

VOL 80 - Nº 2
Mayo-Agosto de 2016
Ciudad de Bs. As. Argentina
ISSN 1515-6761 Ed. Impresa
ISSN 2250-5903 Ed. CD-ROM

Bioquímica y Patología Clínica



Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP)



Revista de la Asociación Bioquímica Argentina.
Publicación cuatrimestral.



Bioquímica y Patología Clínica

Revista de la Asociación Bioquímica Argentina

SUMARIO

- Pág. 8 **EDITORIAL: Nuestros residentes**
Dra. Liliana Arias, Dra. Isabel Desimone
- Pág. 9 **9 Manifestaciones cutáneas en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias primarias**
Cantisano, C.; Díaz, H.; Balbaryski, J.; Quiroz, H.; Gaddi, E.
- Pág. 15 **Evaluación de la tasa de revisión manual del frotis de sangre periférica en pacientes pediátricos.**
Osta, V.; Guiñazú, K.; Ayuso, C.
- Pág. 24 **Cuantificación del colesterol en glóbulos rojos de distintos tamaños. Valores obtenidos en personas con riesgo cardiovascular.**
Chiari J.
- Pág. 28 **Uso del inmunoblot (Western blot) en el laboratorio clínico para la detección de distrofina, disferlina y calpaína 3: tres proteínas de relevancia en el diagnóstico de miopatías hereditarias.**
Sorroche, P.B.; Cucci, M.; Wilda, M.; Ruggiero, M. F.; Bettini, M.; Giménez, M.I.; Christiansen, S.; Grigera, P.R.
- Pág. 34 **Activación y cascada de señalización de los linfocitos B**
Sánchez, M.L.
- Pág. 45 **Cursos**

Bioquímica y Patología Clínica

REVISTA DE LA ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA

Venezuela 1823 - Piso 3 - CP (1096)
Buenos Aires - Argentina
Tel/ fax: 4384-7415 / Tel: 4381-2907
e-mail: info@aba-online.org.ar
www.aba-online.org.ar
Registro Nacional de Derechos de Autor N° 034772
Publicación cuatrimestral

COMISIÓN DE REVISTA

Director: Dr. Fernando Brites
Secretario Científico: Dr. Jaime Kovensky
Secretarios Administrativos:
Sr. Gastón Goldberg
Sr. Jorge Signorelli
Comité Editorial:
Dr. Orlando Gabriel Carballo
Dra. Isabel Desimone
Dra. María Laura D´Ambrosio
Dr. Julián Verona.
Correctoras:
Lic. Inés Carozza (Castellano)
Lic. María Victoria González Eusevi (Inglés)

ASOCIACIÓN BIOQUÍMICA ARGENTINA - Fundada el 3 de septiembre de 1934

COMISION DIRECTIVA

Presidente: Dra. Silvia B. González
Vicepresidente: Dra. Patricia Otero
Secretaria: Dra. Viviana Osta
Tesorera: Dra. Isabel Desimone

1º Vocal Titular: Dr. Orlando G. Carballo
2º Vocal Titular: Dr. Alberto Villagra
3º Vocal Titular: Dra. María José Rial

1º Vocal Suplente: Dra. María Rugiero
2º Vocal Suplente: Dr. Eduardo Mormandi
3º Vocal Suplente: Dr. Santiago Fares Taie

COMISION REVISORA DE CUENTAS

Titular 1º: Dra. Silvia Morilla
Titular 2º: Dra. Estella Meyer
Titular 3º: Dra. Silvia Cajiao

1º Vocal Suplente: Dra. Graciela Astarita
2º Vocal Suplente: Dra. Claudia Ayuso

COMISIONES INTERNAS

PRENSA Y DIFUSIÓN
Presidente: Dra. Laura Colitto
Secretario: Dr. Santiago Fares Taie
Vocales:
Dr. Eduardo Mormandi

CERTIFICACION

Presidente: Dr. Alberto Villagra
Secretario: Dra. Viviana Osta
Vocales:
Dra. María José Rial

CURSOS

Presidente: Dra. Silvia González
Secretaria: Dra. María Soledad Caldirola
Vocales:
Dra. María de la Paz Domínguez
Dra. Liliana Maggi
Dra. María José Rial
Dra. Alejandra Svartz
Dra. Marysia Szefer

COMITÉ CIENTÍFICO ASESOR

Dra. Mónica Aixalá
Dr. Gloria Alvarez
Dra. Liliana Arias
Dra. Alicia Blanco
Dr. Orlando Gabriel Carballo
Dra. Silvia González
Dr. Gabriel Migliarino
Dr. Eduardo Mormandi
Dra. Raquel Osatinsky
Dr. Jorge Rey
Dra. María José Rial
Dra. Sandra Rozental
Dra. Gabriela Santizo
Dra. Nora Slobodianik

PREMIOS Y DISTINCIONES

Dra. Alicia Blanco
Dr. Fernando Brites
Dra. Nilda Fink
Dr. Nestor Litwin
Dra. Raquel Osatinsky

REVISIÓN

Activación y cascada de señalización de los linfocitos B

Sánchez, M.L.

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos- CEFYBO-CONICET. Facultad de Medicina-UBA. CABA, ARGENTINA

Contacto: mercedessanchez57@yahoo.com.ar; mercedes.sanchez@conicet.gov.ar

Resumen

Las células B expresan en su superficie inmunoglobulinas de membrana asociadas a un heterodímero, que participa en la cascada de señalización para la activación de estas células y su diferenciación en células plasmáticas productoras de anticuerpos secretados. Los reordenamientos del ADN y el corte y empalme alternativo del ARN son dos mecanismos que permiten explicar la gran diversidad de idiotipos de anticuerpos presentes en el organismo, los sitios de reconocimiento del antígeno con diferente especificidad o afinidad, así como la co-expresión de diferentes isotipos de inmunoglobulinas (IgM e IgD) sobre la membrana plasmática y la diferenciación entre inmunoglobulinas de membrana y secretadas (mIgM y sIgM). Las reacciones de fosforilación de las proteínas resultan de fundamental importancia para este proceso. En esta activación, participan también los fosfatidil-inositoles para la producción del inositol 3 fosfato (IP3), que incrementa la concentración de calcio intracelular y del diacilglicerol (DAG), que activa la proteína-quinasa C. Por otro lado, se produce la activación de proteínas BLNK, Tec quinasas, PLC y GEF (*guanine Exchange factor*), el que activa Ras y Rac, los cuales a su vez activan la vía de las MAP quinasas. Todas estas vías producen la activación de diversos factores de transcripción, como NF- κ B, NFAT y AP1, capaces de regular la transcripción de diversos genes. Las inmunodeficiencias genéticas de algunas de las moléculas, que participan en la cascada de señalización de la activación del receptor de células B funcional (BCR) producen distintos fenotipos, entre los cuales se encuentra el detenimiento de la transición de células pro-B a pre-B. El empleo de terapias génicas resulta de fundamental utilidad para el correcto funcionamiento del sistema inmune. Los microARNs (miARNs) son moléculas endógenas que cumplen un rol fundamental en la regulación de la expresión de los ARN, mensajeros celulares. La inhibición de la expresión de dos enzimas clave en su biosíntesis en progenitores de células B tempranas, resulta en un bloqueo completo en el desarrollo de células B, en la transición pro-B a pre-B. Los miARNs también regulan el desarrollo de las células B en la periferia. La inhibición de la molécula Dicer en células B maduras, resulta en un aumento de células B en la zona marginal y una disminución de células B foliculares.

Palabras clave: linfocitos, receptor, microARN.

Abstract

On the cell membrane, B cells express immunoglobulins that are associated with a heterodimer that participates in the signalling cascade for the activation and the posterior differentiation in plasma cells that produce secreted antibodies. The great diversity of antibodies that exist in the organism, the sites of antigen recognition with different specificity and affinity, the co-expression of different isotypes of immunoglobulins (IgM and IgD) on the plasma membrane, and the differentiation between membrane and secreted immunoglobulins (mIgM and sIgM) can be explained by genetic rearrangements of the DNA and alternative splicing of the RNA. Phosphorylation reactions of the proteins result of fundamental importance for this process. In the activation, phosphatidylinositols participate in the production of phosphate-3 inositol (IP3), which increases the intracellular calcium levels, and of diacylglycerol (DAG), which activates protein-kinase C. On the other hand, BLNK protein, Tec kinases, PLC and GEF, Ras and Rac are activated and the MAP kinase pathway is stimulated. All these processes induce the activation of several transcription factors such as NF- κ B, NFAT and AP-1, which regulate the transcription of several genes. Genetic immunodeficiencies caused by mutations of the molecules involved in the signaling cascade of B cell receptor (BCR) activation produce different phenotypes, including the blockage of the transition from pro-B to pre-B cells. The use of gene therapies is of fundamental value for the proper functioning of the immune system. Micro-RNAs (miRNAs) are endogenous molecules that have a fundamental role in the regulation of the expression of cellular mRNAs. The inhibition of the expression of two key enzymes in the biosynthesis in progenitors of early B cells results in a complete blockage of the development of B cells, in the pro-B to pre-B transition. MiRNAs also regulate the development of B cells in the periphery. The inhibition of Dicer in mature B cells leads to an increase in the marginal zone B cells and a decrease in follicular B cells.

Key words: lymphocyte, receptor, miRNA.

En la respuesta inmune adaptativa, las células B son responsables de la respuesta mediada por anticuerpos. El desarrollo de las células B comienza en los tejidos linfoides primarios, con una maduración funcional subsecuente en los tejidos linfoides secundarios. Se han descrito diferentes estadios definidos por la expresión y reordenamiento del receptor de células B funcional (BCR) y los genes de la inmunoglobulina [Ig]³. El primer estadio de desarrollo que se ha especificado en la diferenciación hacia el linaje B, se denomina pro-B y está caracterizado por el reordenamiento de la cadena pesada Ig. En el estadio pro-B, Ig α (CD79a) e Ig β (CD79b) son expresadas en la superficie.

Las células B participan en la respuesta inmune adaptativa contra patógenos, que proliferan, diferenciándose y produciendo anticuerpos. La región N-terminal de la inmunoglobulina contiene el paratope, que es la región de unión al epítipo antigénico. La región C-terminal de la cadena pesada de la inmunoglobulina presenta una cola hidrofílica con una cisteína, que desempeña el rol de prevenir la secreción prematura y el ensamblaje de la IgM secretoria madura. Una vez que se llega al estadio de célula plasmática, la cisteína participa en la formación de un enlace covalente de puentes disulfuro de las unidades monoméricas, para formar la IgM secretoria polimérica. Las células plasmáticas secretan IgM, ya sea como pentámeros o hexámeros, en los cuales una cadena J une a las unidades monoméricas por puentes disulfuro. Las cadenas pesadas y las cadenas livianas de la inmunoglobulina están unidas covalentemente por puentes disulfuro. Las cadenas pesadas presentan un dominio variable (VH) en el dominio N-terminal y cuatro dominios constantes (denominados CH1- CH4 desde el extremo N al extremo C terminal). Las livianas presentan un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). El CL está juxtapuesto a CH1 y el VL al VH en los extremos del receptor de células B. La VH y la VL determinan la especificidad del BCR en el reconocimiento antigénico.

Existen eventos de recombinación de los distintos dominios de las cadenas livianas y pesadas, por los que se pueden yuxtaponer secuencias exónicas a partir de un gran número de segmentos génicos, que dan como resultado un repertorio de anticuerpos muy vasto.

El primer evento de recombinación se produce entre los segmentos D (*Diversity*) y J (*Joining*) de la cadena pesada, por selección de sólo uno de los segmentos D y sólo uno de los segmentos J de conjuntos exónicos, que se encuentran en el ADN genómico. En este proceso tienen un rol fundamental las enzimas catalíticas recombinasas (*recombination activating gene*), denominadas Rag1 y Rag2.

Existen factores epigenéticos que regulan la accesibilidad de las enzimas al ADN enrollado en el nucleosoma. La acetilación de lisinas, la metilación de lisinas, la fosforilación de tirosinas y serinas y la ubiquitinización de lisinas en las colas aminoterminales de las histonas son factores, que modifican el grado de compactación de la cromatina. La acetilación producida por la HAT (*histone acetyltransfera-*

ses) permite un grado de accesibilidad de las enzimas a la cromatina, para que la recombinación VDJ se produzca con éxito. Por otro lado, la metilación de la lisina 4 de la histona H3 promueve la recombinación VDJ, mientras que la dimetilación de la lisina 9 en la histona H3 parece asociarse con la inhibición de la recombinación VDJ.

En el proceso de recombinación se pierde el material genómico correspondiente a los intrones no codificantes, ubicados entre los distintos segmentos génicos. Luego tiene lugar la recombinación VDJ, que es el proceso por el cual un segmento V es seleccionado a partir de un gran número de segmentos V, para ser juxtapuesto a un segmento reordenado DJ.

El procedimiento que permite la expresión selectiva de los genes codificados en uno de los alelos, ya sea materno o paterno, recibe el nombre de exclusión alélica. Después de que se produce el reordenamiento productivo de la cadena pesada, tiene lugar el de la cadena liviana.

Las horquillas de ADN son reconocidas, procesadas y reparadas por el camino de unión no-homólogo (*non-homologous end joining pathway: NHEJ*). En primer lugar, el heterodímero Ku70/80 se une al ADN y forma un anillo alrededor del extremo del mismo, que puede migrar a lo largo de la doble hélice. Ku70/80 puede atraer a la subunidad catalítica de la proteína-quinasa ADN-dependiente (DNA-PK). Esta proteína es una quinasa serina/treonina de mamífero, que está implicada en la reparación de la doble ruptura del ADN^{4,7}, la replicación del ADN, la transcripción y la recombinación V (D) J^{8,11}. Los ratones deficientes en Ku80 no presentan recombinación V (D) J en el locus de la inmunoglobulina¹².

La autofosforilación de la DNA-PK induce un cambio conformacional en el complejo de unión del ADN de Ku70/80 y DNA-PK, denominado colectivamente complejo DNA-PK^{13,14}. Luego de este cambio conformacional, el complejo Artemis abre la horquilla de ADN^{15,16}. Si los extremos son compatibles, pueden ser ligados por la ligasa IV, la que forma un complejo estable denominado "Cernunnos"¹⁷. Antes de la ligación, los nucleótidos sin templado (N) pueden ser insertados por la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) o delecionados vía la actividad de la exonucleasa^{18,19}. La apertura de la cromatina probablemente requiere la fosforilación inicial de la histona H2AX, la quinasa ATM, el complejo (NBS)1 y varias enzimas necesarias para la adición de ubiquitina cerca de las rupturas de doble cadena, incluyendo RNF8 y RNF168^{20,22}.

En la cadena liviana también se producen eventos de recombinación entre los segmentos V y J de la cadena κ . Si este reordenamiento no es productivo, es decir, si no se forma una unión, que dé como resultado una cadena proteica entera sin mutaciones por corrimiento del marco de lectura, se producirá el reordenamiento de la segunda cadena κ . Si estos eventos no son productivos, se producirá el reordenamiento de una cadena λ y, si este no es productivo, el de la otra.

El segundo fenómeno que incrementa la diversidad del

repertorio de anticuerpos es la combinación de las cadenas pesadas y livianas.

El tercer evento es la adición de nucleótidos P (palindrómicos) o N (sin templado) a los extremos de los exones, que quedaron libres luego del fenómeno de ruptura de la doble hebra de ADN.

El cuarto, que aporta diversidad al sistema es la hipermutación somática, por la cual se reemplazan nucleótidos de las regiones determinantes de complementariedad, ubicadas en el paratope del anticuerpo. Todos estos procesos dan como resultado un repertorio de anticuerpos mayor a 1012 idiotipos.

Posteriormente, tiene lugar la recombinación de los segmentos VDJ a las regiones C de las cadenas pesadas y livianas.

Existen cinco segmentos C μ , C δ , C γ , C ϵ y C α cuya selección dará lugar a los distintos isotipos de las inmunoglobulinas. El proceso de recombinación también es activado para juxtaponer los segmentos VDJ con los segmentos C de la región constante de la inmunoglobulina.

Los linfocitos B en su etapa de maduración a células plasmáticas sufren un proceso de corte y empalme alternativo de ARN (*splicing alternativo*), que permite a las células expresar IgM e IgD al mismo tiempo sobre la membrana celular. Este proceso de corte y empalme implica que algunas copias del ARN mensajero contendrán el exón correspondiente a C μ y otras copias el correspondiente a C δ .

Otro proceso de corte y empalme alternativo implica la eliminación de los ribonucleótidos correspondientes a los dos exones transmembrana, que se encuentran en el ARN que codifica para la IgM de membrana. Al eliminar estos exones, la proteína será asociada con otros monómeros y la cadena J para ser secretados.

Receptor de células B

Las células B están involucradas en el proceso de presentación antigénica a células T y secretan citoquinas reguladoras y quimoquinas. Las células B expresan receptores de unión al antígeno con regiones altamente variables y restringidas clonalmente, es decir que cada clon expresa un tipo de inmunoglobulina, ya sea IgM, IgD, IgA, IgE o IgG²³.

En la superficie celular, la molécula por inmunoglobulina forma un complejo con otras proteínas como CD79a (Ig α) e CD79b (Ig β), que están implicadas en el ensamblaje del receptor. El receptor de células B está compuesto de una IgM o IgD, unida a membrana (mlg) asociada no-covalentemente a este heterodímero de Ig α e Ig β ligados por puentes disulfuro^{24,27}.

Una vez que el antígeno se une al receptor de membrana plasmática, las señales son transducidas a través de la fosforilación, motivo de activación basado en tirosina del inmunoreceptor [*immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)] contenido en las colas citoplasmáticas de CD79 α y CD79 β ^{23,25,28,30}.

Los receptores antigénicos de los linfocitos B y T son

miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, cuya especificidad está determinada por una serie de reordenamientos genómicos. En ambos casos, los dominios de unión del ligando a los receptores están definidos por una combinación de dos polipéptidos codificados independientemente, que están unidos por puentes disulfuro. Además, estos receptores están asociados con un número de otras proteínas sobre la superficie celular. El TCR (*T cell receptor*) es un complejo de al menos seis polipéptidos diferentes, incluyendo las cadenas antígeno específicas α/β y γ/δ , asociadas con los polipéptidos CD3 ϵ , γ , δ y ζ o η , los cuales son requeridos para el correcto ensamblaje y el transporte a la superficie^{31,34}. Los homólogos de las proteínas asociadas al TCR en las células B son Ig α e Ig β ^{35,39}, las cuales forman un heterodímero que está asociado a IgM²⁴, y ambas proteínas comparten un dominio de secuencia intracitoplasmática con CD3 γ , δ y ζ ²⁸. Además, Ig α e Ig β parecen ser requeridas para el transporte de IgM a la membrana celular de fibroblastos transfectados y células B^{24,40}.

Se ha reconstituido la función del receptor de inmunoglobulinas en linfocitos T por transfección de los componentes clonados del receptor. El transporte eficiente de la IgM a la superficie de células T requiere la co-expresión de Ig β . Más aun, las moléculas IgM e Ig β solas fueron suficientes para reconstituir la señal de transducción antígeno específica por la inmunoglobulina en células T transfectadas. El entrecruzamiento de la IgM, ya sea con los anticuerpos anti-receptor o el antígeno inducen el flujo de calcio, el recambio del fosfatidilinositol y la secreción de interleuquinas en células T.

Estos experimentos establecen un requerimiento de Ig β en la función del receptor de inmunoglobulinas y sugiere que este aparato de señalización de las células T y B es estructuralmente homólogo⁴¹. Una función biológica efectora que es inducida por la activación del TCR es la secreción de IL-2. Las células T Jurkat transfectadas con IgM e Ig β o IgM, Ig β , e Ig α secretan IL-2 en respuesta al tratamiento con anti-IgM.

Experiencias con líneas celulares T mutantes y componentes aislados del TCR han establecido que la cadena CD3 ζ es necesaria y suficiente para la transducción de señales^{42,45}. Además, la cadena CD3 ϵ es también capaz de inducir la activación T, posiblemente por un camino alternativo⁴⁶. El entrecruzamiento del TCR, o de las cadenas aisladas ζ o ϵ , lleva a la activación de quinasas dependientes de CD45, incrementa el recambio de fosfoinositol y la movilización de calcio. Un conjunto muy similar de eventos es inducido por el entrecruzamiento de la IgM sobre la superficie de las células B. Por otra parte, el tratamiento de las células con antígeno monomérico no indujo la señalización. Sin embargo, el pre-tratamiento de las células con fosforilcolina (PC) bloqueó la respuesta a PC-BSA. Así, el entrecruzamiento de la inmunoglobulina transfectada parece ser un hito importante del mecanismo de señalización.

La co-expresión de IgM e Ig β es suficiente para reconsti-

tuir tanto la expresión de IgM en la superficie y la función en las células T.

Existen evidencias que indican que Ig α e Ig β son importantes para el transporte de la Ig a la superficie de células B y fibroblastos. Las líneas celulares B a las que les falta Ig β fallan en la expresión de IgM, y este fenotipo puede ser restaurado por transfección de Ig α clonada²⁴. Similarmente, en los fibroblastos, tanto la molécula Ig α como la Ig β son requeridas para la expresión en la superficie de IgM, sin embargo, otros isotipos de IgM pueden ser expresados sobre la superficie de fibroblastos con Ig β aún en ausencia de Ig α ⁴⁰.

Un modelo atractivo de la estructura del receptor de IgM propone que la IgM interactúa con el par de heterodímeros Ig α e Ig β . En este modelo, estas moléculas están unidas por puentes disulfuro e interactúan con IgM, en parte a través de cadenas laterales de aminoácidos en los dominios transmembrana. Teniendo en cuenta la estructura cuaternaria propuesta, se demostró que Ig α no era requerido estrictamente, tanto para la expresión en la superficie o en la función de los receptores antigénicos IgM en células T transfectadas. Se interpretó que uno o más componentes de la célula T, no presentes en fibroblastos o en células B, puede substituir a Ig α .

La experiencia indica que la señalización en células T y B se inicia por activación de las tirosin quinasa. Así, tanto Ig α como Ig β son, rápidamente, fosforiladas después del entrecruzamiento de la IgM en las células B^{25,26,39}. Las proteínas ζ y ZAP-70 son fosforiladas luego del entrecruzamiento del TCR en células T^{47,48}. Las quinasa que se asocian con la IgM en células B son p56lyn, fyn y blk^{49,50} y difieren de las asociadas con el TCR{fyn}⁵¹.

Existen al menos dos mecanismos por los cuales la IgM y la Ig pueden explicar las diferencias entre el aparato de transducción de señales de células T y B. Primero, IgM e Ig β pueden interactuar directamente con una de las tirosin quinasa de la célula T, formando un complejo con similaridad estructural al CD3 ζ o ϵ . El entrecruzamiento de las cadenas aisladas ζ y ϵ es suficiente para inducir la señalización inducida en células T transfectadas^{43,44,46} y existe secuencia de homología entre ζ , ϵ e Ig β ²⁸. Así, las mutaciones en la secuencia consenso intracitoplasmática compartida destruyen la señal de transducción mediada por ϵ . Un segundo mecanismo para explicar la transducción de señales por IgM e Ig α en las células T puede involucrar una asociación directa de IgM con las proteínas codificadas por las células T. Los componentes CD3 realizan esta función, puesto que están estructural y funcionalmente relacionados con Ig α e Ig β ¹³.

Una diferencia mayor entre los receptores TCR y la inmunoglobulina es la naturaleza del antígeno reconocido por los dos receptores. Las inmunoglobulinas reconocen los antígenos directamente, mientras que el reconocimiento del antígeno por el TCR está restringido por el complejo mayor de histocompatibilidad. Varios grupos han mostrado, que los receptores quiméricos compuestos de regiones variables de inmunoglobulinas y regiones constantes del TCR pueden funcionar de una forma independiente del complejo mayor de histocompatibilidad. Las células T que expresan

receptores antigénicos funcionales de inmunoglobulinas tienen el potencial para el reconocimiento de cualquier antígeno reconocido por los anticuerpos de una forma independiente del complejo mayor de histocompatibilidad.

Señalización intracelular en las células B

La transducción de señales por inmunoglobulinas es mediada a través de Ig α e Ig β ⁵². El dominio citoplasmático de estas Igs asociadas contiene una secuencia consenso, que es compartida con las proteínas de señalización de la célula T y el receptor Fc²⁸.

Con el objeto de verificar que los heterodímeros Ig α e Ig β son los componentes de la señalización del receptor Ig, se estudiaron mutaciones de inmunoglobulinas que interfieren con la señal de transducción. Se encontró que mutaciones específicas en el dominio transmembrana de la inmunoglobulina, que inactivan las respuestas de Ca²⁺ y la fosforilación, son capaces de desacoplar la IgM del heterodímero Ig α -Ig β . Estos resultados definen los dominios, que son esenciales para el ensamblaje del receptor de las inmunoglobulinas. En contraste, Ig α e Ig β son ambas necesarias y suficientes para mediar la transducción de señales por el receptor de inmunoglobulinas en células B. Además, la Ig α y la Ig β pueden activar diferentes caminos de señalización.

El entrecruzamiento de las inmunoglobulinas de superficie conduce a la fosforilación de Ig α e Ig β y a la activación de quinasa asociadas al receptor^{26,39,40,49,50,53,54}. Las líneas celulares B que llevan inmunoglobulinas con mutaciones en la región transmembrana impiden la transducción de señales^{55,56}. El trabajo con mutaciones de sustitución de los aminoácidos YS por VV de los exones transmembrana de la IgM humana y proteínas quiméricas compuestas por las colas citoplasmáticas de Ig α e Ig β , más el dominio transmembrana de las inmunoglobulinas: IgM:Ig β , IgM:Ig α e IgM:Ig β -Y/F 206, se demostró que las mismas desestabilizan el receptor antigénico de la célula B. Las células de linfoma B A20 transfectadas con inmunoglobulinas, que unen la fosforilación, fueron usadas para determinar si las mutaciones del dominio transmembrana de la inmunoglobulina tenían algún efecto en las interacciones de la inmunoglobulina con el complejo Ig α -Ig β ⁵⁷. Las células A20 presentan el antígeno a través de la IgG2a, mientras que el entrecruzamiento de la IgG2a produce el flujo de calcio⁵⁷.

El análisis de las mutaciones de la inmunoglobulina de membrana ha definido dos grupos distintos de mutantes, que interfieren con la transducción de señales⁵⁵⁻⁵⁸. El primer grupo, representado por la delección de los tres aminoácidos del extremo COOH-terminal de la cadena IgH{cito}, resulta de una IgM anclada por el inositol, que une el antígeno pero no induce a una respuesta en calcio ni presenta antígeno^{57,59}. El segundo grupo de mutaciones involucra los aminoácidos polares en el dominio transmembrana de la inmunoglobulina^{55,57,59}. La alteración de estos residuos polares tiene efecto tanto sobre la transducción de señales, como en el transporte de la IgM a la superficie celular, sin alterar el anclaje a la membrana. Por ejemplo, la introducción de grupos no polares en la posición 587-588{YS/VV} produce un receptor que no puede producir el flujo de calcio o presentar

antígenos⁵⁷. Cambios similares, también, resultan en una inmunoglobulina, cuyo transporte a la superficie celular es independiente de la coexpresión de Ig α e Ig β ⁵⁵. Una explicación para estas observaciones es que los aminoácidos polares en el dominio transmembrana de la inmunoglobulina forman un puente entre la IgM y el heterodímero Ig α -Ig β . La asociación de IgM e IgG2a endógena con estas moléculas no se produce cuando las mismas se encuentran mutadas o truncada su cola citoplasmática^{24,55,57}. Los grupos polares en el dominio transmembrana de la inmunoglobulina son puntos de contacto esenciales para Ig α -Ig β . Además, existe una fuerte correlación entre la actividad del receptor y la habilidad de la cadena pesada de la inmunoglobulina para formar un complejo estable con Ig α -Ig β .

Las mutaciones de la región transmembrana interfieren con la activación de la fosforilación de la tirosina. La inducción de la fosforilación por entrecruzamiento del receptor se ve completamente disminuida por la mutación cito. Por otro lado, la mutación cito, que crea una forma de IgM anclada a la membrana por el inositol, destruye completamente la habilidad del receptor antigénico para estimular la fosforilación en tirosina. La mutación YS/VV, que también desacopla al receptor de la Ig α -Ig β , reduce dramáticamente la inducción de la fosforilación, pero no elimina completamente esta respuesta. Este pequeño aumento en la fosforilación es reproducible y no una función de la reactividad cruzada, ya que no hay respuesta en las células B, que expresan la mutante cito o las células no transfectadas.

La respuesta de Ca²⁺ es dependiente de la presencia de tirosinas conservadas en la posición 206 de la Ig β . Los mecanismos de señalización para el flujo de Ca²⁺ son dependientes de este residuo, el cual es en parte una secuencia consenso compartida con otros receptores de reconocimiento inmune⁵².

Los componentes del receptor Ig han sido asociados con varias quinasas diferentes incluyendo Lyn, Fyn, Blk y Syk, la que es homóloga a la ZAP-70^{49,50,60,61}. En células B, Ig α e Ig β pueden servir para conectar la IgM con las quinasas celulares por unión directa a los dominios SH2.

Los estudios estructurales de los dominios SH2 de src han demostrado que la interacción de SH2 con los péptidos se realiza a través de bolsillos de unión de fosfotirosina e isoleucina separados por dos aminoácidos^{62,64}. El consenso encontrado en los receptores de reconocimiento inmune incluye, al menos, dos secuencias repetidas YXXL/I, que interactuarían con los dominios SH2 de la familia de quinasas Src^{62,65}. Los experimentos *in vitro* sugieren, que Ig α e Ig β pueden mediar diferentes funciones de señalización a través de interacciones con diferentes quinasas. Ig α e Ig β tienen diferentes actividades de señalización y pueden mediar procesos fisiológicos independientes *in vivo*.

La quinasa responsable de esta fosforilación es la quinasa producida en el bazo, de la familia de Src [*Src-family kinase* (SKF)]: particularmente, Lyn, la cual es expresada predominantemente en células B⁶⁶.

Los niveles alterados de Lyn, ya sea su alta o baja expresión, resultan en fenotipos autoinmunes. SKF se une a los dominios tirosina de SH2 (*Src-homology 2*) para producir

la fosforilación de ITAM y se observa la regulación positiva de la actividad de la quinasa^{30,67}. Este proceso resulta en la activación y fosforilación de Syk^{68,69}. Una vez que Syk es activada, la señal del BCR es propagada por la vía de un grupo de proteínas, asociadas con una proteína adaptadora de unión de célula B (Blnk, SLP-65). Este grupo se denomina signalosoma³. Blnk es otra quinasa que se une a CD79 α vía tirosinas no-ITAM y es fosforilada por Syk⁷⁰.

Syk participa en la fosforilación de ITAM, la autofosforilación, así como en la activación, que se encuentran posteriormente en la vía. En contraste, Lyn activa ambos reguladores positivos y negativos de la señalización del BCR, tales como CD22, Fc γ R1b, SHP1 y SHIP1²⁹.

SHIP1 y SHP1 han mostrado que cumplen un rol adicional en las células B, modulando la señalización en los centros germinales, en los que las células B sufren mutación somática de sus BCRs, además, aquellos con afinidad incrementada por el antígeno, son seleccionados para la sobrevivencia y cambio de clase (*class switching*). Estas fosfatasa son reguladas positivamente en las células B de los centros germinales y presentan una señalización positiva de su BCR en diferentes niveles, a través del ciclo de estas células altamente proliferativas. Las células con receptores de mayor afinidad son más competitivas, conduciendo a la maduración de la afinidad de los anticuerpos^{29,30}.

Por otra parte, también son importantes los estados monofosforilado o difosforilado de los dominios ITAM, porque producen la activación mediada por Syk y la señalización inhibitoria mediada por Lyn. Así, en células B anérgicas, estimuladas por antígeno, CD79 α es monofosforilado y conduce a una activación crónica de la señalización inhibitoria por SHIP1^{25,29}.

La Blnk fosforilada sirve para el ensamblaje de otros componentes, incluyendo la tirosin quinasa de Bruton (Btk), Vav 1, y la fosfolipasa Cy2 (PLy2)⁷¹. Estas últimas contienen dominios de homología plecstrina (PH), que se unen a los fosfoinositoles lipídicos. Los mismos son numerosos en la cara interna de la membrana plasmática y tienen suma importancia en la propagación de caminos de señalización múltiples. El fosfatidilinositol 3, 4, 5 - trifosfato es el producto de la fosforilación de PI^{4,5} P2 en su tercera posición por la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K). PI^{3,4,5} P3 es un segundo mensajero crítico en la señalización por el BCR y es el blanco específico de las fosfatasa de lípidos, que regulan la señalización. Luego de la interacción con Blnk, Btk fosforila la PLCy2, la cual, a su vez, produce la ruptura del fosfatidilinositol PI^{4,5} P2, generando IP3 y DAG^{72,73}. IP3 se une al receptor (IP3R) en la membrana del retículo endoplasmático, dando como resultado la liberación de los depósitos intracelulares de Ca²⁺. Esta reducción en los depósitos de calcio activa los canales, lo que permite el influjo de los iones calcio extracelulares^{74,75}. A su mismo, DAG se une a la proteína Ras de liberación de guanil-nucleótidos, así como a los miembros clásicos de la familia de proteína quinasa C, tales como PKCb en células B promoviendo su actividad^{76,78}.

En la activación de las células B se impulsan cascadas de quinasas múltiples (por ejemplo, Erk/MAP quinasas) y los factores de intercambio de guanil-nucleótidos (por ejem-

plo, Ras/Raf]. La consecuencia de estas señales incluye la translocación de los factores de transcripción (por ejemplo, NF- κ B, AP1 y NFAT); el resultado neto de estos procesos conduce a la activación de la célula B, a la presentación del antígeno, a la producción de citoquinas, a la proliferación celular y a la diferenciación.

Estas señales de activación son necesarias para iniciar respuestas contra antígenos con potencial patogénico. Existen múltiples receptores y caminos acoplados y mediados por fosfatasa, que regulan estas respuestas, así como silenciando a células B auto-reactivas. Los reguladores clave de la señalización del BCR incluyen los dominios de la tirosin fosfatasa 1 (SHP1), y un dominio SH2, que contiene inositol 5' fosfatasa 1 (SHIP1), el homólogo de tensina (PTEN) y fosfatasa lipídicas. Múltiples estudios han mostrado que la disrupción de los circuitos regulatorios negativos de esta vía pueden resultar en la modificación de los mecanismos de tolerancia y autoinmunidad^{79,82}.

CD19, una glicoproteína de membrana restringida a la célula B, funciona como una proteína accesoria en la señalización del BCR y cuando se encuentra asociada con CD21, lo hace como un correceptor para los fragmentos del complemento C3dg⁸³. El requerimiento de CD19 en esta respuesta puede estar mecánicamente relacionado con un requerimiento aparente por SKF en la señalización del BCR, inducida por antígenos de baja afinidad⁸⁴.

El BCR se encuentra asociado a un complejo formado por las moléculas CD19, CD81 (TAPA-1 y CD21, conjunto denominado correceptor del linfocito B. La unión del antígeno al BCR impulsa la fosforilación en tirosina de los dominios ITAM presentes en la molécula CD19, con la consecuente amplificación de la señal de activación. El CD21 reconoce productos de degradación del componente C3 del complemento. Cuando el antígeno se encuentra opsonizado por complemento, el complejo CD21-CD19-CD81 permite la activación de la célula B con concentraciones subóptimas de antígeno. Además, cuando éste se encuentra opsonizado por anticuerpos IgG, el reconocimiento del antígeno favorece la co-agregación del BCR con el RFc γ IIb. Este proceso inhibe la señal de activación disparada por el BCR. La porción intracitoplasmática del RFc γ IIb tiene dominios inhibitorios ITIM; la fosforilación de los mismos permite el reclutamiento de las fosfatasa encargadas de inhibir la transducción de la señal de activación disparada por el BCR.

En la desactivación de las células B, Lyn fosforila los motivos de inhibición basados en tirosina del inmunoreceptor (ITIMs) en CD22 y Fc γ RIIb. Estos ITIMs activan SHP I y SHIP1, los cuales funcionan para impedir la señalización del BCR. La proteína fosfatasa SHP I tiene muchos sustratos incluyendo CD79, Syk, Grb2, y Vav, así como otros no mostrados. Adicionalmente, los ITIMs y los ITAMs mono-fosforilados pueden activar la fosfatasa lipídica SHIP I. Ésta hidroliza la posición 5 de PI^{3,4,5} P3, mientras PTEN remueve el de la posición 3. Esta disminución en la concentración de PI^{3,4,5} P3 deriva en la disociación de moléculas conteniendo dominios PH, inhibiendo el ensamblaje del signalosoma y la señalización corriente abajo.

Un motivo de 13 aminoácidos en el dominio citoplasmáti-

co de Fc γ RIIb modula la señalización del receptor de células B⁸⁵. El receptor Fc de los linfocitos B, Fc γ RIIb (isoforma β 1), contribuye a modular la activación de las células B, gatillado por el complejo de inmunoglobulina de superficie^{86,87}. El entrecruzamiento de la inmunoglobulina de superficie por el antígeno o el anticuerpo anti-Ig F (ab')₂ induce un incremento transiente en el Ca²⁺ libre citosólico, un aumento en el inositol-3-fosfato, la activación de proteína quinasa C y una incrementada fosforilación en tirosina^{88,90}. El entrecruzamiento del Fc γ RIIb con el complejo de inmunoglobulina de superficie confiere una señal dominante, que previene o aborta la activación de los linfocitos, gatillada a través de los motivos ARH-1 de las subunidades de transducción de señales Ig- α e Ig- β . El receptor Fc γ RIIb modula la movilización de Ca²⁺, inducida por la inmunoglobulina de membrana por inhibición del flujo de Ca²⁺, sin cambios en el patrón de fosforilación en tirosina. Un motivo de 13 aminoácidos en el dominio citoplasmático de Fc γ RIIb es necesario y suficiente para este efecto. La tirosina en la posición 309 es fosforilada luego del entrecruzamiento con la inmunoglobulina de superficie; la mutación de este residuo aborta el efecto inhibitorio de Fc γ RIIb. Esta inhibición está acoplada directamente a la señalización mediada a través de Ig- α e Ig- β como se evidencia por el empleo de moléculas quiméricas IgM/ α e IgM/ β . El motivo de 13 aminoácidos en el Fc γ RIIb controla la activación del linfocito inhibiendo el camino de señalización de Ca²⁺ gatillado a través de los motivos ARH-1 como resultado del reclutamiento de proteínas que contienen SH2 que interactúan con el dominio citoplasmático Fc γ RIIb.

El entrecruzamiento del Fc γ RII con la inmunoglobulina de membrana (mIg) inhibe la movilización de Ca²⁺. Esta inhibición es revertida por el anticuerpo monoclonal 2.4G2 anti-Fc γ RII, el cual previene la unión del dominio Fc intacto del anticuerpo anti-mIg al Fc γ RII⁹¹. La estimulación de mIg produce la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares y el influjo de Ca²⁺ desde el exterior⁵⁷. La estimulación de las células B en presencia y ausencia de EGTA permite distinguir entre estas dos fuentes de Ca²⁺. La incubación con EGTA disminuye la movilización de Ca²⁺ cuando se produce el entrecruzamiento de la mIg con anti-mIg F (ab')₂, mientras que aun en presencia de EGTA, la movilización de Ca²⁺ inducida por agregado de anti-mIg entera es aproximadamente la misma. Esto indica que el efecto de Fc γ RII es, primariamente, inhibir el flujo de Ca²⁺ a través de la membrana celular. La delección de 13 aminoácidos de la molécula receptora no presenta efecto sobre el influjo de Ca²⁺ inducido por entrecruzamiento del Fc γ RII con mIg.

Una segunda forma del pre-BCR es conocida como D μ pre-BCR⁹², y se encuentra en células pre-B1, además contiene cadenas mIg μ truncadas, a las que le falta el dominio VH (mD μ). mD μ , es producida por genes Ig que tienen re arreglados los segmentos génicos DJH en el marco de lectura 2 (RF), produciendo un codón de iniciación en el marco de lectura y una unidad de transcripción truncada⁹². mD μ es una proteína de membrana, que forma un complejo con λ 5, V-pre-B e Ig α -Ig β . Las células pre-B son seleccionadas negativamente en un proceso, que es mediado a través del

dominio transmembrana de la proteína $D\mu^{93}$. En contraste, las células pre-B que expresan $Ig\mu$ intacta en el pre-BCR son seleccionadas positivamente.

La selección negativa contra $D\mu$ es mediada por $Ig\alpha$ - $Ig\beta^{94}$. El dominio transmembrana de la cadena pesada de la IgM es requerido para que se produzcan los fenómenos de exclusión alélica y la transición de células pre-B^{95,99}.

Los reordenamientos del locus de la inmunoglobulina resultan en la generación y expresión de superficie del pre-BCR, compuesto por una cadena pesada $Ig\mu$, cadenas livianas substitutas $VpreB$ y λ 5, y finalmente, por el BCR maduro, capaz de unir el antígeno¹⁰⁰. Las células B maduras que se mueven en la periferia, pueden ser activadas por el antígeno, sufrir expansión clonal y diferenciarse de las células plasmáticas productoras de anticuerpos o células B de memoria, que responderán más rápido a una segunda exposición al antígeno. Las células B-2 se originan a partir de progenitores de la médula ósea adulta. Otra subpoblación de linfocitos B, denominada B-1, aparece durante la vida fetal y expresa en la superficie IgM , y poca o nula, IgD . Los linfocitos B-1 no presentan cambio de clase de inmunoglobulina y producen anticuerpos con baja afinidad habiendo sido implicados en enfermedades autoinmunes y muchas leucemias crónicas.

MicroARN

Los microARNs (miARNs) son moléculas endógenas que cumplen un rol fundamental en la regulación de la expresión de los ARN mensajeros celulares. Están involucrados en mecanismos de retroalimentación positiva o negativa de la expresión de numerosas moléculas¹⁰¹.

Los miARNs son moléculas pequeñas de ARN no codificante, que tienen un largo de 20 a 22 nucleótidos y se encuentran en todas las células eucariotas, con excepción de los hongos. Más de 1000 miARNs están codificados por el genoma humano y ellos tienen como blanco alrededor del 60 % de los genes codificantes para proteínas humanas. Cada miARN puede tener como blanco cientos de ARNs mensajeros (mARNs) y un sólo mARN es a menudo el blanco de múltiples miARNs dentro de un tipo celular¹¹. Actúan como represores traduccionales de los transcritos de mARN¹² y participan en la resolución de la inflamación^{13,14}.

La inhibición de la expresión de Dicer y Ago2 en progenitores de células B tempranas resultó en un bloqueo completo en el desarrollo de células B, en la transición pro-B a pre-B, lo cual muestra la importancia de los miARNs en este proceso¹. Las células B deficientes en Dicer muestran una expresión incrementada de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TDT) y una diversificación de anticuerpos incrementada^{1,102,103}. Varios miARNs controlan el desarrollo de las células B, el que se encuentra frenado en los ratones deficientes en Dicer. El cluster miR-17-92 está altamente expresado en las células B progenitoras, y su expresión disminuye durante la maduración de la célula B, sugiriendo que es un regulador positivo de la diferenciación de la célula B⁴⁷. En los ratones deficientes en miR-17-92, la transición del estadio pro-B a pre-B está comprometida, teniendo lugar un incremento de la apoptosis, lo cual se corre-

laciona con una alta expresión de la proteína pro-apoptótica Bim, un blanco del cluster miR-17-92¹⁰⁴.

La expresión constitutiva de miR-34a, cuya expresión es regulada negativamente en la transición pro-B a pre-B, determina el bloqueo del desarrollo de células B temprano con una acumulación de células pro-B y una reducción de células pre-B y células B maduras⁴⁸. Ha sido demostrado que estos efectos son el resultado de tener como blanco a la molécula Foxp1, un factor de transcripción requerido para el desarrollo temprano de la célula B. El efecto de miR-34a sobre el desarrollo de las células B es consistente con anomalías asociadas con la deficiencia de p53 como el incrementado número de células pre-B, así como células B maduras, siendo este último hallazgo una consecuencia de la pérdida de la función de miR-34a. Esta evidencia implica una conexión entre p53 y Foxp1 a través de la acción de miR-34a, el cual ha demostrado ser un blanco transcripcional de p53 y participar del control de la proliferación celular inapropiada^{47,105}.

Los miARNs también regulan el desarrollo de las células B en la periferia. La inhibición de Dicer en células B maduras da como resultado un aumento de células B en la zona marginal y una disminución de células B foliculares.

Referencias Bibliográficas

- Xu, S, Guo, K, Zeng, Q, Huo, J, Lam, K P. The RNase III enzyme Dicer is essential for germinal center B cell formation. *Blood* 2012;119:767-776.
- Curtale, G., and Citarella, F. Dynamic nature of noncoding RNA regulation of adaptive immune response, *International journal of molecular sciences* 2013;14:17347-17377.
- Fruman, D. A., Satterthwaite, A. B., and Witte, O. N. Xid-like phenotypes: a B cell signalosome takes shape, *Immunity* 2000;13:1-3.
- Jeggo, P. A., Taccioli, G. E., and Jackson, S. P. Menage a trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK, *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1995;17:949-957.
- Weaver, D. T. What to do at an end: DNA double-strand break repair, *Trends in genetics: TIG* 1995;11:388-392.
- Getts, R. C., and Stamato, T. D. Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the xrs double-strand DNA repair-deficient mutant, *The Journal of biological chemistry* 1994;269:15981-15984.
- Lees-Miller, S. P., Godbout, R., Chan, D. W., Weinfeld, M., Day, R. S., 3rd, Barron, G. M., and Allalunis-Turner, J. Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radio-sensitive human cell line, *Science* 1995;267:1183-1185.
- Smider, V., Rathmell, W. K., Lieber, M. R., and Chu, G. Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA, *Science* 1994;266:288-291.
- Taccioli, G. E., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A. R., Alt, F. W., Jackson, S. P., and Jeggo, P. A. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination, *Science* 1994;265:1442-1445.
- Kirchgessner, C. U., Patil, C. K., Evans, J. W., Cuomo, C. A.,

- Fried, L. M., Carter, T., Oettinger, M. A., and Brown, J. M. DNA-dependent kinase [p350] as a candidate gene for the murine SCID defect, *Science* 1995;267:1178-1183.
11. Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C., Demengeot, J., Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W., Jeggo, P. A., and Jackson, S. P. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V[D]J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation, *Cell* 1995;80:813-823.
 12. Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M. C., and Li, G. C. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V[D]J recombination, *Nature* 1996;382:551-555.
 13. Smith, G. C., and Jackson, S. P. The DNA-dependent protein kinase, *Genes & development* 1999;13:916-934.
 14. Weterings, E., and van Gent, D. C. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis, *DNA repair* 2004;3:1425-1435.
 15. Douglas, P., Sapkota, G. P., Morrice, N., Yu, Y., Goodarzi, A. A., Merkle, D., Meek, K., Alessi, D. R., and Lees-Miller, S. P. Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase, *The Biochemical journal* 2022;368:243-251.
 16. Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M. R. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V[D]J recombination, *Cell* 2002;108:781-794.
 17. Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S. P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA non-homologous end-joining, *Cell* 2006;124:301-313.
 18. Kallenbach, S., Doyen, N., Fanton d'Andon, M., and Rougeon, F. Three lymphoid-specific factors account for all junctional diversity characteristic of somatic assembly of T-cell receptor and immunoglobulin genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:2799-2803.
 19. Landau, N. R., Schatz, D. G., Rosa, M., and Baltimore, D. Increased frequency of N-region insertion in a murine pre-B-cell line infected with a terminal deoxynucleotidyl transferase retroviral expression vector, *Molecular and cellular biology* 1987;7:3237-3243.
 20. Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D. J. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks, *The Journal of biological chemistry* 2001;276:42462-42467.
 21. Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins, *Cell* 2007;131:887-900.
 22. Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., and Jackson, S. P. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks, *Cell* 2005;123:1213-1226.
 23. Packard, T. A., and Cambier, J. C. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation, *F1000prime reports* 2013;5:40.
 24. Hombach, J., Tsubata, T., Leclercq, L., Stappert, H., and Reth, M. Molecular components of the B-cell antigen receptor complex of the IgM class, *Nature* 1990;343:760-762.
 25. Campbell, K. S., and Cambier, J. C. B lymphocyte antigen receptors (mlg) are non-covalently associated with a disulfide linked, inducibly phosphorylated glycoprotein complex, *The EMBO journal* 1990;9:441-448.
 26. Gold, M. R., Matsuchi, L., Kelly, R. B., and DeFranco, A. L. Tyrosine phosphorylation of components of the B-cell antigen receptors following receptor crosslinking, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:3436-3440.
 27. Cambier, J. C., Pleiman, C. M., and Clark, M. R. Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors, *Annual review of immunology* 1994;12:457-486.
 28. Reth, M. Antigen receptor tail clue, *Nature* 1989;338:383-384.
 29. Yao, X. R., Flaswinkel, H., Reth, M., and Scott, D. W. Immunoreceptor tyrosine-based activation motif is required to signal pathways of receptor-mediated growth arrest and apoptosis in murine B lymphoma cells, *Journal of immunology* 1995;155:652-661.
 30. Johnson, S. A., Pleiman, C. M., Pao, L., Schneringer, J., Hippen, K., and Cambier, J. C. Phosphorylated immunoreceptor signaling motifs (ITAMs) exhibit unique abilities to bind and activate Lyn and Syk tyrosine kinases, *Journal of immunology* 1995;155:4596-4603.
 31. Berkhout, B., Alarcon, B., and Terhorst, C. Transfection of genes encoding the T cell receptor-associated CD3 complex into COS cells results in assembly of the macromolecular structure, *The Journal of biological chemistry* 1988;263:8528-8536.
 32. Weiss, A., and Stobo, J. D. Requirement for the coexpression of T3 and the T cell antigen receptor on a malignant human T cell line, *The Journal of experimental medicine* 1984;160:1284-1299.
 33. Sussman, J. J., Bonifacino, J. S., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A. M., Saito, T., Klausner, R. D., and Ashwell, J. D. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex, *Cell* 1988;52:85-95.
 34. Ohashi, P. S., Mak, T. W., Van den Elsen, P., Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Calman, A. F., Terhorst, C., Stobo, J. D., and Weiss, A. Reconstitution of an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer, *Nature* 1985;316:606-609.
 35. Sakaguchi, N., Kashiwamura, S., Kimoto, M., Thalmann, P., and Melchers, F. B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties, *The EMBO journal* 1988;7:3457-3464.
 36. Hombach, J., Leclercq, L., Radbruch, A., Rajewsky, K., and Reth, M. A novel 34-kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells, *The EMBO journal* 1988;7:3451-3456.
 37. Hermanson, G. G., Eisenberg, D., Kincade, P. W., and Wall, R. B29: a member of the immunoglobulin gene superfamily exclusively expressed on beta-lineage cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:6890-6894.
 38. Hombach, J., Lottspeich, F., and Reth, M. Identification

- of the genes encoding the IgM-alpha and Ig-beta components of the IgM antigen receptor complex by amino-terminal sequencing, *European journal of immunology* 1990;20:2795-2799.
39. Campbell, K. S., Hager, E. J., Friedrich, R. J., and Cambier, J. C. IgM antigen receptor complex contains phosphoprotein products of B29 and mb-1 genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:3982-3986.
 40. Venkitaraman, A. R., Williams, G. T., Dariavach, P., and Neuberger, M. S. The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes, *Nature* 1991;352:777-781.
 41. Costa, T. E., Franke, R. R., Sanchez, M., Misulovin, Z., and Nussenzweig, M. C. Functional reconstitution of an immunoglobulin antigen receptor in T cells, *The Journal of experimental medicine* 1992;175:1669-1676.
 42. Frank, S. J., Niklinska, B. B., Orloff, D. G., Mercep, M., Ashwell, J. D., and Klausner, R. D. Structural mutations of the T cell receptor zeta chain and its role in T cell activation, *Science* 1990;249:174-177.
 43. Irving, B. A., and Weiss, A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways, *Cell* 1991;64:891-901.
 44. Romeo, C., and Seed, B. Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides, *Cell* 1991;64:1037-1046.
 45. Weissman, A. M., Frank, S. J., Orloff, D. G., Mercep, M., Ashwell, J. D., and Klausner, R. D. Role of the zeta chain in the expression of the T cell antigen receptor: genetic reconstitution studies, *The EMBO journal* 1989;8:3651-3656.
 46. Letourneur, F., and Klausner, R. D. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 epsilon, *Science* 1992;255:79-82.
 47. Chang, T. C., Wentzel, E. A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K. H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C. J., Arking, D. E., Beer, M. A., Maitra, A., and Mendell, J. T. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis, *Molecular cell* 2007;26:745-752.
 48. Baniyash, M., Garcia-Morales, P., Luong, E., Samelson, L. E., and Klausner, R. D. The T cell antigen receptor zeta chain is tyrosine phosphorylated upon activation, *The Journal of biological chemistry* 1988;263:18225-18230.
 49. Yamanashi, Y., Kakiuchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto, T., and Toyoshima, K. Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn, *Science* 1991;251:192-194.
 50. Burkhardt, A. L., Brunswick, M., Bolen, J. B., and Mond, J. J. Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88:7410-7414.
 51. Samelson, L. E., Phillips, A. F., Luong, E. T., and Klausner, R. D. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87:4358-4362.
 52. Sanchez, M., Misulovin, Z., Burkhardt, A. L., Mahajan, S., Costa, T., Franke, R., Bolen, J. B., and Nussenzweig, M. Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig alpha and Ig beta, *The Journal of experimental medicine* 1993;178:1049-1055.
 53. Gold, M. R., Law, D. A., and DeFranco, A. L. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by the B-lymphocyte antigen receptor, *Nature* 1990;345:810-813.
 54. Campbell, M. A., and Sefton, B. M. Protein tyrosine phosphorylation is induced in murine B lymphocytes in response to stimulation with anti-immunoglobulin, *The EMBO journal* 1990;9:2125-2131.
 55. Williams, G. T., Venkitaraman, A. R., Gilmore, D. J., and Neuberger, M. S. The sequence of the mu transmembrane segment determines the tissue specificity of the transport of immunoglobulin M to the cell surface, *The Journal of experimental medicine* 1990;171:947-952.
 56. Parikh, V. S., Bishop, G. A., Liu, K. J., Do, B. T., Ghosh, M. R., Kim, B. S., and Tucker, P. W. Differential structure-function requirements of the transmembrane domain of the B cell antigen receptor, *The Journal of experimental medicine* 1992;176:1025-1031.
 57. Shaw, A. C., Mitchell, R. N., Weaver, Y. K., Campos-Torres, J., Abbas, A. K., and Leder, P. Mutations of immunoglobulin transmembrane and cytoplasmic domains: effects on intracellular signaling and antigen presentation, *Cell* 1990;63:381-392.
 58. Parikh, V. S., Nakai, C., Yokota, S. J., Bankert, R. B., and Tucker, P. W. COOH terminus of membrane IgM is essential for an antigen-specific induction of some but not all early activation events in mature B cells, *The Journal of experimental medicine* 1991;174:1103-1109.
 59. Mitchell, R. N., Shaw, A. C., Weaver, Y. K., Leder, P., and Abbas, A. K. Cytoplasmic tail deletion converts membrane immunoglobulin to a phosphatidylinositol-linked form lacking signaling and efficient antigen internalization functions, *The Journal of biological chemistry* 1991;266:8856-8860.
 60. Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W., and Weiss, A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain, *Cell* 1992;71:649-662.
 61. Taniguchi, T., Kobayashi, T., Kondo, J., Takahashi, K., Nakamura, H., Suzuki, J., Nagai, K., Yamada, T., Nakamura, S., and Yamamura, H. Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis, *The Journal of biological chemistry* 1991;266:15790-15796.
 62. Eck, M. J., Shoelson, S. E., and Harrison, S. C. Recognition of a high-affinity phosphotyrosyl peptide by the Src homology-2 domain of p56lck, *Nature* 1993;362:87-91.
 63. Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., and et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences, *Cell* 1993;72:767-778.
 64. Waksman, G., Shoelson, S. E., Pant, N., Cowburn, D., and Kuriyan, J. Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms, *Cell* 1993;72:779-790.
 65. Reth, M., Hombach, J., Wienands, J., Campbell, K. S., Chien,

- N., Justement, L. B., and Cambier, J. C. The B-cell antigen receptor complex, *Immunology today* 1991;12:196-201.
66. Saijo, K., Schmedt, C., Su, I. H., Karasuyama, H., Lowell, C. A., Reth, M., Adachi, T., Patke, A., Santana, A., and Tarakhovsky, A. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development, *Nature immunology* 2003;4:274-279.
 67. Kurosaki, T., Johnson, S. A., Pao, L., Sada, K., Yamamura, H., and Cambier, J. C. Role of the Syk autophosphorylation site and SH2 domains in B cell antigen receptor signaling, *The Journal of experimental medicine* 1995;182:1815-1823.
 68. Rowley, R. B., Burkhardt, A. L., Chao, H. G., Matsueda, G. R., and Bolen, J. B. Syk protein-tyrosine kinase is regulated by tyrosine-phosphorylated Ig alpha/Ig beta immunoreceptor tyrosine activation motif binding and autophosphorylation, *The Journal of biological chemistry* 1995;270:11590-11594.
 69. Shiue, L., Zoller, M. J., and Brugge, J. S. Syk is activated by phosphotyrosine-containing peptides representing the tyrosine-based activation motifs of the high affinity receptor for IgE, *The Journal of biological chemistry* 1995;270:10498-10502.
 70. Kabak, S., Skaggs, B. J., Gold, M. R., Affolter, M., West, K. L., Foster, M. S., Siemasko, K., Chan, A. C., Aebersold, R., and Clark, M. R. The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways, *Molecular and cellular biology* 2002;22:2524-2535.
 71. Fu, C., Turck, C. W., Kurosaki, T., and Chan, A. C. BLNK: a central linker protein in B cell activation, *Immunity* 1998;9:93-103.
 72. Coggeshall, K. M., and Cambier, J. C. B cell activation. VIII. Membrane immunoglobulins transduce signals via activation of phosphatidylinositol hydrolysis, *Journal of immunology* 1984;133:3382-3386.
 73. Ransom, J. T., Harris, L. K., and Cambier, J. C. Anti-Ig induces release of inositol 1,4,5-trisphosphate, which mediates mobilization of intracellular Ca⁺⁺ stores in B lymphocytes, *Journal of immunology* 1986;137:708-714.
 74. Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M. D. The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers, *Nature* 2008;456:116-120.
 75. Hogan, P. G., Lewis, R. S., and Rao, A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI, *Annual review of immunology* 2010;28:491-533.
 76. Roose, J. P., Mollenauer, M., Ho, M., Kurosaki, T., and Weiss, A. Unusual interplay of two types of Ras activators, RasGRP and SOS, establishes sensitive and robust Ras activation in lymphocytes, *Molecular and cellular biology* 2007;27:2732-2745.
 77. Stone, J. C. Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells, *Genes & cancer* 2011;2:320-334.
 78. Guo, B., Su, T. T., and Rawlings, D. J. Protein kinase C family functions in B-cell activation, *Current opinion in immunology* 2004;16:367-373.
 79. Suzuki, A., Kaisho, T., Ohishi, M., Tsukio-Yamaguchi, M., Tsubata, T., Koni, P. A., Sasaki, T., Mak, T. W., and Nakano, T. Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination, *The Journal of experimental medicine* 2003;197:657-667.
 80. Maxwell, M. J., Duan, M., Armes, J. E., Anderson, G. P., Tarlinton, D. M., and Hibbs, M. L. Genetic segregation of inflammatory lung disease and autoimmune disease severity in SHIP-1^{-/-} mice, *Journal of immunology* 2011;186:7164-7175.
 81. O'Neill, S. K., Getahun, A., Gauld, S. B., Merrell, K. T., Tamir, I., Smith, M. J., Dal Porto, J. M., Li, Q. Z., and Cambier, J. C. Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy, *Immunity* 2011;35:746-756.
 82. Pao, L. I., Lam, K. P., Henderson, J. M., Kutok, J. L., Alimzhanov, M., Nitschke, L., Thomas, M. L., Neel, B. G., and Rajewsky, K. B cell-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase Shp1 promotes B-1a cell development and causes systemic autoimmunity, *Immunity* 2007;27:35-48.
 83. Depoil, D., Fleire, S., Treanor, B. L., Weber, M., Harwood, N. E., Marchbank, K. L., Tybulewicz, V. L., and Batista, F. D. CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand, *Nature immunology* 2008;9:63-72.
 84. Mukherjee, S., Zhu, J., Zikherman, J., Parameswaran, R., Kadlecsek, T. A., Wang, Q., Au-Yeung, B., Ploegh, H., Kuriyan, J., Das, J., and Weiss, A. Monovalent and multivalent ligation of the B cell receptor exhibit differential dependence upon Syk and Src family kinases, *Science signaling* 2013;6:ra1.
 85. Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussen-zweig, M. C., and Ravetch, J. V. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIb modulates B-cell receptor signalling, *Nature* 1994;369:340.
 86. Ravetch, J. V., and Kinet, J. P. Fc receptors, *Annual review of immunology* 1991;9:457-492.
 87. Mellman, I. Relationships between structure and function in the Fc receptor family, *Current opinion in immunology* 1988;1:16-25.
 88. Reth, M. Antigen receptors on B lymphocytes, *Annual review of immunology* 1992;10:97-121.
 89. Desiderio, S. V. B-cell activation, *Current opinion in immunology* 1992;4:252-256.
 90. Cambier, J. C., and Ransom, J. T. Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes, *Annual review of immunology* 1987;5:175-199.
 91. Wilson, H. A., Greenblatt, D., Taylor, C. W., Putney, J. W., Tsien, R. Y., Finkelman, F. D., and Chused, T. M. The B lymphocyte calcium response to anti-Ig is diminished by membrane immunoglobulin cross-linkage to the Fc gamma receptor, *Journal of immunology* 1987;138:1712-1718.
 92. Reth, M. G., and Alt, F. W. Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJH gene segment rearrangements in lymphoid cells, *Nature* 1984;312:418-423.
 93. Gu, H., Kitamura, D., and Rajewsky, K. B cell development regulated by gene rearrangement: arrest of maturation by

- membrane-bound D mu protein and selection of DH element reading frames, *Cell* 1991;65:47-54.
94. Gong, S., Sanchez, M., and Nussenzweig, M. C. Counterselection against D mu is mediated through immunoglobulin [lg]alpha-Igbeta, *The Journal of experimental medicine* 1996;184:2079-2084.
 95. Nussenzweig, M. C., Shaw, A. C., Sinn, E., Danner, D. B., Holmes, K. L., Morse, H. C., 3rd, and Leder, P. Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu, *Science* 1987;236:816-819.
 96. Kitamura, D., and Rajewsky, K. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion, *Nature* 1992;356:154-156.
 97. Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R., and Rajewsky, K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene, *Nature* 1991;350:423-426.
 98. Nussenzweig, M. C., Schmidt, E. V., Shaw, A. C., Sinn, E., Campos-Torres, J., Mathey-Prevot, B., Pattengale, P. K., and Leder, P. A human immunoglobulin gene reduces the incidence of lymphomas in c-Myc-bearing transgenic mice, *Nature* 1988;336:446-450.
 99. Manz, J., Denis, K., Witte, O., Brinster, R., and Storb, U. Feedback inhibition of immunoglobulin gene rearrangement by membrane mu, but not by secreted mu heavy chains, *The Journal of experimental medicine* 1988;168:1363-1381.
 100. Blom, B., and Spits, H. Development of human lymphoid cells, *Annual review of immunology* 2006;24:287-320.
 101. Sánchez, M. L. MicroARNs en Inmunología, *Bioquímica y Patología Clínica* 2014;78:40-63.
 102. Mendell, J. T. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease, *Cell* 2008;133:217-222.
 103. Koralov, S. B., Muljo, S. A., Galler, G. R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B. S., Merkenschlager, M., Rajewsky, N., and Rajewsky, K. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage, *Cell* 2008;132:860-874.
 104. Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D. P., Patterson, H. C., Zhang, B., Wang, J., Henderson, J. M., Kutok, J. L., and Rajewsky, K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes, *Nature immunology* 2008;9:405-414.
 105. Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., Zhai, Y., Giordano, T. J., Qin, Z. S., Moore, B. B., MacDougald, O. A., Cho, K. R., and Fearon, E. R. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes, *Current biology : CB* 2007;17:1298-1307.