



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

Organización lateral de los receptores para el factor activador de células B (BAFF)

Trabajo Final para optar por el título de
Licenciada en Ciencias Biológicas

Melina Logüercho Kappler

Director: Dr. Cristian Roberto Smulski

Co-directora: Dra. Diana Lorena Franco

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunología Molecular, Departamento de Física
Medica, Centro Atómico Bariloche

Año: 2023

Contacto: loguerchom@gmail.com

Índice

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN.....	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Interacciones proteicas	14
Plásmidos.....	14
Amplificación y purificación de ADN plasmídico.....	14
Cultivo celular.....	15
Transfección.....	15
Puesta a punto de la transfección.....	15
Estandarización de los niveles de expresión proteica.....	16
Análisis de las interacciones proteicas	16
Co-inmunoprecipitación	17
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot.....	18
Construcción del interactoma de membrana.....	19
RESULTADOS	21
Puesta a punto de la transfección	21
Estandarización de los niveles de expresión proteica	22
Análisis de las interacciones proteicas: co-inmunoprecipitación	24
Construcción del interactoma de membrana.....	28
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	32
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXOS.....	38
Anexo 1. Plásmidos.....	38
Anexo 2. Amplificación y purificación de ADN plasmídico.....	46
Anexo 3. Cultivo celular.....	49
Anexo 4. Transfección.....	51
Anexo 5. Co-inmunoprecipitación.....	54
Anexo 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot.....	57
AGRADECIMIENTOS	62

RESUMEN

Los linfocitos B son las células encargadas de la inmunidad adaptativa humoral. Su supervivencia en circulación depende principalmente de señales transducidas por el *receptor del factor activador de células B* (BAFF-R). Este receptor se une a un solo ligando, el *factor activador de células B* (BAFF) que, a su vez, puede unirse a otros dos receptores: TACI y BCMA. Sin embargo, este ligando, esencial para el desarrollo de los linfocitos B, es capaz de activar diversas vías de señalización, algunas de las cuales no parecen estar asociadas directamente a ninguno de sus tres receptores. La hipótesis del presente trabajo es que estos receptores, al tener la capacidad de oligomerizar, podrían formar parte de un gran complejo de proteínas asociadas en la membrana plasmática que utilizan componentes de señalización comunes, lo cual permitiría la activación de vías de señalización alternativas. El objetivo de este trabajo es caracterizar las interacciones que los receptores de BAFF establecen entre sí y con otras moléculas de membrana de los linfocitos B, con el fin de conformar un mapa de interacciones (interactoma de membrana) que pueda funcionar como base para el estudio futuro de distintas vías de señalización en contextos fisiológicos y patológicos.

Palabras clave: BAFF/BAFF-R, interactoma de membrana, receptores de la superfamilia TNF, supervivencia de linfocitos B

ABSTRACT

B lymphocytes are the cells mediating adaptive humoral immunity. Their survival in circulation rely mainly on signals transduced by the *B cell activating factor receptor* (BAFF-R). This receptor binds to only one ligand, the *B cell activating factor* (BAFF), which can also bind to another two receptors in B cells: TACI and BCMA. Nevertheless, this ligand, essential for B cell development, is capable of triggering several signaling pathways that do not seem to be directly associated with none of its receptors. The central hypothesis of this project is that these receptors, which are capable of oligomerization, might be part of a protein complex associated in the plasma membrane which uses common signaling components. This would allow the activation of alternative signaling pathways. The aim of this project is to characterize the interactions that the receptors for BAFF establish with each other and with other molecules in the membrane of B lymphocytes. This would allow to generate a map of interactions (membrane interactome) which can serve as a platform for the study of different signaling pathways in physiological and pathological contexts.

Key words: BAFF/BAFF-R, B lymphocyte survival, membrane interactome, TNF receptors superfamily

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico de los animales vertebrados está compuesto de una variedad de células y moléculas efectoras que, a través de una respuesta altamente coordinada, protegen al organismo de patógenos y sustancias dañinas¹.

La respuesta inmunológica está mediada por las respuestas tempranas de la inmunidad innata y por las respuestas más tardías de la inmunidad adaptativa, ambas reguladas y coordinadas por citoquinas. La inmunidad innata es una primera línea de defensa que consiste en mecanismos celulares y bioquímicos que están presentes antes de que ocurra la infección o el daño, y que actúan de la misma manera frente a diferentes patógenos y a infecciones recurrentes. Por otro lado, la inmunidad adaptativa se desarrolla en respuesta a un estímulo (infección, inmunización, alérgenos, etc.) y es altamente específica. Además, tiene la capacidad de generar memoria inmunológica, lo que permite que la respuesta se vuelva más rápida y eficiente frente a un estímulo recurrente¹.

El principal componente celular de la inmunidad adaptativa son los linfocitos. Estas son las únicas células que expresan receptores antigénicos altamente diversos y específicos que se distribuyen clonalmente. Luego de la exposición al antígeno ocurre el proceso de expansión clonal en el cual, mediante divisiones celulares sucesivas, se genera un gran número de linfocitos que expresan receptores idénticos para dicho antígeno, por lo que reciben el nombre de clones. Este aumento de células permite que la respuesta adaptativa pueda hacer frente a los patógenos infecciosos que se dividen rápidamente. Simultáneamente, los linfocitos estimulados se diferencian en células efectoras, cuya función es eliminar al antígeno, y en células de memoria, cuya función es mediar respuestas rápidas y mejoradas tras exposiciones posteriores al antígeno. Existen dos tipos de respuestas inmunológicas adaptativas mediadas por diferentes tipos de linfocitos: la inmunidad celular, mediada por linfocitos T que se encargan de eliminar patógenos intracelulares, y la inmunidad humoral mediada por linfocitos B, que es el principal mecanismo de defensa contra patógenos extracelulares (Figura 1)¹.

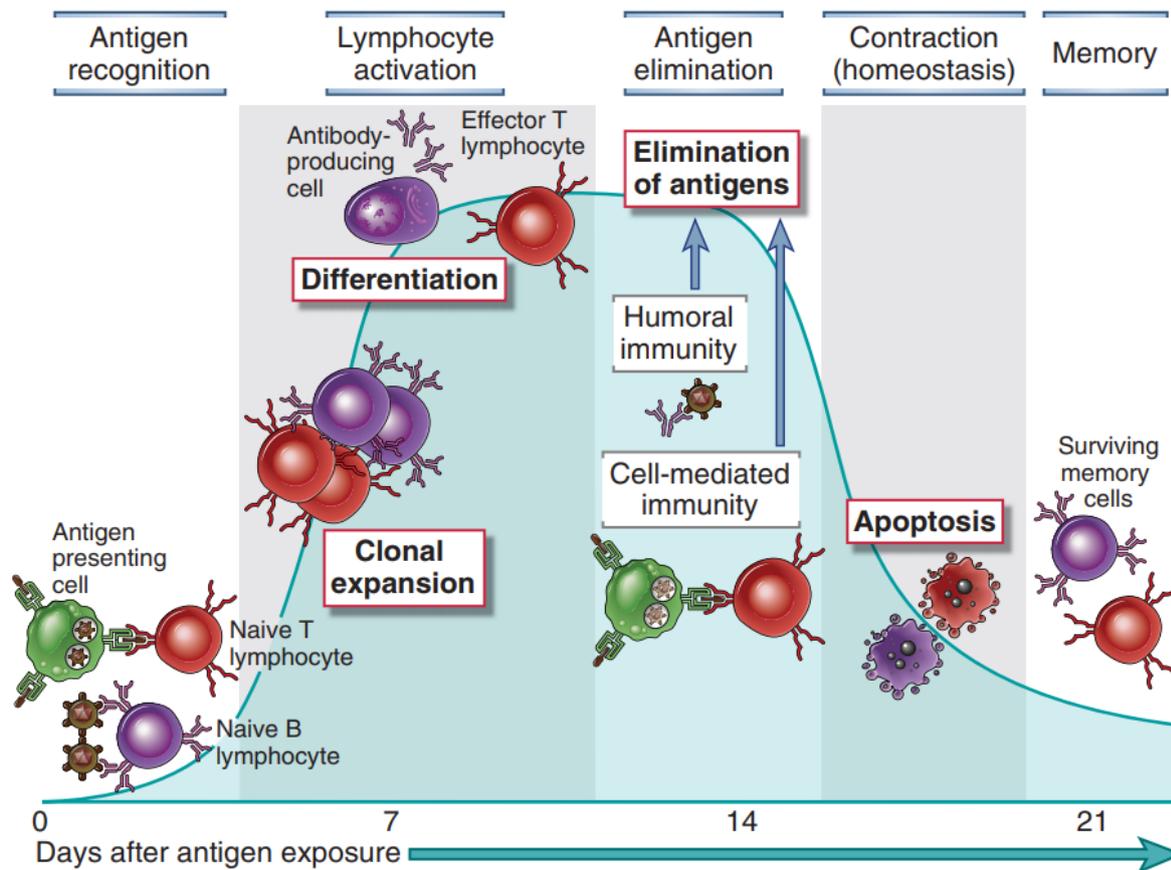


Figura 1. Fases de las respuestas inmunológicas adaptativas. Las tres primeras son el reconocimiento del antígeno, la activación de los linfocitos y la eliminación del antígeno. La respuesta disminuye a medida que los linfocitos estimulados por antígeno mueren por apoptosis, restaurando la homeostasis. Las células que sobreviven son responsables de la memoria. Estos principios se aplican a la inmunidad humoral (mediada por linfocitos B) y a la inmunidad celular (mediada por linfocitos T). Extraído de Abbas, et al. (2018).

Los linfocitos B, al reconocer antígenos, proliferan y se diferencian en linfocitos B de memoria y en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Las funciones efectoras mediadas por anticuerpos o inmunoglobulinas incluyen la neutralización de patógenos y/o de sus productos tóxicos, opsonización de patógenos para mejorar la eficiencia de la fagocitosis, citotoxicidad dependiente de anticuerpos, activación del sistema del complemento, entre otros¹. Defectos en el desarrollo de los linfocitos B y, por lo tanto, en la producción de anticuerpos, pueden conducir a inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, cáncer y alergias².

Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea a partir de progenitores linfoides comunes. Los distintos estadios de desarrollo se caracterizan por la expresión diferencial de proteínas de superficie celular e inmunoglobulinas. Los linfocitos B que logran expresar una inmunoglobulina de membrana (IgM/IgD) capaz de interactuar con antígenos se denominan linfocitos B inmaduros. Las inmunoglobulinas de membrana se asocian con las moléculas CD79A y CD79B, y otras proteínas de membrana para conformar el receptor de células B (RCB). Los linfocitos B inmaduros no autorreactivos abandonan la médula ósea y llegan como linfocitos B transicionales hacia el bazo, donde completan su desarrollo y se diferencian en linfocitos B foliculares o de la zona marginal (Figura 2). Los linfocitos B pueden permanecer en el bazo o migrar vía circulación hacia ganglios linfáticos y tejidos linfoides asociados a mucosas, donde se agrupan en folículos. Los folículos primarios tienen linfocitos B *naive*, es decir, que aún no se han encontrado con un antígeno, mientras que los folículos secundarios tienen centros germinales que se desarrollan en respuesta al estímulo antigénico. Estos son sitios de activación, proliferación y diferenciación de linfocitos B en células de memoria y células plasmáticas¹.

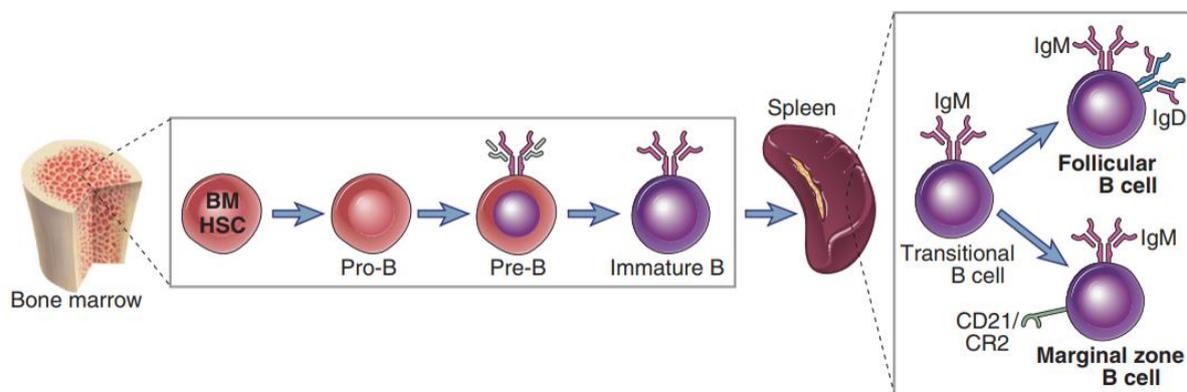


Figura 2. Desarrollo de los linfocitos B. Las células madre hematopoyéticas derivadas de la médula ósea (BM HSC por bone marrow-derived hematopoietic stem cells) dan lugar a los linfocitos B. Estas células pasan por diferentes estadios de desarrollo que se caracterizan por la expresión diferencial de proteínas de superficie celular e inmunoglobulinas. Los linfocitos B inmaduros abandonan la médula ósea y llegan al bazo como linfocitos B transicionales, donde se diferencian en linfocitos B foliculares o de la zona marginal. Extraído de Abbas, et al. (2018).

Mientras que el desarrollo temprano y la supervivencia de los linfocitos B en la médula ósea depende de la expresión de un RCB funcional y no autorreactivo, la supervivencia de estas células en circulación depende de un sistema de receptores y ligandos de la superfamilia TNF (Figura 3)². Este sistema comprende al *receptor del factor activador de células B* (BAFF-R), al *activador transmembrana e interactor de ligandos de ciclofilina* (TACI) y al *antígeno de maduración de células B* (BCMA), que se unen a su ligando común, el *factor activador de células B* (BAFF). TACI y BCMA, a su vez, se pueden unir a un segundo ligando llamado *un ligando de proliferación* (APRIL)³.

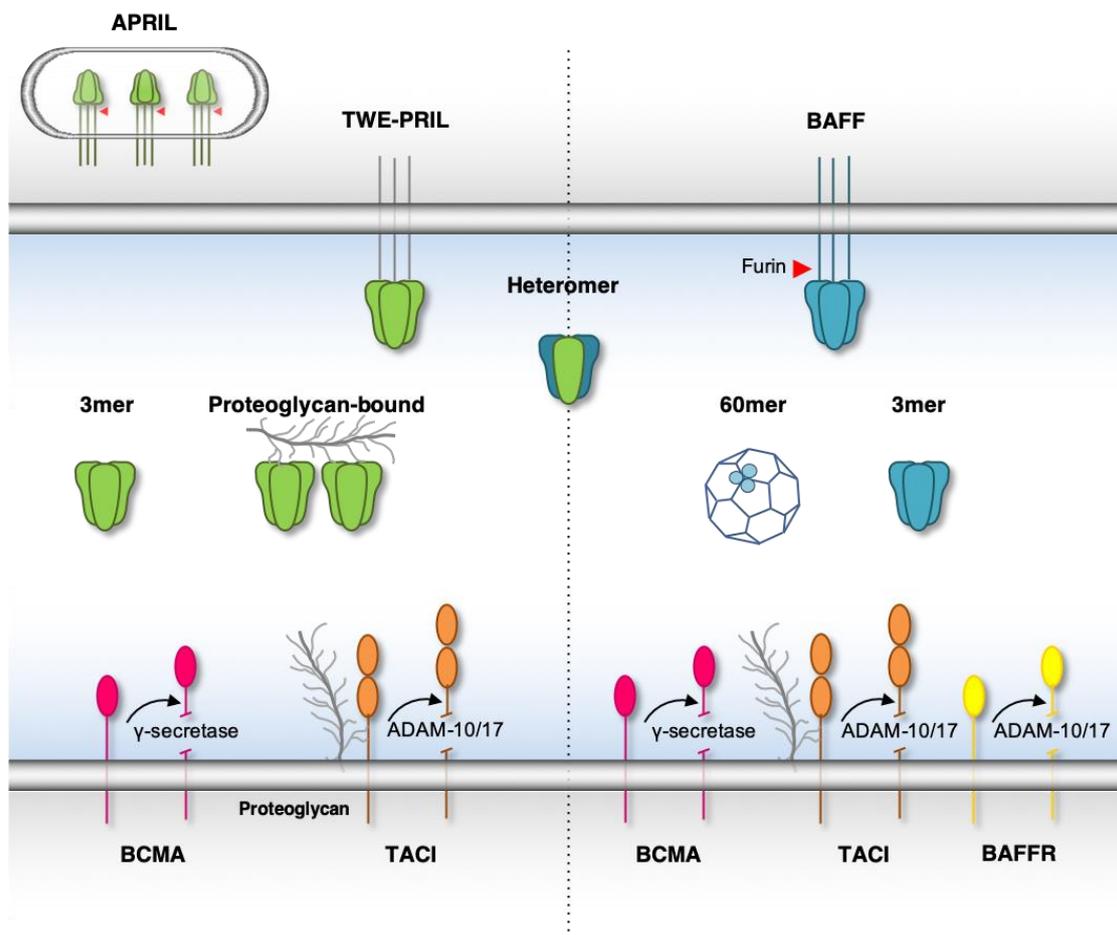


Figura 3. Sistema de receptores y ligandos de la superfamilia TNF que promueven la supervivencia de los linfocitos B fuera de la médula ósea. BAFF-R, TACI y BCMA se unen a su ligando común BAFF. Además, TACI y BCMA se unen a un segundo ligando llamado APRIL.

El rol de la interacción entre BAFF y BAFF-R en la supervivencia de los linfocitos B se demostró por primera vez en ratones. Los ratones con una delección de los genes *Baff* o *Baff-r* presentaron un bloqueo en el desarrollo de los linfocitos B en el estadio transicional^{4,5}. En humanos, la implicancia de esta interacción fue descubierta en pacientes con inmunodeficiencia común variable (IDCV). Aquellos con deficiencia de BAFF-R presentan números bajos de linfocitos B de la zona marginal y de memoria, aumento de linfocitos B transicionales y disminución en los niveles de inmunoglobulinas en suero⁶.

TACI y BCMA también tienen un rol importante en la homeostasis y la función de los linfocitos B³. La deficiencia de TACI y BCMA están asociadas con desórdenes linfoproliferativos y enfermedades autoinmunes con altos títulos de autoanticuerpos⁷⁻⁹. Se ha sugerido que la disminución de la expresión de TACI o mutaciones que impiden la unión al ligando genera que haya más BAFF en circulación, lo cual estimularía la supervivencia de los linfocitos B vía BAFF-R¹⁰. La sobreexpresión de BAFF aumenta la cantidad de linfocitos B maduros y puede llevar a enfermedades autoinmunes¹¹.

Estos tres receptores se expresan de manera diferencial a lo largo de la maduración de los linfocitos B: los linfocitos B transicionales y foliculares expresan solo BAFF-R, los linfocitos B de memoria y de la zona marginal expresan BAFF-R y TACI, y las células plasmáticas expresan TACI y BCMA². Esto, junto con la distribución diferencial de los ligandos, contribuye a dar forma al conjunto de los linfocitos B en el organismo (Figura 4).

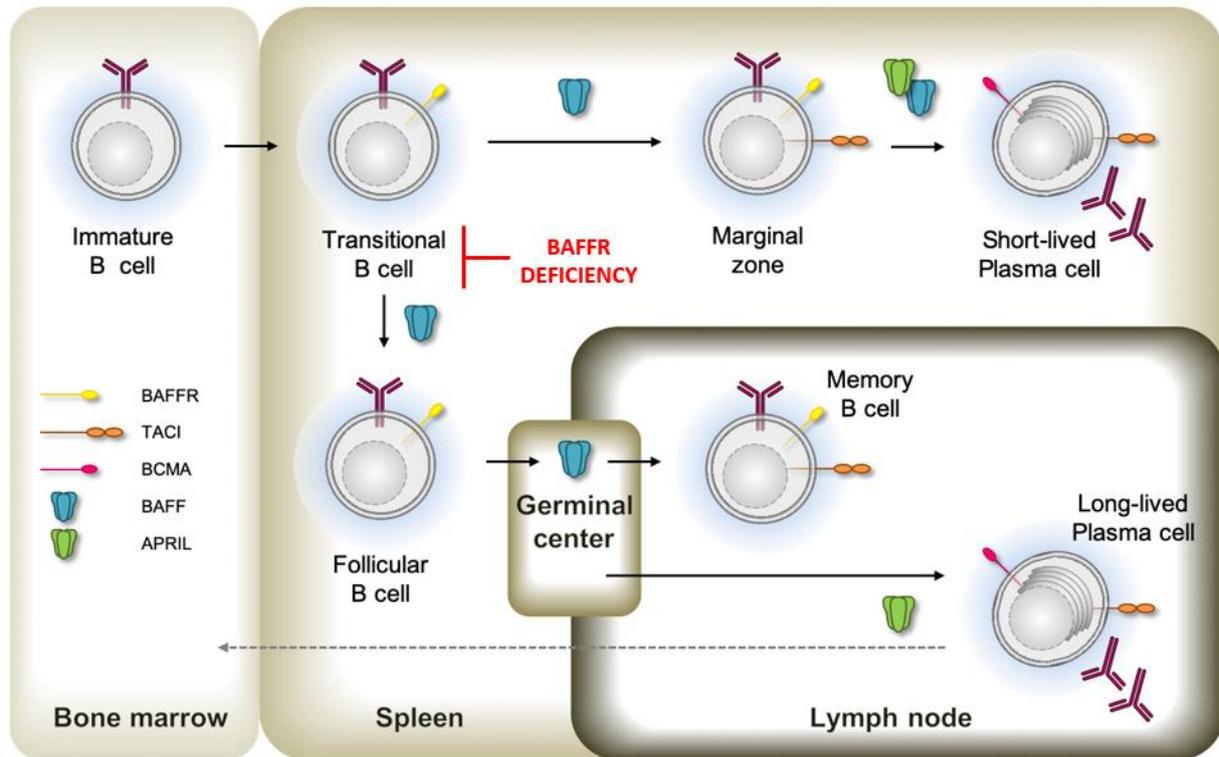


Figura 4. Esquema de la expresión diferencial de los receptores de BAFF a lo largo del desarrollo de los linfocitos B. Extraído de Smulski, C. R., & Eibel, H. (2018).

Aunque BAFF-R, TACI y BCMA pueden ser activados por el mismo ligando (BAFF), los tres activan distintas vías de transducción de señales. Esto aumenta la complejidad del sistema y la diversidad de respuestas que puede desencadenar el mismo ligando en diferentes subpoblaciones de células B. La unión de BAFF a BAFF-R activa la vía alternativa de NF- κ B, mientras que la unión con TACI y BCMA activa la vía canónica de NF- κ B^{3,12}. NF- κ B es una familia de factores de transcripción que promueven la expresión de una variedad de factores de supervivencia y diferenciación, así como también mediadores de la inflamación². El primer paso de la activación de la vía NF- κ B incluye la modificación post traduccional de proteínas inhibitoras presentes en el citoplasma, lo cual puede ocurrir a través de una vía canónica que responde rápidamente, o a través de una vía alternativa que responde lentamente ya que depende de la síntesis de nuevas proteínas¹³. La vía de señalización NF- κ B está asociada con la proliferación, supervivencia y desarrollo de los linfocitos B, así como también con la producción de anticuerpos¹².

La unión de BAFF a BAFF-R gatilla la vía alternativa de NF- κ B, que regula funciones básicas de supervivencia, como la síntesis proteica y el metabolismo energético^{3,14}. Sin embargo, la delección de componentes de esta vía causa un impacto parcial en la maduración y la supervivencia de los linfocitos B¹⁵, lo que sugiere que BAFF-R podría promover estos procesos a través de vías de señalización alternativas. Se ha demostrado que BAFF-R es capaz de activar la vía de señalización fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) gracias a la interacción con las subunidades de señalización CD79A y CD79B del RCB¹⁶, y la vía ERK1/2 gracias a interacciones con el co-receptor CD19¹⁷. Por otro lado, la unión de BAFF a TACI gatilla la vía canónica de NF- κ B^{3,12}. Sin embargo, se ha demostrado que TACI también es capaz de activar la vía de señalización NF-AT gracias a la interacción con la proteína integral de membrana CAML¹⁸. Además, TACI forma complejos con la proteína de membrana TLR9¹⁹. Esto sugiere que BAFF-R y TACI podrían ser parte de un gran complejo de proteínas asociadas a la membrana plasmática que utilizan componentes de señalización comunes¹⁴.

Una característica común de los ligandos de esta familia es la capacidad de formar homo-trímeros²⁰. La oligomerización natural del ligando induce la oligomerización del receptor correspondiente en la membrana plasmática, función que resulta esencial para la correcta transducción de señales²¹. De manera análoga, algunos receptores de la superfamilia TNF se ensamblan en la membrana plasmática formando homo-dímeros o trímeros previo a la unión del ligando^{22,23}. Estos receptores son proteínas transmembrana caracterizadas por tener dominios ricos en cisteína (CRD) en su región extracelular, definidos por puentes disulfuro generados entre residuos altamente conservados de cisteína²³. La formación de complejos en la superficie celular en ausencia de ligando ocurre gracias a la presencia de dominios de pre-ensamblaje (PLAD: *pre ligand assembly domain*) ubicados, generalmente, en el CRD N-terminal²².

La oligomerización de los receptores aumenta la afinidad de unión a ligandos, lo cual facilita respuestas celulares rápidas a la estimulación vía citoquinas TNF que, en condiciones fisiológicas, suelen estar presentes a bajas concentraciones²². Se ha observado que mutaciones en el PLAD afectan la pre-oligomerización de los

receptores TNF, lo cual compromete su capacidad de unión al ligando y de transducción de señales²². En el caso de BAFF-R, estas mutaciones afectan la activación inducida por BAFF de la vía alternativa de NF- κ B²⁴, mientras que en el caso de TACI se ve perjudicada la señalización tanto dependiente como independiente de ligando²⁵. Además, la pre-oligomerización permite la formación de redes de interacción entre múltiples receptores y ligandos, lo cual amplifica la transducción de señales²⁵.

Trabajos previos han identificado que también pueden ocurrir interacciones heteroméricas entre miembros de la superfamilia TNF^{26,27}. Se ha reportado que estas interacciones pueden inhibir la señalización de alguno de los receptores que estén formando parte del complejo en condiciones fisiológicas²⁷ o patológicas²⁶. Por lo tanto, podrían representar una instancia basal de regulación de la señalización a través de los receptores de la superfamilia TNF²⁶.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a lo expuesto, en el presente trabajo se propone la hipótesis de que los receptores de BAFF (BAFF-R, TACI y BCMA) son capaces de establecer interacciones entre sí y con otras proteínas de membrana de los linfocitos B, conformando complejos proteicos que aumentan la variedad de señales que puede activar el ligando BAFF. Estas interacciones podrían, entonces, promover la supervivencia y diferenciación de los linfocitos B en diferentes contextos fisiológicos y patológicos.

Los objetivos son:

- Caracterizar las interacciones que los receptores de BAFF (BAFF-R, TACI y BCMA) establecen entre sí.
- Construir un interactoma de membrana (o mapa de interacciones) que pueda funcionar como base para el estudio futuro de las distintas vías de señalización asociadas a estos receptores.

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presentan las generalidades de los métodos empleados en este trabajo. Los detalles de cada protocolo se encuentran en los anexos correspondientes.

Interacciones proteicas

Para caracterizar las interacciones proteicas se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación. El concepto general de esta metodología es que, si la proteína 'a' forma un complejo con la proteína 'b', y la proteína 'a' se inmunoprecipita utilizando un anticuerpo específico, la proteína 'b' asociada también va a precipitar. La precipitación de 'b' debido a la interacción física con 'a' se denomina co-inmunoprecipitación²⁸.

Este procedimiento comienza con el cultivo de células que expresan las proteínas de interés de forma endógena, o bien induciendo su expresión transfectando líneas celulares. En el presente trabajo se optó por la segunda opción. Posteriormente las células se lisan bajo condiciones no desnaturizantes y las proteínas se inmunoprecipitan con un anticuerpo específico. Estas se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se detectan mediante un ensayo de Western Blot.

Plásmidos

Se utilizaron plásmidos de expresión eucariota codificantes para BAFF-R, TACI y BCMA en los cuales las secuencias de las proteínas se encuentran fusionadas a señales FLAG y VSV en sus extremos C- o N-terminal (Anexo 1). Las señales FLAG y VSV son oligopéptidos que permiten la inmunodetección de un conjunto de proteínas diferentes utilizando un mismo anticuerpo (anti-FLAG o anti-VSV, respectivamente).

Amplificación y purificación de ADN plasmídico

Se amplificaron los plásmidos codificantes para las proteínas de interés utilizando cepas competentes de *E. coli* JM109. En este proceso se aprovecha la maquinaria de replicación endógena de las bacterias para generar copias del ADN plasmídico de interés.

Las bacterias transformadas se amplificaron y, posteriormente, se lisaron con detergentes altamente aniónicos que interrumpen la pared celular. Luego, se precipitó el ADN genómico con acetato de potasio, quedando las proteínas y el ADN plasmídico en solución. Se eliminó la fracción proteica mediante cloroformo/alcohol isoamílico, y se concentró el ADN plasmídico mediante precipitación en isopropanol (Anexo 2).

La concentración del ADN plasmídico se cuantificó utilizando el equipo NanoPhotometer NP50 (Implen). Su pureza se comprobó midiendo la relación de absorbancia a 260 y 280 nanómetros (A260/280). Una relación cercana a 1.8 se considera adecuada para ADN; una relación más baja puede indicar la presencia de proteína, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm o valores cercanos de longitud de onda.

Cultivo celular

Se cultivaron células HEK 293T en medio DMEM F12 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina y 0.025% de anfotericina B, a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ en placas para cultivo celular de 6 *wells* de fondo plano. Se cultivaron 900.000 células en un volumen final de 3 ml por *well* (Anexo 3) durante 24 horas previas a la transfección.

Transfección

Para transfectar las células se utilizó el reactivo PEI²⁹. Este compacta el ADN plasmídico formando complejos protonados que son interiorizados en la célula por endocitosis. Una vez dentro del compartimento endosomal el PEI actúa como *buffer*, evitando la degradación del ADN. Esto lleva a la ruptura del endosoma y la liberación del ADN dentro del citoplasma, lo cual permite su translocación al núcleo.

Puesta a punto de la transfección

El protocolo de transfección con PEI estándar indica transfectar 3 µg de ADN para la cantidad de células cultivadas (900.000 células/*well*), y ajustar empíricamente la cantidad de reactivo de 1 a 4 µl por µg de ADN dependiendo de la línea celular a transfectar. Para evaluar las cantidades óptimas de ADN y PEI que producen una

mayor expresión de las proteínas de interés en células HEK 293T, se transfectaron 3 µg de ADN con 6, 9 y 12 µl de PEI y 6 µg de ADN con 12, 18 y 24 µl de PEI, utilizando un plásmido codificante para BAFF-R con la señal FLAG (Anexo 4A). Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de un ensayo de Western Blot con un anticuerpo anti-FLAG. Se cuantificó la intensidad de cada señal utilizando el software de procesamiento de imagen ImageJ.

Estandarización de los niveles de expresión proteica

Previo a la evaluación de las interacciones proteicas se llevó a cabo un ensayo para estandarizar los niveles de expresión de cada proteína, con el fin de evitar obtener falsos positivos como resultado de una interacción inespecífica debido a la sobre-expresión de las mismas. Para ello se transfectaron los plásmidos codificantes para cada proteína en sus versiones FLAG y VSV a diferentes concentraciones (Anexo 4B), que se determinaron en función de la condición de transfección elegida para las células HEK 293T. Se transfectó siempre la misma cantidad total de ADN, completando con un plásmido vacío (*mock*) en caso de ser necesario. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de un ensayo de Western Blot con un anticuerpo anti-FLAG y anti-VSV, con el fin de determinar qué condiciones de transfección para cada proteína generaban una intensidad de señal similar.

Análisis de las interacciones proteicas

Una vez establecidas las condiciones de transfección para cada proteína, se procedió a evaluar sus interacciones. Se transfectó un plásmido codificante para una proteína con la señal FLAG (por ejemplo, BAFF-R FLAG) junto con un plásmido codificante para esa misma proteína pero con la señal VSV (por ejemplo, BAFF-R VSV) para evaluar la formación de homo-oligómeros. Por otro lado, se transfectó un plásmido codificante para una proteína con la señal FLAG (por ejemplo, BAFF-R FLAG) junto con un plásmido codificante para otra proteína con la señal VSV (por ejemplo, TACI VSV o BCMA VSV) para evaluar la formación de hetero-oligómeros. Además, se transfectaron los plásmidos codificantes para las tres proteínas con la señal VSV sin un par acompañante con la señal FLAG, para descartar interacciones inespecíficas

entre la señal VSV y la resina anti-FLAG utilizada en la co-inmunoprecipitación. Las combinaciones de los plásmidos transfectados se muestran en la Tabla 1 (Anexo 4C).

FLAG	BAFF-R	+	+	+									
	TACI				+	+	+						
	BCMA							+	+	+			
VSV	BAFF-R	+			+			+			+		
	TACI		+			+			+			+	
	BCMA			+			+			+			+

Tabla 1. Diagrama de co-transfección de las proteínas de interés fusionadas a las señales FLAG y VSV para la detección de homo- y hetero-oligómeros. En gris los controles para detectar interacciones inespecíficas entre las proteínas con la señal VSV y la resina anti-FLAG.

En todos los casos se transfectó, además, una proteína verde fluorescente (GFP por *green fluorescent protein*) para verificar que el procedimiento de transfección haya sido exitoso antes de continuar con el resto de los experimentos. En el caso de la puesta a punto de la transfección y de la estandarización de los niveles de expresión proteica se co-transfectaron los plásmidos correspondientes con 0.5 µg de GFP. En el caso de la co-inmunoprecipitación, se transfectó 1 µg de GFP en un *well* a parte para no interferir con las interacciones proteicas. La cantidad de ADN total a transfectar se completó con un plásmido vacío.

Co-inmunoprecipitación

Las células transfectadas se lisaron con un *buffer* de lisis (HEPES 500 mM) con concentraciones bajas de sal (NaCl 150 mM) y un detergente no-iónico (1% Tritón) que solubiliza las proteínas de interés sin afectar las interacciones proteicas. Se centrifugó el lisado para eliminar los restos celulares insolubles y se tomó una alícuota del sobrenadante (*“INPUT”*) para evaluar la presencia de las proteínas en la muestra, independientemente de si estaban o no formando un complejo.

Con el resto del sobrenadante se llevó a cabo la co-inmunoprecipitación. Esto comienza con la incubación de las muestras con una resina formada por esferas de agarosa que, en este caso, están unidas a un anticuerpo anti-FLAG de manera

covalente. La unión entre el anticuerpo anti-FLAG de la resina y las proteínas marcadas con la señal FLAG permite la purificación de las mismas y, por lo tanto, del resto de las proteínas con las que estén interactuando. Tras la incubación, las muestras se cargan en una mini-columna donde la resina y los complejos proteicos asociados quedan retenidos. Mediante lavados con *buffer* de lisis se eluyen las proteínas presentes en la muestra que no estén interactuando. Posteriormente, las proteínas interactuantes se eluyen con *buffer* citrato (50 mM pH 2.7), que disocia las interacciones con el anticuerpo anti-FLAG (Figura 5). Los eluidos se colectan en tubos eppendorf conteniendo *buffer* TRIS (1.5 M pH 9) para equilibrar el pH.

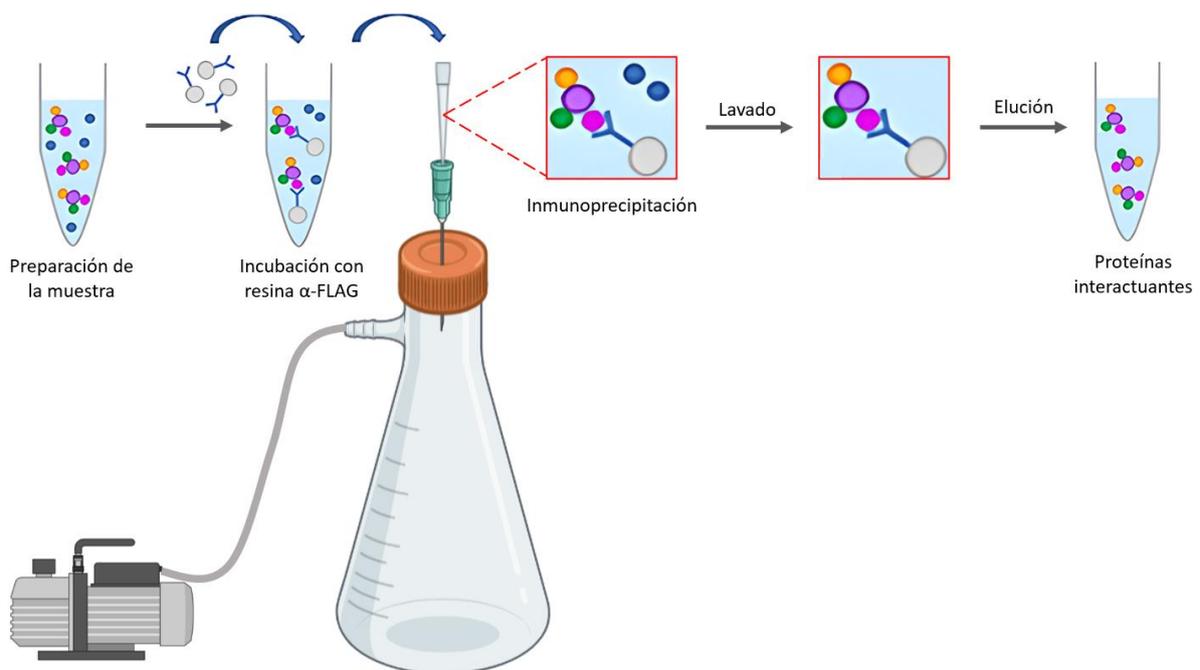


Figura 5. Esquema de los pasos de la co-inmunoprecipitación. El sobrenadante con las proteínas de interés se incuba con resina formada por esferas de agarosa unidas covalentemente a un anticuerpo anti-FLAG. Luego las muestras se cargan en el dispositivo de inmunoprecipitación, que consta de una mini-columna (tip de pipeta de 200 μ l con filtro) dentro de una aguja catéter tipo abbocath, atravesando la tapa de un kitasato conectado a una bomba de vacío. Los complejos proteína-anticuerpo quedan retenidos en la mini columna. Las proteínas no interactuantes se lavan con *buffer* de lisis y, por último, se eluyen los complejos con *buffer* citrato que interrumpe las interacciones con el anticuerpo anti-FLAG.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con los extractos totales (“INPUT”) y la fracción inmunoprecipitada (“IP”). En el ensayo SDS-PAGE se aplica una corriente eléctrica para que las proteínas

migren a través del gel de poliacrilamida y se fraccionen en bandas discretas ordenadas en función de su peso molecular (Anexo 6).

Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo de Western Blot. Para ello, las proteínas son transferidas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa aplicando, nuevamente, una corriente eléctrica. Como control de la transferencia, la membrana se incuba con colorante rojo ponceau que tiñe de manera inespecífica todas las proteínas, permitiendo verificar su presencia en la membrana. Además, esto permite comprobar que se sembró la misma cantidad de proteína en cada calle.

Como las membranas de nitrocelulosa tienen capacidad intrínseca de unir proteínas, luego de la transferencia y previo a la incubación con anticuerpos es preciso bloquear los lugares de unión que han quedado libres para evitar la detección inespecífica de proteínas. Esto se lleva a cabo utilizando proteínas de la leche mediante un *buffer* PBS-tween-leche al 5%.

Luego del bloqueo, la membrana se incuba con un anticuerpo primario anti-VSV, se lava y se incuba con un anticuerpo secundario anti-especie acoplado a la enzima peroxidasa de rábano que, al colocar el sustrato correspondiente, cataliza una reacción quimioluminiscente. Luego del revelado de las proteínas VSV se incuba la membrana con un *buffer* para eliminar la actividad residual de la peroxidasa (*bleaching*), y se repite el proceso con un anticuerpo primario anti-FLAG (Anexo 6). De esta forma se logra identificar a las proteínas con la señal VSV, y posteriormente, a las proteínas con la señal FLAG. La presencia de una proteína con la señal VSV al mismo tiempo de una señal positiva para su par interactuante con la señal FLAG en los extractos totales (“*INPUT*”) confirma que las dos proteínas han sido transfectadas y se expresan correctamente. La presencia de una proteína con la señal VSV al mismo tiempo de una señal positiva para su par interactuante con la señal FLAG en la fracción inmunoprecipitada (“*IP*”) confirma la interacción proteica³⁰.

Construcción del interactoma de membrana

Se construyeron mapas de interacciones de las proteínas de interés utilizando el software Cytoscape y la base de datos de interacciones BioGRID. Los interactomas

fueron graficados con el software BioRender, incluyendo los datos obtenidos mediante la co-inmunoprecipitación y los datos experimentales disponibles en la bibliografía.

RESULTADOS

Puesta a punto de la transfección

Se evaluó la eficiencia de transfección del reactivo PEI en células HEK 293T. Para ello se transfectaron 3 µg de ADN con 6, 9 y 12 µl de PEI y 6 µg de ADN con 12, 18 y 24 µl de PEI, utilizando un plásmido codificante para BAFF-R con la señal FLAG. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de un ensayo de Western Blot con un anticuerpo primario anti-FLAG. Se cuantificó la intensidad de cada señal utilizando el software de procesamiento de imagen ImageJ.

En la Figura 6 se puede observar que la condición de transfección que generó la señal más intensa (27.7%) y uniforme fue de 6 µg de ADN con 12 µl de PEI. Por lo tanto, esta se eligió como la condición óptima de transfección para las células HEK 293T, y se continuó utilizando para el resto de las transfecciones. La tinción homogénea de las proteínas con colorante rojo ponceau permitió comprobar que la diferencia de intensidad de las señales estaba dada por la eficiencia de cada transfección y no por la siembra desigual de las mismas.

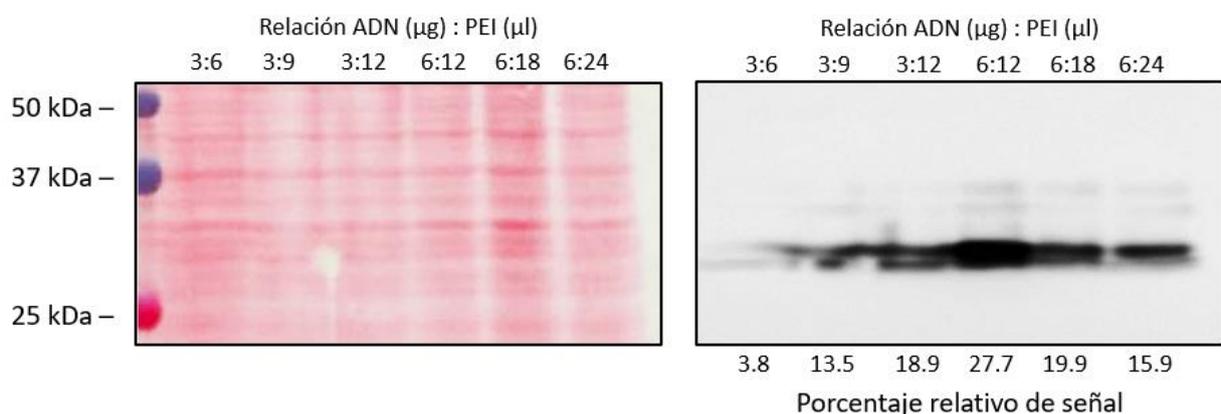


Figura 6. (Izq) Tinción con rojo ponceau de las proteínas sembradas en cada calle, provenientes de células transfectadas con diferentes condiciones de ADN:PEI. (Der) Inmunodetección con anticuerpo primario anti-FLAG para el análisis de los niveles de expresión resultantes de la transfección con diferentes condiciones de ADN:PEI.

Todas las transfecciones incluyeron un control positivo en el cual se transfectó una proteína verde fluorescente (GFP) para comprobar que el procedimiento de transfección haya sido exitoso antes de continuar con el resto de los experimentos. En la Figura 7 se pueden observar células HEK 293T sin fluorescencia (arriba) y células HEK 293T fluorescentes, como resultado de la transfección de la GFP (abajo).

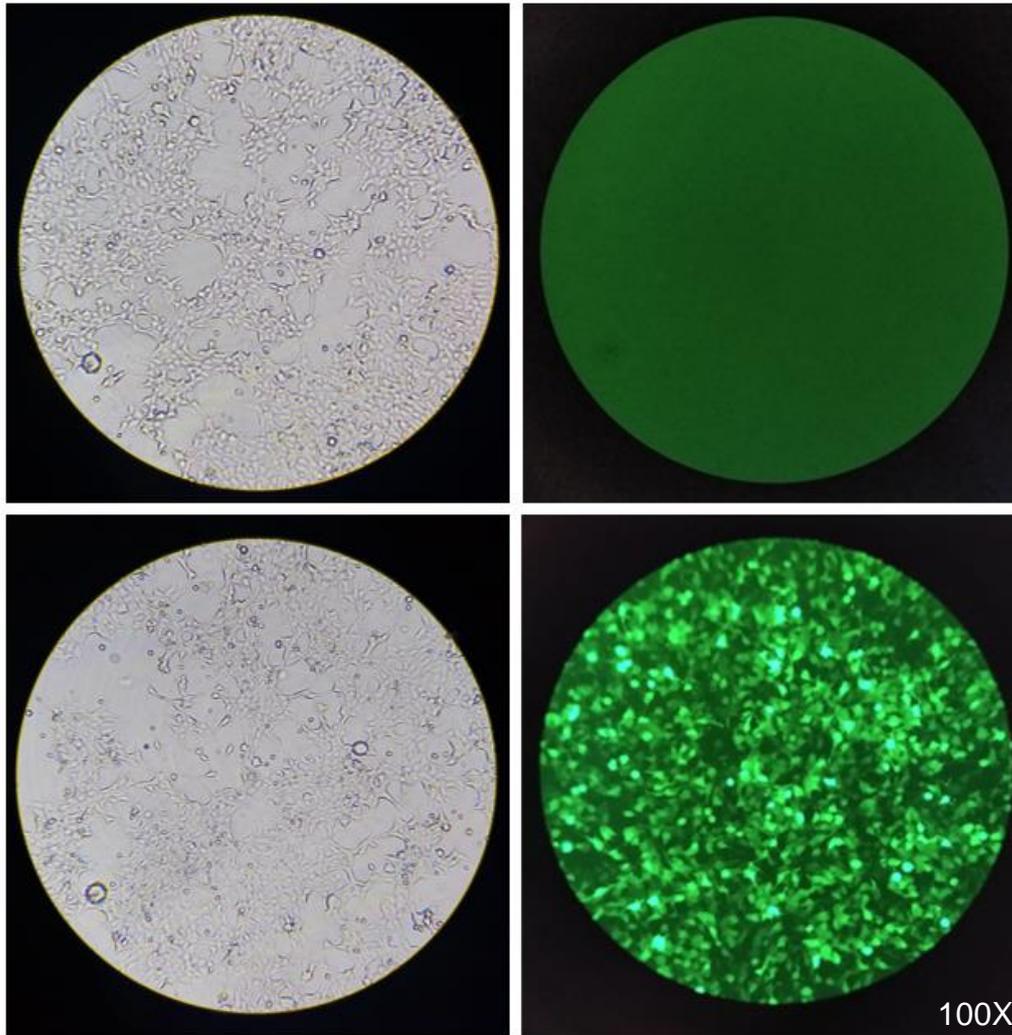


Figura 7. Imagen de contraste de fase (Izq) y de fluorescencia a 530 nm (Der) de células HEK 293T no transfectadas (Arriba) y transfectadas con proteína fluorescente verde (Abajo) observadas al microscopio óptico invertido. Aumento 100X.

Estandarización de los niveles de expresión proteica

Teniendo en cuenta que la condición de transfección elegida fue de 6 μg de ADN total (con 12 μl de PEI), y que para evaluar las interacciones proteicas se deben transfectar dos plásmidos, los niveles de expresión de BAFF-R, TACI y BCMA en sus versiones

FLAG y VSV se evaluaron transfectando 3, 1.5 y 0.75 µg de los plásmidos codificantes para cada proteína (la mitad, un cuarto y un octavo del ADN total a transfectar). Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de un ensayo de Western Blot con anticuerpos primarios anti-FLAG y anti-VSV (Figura 8).

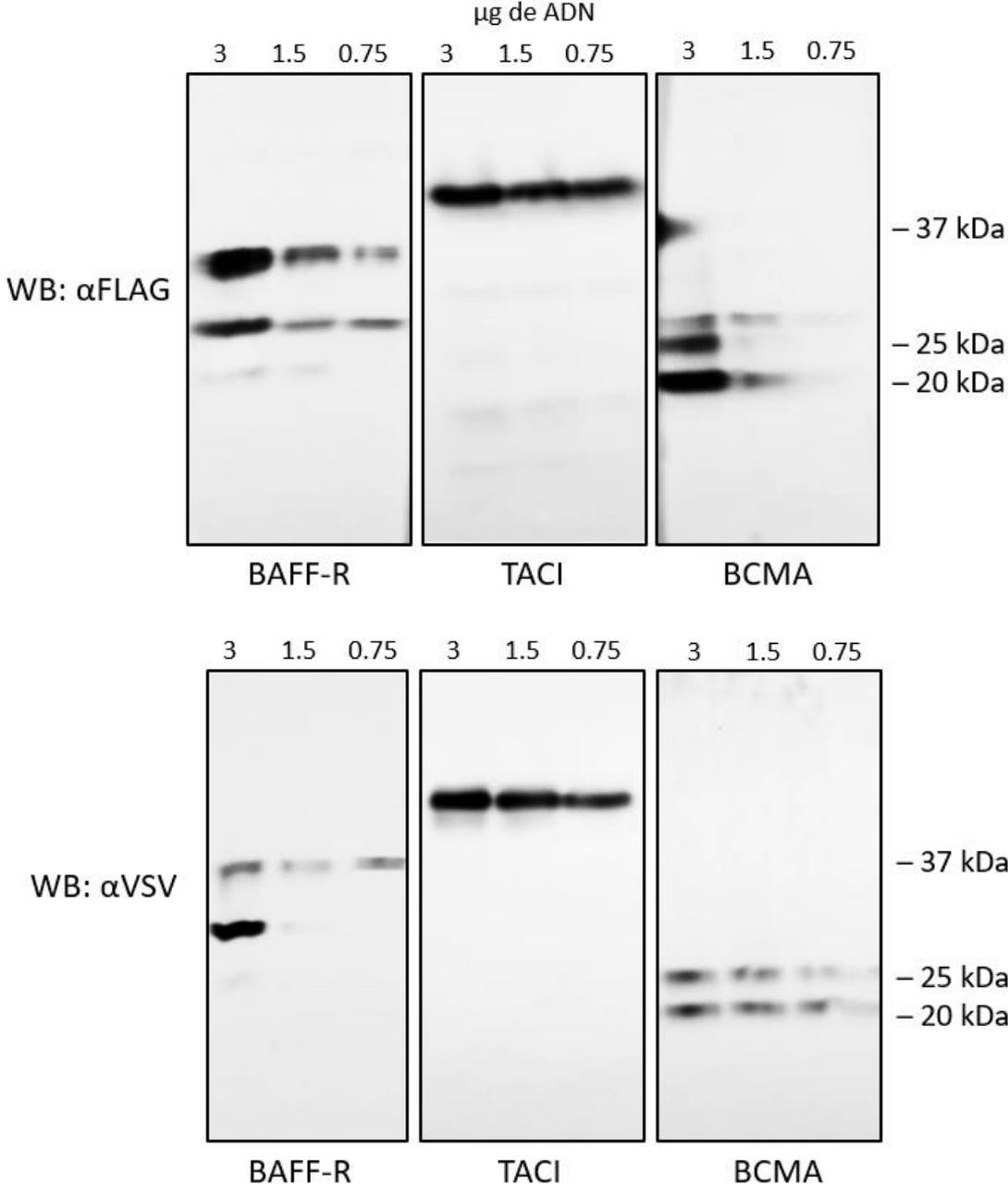


Figura 8. Inmunodetección de las proteínas de interés transfectadas a diferentes concentraciones de ADN (3, 1.5 y 0.75 µg). (Arriba) Revelado de los receptores de BAFF (BAFF-R, TACI y BCMA) fusionados a la señal FLAG con anticuerpo primario anti-FLAG. (Abajo) Revelado de los receptores de BAFF fusionados a la señal VSV con anticuerpo primario anti-VSV.

Se eligieron las condiciones de transfección en las cuales se observó una intensidad de señal similar, las cuales se describen en al Tabla 2.

<i>Receptor</i>	<i>Señal fusionada</i>	<i>Condición de transfección (μg de ADN)</i>
BAFF-R	FLAG	3 μg
TACI	FLAG	0.75 μg
BCMA	FLAG	3 μg
BAFF-R	VSV	3 μg
TACI	VSV	1.5 μg
BCMA	VSV	3 μg

Tabla 2. Condiciones de transfección elegidas (μg de ADN) para BAFF-R, TACI y BCMA en sus versiones FLAG y VSV.

Análisis de las interacciones proteicas: co-inmunoprecipitación

En función de las condiciones de transfección elegidas para cada receptor de BAFF, se transfectaron los plásmidos en diferentes combinaciones para evaluar la formación de homo y hetero-oligómeros. Se llevó a cabo un ensayo de co-inmunoprecipitación con resina anti-FLAG. Con los extractos totales (“*INPUT*”) y la fracción inmunoprecipitada (“*IP*”) se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida seguido de un ensayo de Western Blot con anticuerpos primarios anti-FLAG y anti-VSV (Figuras 9 y 10).

FLAG	BAFF-R	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TACI	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	BCMA	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
VSV	BAFF-R	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	TACI	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
	BCMA	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

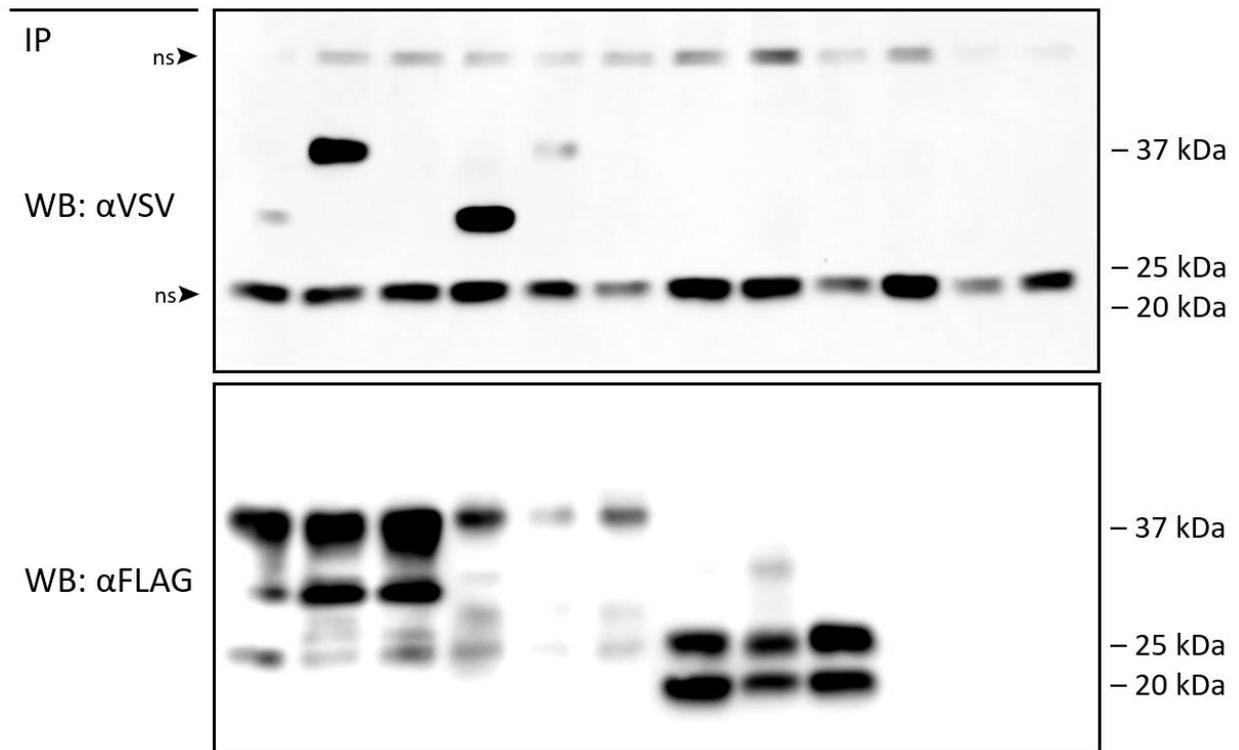


Figura 9. Inmunodetección de los receptores de BAFF fusionados a las señales VSV (Arriba) y FLAG (Abajo) con anticuerpo primario anti-VSV y anti-FLAG (respectivamente) en la fracción inmunoprecipitada ("IP"); ns detección inespecífica.

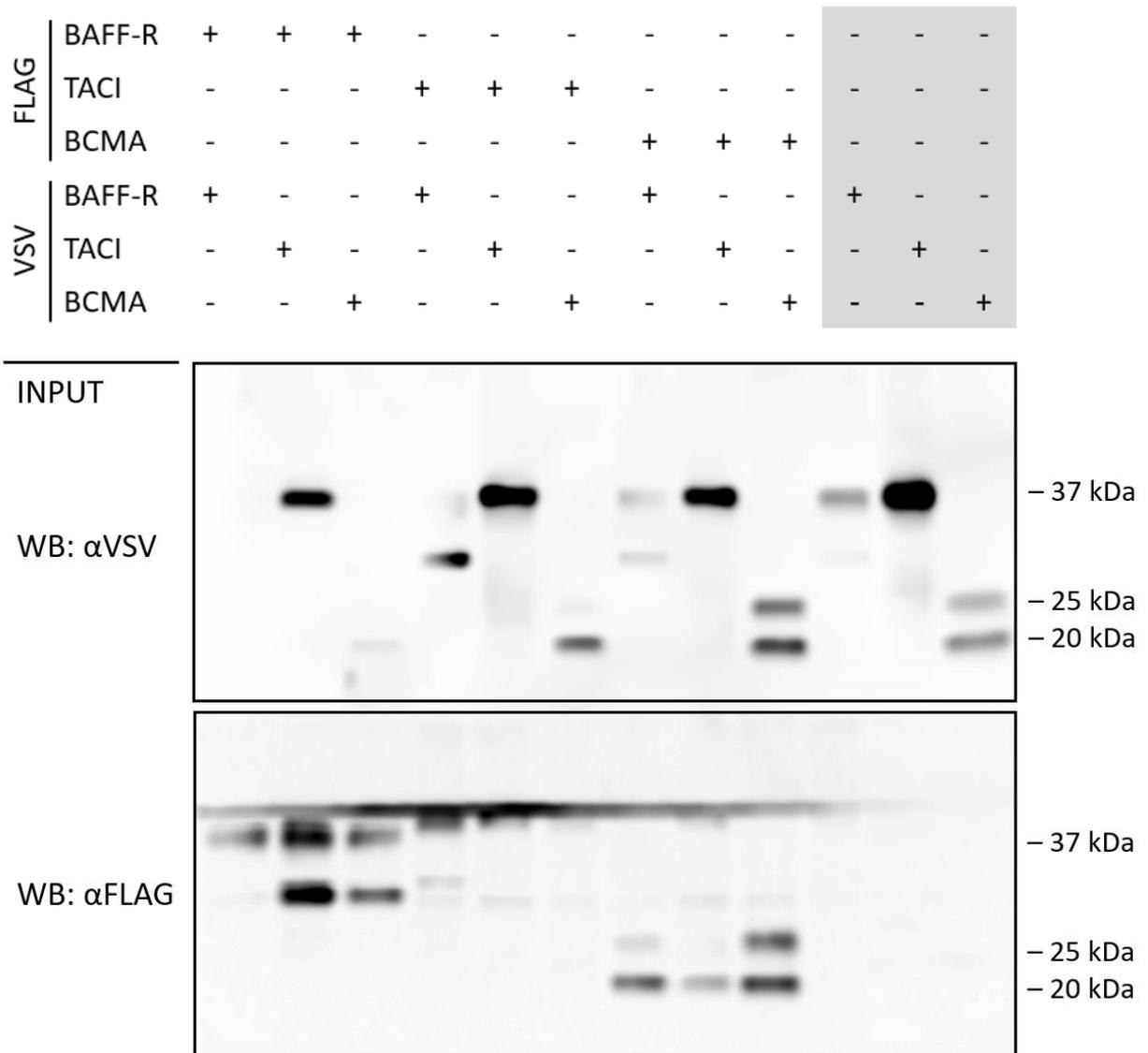


Figura 10. Inmunodetección de los receptores de BAFF fusionados a las señales VSV (Arriba) y FLAG (Abajo) con anticuerpo primario anti-VSV y anti-FLAG (respectivamente) en los extractos totales (“INPUT”), previo a la co-inmunoprecipitación.

En la Figura 9 se observan las proteínas fusionadas a las señales FLAG y VSV en la fracción inmunoprecipitada (“IP”). Las interacciones proteicas se confirmaron mediante la presencia de una proteína con la señal FLAG al mismo tiempo de una señal positiva para su par interactuante con la señal VSV. Se observa la homo-oligomerización de BAFF-R (calle 1: presencia de BAFF-R VSV y BAFF-R FLAG) y de TACI (calle 5: presencia de TACI VSV y TACI FLAG). Sin embargo, no se observa la homo-oligomerización de BCMA (calle 9: ausencia de BCMA VSV y presencia de BCMA FLAG).

Además, se observa la hetero-oligomerización entre BAFF-R y TACI (calle 2: presencia de TACI VSV y BAFF-R FLAG / calle 4: presencia de BAFF-R VSV y TACI FLAG). No se observaron interacciones entre BAFF-R y BCMA (calle 3: ausencia de BCMA VSV y presencia de BAFF-R FLAG / calle 7: ausencia de BAFF-R VSV y presencia de BCMA FLAG) ni entre TACI y BCMA (calle 6: ausencia de BCMA VSV y presencia de TACI FLAG / calle 8: ausencia de TACI VSV y presencia de BCMA FLAG).

En las calles 10, 11 y 12 se observa la ausencia de las proteínas fusionadas a la señal VSV, lo que indica que no existe una interacción inespecífica entre la resina anti-FLAG y el oligopéptido VSV. Esto permite confirmar que si se detecta una proteína con la señal VSV, es porque co-inmunoprecipitó debido a la interacción física con las proteínas fusionadas a la señal FLAG.

En la Figura 10 se observan las proteínas fusionadas a las señales FLAG y VSV en los extractos totales (“INPUT”). Estos permiten confirmar la presencia de las proteínas de interés en la muestra, independientemente de si están o no formando complejos. Se observa que la expresión de BAFF-R VSV (calle 1, arriba) y BCMA VSV (calle 3, arriba) fue muy débil. Sin embargo, estas proteínas se lograron detectar en la fracción inmunoprecipitada donde se encontraban purificadas y, por lo tanto, a mayor concentración. Se observa que el resto de las proteínas de interés estaban presentes en las muestras correspondientes.

Construcción del interactoma de membrana

Se construyó un mapa de interacciones de proteínas de membrana utilizando el software Cytoscape y la base de datos de interacciones BioGRID (Figura 11). El mapa resultante muestra la interacción del ligando BAFF con sus tres receptores: BAFF-R, TACI y BCMA, y del ligando APRIL con TACI y BCMA. En cuanto a las interacciones de membrana, evidencia la interacción entre TACI y CAML, y entre BAFF-R y las proteínas ATPasas transportadoras de calcio ATP2B3 y ATP2B4. El mapa no muestra interacciones homo- ni hetero-oligoméricas entre los receptores de BAFF. También evidencia interacciones entre los receptores de BAFF y las proteínas intracelulares TRAF (factores asociados a los receptores TNF), que median la señalización a través de los receptores TNF³¹. Además, indica que TACI es capaz de interactuar con MyD88, una proteína de señalización intracelular que recluta proteínas quinasas asociadas a IL-1R (IRAK) y gatilla diversas vías de señalización, entre ellas NF- κ B³². Las flechas rojas indican las interacciones proteicas novedosas descritas en este trabajo.

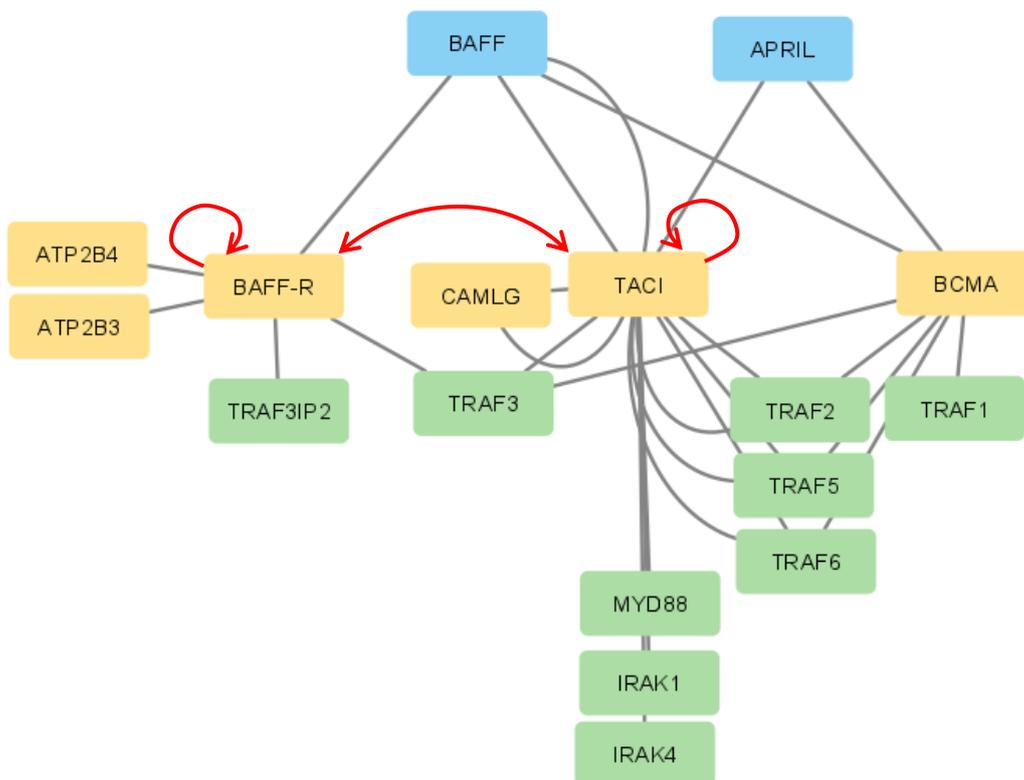


Figura 11. Mapa de interacciones creado con el software Cytoscape y la base de datos de interacciones BioGRID. Ligandos en color celeste, proteínas de membrana en color amarillo, y proteínas de señalización intracelular en color verde.

Asimismo, se construyeron interactomas de membrana para cada proteína con los datos obtenidos mediante la co-inmunoprecipitación y los datos disponibles en la bibliografía. Trabajos previos han identificado que BAFF-R y TACI se ensamblan formando dímeros o trímeros previo a la unión del ligando^{25,24}, lo cual fue confirmado en este trabajo mediante los ensayos de co-inmunoprecipitación (Figura 12).

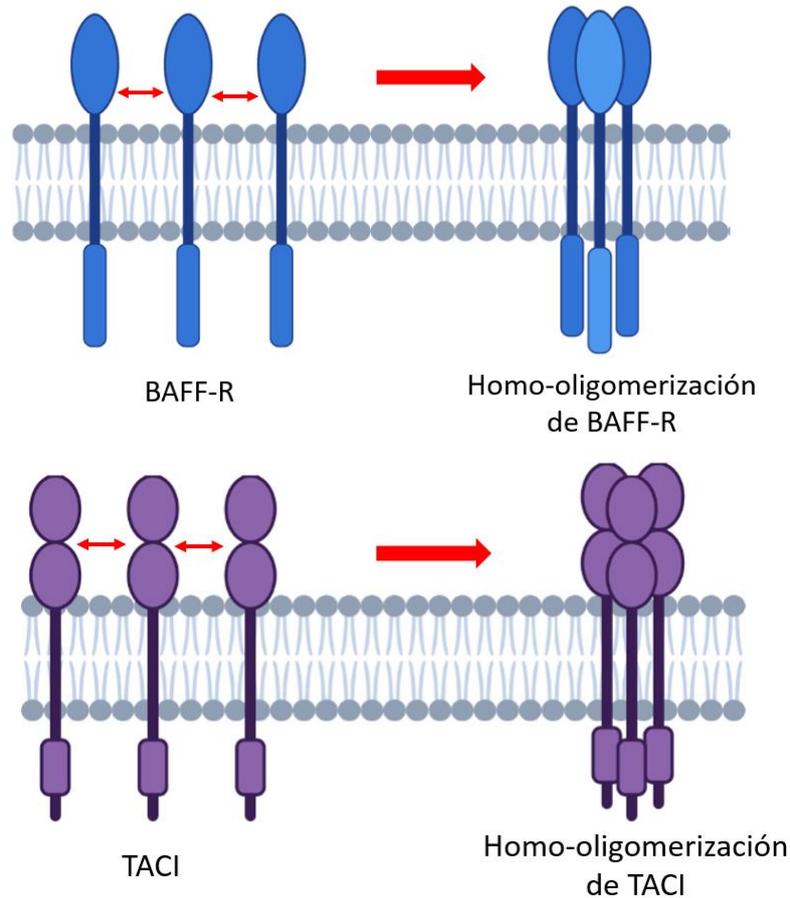


Figura 12. Homo-oligomerización de BAFF-R y TACI. Creado con el software BioRender.

BAFF-R interactúa con el ligando BAFF, lo cual gatilla la vía alternativa de NF- κ B¹⁴. También es capaz de interactuar con el RCB, gatillando vías de señalización alternativas como PI3K y ERK1/2^{16,17} (Figura 13). TACI, por otro lado, interactúa con los ligandos BAFF y APRIL, lo cual gatilla la vía canónica de NF- κ B³. Además, interactúa con CAML lo cual gatilla la vía de señalización NFAT¹⁸, y forma complejos de membrana con TLR9¹⁹ (Figura 14). Estas interacciones proteicas no fueron verificadas en este trabajo pero forman parte del interactoma de membrana de cada receptor.

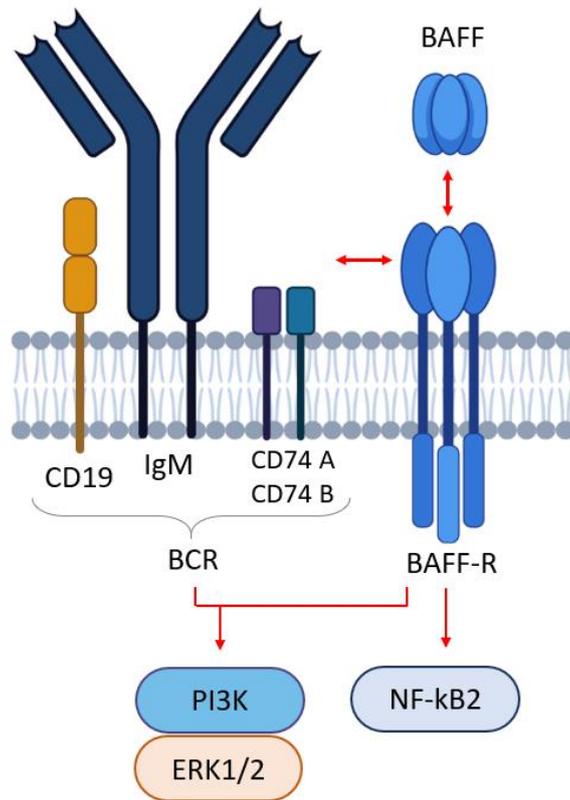


Figura 13. Interactoma de BAFF-R.

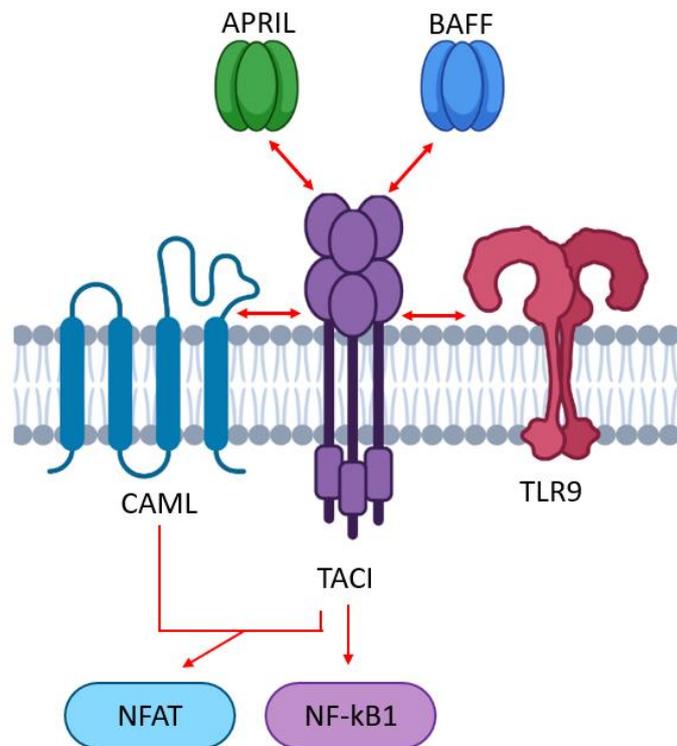


Figura 14. Interactoma de TACI.

En el presente trabajo se observó, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, que BAFF-R y TACI son capaces de formar hetero-oligómeros (Figura 9). En base a esto, se construyó un posible mapa de interacciones que incluye a ambos receptores (Figura 15) y que, por lo tanto, sólo podría darse en los linfocitos B que expresan tanto BAFF-R como TACI.

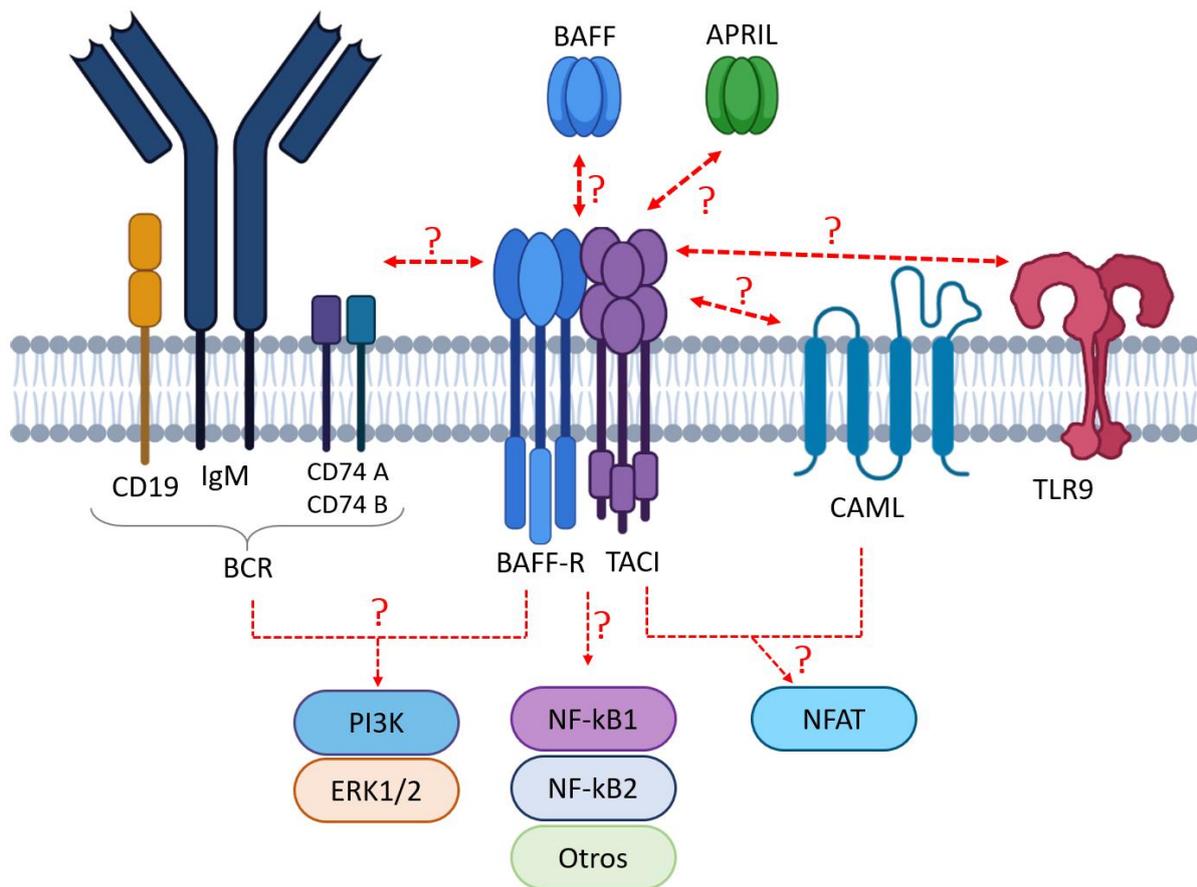


Figura 15. Posible interactoma de BAFF-R y TACI. Las líneas punteadas indican potenciales interacciones y vías de señalización que podrían activarse en consecuencia, que aún no han sido verificadas experimentalmente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El principal objetivo del presente trabajo fue caracterizar interacciones proteicas. Para ello fue necesario poner a punto una serie de técnicas experimentales que se realizaron por primera vez en este el laboratorio.

Se comenzó amplificando y purificando ADN plasmídico codificante para las proteínas de interés, lo cual implicó la transformación de cultivos bacterianos. Una vez obtenidos los plásmidos, se procedió a cultivar y transfectar células eucariotas adherentes (HEK 293T). Una vez dominadas dichas técnicas, se procedió con el análisis de expresión de las proteínas. Esto implicó poner a punto las condiciones de transfección, que varían en función de la línea celular a utilizar. Posteriormente, para identificar a las proteínas transfectadas, se puso a punto la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y de Western Blot. Una vez que se confirmó que estos protocolos funcionaban correctamente, se estandarizaron las condiciones de expresión de las proteínas de interés y se procedió a transfectarlas en condiciones que permitieran identificar la formación de homo- y hetero-oligómeros. Por último, se puso a punto la técnica de co-inmunoprecipitación con resina de agarosa.

El primer objetivo fue caracterizar las interacciones entre los tres receptores del factor activador de células B (BAFF). Estas tres proteínas, BAFF-R, TACI y BCMA, tienen un rol fundamental en la supervivencia, homeostasis y función de los linfocitos B y se expresan de manera diferencial durante su desarrollo. Los linfocitos B *naive* expresan solamente BAFF-R, los linfocitos B activados y de memoria expresan BAFF-R y TACI, y las células plasmáticas productoras de anticuerpos expresan TACI y BCMA.

BAFF-R, TACI y BCMA son miembros de la superfamilia de receptores TNF. Algunos de los receptores de esta familia se caracterizan por formar homo-dímeros o trímeros en la superficie celular previo a la unión del ligando, gracias a la presencia del dominio PLAD²². En el presente trabajo se confirmó que BAFF-R y TACI son capaces de formar homo-oligómeros (Figura 9), lo cual resulta esencial para la unión al ligando y la transducción de señales²². Trabajos previos han identificado que ciertas mutaciones en BAFF-R (Pro21Arg) imposibilitan la formación de homo-oligómeros y, en consecuencia, perjudican la activación de la vía alternativa de

NF- κ B inducida por la unión de BAFF a BAFF-R²⁴. Si bien esto no parece afectar la supervivencia y la composición de las subpoblaciones de linfocitos B, sí afecta su activación y la secreción de IgM. Se han identificado, además, mutaciones en TACI que imposibilitan la formación de homo-oligómeros, y que disminuyen (Cys172Tyr) o cesan (Ala181Glu) la señalización a través de la vía canónica de NF- κ B en respuesta al ligando BAFF. Estas mutaciones afectan la proliferación celular mediada por TACI, y la formación de linfocitos B secretores de IgA²⁵. Estas mutaciones, tanto en BAFF-R como en TACI, están asociadas con la inmunodeficiencia común variable (IDCV), una de las deficiencias de anticuerpos primarios más frecuentes en humanos caracterizada por la fuerte reducción de los títulos de inmunoglobulinas séricas^{24,25}.

Trabajos previos han identificado, además, interacciones heteroméricas entre otros receptores de la superfamilia TNF^{26,27}. En el presente trabajo se ha demostrado que BAFF-R y TACI interactúan entre sí dando lugar a hetero-oligómeros (Figura 9). La formación de complejos mixtos podría representar una instancia de regulación basal de las vías de señalización que gatillan estos receptores. Por ejemplo, las interacciones heteroméricas pueden inhibir la señalización de alguno de los receptores que estén formando parte del complejo en condiciones fisiológicas²⁷ o patológicas²⁶. Las interacciones heteroméricas podrían permitir, además, que los receptores gatillen vías de señalización alternativas^{16,17}. Por lo tanto, resulta factible que la interacción heteromérica entre BAFF-R y TACI tenga algún impacto en la señalización de estos receptores en respuesta a su ligando común BAFF, siendo ésta diferente en sub-poblaciones de linfocitos B que expresen uno o ambos receptores. Se ha observado que la activación de la vía PI3K tras la interacción de BAFF-R con el RCB ocurre en linfocitos B *naive*, que sólo expresan BAFF-R, y no en linfocitos B de memoria que expresan BAFF-R y TACI¹⁶. Podría ocurrir que BAFF-R, al interactuar con TACI, se vuelva incapaz de interactuar con el RCB por algún cambio conformacional en la estructura de la proteína, o bien por inaccesibilidad estérica.

No obstante, para sacar conclusiones acerca de qué manera las interacciones heteroméricas entre estos receptores afectan las vías de señalización que gatillan, se deben llevar a cabo estudios complementarios que analicen la activación de las vías

de señalización en ausencia y presencia de dichas interacciones, lo cual excede los objetivos de este trabajo.

En el presente trabajo se lograron poner a punto una serie de técnicas experimentales nunca antes llevadas a cabo en este laboratorio que permitieron, entre otras cosas, caracterizar las interacciones entre los receptores de BAFF (BAFF-R, TACI y BCMA). Se confirmó la formación de homo-oligómeros por parte de BAFF-R y TACI, y se describió una nueva interacción heteromérica entre dichos receptores. Estos y otros datos de interacción disponibles en la bibliografía se utilizaron para construir interactomas de membrana, que serán utilizados en esta misma línea de trabajo para estudiar de qué manera estas interacciones regulan las vías de señalización asociadas a cada receptor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. (Elsevier, 2012).
2. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 959–971 (2013).
3. MacKay, F. & Schneider, P. Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 491–502 (2009).
4. Thompson, J. S. *et al.* BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science (80-.)*. **293**, 2108–2111 (2001).
5. Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J. L., Rajewsky, K. & Schmidt-Supprian, M. TNF Family Member B Cell-Activating Factor (BAFF) Receptor-Dependent and -Independent Roles for BAFF in B Cell Physiology. *J. Immunol.* **173**, 2245–2252 (2004).
6. Warnatz, K. *et al.* B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 13945–13950 (2009).
7. Seshasayee, D. *et al.* Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BlyS receptor. *Immunity* **18**, 279–288 (2003).
8. Yan, M. *et al.* Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat. Immunol.* **2**, 638–643 (2001).
9. Jiang, C., Loo, W. M., Greenley, E. J., Tung, K. S. & Erickson, L. D. B Cell Maturation Antigen Deficiency Exacerbates Lymphoproliferation and Autoimmunity in Murine Lupus. *J. Immunol.* **186**, 6136–6147 (2011).
10. Khan, W. N. B Cell Receptor and BAFF Receptor Signaling Regulation of B Cell Homeostasis. *J. Immunol.* **183**, 3561–3567 (2009).
11. Mackay, F. *et al.* Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J. Exp. Med.* **190**, 1697–1710 (1999).
12. Rickert, R. C., Jellusova, J. & Miletic, A. V. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunol. Rev.* **244**, 115–133 (2011).
13. Zhang, Q., Lenardo, M. J. & Baltimore, D. 30 Years of NF- κ B: A Blossoming of

- Relevance to Human Pathobiology. *Cell* **168**, 37–57 (2017).
14. Smulski, C. R. & Eibel, H. BAFF and BAFF-receptor in B cell selection and survival. *Front. Immunol.* **9**, 1–10 (2018).
 15. Jellusova, J. *et al.* Context-Specific BAFF-R Signaling by the NF- κ B and PI3K Pathways. *Cell Rep.* **5**, 1022–1035 (2013).
 16. Sevdali, E. *et al.* BAFFR activates PI3K/AKT signaling in human naive but not in switched memory B cells through direct interactions with B cell antigen receptors. *Cell Rep.* **39**, (2022).
 17. Schweighoffer, E. & Tybulewicz, V. L. BAFF signaling in health and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **71**, 124–131 (2021).
 18. Von Bülow, G. U. & Bram, R. J. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science (80-.)*. **278**, 138–141 (1997).
 19. Garcia-Carmona, Y. *et al.* TACI isoforms regulate ligand binding and receptor function. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
 20. Idriss, H. T. & Naismith, J. H. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* **50**, 184–195 (2000).
 21. Chan, F. K. M. *et al.* A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science (80-.)*. **288**, 2351–2354 (2000).
 22. Chan, F. K. M. Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* **37**, 101–107 (2007).
 23. Hehlhans, T. & Pfeffer, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology* **115**, 1–20 (2005).
 24. Pieper, K. *et al.* A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization, contributing to common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 1222-1225.e10 (2014).
 25. Smulski, C. R. *et al.* Ligand-independent oligomerization of TACI is controlled by the transmembrane domain and regulates proliferation of activated B cells. *Cell Rep.* **38**, (2022).
 26. Smulski, C. R. *et al.* Hetero-oligomerization between the TNF receptor superfamily members CD40, Fas and TRAILR2 modulate CD40 signalling. *Cell*

- Death Dis.* **8**, (2017).
27. Clancy, L. *et al.* Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18099–18104 (2005).
 28. Sambrook, J. & Russel, D, W. Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual. *Cold Spring Harboc Laboratory Press* vol. 3 999 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532655> (2000).
 29. Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S. & Leahy, D. J. *Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI)*. *Methods in Enzymology* vol. 529 (Elsevier Inc., 2013).
 30. Schneider, P., Willen, L. & Smulski, C. R. *Tools and techniques to study ligand-receptor interactions and receptor activation by TNF superfamily members*. *Methods in Enzymology* vol. 545 (Elsevier Inc., 2014).
 31. Ha, H., Han, D. & Choi, Y. TRAF-Mediated TNFR-Family Signaling. 1–19 (2009) doi:10.1002/0471142735.im1109ds87.
 32. Content, R. MyD88: A Critical Adaptor Protein in Innate Immunity Signal Transduction. 4–6 (2015) doi:10.4049/jimmunol.1203103.

aaa aaa aag ggc ggc cgc tcg agc atg cat cta gag ggc cct att cta tag tgt cac cta
aat

XbaI

Sp6

Plásmido ps3290 BAFF-R FULL VSV

T7 HindIII HA
ata cga ctc act ata ggg aga ccc aag ctt aat caa aac atg gct atc atc tac ctc atc
M A I I Y L I
VSV
ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc tac acc gac atc gag atg aac cgg ttg ggc aag gga
L L F T A V R G Y T D I E M N R L G K G
Sall BAFF-R (2-184)
ccc gga cag gtg cag ctg cag gtc gac agg cga ggg ccc cgg agc ctg cgg ggc agg gac
P G Q V Q L Q V D R R G P R S L R G R D
gcg cca gcc ccc acg ccc tgc gtc ccg gcc gag tgc ttc gac ctg ctg gtc cgc cac tgc
A P A P T P C V P A E C F D L L V R H C
gtg gcc tgc ggg ctc ctg cgc acg ccg cgg ccg aaa ccg gcc ggg gcc agc agc cct gcg
V A C G L L R T P R P K P A G A S S P A
ccc agg acg gcg ctg cag ccg cag gag tcg gtg ggc gcg ggg gcc ggc gag gcg gcg ctg
P R T A L Q P Q E S V G A G A G E A A L
ccc ctg ccc ggg ctg ctc ttt ggc gcc ccc gcg ctg ctg ggc ctg gca ctg gtc ctg gcg
P L P G L L F G A P A L L G L A L V L A
ctg gtc ctg gtg ggt ctg gtg agc tgg agg cgg cga cag cgg cgg ctt cgc ggc gcg tcc
L V L V G L V S W R R R Q R R L R G A S
tcc gca gag gcc ccc gac gga gac aag gac gcc cca gag ccc ctg gac aag gtc atc att
S A E A P D G D K D A P E P L D K V I I
ctg tct ccg gga atc tct gat gcc aca gct cct gcc tgg cct cct cct ggg gaa gac cca
L S P G I S D A T A P A W P P P G E D P
gga acc acc cca cct ggc cac agt gtc cct gtg cca gcc aca gag ctg ggc tcc act gaa
G T T P P G H S V P V P A T E L G S T E
ctg gtg acc acc aag acg gcc ggc cct gag caa caa tag cag gga gcc ggc agg agg tgg
L V T T K T A G P E Q Q *
ccc ctg ccc tcc ctc tgg acc ccc agc cag ggg ctt gga aat caa att cag ctc ttc act
cca gca tgc aca tgc cct ctt tot ggg acc agg cta acc ctg cag aag cac aga cac tac
aga cca cag cat tca gcc ccc atg gag ttt ggt gtg ctt gcc ttt ggc ttc aga cct cac
cat ctt tga cag ccc ttg aag gtg gta gcc cag ctc ctg ttc ctg tgc ctt caa aag gct
ggg gca cta tga gta aaa gac cgc ttt taa aat ggg gaa ggc acc att aag cca aaa tga
atc tga aaa aag aca aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aag ggc ggc cgc tcg agc

atg XbaI cta gag ggc cct att Sp6 cta tag tgt cac cta aat

Plásmido ps3348 BCMA FULL FLAG

cgc aaa tgg gcg gta ggc gtg tac ggt ggg agg tct ata taa gca gag ctc tct ggc taa

cta gag aac cca ctg ctt act ggc tta tcg aaa tta ata cga ctc act ata ggg aga ccc

HindIII aag ctt aat caa aac HA atg gct atc atc tac ctc atc ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc
M A I I Y L I L L F T A V R G

FLAG gat tac aaa gac gat gac gat aaa gga ccc gga cag gtg cag ctg cag ttg cag atg gct
D Y K D D D D K G P G Q V Q L Q L Q M A
ggg caa tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata cct tgt caa
G Q C S Q N E Y F D S L L H A C I P C Q
ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag cgt tat tgt aat gca agt gtg
L R C S S N T P P L T C Q R Y C N A S V
acc aat tca gtg aaa gga acg aat gcg att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg agc tta ata
T N S V K G T N A I L W T C L G L S L I
att tct ttg gca gtt ttc gtg cta atg ttt ttg cta agg aag ata agc tct gaa cca tta
I S L A V F V L M F L L R K I S S E P L
aag gac gag ttt aaa aac aca gga tca ggt ctc ctg ggc atg gct aac att gac ctg gaa
K D E F K N T G S G L L G M A N I D L E
aag agc agg act ggt gat gaa att att ctt ccg aga ggc ctc gag tac acg gtg gaa gaa
K S R T G D E I I L P R G L E Y T V E E
tgc acc tgt gaa gac tgc atc aag agc aaa ccg aag gtc gac tct gac cat tgc ttt cca
C T C E D C I K S K P K V D S D H C F P
ctc cca gct atg gag gaa ggc gca acc att ctt gtc acc acg aaa acg aat gac tat tgc
L P A M E E G A T I L V T T K T N D Y C
aag agc ctg cca gct gct ttg agt gct acg gag ata gag aaa tca att tct gct agg taa
K S L P A A L S A T E I E K S I S A R *

EcoRI cgc gcc gcc aac ctg aat tcc ccg ggt cta gag ggc cct att Sp6 cta tag tgt cac cta aat
gct aga gct cgc tga tca gcc tcg act gtg cct tct agt tgc cag cca tct gtt gtt tgc
ccc tcc ccc gtg cct tcc ttg acc ctg gaa ggt gcc act ccc act gtc ctt tcc taa taa
aat gag gaa att gca tcg cat tgt ctg agt agg tgt cat tct att ctg

Plásmido ps2595 TACI FULL FLAG

```

          T7                HindIII                HA
ata cga ctc act ata ggg aga ccc aag ctt aat caa aac atg gct atc atc tac ctc atc
I  R  L  T  I  G  R  P  K  L  N  Q  N  M  A  I  I  Y  L  I

          FLAG
ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc gat tac aaa gac gat gac gat aaa gga ccc gga cag
L  L  F  T  A  V  R  G  D  Y  K  D  D  D  D  K  G  P  G  Q

          Sall    TACI (2-293)
gtg cag ctg cag gtc gac agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg agc cgt gtg
V  Q  L  Q  V  D  S  G  L  G  R  S  R  R  G  G  R  S  R  V
gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg aca ggg gtg gct atg aga tcc tgc ccc
D  Q  E  E  R  F  P  Q  G  L  W  T  G  V  A  M  R  S  C  P
gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac
E  E  Q  Y  W  D  P  L  L  G  T  C  M  S  C  K  T  I  C  N
cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa
H  Q  S  Q  R  T  C  A  A  F  C  R  S  L  S  C  R  K  E  Q
ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga cag
G  K  F  Y  D  H  L  L  R  D  C  I  S  C  A  S  I  C  G  Q
cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg aac ctt cca
H  P  K  Q  C  A  Y  F  C  E  N  K  L  R  S  P  V  N  L  P
cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg
P  E  L  R  R  Q  R  S  G  E  V  E  N  N  S  D  N  S  G  R
tac caa gga ttg gag cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg
Y  Q  G  L  E  H  R  G  S  E  A  S  P  A  L  P  G  L  K  L
agt gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt gcc gtc ctc
S  A  D  Q  V  A  L  V  Y  S  T  L  G  L  C  L  C  A  V  L
tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag agg ggg gat ccc tgc tcc tgc
C  C  F  L  V  A  V  A  C  F  L  K  K  R  G  D  P  C  S  C
cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt ccg gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa
Q  P  R  S  R  P  R  Q  S  P  A  K  S  S  Q  D  H  A  M  E
gcc ggc agc cct gtg agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct
A  G  S  P  V  S  T  S  P  E  P  V  E  T  C  S  F  C  F  P
gag tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac ccc act tgt
E  C  R  A  P  T  Q  E  S  A  V  T  P  G  T  P  D  P  T  C
gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg cag cct tgc cca cac atc cca
A  G  R  W  G  C  H  T  R  T  T  V  L  Q  P  C  P  H  I  P

gac agc ggc ctt ggc att gtg tgt gtg cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taa tct
D  S  G  L  G  I  V  C  V  P  A  Q  E  G  G  P  G  A  *
    
```

XbaI

Sp6

aga gga ccc tat tct ata gtg tca cct aaa t

Plásmido ps2596 TACI FULL VSV

T7

ata cga ctc act ata ggg

HindIII

aga ccc aag ctt aat caa aac

HA

atg gct atc atc tac ctc atc

M A I I Y L I

VSV

ctc ctg ttc acc gct gtg cgg ggc tac acc gac atc gag atg aac cgg ttg ggc aag gga

L L F T A V R G Y T D I E M N R L G K G

Sall

TACI (2-293)

ccc gga cag gtg cag ctg cag gtc gac agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg

P G Q V Q L Q V D S G L G R S R R G G R

agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg aca ggg gtg gct atg aga

S R V D Q E E R F P Q G L W T G V A M R

tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc

S C P E E Q Y W D P L L G T C M S C K T

att tgc aac cat cag agc cag cgc acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc

I C N H Q S Q R T C A A F C R S L S C R

aag gag caa ggc aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc

K E Q G K F Y D H L L R D C I S C A S I

tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc agg agc cca gtg

C G Q H P K Q C A Y F C E N K L R S P V

aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga gaa gtt gaa aac aat tca gac aac

N L P P E L R R Q R S G E V E N N S D N

tcg gga agg tac caa gga ttg gag cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg

S G R Y Q G L E H R G S E A S P A L P G

ctg aag ctg agt gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt

L K L S A D Q V A L V Y S T L G L C L C

gcc gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag agg ggg gat ccc

A V L C C F L V A V A C F L K K R G D P

tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt ccg gcc aag tct tcc cag gat cac

C S C Q P R S R P R Q S P A K S S Q D H

gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc

A M E A G S P V S T S P E P V E T C S F

tgc ttc cct gag tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac

C F P E C R A P T Q E S A V T P G T P D

ccc act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg cag cct tgc cca

P T C A G R W G C H T R T T V L Q P C P

cac atc cca gac agc ggc ctt ggc att gtg tgt gtg cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt

H I P D S G L G I V C V P A Q E G G P G

XbaI Sp6
gca taa tct aga ggg ccc tat tct ata gtg tca cct aaa t
A *

Plásmido ps515 GFP

T7
gca gag ctc tct ggc taa cta gag aac cca ctg ctt act ggc tta tcg aaa tta ata cga
ctc act ata ggg aga ccc aag ctg gct agc gtt taa act taa gct tgg tac cga gct cgg

BamHI

GFP (2-238)

atc cac cgg ccg gtc gcc acc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg
M V S K G E E L F T G V V
ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag
P I L V E L D G D V N G H K F S V S G E
ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag
G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K
ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tac ggc gtg cag tgc ttc agc
L P V P W P T L V T T L T Y G V Q C F S
cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac
R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y
gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg
V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V
aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag
K F E G D T L V N R I E L K G I D F K E
gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc cac aac gtc tat atc
D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I
atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag
M A D K Q K N G I K V N F K I R H N I E
gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc
D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P
gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac
V L L P D N H Y L S T Q S A L S K D P N
gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc
E K R D H M V L L E F V T A A G I T L G

NotI

atg gac gag ctg tac aag taa agc ggc cgc tcg agt cta gag ggc ccg ttt aaa ccc gct
M D E L Y K *
gat cag cct cga ctg tgc ctt cta gtt gcc agc cat ctg ttg ttt gcc cct ccc ccg tgc
ctt cct tga

Plásmido ps015 Mock (derivado de PCR3.1 de Invitrogen)

SpeI

C in Invitrogen files, G by seq

GCGCGCGTTG ACATTGATA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG	60
TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT	120
GACCGCCCAA CGACCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC	180
CAATAGGGAC TTTCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG	240
CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT	300
GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCTACT TGGCAGTACA	360
TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC	420
GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTT CAAGTCTCCA CCCCATGAC GTCAATGGGA	480
GTTTGTTTT GCACAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCAT	540
<u>JT5629 (T7-115)</u> TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC	600
<u>Putative transcriptional start</u> TAACTAGAGA ACCCACTGGT TACTGACTTA TCGAAATTA TACGACTCAC TATAGGGAGA	660
<u>HindIII KpnI SacI BamHI SpeI EclXI EcoRI PstI</u> CCCAAGCTTG GTACCGAGCT CGGATCCACT AGTAACGGCC GCCAGTGTGC TGGAAATCTG	720
<u>EcoRV NotI XhoI SphI NsiI XbaI ApaI Sp6</u> CAGATATCCA TCACACTGGC GGCCGCTCGA GCATGCATCT AGAGGGCCCT ATTCTATAGT	780
<u>Sp6</u> GTCACCTAAA TGCTAGAGCT CGCTGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT	840
CTGTGTTTTG CCCCTCCCC GTGCCTTCTT TGACCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC	900
TTTCCTAATA AAATGAGGAA ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCAT TCTATTCTGG	960
GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG	1020
GGGATGCGGT GGGCTCTATG GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGTGGCGGT AATACGGTTA	1080
TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC	1140
AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG	1200
CATCACAAAA ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC	1260
CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC	1320
GGATACCTGT CCGCCTTCTT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCATAG CTCACGCTGT	1380
AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTGCTTCGC TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC	1440
GTTAGCCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCAA CCGGTAAGA	1500
CACGACTTAT CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA	1560
GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA	1620
TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA	1680
TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG	1740
CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG	1800

PCR3.1 rev (Microsynth)

Sp6

ColE1 origin

JT5630 (Sp6+187)

BGH poly A

Anexo 2. Amplificación y purificación de ADN plasmídico

SOLUCIONES

a) Glicerol al 80%

b) Solución de lisis alcalina 1

- Glucosa 50 mM
- TRIS-Cl 25 mM ph 8
- Ácido etilendiamilotetraético (EDTA) 10 mM
- Autoclavar y guardar a 4°C

c) Solución de lisis alcalina 2

Para 1 ml

- 100 µl dodecilsulfato sódico (SDS)
- 100 µl NaOH 2N
- 800 µl H₂O milliQ
- Se prepara en el momento y se mantiene a temperatura ambiente

d) Solución de lisis alcalina 3

Para 100 ml

- 60 ml de acetato de potasio 5 M
- 11,5 ml ácido acético glacial
- 28,5 ml H₂O milliQ
- Guardar a 4°C y pasar a hielo antes de usar (no es necesario autoclavar)

e) Ampicilina 1000 X

f) Etanol 70% frío en freezer a -20°C

g) Isopropanol

h) Cloroformo isoamílico en proporción 24:1

i) Medio de cultivo LB

- Triptona 1%
- Extracto de levadura 0,5%
- NaCl 1 %
- H₂O milliQ
- Llevar a pH 7
- Autoclavar en el momento

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR SHOCK TÉRMICO

- Descongelar un criotubo de bacterias competentes E. coli JM109 e inocular 1 ng de plásmido
- Dejar en hielo 30'
- Llevar a baño térmico a 42°C durante 45'
- Devolver al hielo y dejarlo 2'
- Agregar 250 µl de medio de cultivo LB sin antibiótico a temperatura ambiente
- Incubar en agitación a 750 rpm a 37°C durante 1 hora
- Sembrar 30 µl en una placa de petri con medio LB con ampicilina sólido
- Incubar toda la noche (~16 hs) a 37°C

EXTRACCIÓN DE ADN POR LISIS ALCALINA

- Colocar 15 ml de medio LB más 15 µl de Ampicilina 1000X en un falcon de 50 ml estéril
- Inocular una colonia aislada utilizando un *tip* de 200 µl estéril montado en una pipeta
- Incubar a 37°C en agitación por 16-20 horas
- Centrifugar los cultivos a 3000 rpm, 4°C, durante 5 minutos

- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet de bacterias en 300µl de solución de lisis alcalina 1 fría. Pasar todo a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml
- Agregar 300 µl de solución de lisis alcalina 2 y mezclar 10 veces por inversión
- Agregar 300 µl de solución de lisis alcalina 3 y mezclar 10 veces por inversión
- Dejar 15 minutos en hielo
- Centrifugar a 14000 rpm, 4°C, durante 15 minutos
- Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf de 2 ml estéril y agregar 3 µl de RNAsa (10mg/ml). Incubar por 1 hora a 37°C
- Añadir 600 µl de Cloroformo Isoamílico (24:1), vortexear 10 segundos y centrifugar a 14000 rpm, 4°C, durante 5 minutos
- Trasvasar la fase superior a un tubo eppendorf estéril de 2 ml conteniendo 700 µl de isopropanol sin tocar la interfase, la cual contiene las proteínas
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar a 14000 rpm, 4°C, durante 15 minutos
- Descartar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol 70% a -20°C suavemente sobre el pellet
- Centrifugar a 14000 rpm, 4°C, durante 5 minutos
- Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente
- Resuspender el pellet en 50 µl H₂O milliQ
- Medir la concentración de ADN plasmídico en el nanofotómetro y diluír con H₂O milliQ hasta obtener una concentración de 1 µg ADN/µl

Anexo 3. Cultivo celular

SOLUCIONES

a) Medio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina y 0.025% anfotericina B

b) Buffer fosfato salino (PBS) 10X

Para 1000 ml

- 80 g NaCl
- 2 g KCl
- 14.4 g Na₂HPO₄
- 2.45 g KH₂PO₄
- Ajustar pH 7.4

c) PBS 1X

100 ml de PBS 10X + 900 ml de H₂O milliQ

d) Tripsina

PROCEDIMIENTO

- Colocar medio de cultivo DMEM y PBS 1X en el baño térmico a 37°C.

- Colocar tripsina a temperatura ambiente

Bajo campana:

- Descartar el medio de cultivo con una pipeta

- Agregar 10 ml de PBS 1X con mucho cuidado (mismo volumen de PBS que de medio de cultivo), sobre el costado de la placa para no despegar las células de la placa. Mover gentilmente la placa para lavar las células y retirar el PBS

- Agregar 1 ml de tripsina e incubar a 37°C durante 6 minutos. Comprobar que las células hayan perdido su adherencia observándose al microscopio: deben estar redondeadas y en suspensión

- Agregar 10 ml de medio de cultivo DMEM atemperado y resuspender

- Llevar a tubo falcon de 15 ml
- Tomar 15 μ l y colocar en tubo eppendorf de 200 μ l para la cuantificación de las células. Agregar 15 μ l de colorante trypan blue y resuspender. Tomar 10 μ l de esa solución y cargar en cámara de Neubauer

El número de células se calcula de la siguiente manera:

$$(\# \text{ células en los 4 cuadrantes}/4) \times 2 \times 10.000 = \# \text{ células por mililitro}$$

$$\# \text{ células por mililitro} \times 10 = \# \text{ células total}$$

- Centrifugar a 990 rpm, a temperatura ambiente, durante 7 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Resuspender el pellet con el volumen de medio de cultivo necesario para obtener 300.000 céls/ml.
- Colocar 3 ml de medio de cultivo conteniendo aproximadamente 900.000 células por *well*
- Dejar incubando toda la noche

Anexo 4. Transfección

A) Puesta a punto de la transfección

- Colocar en 100 μ l NaCl 150mM estéril:

3 μ g del plásmido BAFF-R FLAG (por triplicado)

6 μ g del plásmido BAFF-R FLAG (por triplicado)

5 μ g Mock (plásmido vacío) + 1 μ g GFP (proteína verde fluorescente)

- A parte preparar el PEI:

100 μ l NaCl 150 mM estéril + 6, 9 y 12 μ l de PEI

100 μ l NaCl 150 mM estéril + 12, 18 y 24 μ l de PEI

- Vortexear 10 segundos y centrifugar todos los tubos

- Agregar 100 μ l de la solución de NaCl PEI a cada eppendorf con ADN en las siguientes combinaciones:

3 μ g ADN – 6 μ l de PEI

3 μ g ADN – 9 μ l de PEI

3 μ g ADN – 12 μ l de PEI

6 μ g ADN – 12 μ l de PEI

6 μ g ADN – 18 μ l de PEI

6 μ g ADN – 24 μ l de PEI

- Vortexear 10 segundos y centrifugar todos los tubos

- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos

- Tomar el contenido (200 μ l totales) y agregar gota a gota en toda la superficie del cultivo

- Hacer movimientos circulares sutiles para reunificar

- Dejar en incubadora toda la noche

B) Estandarización de los niveles de expresión proteica

- Colocar en 100 µl NaCl 150mM estéril:

Receptores fusionados a la señal FLAG

1. 3 µg BAFF-R FLAG + 2.5 µg mock + 0.5 µg GFP
2. 1.5 µg BAFF-R FLAG + 4 µg mock + 0.5 µg GFP
3. 0.75 µg BAFF-R FLAG + 4.75 µg mock + 0.5 µg GFP

4. 3 µg TACI FLAG + 2.5 µg mock + 0.5 µg GFP
5. 1.5 µg TACI FLAG + 4 µg mock + 0.5 µg GFP
6. 0.75 µg TACI FLAG + 4.75 µg mock + 0.5 µg GFP

7. 3 µg BCMA FLAG + 2.5 µg mock + 0.5 µg GFP
8. 1.5 µg BCMA FLAG + 4 µg mock + 0.5 µg GFP
9. 0.75 µg BCMA FLAG + 4.75 µg mock + 0.5 µg GFP

Receptores fusionados a la señal VSV

1. 3 µg BAFF-R VSV + 2.5 µg mock + 0.5 µg GFP
2. 1.5 µg BAFF-R VSV + 4 µg mock + 0.5 µg GFP
3. 0.75 µg BAFF-R VSV + 4.75 µg mock + 0.5 µg GFP

4. 3 µg TACI VSV + 2.5 µg mock + 0.5 µg GFP
5. 1.5 µg TACI VSV + 4 µg mock + 0.5 µg GFP
6. 0.75 µg TACI VSV + 4.75 µg mock + 0.5 µg GFP

7. 3 µg BCMA VSV + 2.5 µg mock + 0.5 µg GFP
8. 1.5 µg BCMA VSV + 4 µg mock + 0.5 µg GFP
9. 0.75 µg BCMA VSV + 4.75 µg mock + 0.5 µg GFP

- A parte preparar el PEI: 100 µl NaCl 150 mM estéril + 12 µl de PEI por transfección

- Vortexear 10 segundos y centrifugar todos los tubos

- Agregar 100 µl de la solución de NaCl PEI a cada eppendorf con ADN

- Vortexear 10 segundos y centrifugar todos los tubos
- Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos
- Tomar el contenido (200 µl totales) y agregar gota a gota en toda la superficie del cultivo
- Hacer movimientos circulares sutiles para reunificar
- Dejar en incubadora toda la noche

C) Análisis de las interacciones proteicas

- Colocar en 100 µl NaCl 150mM estéril:

1. 3 µg BAFF-R FLAG + 3 µg BAFF-R VSV
2. 3 µg BAFF-R FLAG + 3 µg BCMA VSV
3. 3 µg BAFF-R FLAG + 1.5 µg TACI VSV + 2.25 µg mock

4. 0.75 µg TACI FLAG + 1.5 µg TACI VSV + 3.75 µg mock
5. 0.75 µg TACI FLAG + 3 µg BCMA VSV + 2.25 µg mock
6. 0.75 µg TACI FLAG + 3 µg BAFF-R VSV + 2.25 µg mock

7. 3 µg BCMA FLAG + 3 µg BCMA VSV
8. 3 µg BCMA FLAG + 3 µg BAFF-R VSV
9. 3 µg BCMA FLAG + 1.5 µg TACI VSV + 1.5 µg mock

10. 3 µg BAFF-R VSV + 3 µg mock
11. 1.5 µg TACI VSV + 4.5 µg mock
12. 3 µg BCMA VSV + 3 µg mock

13. 1 µg GFP + 5 µg mock

- A parte preparar el PEI: 100 µl NaCl 150 mM estéril + 12 µl de PEI por transfección
- Vortexear 10 segundos y centrifugar todos los tubos
- Agregar 100 µl de la solución de NaCl PEI a cada eppendorf con ADN

- Vortexear 10 segundos y centrifugar todos los tubos
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- Tomar el contenido (200 μ l totales) y agregar gota a gota en toda la superficie del cultivo
- Hacer movimientos circulares sutiles para reunificar y dejar en incubadora toda la noche

Anexo 5. Co-inmunoprecipitación

SOLUCIONES

a) Buffer de lisis

Para 10 ml:

- 1 ml HEPES 500 mM
- 1 ml NaCl 1,5 M
- 7,9 ml H₂O milliQ
- 100 μ l de Tritón
- Un comprimido de inhibidor de proteasas
- Vortexear hasta que el comprimido se disuelva

b) TRIS 1.5 M pH 9

c) Buffer citrato 50 mM pH 2.7

d) Resina agarosa-anticuerpo anti-FLAG glicerolada

e) Sample buffer 4X

Para 20 ml:

- 8 ml glicerol 100%
- 4.8 ml TRIS 1 M pH 6.8
- 1.6 g SDS
- 8 mg de azul de bromofenol
- 1 ml β -mercaptoetanol
- 6.2 ml H₂O milliQ

INCUBACIÓN CON RESINA

- Preparar buffer de lisis y mantenerlo siempre en hielo

Bajo campana:

- Aspirar el medio de cultivo de las células
- Agregar 1 ml de PBS 1X frío y resuspender las células
- Colectar el volumen de cada well en un tubo eppendorf
- Centrifugar a 500 g durante 5 minutos y descartar el sobrenadante con pipeta sin tocar el pellet
- Resuspender en 500 μ l de buffer de lisis IP
- Incubar en hielo durante 30 minutos
- Durante la incubación, preparar la resina anti-FLAG

Se deben hacer lavados con buffer de lisis para deshacerse del glicerol.

Para 9 muestras:

Colocar 250 μ l de resina + 500 μ l buffer IP

Centrifugar a 250 g, 4°C, durante 5 minutos

Descartar el sobrenadante con pipeta

Repetir los pasos anteriores 2 veces más (total 3 lavados)

- Pasados los 30 minutos de incubación, centrifugar las células a 13.000 rpm durante 10 minutos. Se trabaja con el sobrenadante
- Colocar 50 μ l del sobrenadante en un eppendorf rotulado para el análisis del *INPUT* (totalidad de las proteínas en la muestra). Agregar 17 μ l de sample buffer 4X. Calentar a 95°C durante 5 minutos y congelar para su posterior uso
- Colocar los 450 μ l restantes de sobrenadante en otro eppendorf rotulado. Resuspender la resina anti-flag-agarosa (previamente lavada) y agregar 25 μ l a cada tubo
- Incubar toda la noche en agitación a 4°C

INMUNOPRECIPITACIÓN

- Mantener los buffers en frío
- Armar las mini-columnas: colocar la mini-columna (*tip* de 200 μ l con filtro) dentro de la aguja tipo abbocath clavada en la tapa del kitasato. Conectar la bomba de vacío al kitasato
- Preparar un eppendorf por muestra con 15 μ l de TRIS 1.5 M pH 9
- Prender la bomba de vacío
- Resuspender las muestras y cargarlas en las mini-columnas
- Colocar 400 μ l de buffer de lisis en el eppendorf vacío para recuperar lo que haya quedado de muestra
- Resuspender las muestras y cargar de a 200 μ l en la mini-columna
- Esperar a que el buffer baje y se seque la resina. Observar que se torna color blanco
- Posicionar la mini-columna sobre el tubo eppendorf conteniendo 5 μ l de TRIS pH 9
- Agregar 15 μ l de buffer citrato 50 mM pH 2.7 a la mini-columna, en el medio de la resina y dejar 30 segundos. Con la ayuda de una jeringa de 10 ml (con la punta envuelta en parafilm para que encastre en la columna y haga vacío), eluir colocando la mini-columna contra la pared del eppendorf
- Hacer un spin down y mantener en hielo
- Agregar 6 μ l de sample buffer 4X a cada tubo. Calentar a 95°C durante 5 minutos

Anexo 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot

Para el SDS-PAGE y la transferencia de las proteínas se utilizó equipamiento y los protocolos correspondientes de la marca BIO-RAD. Para la inmunodetección de las proteínas se utilizó el sustrato quimioluminiscente de peroxidasa de rábano picante de la marca Thermo Scientific y el detector de quimioluminiscencia GeneGnome XRQ de la marca Syngene.

SOLUCIONES

Todos por 1000 ml

a) Electrode buffer 10X

- 30.3 g TRIS base
- 144 g Glicina
- 10 g SDS
- Llevar a 1000 ml con H₂O milliQ

b) Electrode buffer 1X

100 ml electrode buffer 10X + 900 ml H₂O milliQ

c) Lower buffer

- 182 g TRIS base
- 4 g SDS
- Llevar a mitad de volumen y ajustar pH a 8.8
- Llevar a 1000 ml con H₂O milliQ

d) Upper buffer

- 61 g TRIS base
- 4 g SDS
- Llevar a mitad de volumen y ajustar pH a 6.8
- Llevar a 1000 ml con H₂O milliQ

e) Blot buffer 10X

- 30.3 g TRIS base
- 144.1 g Glicina
- llevar a mitad de volumen y ajustar pH a 8.3
- llevar a 1000 ml con H₂O milliQ

f) Blot buffer 1X

- 100 ml blot buffer 10X
- 700 ml H₂O milliQ
- 200 ml metanol

g) PBS 1X

h) PBS 1X - Tween 0.1% v/v

- 1000 ml PBS 1X
- 1 ml detergente tween

i) PBS 1X - Tween 0.1% v/v más leche en polvo descremada 5 % m/v

ARMADO DE GELES

El tamaño de poro del gel se debe ajustar en función del tamaño de las proteínas que se quieran analizar. Los receptores de BAFF pesan entre 20 y 40 kD, por lo que se utilizó un gel de corrida de 12% acrilamida, y un gel concentrador de 4% acrilamida.

a) Gel de corrida

- 2,2 ml H₂O
- 3.2 ml acrilamida 30%
- 2.5 ml lower buffer
- 3 µl tetrametiletilendiamina (TEMED)
- 80 µl adenosina 5'-fosfosulfato (APS) 10%

b) Gel concentrador

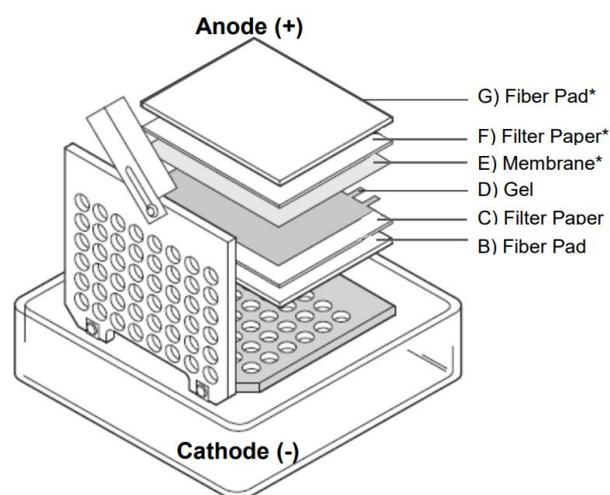
- 2.42 ml H₂O
- 530 µl acrilamida 30%
- 1 ml upper buffer
- 4 µl TEMED
- 40 µl APS 10%

ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA

- Colocar gel en la cuba y llenar de electrode buffer diluído al 1X
- Cargar 5 µL de marker de peso molecular y 25 µL de cada muestra
- Correr a 80V
- Una vez que el frente de corrida pase el gel concentrador subir a 100/120 V
- Una vez que el frente de corrida ya no avance, apagar

TRANSFERENCIA

- Colocar el dispositivo de transferencia, la membrana de nitrocelulosa y el gel en blot buffer 1X
- Preparar la transferencia como muestra el siguiente esquema, teniendo cuidado de que no queden burbujas entre el gel y la membrana



- Colocar el cassette en la cuba
- Agregar unidad de frío congelada
- Agregar blot buffer 1X hasta cubrir el cassette por completo
- Correr a 100 V durante 1 hora
- Comprobar la transferencia con colorante rojo punzó
- Bloquear la membrana: colocar en 30 ml PBS-Tween-leche 5% y dejar en agitación en frío toda la noche

INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie</i>	<i>Marca</i>	<i>N° catálogo</i>
pAb Anti-FLAG	Conejo	Sigma-Aldrich	F7425
IgG1 Anti-VSV	Ratón	Sigma-Aldrich	V5507
IgG Anti-Conejo conjugado a peroxidasa	Burro	Jackson ImmunoResearch	129517
IgG Anti-Ratón conjugado a peroxidasa	Burro	Jackson ImmunoResearch	129117

Preparar anticuerpos primarios en PBS-Tween-leche 5% a una concentración de 1 µg/ml (10 µg ac. en 10 ml PBS)

Preparar anticuerpos secundarios anti-especie en PBS-TW-leche 5% a una concentración de 1/10.000 (1 µL ac. en 10 ml PBS)

A) Primera inmunodetección

- Lavar la membrana con PBS-Tween
- Agregar anticuerpo primario anti-VSV
- Incubar 1 hora en agitación a temperatura ambiente
- Recuperar anticuerpo primario y congelar

- Hacer 2 lavados de 5 minutos con 25 ml de PBS-Tween en agitación
- Agregar anticuerpo secundario anti-ratón
- Incubar 1 hora en agitación a temperatura ambiente
- Hacer 5 lavados de 5 minutos con 25 ml de PBS-Tween en agitación
- Revelar con 500 μ L de sustrato de peroxidasa de rábano

B) Reutilización de la membrana

- Solución para *bleaching*

PBS-TW 0.1%

NaN₃ 0.1%

H₂O₂ 0.3%

- Incubar 1 hora
- Hacer 5 lavados de 5 minutos con 25 ml de PBS-Tween en agitación

C) Segunda inmunodetección

- Agregar anticuerpo primario anti-FLAG
- Incubar 1 hora en agitación a temperatura ambiente
- Recuperar anticuerpo primario y congelar
- Hacer 2 lavados de 5 minutos con 25 ml de PBS-Tween en agitación
- Agregar anticuerpo secundario anti-conejo
- Incubar 1 hora en agitación a temperatura ambiente
- Hacer 5 lavados de 5 minutos con 25 ml de PBS-Tween en agitación
- Revelar con 500 μ L de sustrato de peroxidasa de rábano

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: mamá, papá, abuela, abuelo y tíos, que me apoyaron desde el momento cero sin dudarlos, y me recordaron una y mil veces que tenía la capacidad de lograr lo que me propusiera en la vida.

A mis amigos: Gonzalo, Guido, Joaquín, Lican y Victoria, que fueron y son un sostén fundamental, tanto académico como emocional. El vínculo que construimos durante este trayecto es algo que voy a valorar y atesorar para siempre.

A mi amigo y ahora colega, Juan Pablo, con quien compartimos el amor por la ciencia desde la secundaria, y que siempre me ayudó en todo lo que pudo.

A mis amigos de la vida, por todo.

A mi director Cristian, por darme un lugar en su grupo de investigación, por todo el conocimiento que me transmitió, por el acompañamiento y la paciencia. A mi co-directora y profesora Lorena, quien me mostró por primera vez el maravilloso mundo que es la biología celular y molecular, y me acompañó en cada paso de esta última etapa de mi trayecto de formación.

A mis compañeros de laboratorio y ahora de trabajo, Pablo, Alberto y Julieta, que me asistieron en todo lo que pudieron, celebraron mis logros y acompañaron mis frustraciones.

Al Centro Regional Universitario Bariloche y todos los que forman parte de esta institución, especialmente a los profesores y profesoras que fueron parte de mi trayecto de formación.

A la educación pública.

Gracias.