.
15. Morra, M., et al., *CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells*. FASEB J, 1998. **12**(7): p. 581-92.
16. Deaglio, S., et al., *Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells*. Blood, 2002. **99**(7): p. 2490-8.
17. Lund, F.E., et al., *Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression*. J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1455-67.
18. Deaglio, S., et al., *CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2146-55.
19. Guarini, A., et al., *Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features*. Blood, 2003. **102**(3): p. 1035-41.
20. Ripolles, L., et al., *Genetic abnormalities and clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **171**(1): p. 57-64.
21. Calin, G.A., et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2005. **353**(17): p. 1793-801.
22. Calin, G.A., et al., *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11755-60.

23. Ditch, S. and T.T. Paull, *The ATM protein kinase and cellular redox signaling: beyond the DNA damage response*. Trends Biochem Sci, 2012. **37**(1): p. 15-22.
24. Zenz, T., et al., *TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations*. Leukemia, 2010. **24**(12): p. 2072-9.
25. Skowronska, A., et al., *ATM germline heterozygosity does not play a role in chronic lymphocytic leukemia initiation but influences rapid disease progression through loss of the remaining ATM allele*. Haematologica, 2012. **97**(1): p. 142-6.
26. Mohr, J., et al., *DNA damage-induced transcriptional program in CLL: biological and diagnostic implications for functional p53 testing*. Blood, 2011. **117**(5): p. 1622-32.
27. Caligaris-Cappio, F., *Biology of chronic lymphocytic leukemia*. Rev Clin Exp Hematol, 2000. **4**(1): p. 5-21.
28. Wadhwa, P.D. and V.A. Morrison, *Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia*. Semin Oncol, 2006. **33**(2): p. 240-9.
29. Sampalo, A. and J.A. Brieva, *Humoral immunodeficiency in chronic lymphocytic leukemia: role of CD95/CD95L in tumoral damage and escape*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(4): p. 881-4.
30. Lagneaux, L., et al., *TGF-beta activity and expression of its receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 1998. **31**(1-2): p. 99-106.
31. Semenzato, G., et al., *High serum levels of soluble interleukin 2 receptor in patients with B chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1987. **70**(2): p. 396-400.
32. Hamblin, T.J., *Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia*. Semin Oncol, 2006. **33**(2): p. 230-9.
33. Mauro, F.R., et al., *Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features*. Blood, 2000. **95**(9): p. 2786-92.
34. Diehl, L.F. and L.H. Ketchum, *Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia*. Semin Oncol, 1998. **25**(1): p. 80-97.
35. Barcellini, W., et al., *Relationship between autoimmune phenomena and disease stage and therapy in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2006. **91**(12): p. 1689-92.
36. D'Arena, G. and N. Cascavilla, *Chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune hemolytic anemia*. Leuk Lymphoma, 2007. **48**(6): p. 1072-80.
37. Packham, G. and F.K. Stevenson, *Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia*. Immunology, 2005. **114**(4): p. 441-9.
38. Robertson, L.E. and W. Plunkett, *Apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma, 1993. **11 Suppl 2**: p. 71-4.
39. Dameshek, W., *Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes*. Blood, 1967. **29**(4): p. Suppl:566-84.
40. Damle, R.N., et al., *B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4087-93.
41. Rosenwald, A., et al., *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1639-47.
42. Damle, R.N., et al., *Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations*. Blood, 2004. **103**(2): p. 375-82.
43. Chiorazzi, N., *Cell proliferation and death: forgotten features of chronic lymphocytic leukemia B cells*. Best Pract Res Clin Haematol, 2007. **20**(3): p. 399-413.

44. Bien, E. and A. Balcerska, *Serum soluble interleukin 2 receptor alpha in human cancer of adults and children: a review*. Biomarkers, 2008. **13**(1): p. 1-26.
45. Nelson, B.H., *IL-2, regulatory T cells, and tolerance*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 3983-8.
46. Decker, T., et al., *Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors*. Ann Hematol, 2010. **89**(11): p. 1125-32.
47. Shvidel, L., et al., *Cell surface expression of CD25 antigen (surface IL-2 receptor alpha-chain) is not a prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia: results of a retrospective study of 281 patients*. Ann Hematol, 2012. **91**(10): p. 1597-602.
48. Greenfield, E.A., K.A. Nguyen, and V.K. Kuchroo, *CD28/B7 costimulation: a review*. Crit Rev Immunol, 1998. **18**(5): p. 389-418.
49. Dai, Z.S., et al., *Defective expression and modulation of B7-2/CD86 on B cells in B cell chronic lymphocytic leukemia*. Int J Hematol, 2009. **89**(5): p. 656-63.
50. Secchiero, P., et al., *Combined treatment of CpG-oligodeoxynucleotide with Nutlin-3 induces strong immune stimulation coupled to cytotoxicity in B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(2): p. 434-7.
51. Marzio, R., J. Mael, and S. Betz-Corradin, *CD69 and regulation of the immune function*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1999. **21**(3): p. 565-82.
52. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid, *CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation*. Trends Immunol, 2005. **26**(3): p. 136-40.
53. D'Arena, G., et al., *CD69 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a new prognostic marker ?* Haematologica, 2001. **86**(9): p. 995-6.
54. Del Poeta, G., et al., *CD69 is independently prognostic in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive clinical and biological profiling study*. Haematologica, 2012. **97**(2): p. 279-87.
55. Liu, F.T., et al., *CD160 signaling mediates PI3K-dependent survival and growth signals in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2010. **115**(15): p. 3079-88.
56. Mihara, M., et al., *IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions*. Clin Sci (Lond), 2012. **122**(4): p. 143-59.
57. Yan, X.J., et al., *Identification of outcome-correlated cytokine clusters in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. **118**(19): p. 5201-10.
58. Lai, R., et al., *Prognostic value of plasma interleukin-6 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Cancer, 2002. **95**(5): p. 1071-5.
59. Finter, N.B., et al., *The use of interferon-alpha in virus infections*. Drugs, 1991. **42**(5): p. 749-65.
60. Burke, J.D. and E.N. Fish, *Antiviral strategies: the present and beyond*. Curr Mol Pharmacol, 2009. **2**(1): p. 32-9.
61. Chiao, E.Y., et al., *Risk of immune thrombocytopenic purpura and autoimmune hemolytic anemia among 120 908 US veterans with hepatitis C virus infection*. Arch Intern Med, 2009. **169**(4): p. 357-63.
62. Pourgheysari, B., et al., *The number of cytomegalovirus-specific CD4+ T cells is markedly expanded in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and determines the total CD4+ T-cell repertoire*. Blood, 2010. **116**(16): p. 2968-74.
63. Andriani, A., et al., *Autoimmune hemolytic anemia during alpha interferon treatment in nine patients with hematological diseases*. Haematologica, 1996. **81**(3): p. 258-60.
64. Hoffman, P.C., *Immune hemolytic anemia--selected topics*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2006: p. 13-8.
65. Semple, J.W. and J. Freedman, *Autoimmune pathogenesis and autoimmune hemolytic anemia*. Semin Hematol, 2005. **42**(3): p. 122-30.
66. Meyer, D., et al., *Fc gamma RIII (CD16)-deficient mice show IgG isotype-dependent protection to experimental autoimmune hemolytic anemia*. Blood, 1998. **92**(11): p. 3997-4002.

67. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. *Annu Rev Immunol*, 1999. **17**: p. 593-623.
68. Zilow, G., M. Kirschfink, and D. Roelcke, *Red cell destruction in cold agglutinin disease*. *Infusionsther Transfusionsmed*, 1994. **21**(6): p. 410-5.
69. Sokol, R.J., et al., *Cold haemagglutinin disease: clinical significance of serum haemolysins*. *Clin Lab Haematol*, 2000. **22**(6): p. 337-44.
70. Janeway, C.A., et al., *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science Publishing. Vol. 369. 2005.
71. Mqadmi, A., X. Zheng, and K. Yazdanbakhsh, *CD4+CD25+ regulatory T cells control induction of autoimmune hemolytic anemia*. *Blood*, 2005. **105**(9): p. 3746-8.
72. Ravandi, F. and S. O'Brien, *Immune defects in patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. **55**(2): p. 197-209.
73. Scrivener, S., et al., *Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. *Leuk Lymphoma*, 2003. **44**(3): p. 383-9.
74. Beppu, M., et al., *Macrophage recognition of saccharide chains on the erythrocytes damaged by iron-catalyzed oxidation*. *Arch Biochem Biophys*, 1994. **312**(1): p. 189-97.
75. Beppu, M., et al., *Recognition of poly-N-acetyllactosaminyl saccharide chains on iron-oxidized erythrocytes by human monocytic leukemia cell line THP-1 differentiated into macrophages*. *Biol Pharm Bull*, 1996. **19**(2): p. 188-94.
76. Gorgun, G., et al., *Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(7): p. 1797-805.
77. Steurer, M., et al., *Single-agent purine analogues for the treatment of chronic lymphocytic leukaemia: a systematic review and meta-analysis*. *Cancer Treat Rev*, 2006. **32**(5): p. 377-89.
78. Beyer, M., et al., *Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine*. *Blood*, 2005. **106**(6): p. 2018-25.
79. Yasukawa, M., et al., *Antigen presentation in an HLA-DR-restricted fashion by B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. *Blood*, 1988. **72**(1): p. 102-8.
80. Hall, A.M., et al., *Rh autoantigen presentation to helper T cells in chronic lymphocytic leukemia by malignant B cells*. *Blood*, 2005. **105**(5): p. 2007-15.
81. Galletti, J., et al., *Chronic lymphocytic leukemia cells bind and present the erythrocyte protein band 3: possible role as initiators of autoimmune hemolytic anemia*. *J Immunol*, 2008. **181**(5): p. 3674-83.
82. Kay, M.M., *Band 3 and its alterations in health and disease*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2004. **50**(2): p. 117-38.
83. Jennings, M.L., *Kinetics and mechanism of anion transport in red blood cells*. *Annu Rev Physiol*, 1985. **47**: p. 519-33.
84. Lux, S.E., et al., *Cloning and characterization of band 3, the human erythrocyte anion-exchange protein (AE1)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(23): p. 9089-93.
85. Tanner, M.J., *Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE1)*. *Semin Hematol*, 1993. **30**(1): p. 34-57.
86. Bruce, L.J., et al., *Changes in the blood group Wright antigens are associated with a mutation at amino acid 658 in human erythrocyte band 3: a site of interaction between band 3 and glycophorin A under certain conditions*. *Blood*, 1995. **85**(2): p. 541-7.
87. Bruce, L.J., et al., *A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane*. *Blood*, 2003. **101**(10): p. 4180-8.
88. Tanner, M.J., *The structure and function of band 3 (AE1): recent developments (review)*. *Mol Membr Biol*, 1997. **14**(4): p. 155-65.

89. Fukuda, M., et al., *Structure of branched lactosaminoglycan, the carbohydrate moiety of band 3 isolated from adult human erythrocytes*. J Biol Chem, 1984. **259**(13): p. 8260-73.
90. Wrong, O., et al., *Band 3 mutations, distal renal tubular acidosis, and Southeast Asian ovalocytosis*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 10-9.
91. Peters, L.L., et al., *Anion exchanger 1 (band 3) is required to prevent erythrocyte membrane surface loss but not to form the membrane skeleton*. Cell, 1996. **86**(6): p. 917-27.
92. Inaba, M., et al., *Defective anion transport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to a nonsense mutation*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1804-17.
93. Ribeiro, M.L., et al., *Severe hereditary spherocytosis and distal renal tubular acidosis associated with the total absence of band 3*. Blood, 2000. **96**(4): p. 1602-4.
94. Turrini, F., et al., *Characterization of the autologous antibodies that opsonize erythrocytes with clustered integral membrane proteins*. Blood, 1993. **81**(11): p. 3146-52.
95. Lutz, H.U., R. Flepp, and G. Stringaro-Wipf, *Naturally occurring autoantibodies to exoplasmic and cryptic regions of band 3 protein, the major integral membrane protein of human red blood cells*. J Immunol, 1984. **133**(5): p. 2610-8.
96. Beppu, M., K. Ando, and K. Kikugawa, *Poly-N-acetyllactosaminyl saccharide chains of band 3 as determinants for anti-band 3 autoantibody binding to senescent and oxidized erythrocytes*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1996. **42**(7): p. 1007-24.
97. Ge, Y. and M.T. Elghetany, *CD36: a multiligand molecule*. Lab Hematol, 2005. **11**(1): p. 31-7.
98. Barnwell, J.W., C.F. Ockenhouse, and D.M. Knowles, 2nd, *Monoclonal antibody OKM5 inhibits the in vitro binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to monocytes, endothelial, and C32 melanoma cells*. J Immunol, 1985. **135**(5): p. 3494-7.
99. Barnwell, J.W., et al., *A human 88-kD membrane glycoprotein (CD36) functions in vitro as a receptor for a cytoadherence ligand on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Clin Invest, 1989. **84**(3): p. 765-72.
100. Crandall, I., et al., *Synthetic peptides based on motifs present in human band 3 protein inhibit cytoadherence/sequestration of the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4703-7.
101. Crandall, I. and I.W. Sherman, *Antibodies to synthetic peptides based on band 3 motifs react specifically with Plasmodium falciparum (human malaria)-infected erythrocytes and block cytoadherence*. Parasitology, 1994. **108 ( Pt 4)**: p. 389-96.
102. Rogers, N.J., G.A. Targett, and B.S. Hall, *Plasmodium falciparum gametocyte adhesion to C32 cells via CD36 is inhibited by antibodies to modified band 3*. Infect Immun, 1996. **64**(10): p. 4261-8.
103. Winograd, E., S. Eda, and I.W. Sherman, *Chemical modifications of band 3 protein affect the adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to CD36*. Mol Biochem Parasitol, 2004. **136**(2): p. 243-8.
104. Miki, Y., et al., *Clearance of oxidized erythrocytes by macrophages: involvement of caspases in the generation of clearance signal at band 3 glycoprotein*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **363**(1): p. 57-62.
105. Casey, J.R., D.M. Lieberman, and R.A. Reithmeier, *Purification and characterization of band 3 protein*. Methods Enzymol, 1989. **173**: p. 494-512.
106. Yu, J., D.A. Fischman, and T.L. Steck, *Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents*. J Supramol Struct, 1973. **1**(3): p. 233-48.

107. Hargreaves, W.R., et al., *Reassociation of ankyrin with band 3 in erythrocyte membranes and in lipid vesicles*. J Biol Chem, 1980. **255**(24): p. 11965-72.
108. Tan, Y.J. and A.E. Ting, *Non-ionic detergent affects the conformation of a functionally active mutant of Bcl-X(L)*. Protein Eng, 2000. **13**(12): p. 887-92.
109. Schuck, S., et al., *Resistance of cell membranes to different detergents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5795-800.
110. Seddon, A.M., P. Curnow, and P.J. Booth, *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1666**(1-2): p. 105-17.
111. Ohlendieck, K., *Extraction of membrane proteins*. Methods Mol Biol, 1996. **59**: p. 293-304.
112. Bustin, M., *Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(3): p. 152-3.
113. Spiker, S., J.K. Mardian, and I. Isenberg, *Chomosomal HMG proteins occur in three eukaryotic kingdoms*. Biochem Biophys Res Commun, 1978. **82**(1): p. 129-35.
114. Reeves, R., *Nuclear functions of the HMG proteins*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(1-2): p. 3-14.
115. Prymakowska-Bosak, M., et al., *Mitotic phosphorylation prevents the binding of HMGN proteins to chromatin*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(15): p. 5169-78.
116. Kato, H., et al., *Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(30): p. 12283-8.
117. Feng, Y., et al., *HMGN2: a novel antimicrobial effector molecule of human mononuclear leukocytes?* J Leukoc Biol, 2005. **78**(5): p. 1136-41.
118. Feng, Y., et al., *Alpha-helical domain is essential for antimicrobial activity of high mobility group nucleosomal binding domain 2 (HMGN2)*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(9): p. 1087-92.
119. Hara, T., et al., *Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens*. J Exp Med, 1986. **164**(6): p. 1988-2005.
120. Risso, A., et al., *MLR3 molecule is an activation antigen shared by human B, T lymphocytes and T cell precursors*. Eur J Immunol, 1989. **19**(2): p. 323-8.
121. Rachmawati, N.M., et al., *Inhibition of antibody production in vivo by pre-stimulation of Toll-like receptor 4 before antigen priming is caused by defective B cell priming and not impairment in antigen presentation*. Int Immunol, 2012.
122. Yehudai, D., et al., *B cell-activating factor enhances interleukin-6 and interleukin-10 production by ODN-activated human B cells*. Scand J Immunol, 2012. **76**(4): p. 371-7.
123. Kay, N.E., et al., *B-CLL cells are capable of synthesis and secretion of both pro- and anti-angiogenic molecules*. Leukemia, 2002. **16**(5): p. 911-9.
124. Worthington, J.J., et al., *Regulation of TGFbeta in the immune system: An emerging role for integrins and dendritic cells*. Immunobiology, 2012. **217**(12): p. 1259-65.
125. Blanc, L., et al., *Exosome release by reticulocytes--an integral part of the red blood cell differentiation system*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(1): p. 21-6.
126. Lew, V.L., et al., *Mechanism of spontaneous inside-out vesiculation of red cell membranes*. J Cell Biol, 1988. **106**(6): p. 1893-901.
127. Bosman, G.J., et al., *The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation*. J Proteomics, 2012.
128. Garavito, R.M. and S. Ferguson-Miller, *Detergents as tools in membrane biochemistry*. J Biol Chem, 2001. **276**(35): p. 32403-6.

129. Pogna, E.A., A.L. Clayton, and L.C. Mahadevan, *Signalling to chromatin through post-translational modifications of HMGN*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1799**(1-2): p. 93-100.
130. Feng, Y., et al., *Inhibitory effect of HMGN2 protein on human hepatitis B virus expression and replication in the HepG2.2.15 cell line*. *Antiviral Res*, 2009. **81**(3): p. 277-82.
131. Wu, G., et al., *High-mobility group protein N2 (HMGN2) inhibited the internalization of Klebsiella pneumoniae into cultured bladder epithelial cells*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011. **43**(9): p. 680-7.
132. Yang, D., et al., *High-mobility group nucleosome-binding protein 1 acts as an alarmin and is critical for lipopolysaccharide-induced immune responses*. *J Exp Med*, 2012. **209**(1): p. 157-71.
133. Zetterstrom, C.K., et al., *High mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) is an antibacterial factor produced by the human adenoid*. *Pediatr Res*, 2002. **52**(2): p. 148-54.
134. Andersson, U. and H. Rauvala, *Introduction: HMGB1 in inflammation and innate immunity*. *J Intern Med*, 2011. **270**(4): p. 296-300.
135. Andersson, U., et al., *HMGB1 as a DNA-binding cytokine*. *J Leukoc Biol*, 2002. **72**(6): p. 1084-91.
136. Rouhiainen, A., et al., *Occurrence of amphoterin (HMG1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation*. *Thromb Haemost*, 2000. **84**(6): p. 1087-94.
137. Hori, O., et al., *The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(43): p. 25752-61.
138. Isoai, A., et al., *Tumor invasion-inhibiting factor 2: primary structure and inhibitory effect on invasion in vitro and pulmonary metastasis of tumor cells*. *Cancer Res*, 1992. **52**(6): p. 1422-6.
139. Porkka, K., et al., *A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(11): p. 7444-9.
140. Christian, S., et al., *Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels*. *J Cell Biol*, 2003. **163**(4): p. 871-8.
141. Bustin, M., et al., *Autoantibodies to nucleosomal proteins: antibodies to HMG-17 in autoimmune diseases*. *Science*, 1982. **215**(4537): p. 1245-7.
142. Tzioufas, A.G., et al., *Autoantibodies to HMG-17 nucleosomal protein in autoimmune rheumatic diseases. Correlation with systemic lupus erythematosus clinical activity and with antibodies to double-stranded DNA*. *Arthritis Rheum*, 1993. **36**(7): p. 955-61.
143. Neuer, G., et al., *Autoantibodies to the chromosomal protein HMG-17 in juvenile rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(4): p. 472-5.
144. Vlachoyiannopoulos, P.G., et al., *Autoantibodies to HMG-17 nucleosomal protein in patients with scleroderma*. *J Autoimmun*, 1994. **7**(2): p. 193-201.
145. Holdenrieder, S., et al., *Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases*. *Int J Cancer*, 2001. **95**(2): p. 114-20.
146. Morozova, D., G. Guigas, and M. Weiss, *Dynamic structure formation of peripheral membrane proteins*. *PLoS Comput Biol*, 2011. **7**(6): p. e1002067.
147. Burrack, S., et al., *A new type of intracellular retention signal identified in a pestivirus structural glycoprotein*. *FASEB J*, 2012. **26**(8): p. 3292-305.
148. Penin, F., et al., *Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(39): p. 40835-43.

149. Sapay, N., Y. Guerneur, and G. Deleage, *Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier*. BMC Bioinformatics, 2006. **7**: p. 255.
150. Tomic, J., B. Lichty, and D.E. Spaner, *Aberrant interferon-signaling is associated with aggressive chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2011. **117**(9): p. 2668-80.
151. Gibbert, K., et al., *Interferon alpha subtypes: Distinct biological activities in anti-viral therapy*. Br J Pharmacol, 2012.
152. Verma, S. and C.A. Benedict, *Sources and signals regulating type I interferon production: lessons learned from cytomegalovirus*. J Interferon Cytokine Res, 2011. **31**(2): p. 211-8.
153. Tangye, S.G. and R.L. Raison, *Human cytokines suppress apoptosis of leukaemic CD5+ B cells and preserve expression of bcl-2*. Immunol Cell Biol, 1997. **75**(2): p. 127-35.