

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Estudio de la función de la desaminasa inducida por activación en la diversificación de anticuerpos y en la generación de lesiones linfomagénicas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isora Vidal Sernández

Directora:

Almudena R. Ramiro

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-694-7138-8

© Isora Vidal Sernández, 2011

Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular I



**Estudio de la función de la Desaminasa Inducida
por Activación en la diversificación de
anticuerpos y en la generación de lesiones
linfomagénicas.**

Tesis Doctoral

Isora Vidal Sernández

Madrid, 2011

Memoria presentada por Isora Vidal Sernández, licenciada en Farmacia, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Doctora Almudena R. Ramiro en el laboratorio de Hipermutación de ADN y Cáncer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el CNIO, el Consejo Europeo de Investigación (ERC), el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN), la Comunidad de Madrid (CAM), y el Contrato de Personal Investigado de Apoyo otorgado por la CAM.

A mis padres

Agradecimientos

A todos los que de algún modo han hecho posible el desarrollo de este trabajo.

A Almudena R. Ramiro, la directora de esta tesis, por acogerme tras una llegada frustrada a Madrid y convertirla en una etapa productiva. Por sus enseñanzas y valiosas críticas, por haberme permitido desarrollar este interesante proyecto.

A mis compañeros, los Hipermutantes, por las experiencias durante estos años. Ha sido un placer aprender y trabajar a vuestro lado. A los grandes Hipermutantes, por sus sugerencias y ser ejemplo del trabajo bien hecho. En especial a M^a Pilar Delgado y Virginia G. de Yébenes, cuya ayuda ha sido fundamental para el desarrollo de partes esenciales de este proyecto. A los pequeños Hipermutantes, por haber sido unos magníficos compañeros y hacer más agradable el desarrollo de esta tesis.

Al servicio de Animalario, a la unidad de Transgénicos y a la unidad de Citometría del CNIO, cuyo apoyo técnico ha sido fundamental durante estos años.

A nuestros colaboradores, quienes con su experiencia nos han permitido avanzar.

A mis amigos de siempre, por seguir siéndolo a pesar de las largas ausencias; a los que ya no están pero no pueden ser olvidados; a los nuevos, porque me habéis conocido durante una etapa dura y aún así me habéis sonreído.

A mis padres, por su apoyo incondicional siempre, por creer en mí, por enseñarme que la independencia personal, la superación y la inquietud son virtudes. A mi padre, por motivarme con sus libros a salir del laberinto como hizo Ariadna siguiendo el hilo, porque sin él probablemente no habría hecho este camino. A mi madre, por aportarme estabilidad y seguridad en todo momento, por actuar como mecanismo homeostático al igual que ocurre en el mundo de margaritas en la hipótesis de Gaia.

Y por último, a Javi, por su paciencia constante, por hacerme reír, soñar y vivir. Por estar a mi lado siempre a pesar de todas mis lucecitas.

Gracias de todo corazón.

Índice

25	Abreviaturas
31	Introducción
33	Sistema Inmune. Inmunidad Innata y Adaptativa
34	Linfocitos B
36	Diversificación de anticuerpos <ul style="list-style-type: none">- Diversificación primaria de anticuerpos y diferenciación temprana de los linfocitos B- Diversificación secundaria de anticuerpos
40	La Desaminasa Inducida por Activación (AID)
43	Linfomas B y translocaciones cromosómicas <ul style="list-style-type: none">- Translocaciones cromosómicas (TCs) inducidas por AID- AID en linfomagénesis<ul style="list-style-type: none">Modelos de pérdida de función de AIDModelos de ganancia de función de AID
47	Regulación de AID
55	Objetivos
61	Materiales y métodos
63	Líneas de ratón
66	Análisis fenotípicos de poblaciones B
67	Cultivos celulares y citometría de flujo <ul style="list-style-type: none">- Cultivo de líneas celulares- Cultivo de linfocitos B primarios- Citometría de flujo
69	Obtención de sobrenadantes retrovirales y transducción de linfocitos B primarios
70	Análisis de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)
71	Generación del modelo murino Rosa28 ^{AIDki} <ul style="list-style-type: none">- Construcción del vector de <i>targeting</i> Rosa26AID

- Testaje funcional del vector de *targeting*
- Electroporación
- Identificación por *southern blot* de clones con el vector de *targeting* integrado
- Testaje funcional del clon de células madre 267
- Agregación e implantación
- 75** Análisis de mutaciones
- 76** Detección de translocaciones c-myc/IgH por PCR y *southern blot*
- 77** Análisis del promotor de AID: bioinformático y ensayo luciferasa
- 78** Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)
- 78** Análisis estadísticos
- 81** **Resultados**
- 83** **Parte I:** Análisis del efecto de la dosis génica en la actividad de AID
 - Caracterización de los animales AID^{+/-}
 - Efecto de la dosis génica de AID en el cambio de isotipo (CSR)
 - Efecto de la dosis génica de AID en la hipermutación somática (SHM)
 - Efecto de la dosis génica de AID en la generación de TCs c-myc/IgH *in vivo*
 - Efecto de la dosis génica de AID en la generación de TCs c-myc/IgH *in vitro*
- 98** **Parte II:** Estudio de la regulación de la expresión de AID mediada por hormonas
 - Identificación de elementos de respuesta hormonal en el promotor de AID
 - Efecto del estrógeno en la expresión de AID
 - Efecto del estrógeno en las reacciones de CSR y SHM
 - Efecto del estrógeno en la generación de TCs c-myc/IgH
- 105** **Parte III:** Análisis del efecto de la expresión de AID en distintos estadios de la diferenciación B
 - Generación de un modelo murino de sobre-expresión inducida de AID
 - Expresión de GFP y diferenciación en médula de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}

- Expresión de AID en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}
- Reacciones de CSR y SHM en linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}
- TCs c-myc/IgH en linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}
- Análisis de mutaciones en la región S_μ de linfocitos B *naïve* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}
- Análisis del potencial linfomagénico de AID en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}
- Generación y análisis funcional de animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}
- Análisis de mutaciones en la región S_μ de linfocitos B *naïve* Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}
- Efecto de la proliferación en células B *naïve* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}
- Análisis del potencial linfomagénico de AID en ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}

129 **Discusión**

131 Papel de la dosis génica de AID en la diversificación secundaria de anticuerpos y en la generación de TCs c-myc/IgH

134 Regulación de AID mediada por estrógeno

136 Generación de un modelo murino de sobre-expresión inducible de AID para comprender su papel en linfomagénesis

141 Comentario final

145 **Conclusiones**

151 **Bibliografía**

165 **Anexo**

- Publicaciones

Abreviaturas

- A:** adenina
- 7AAD:** 7-amino-actinomycin D
- Ab-MLV:** del inglés, virus de la leucemia murina de Abelson
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ADN complementario
- AID:** del inglés, desaminasa inducida por activación
- AID^{E58Q}:** mutante catalíticamente inactivo de AID
- APC:** del inglés, alofococianina
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNm:** ARN mensajero
- ATM:** del inglés, gen supresor de tumores mutado de la ataxia-telangiectasia
- Att:** del inglés, site-specific *attachment*
- BCL1:** del inglés, gen asociado a linfomas de células B número 1
- BCL2:** del inglés, gen asociado a linfomas de células B número 2
- BCL6:** del inglés, gen asociado a linfomas de células B número 6
- BCR:** del inglés, receptor para el antígeno de células B
- BER:** reparación por escisión de la base errónea
- C:** citosina
- C μ , C γ , C ϵ y C α :** regiones constantes de la inmunoglobulina μ , γ , ϵ y α
- CFSE:** 5-(6) carboxifluoresceín diacetato succinimidil éster
- CSR:** del inglés, cambio de isotipo
- DDR:** del inglés, respuesta de daño al ADN
- DMEM:** del inglés, medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO:** dimetil sulfóxido
- DSB:** del inglés, rotura en el ADN de doble cadena
- dU:** desoxiuridina
- ELISA:** del inglés, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
- E μ :** del inglés, *enhancer* μ
- ERE:** elemento de respuesta a estrógeno
- FBS:** del inglés, suero fetal bovino
- FELASA:** del inglés, federación de asociaciones europeas de las ciencias de animales de laboratorio
- FITC:** del inglés, isocianato de fluoresceína
- FSC:** del inglés, *forward scatter*
- G:** guanina
- GALT:** del inglés, tejido linfoide asociado al tubo digestivo
- GAPDH:** del inglés, gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa
- GFP:** del inglés, proteína verde fluorescente
- HIGM2:** Síndrome de Hiperinmunoglobulinemia tipo 2
- Ig:** inmunoglobulina
- IgH:** cadena pesada de Ig
- IgL:** cadena ligera de Ig
- IgM, IgD, IgG1, IgG3, IgA, IgE:** isotipos M, D, G1, G3, A y E
- IL4:** interleuquina 4
- IL6Tg:** ratón transgénico para la interleuquina 6
- Ink4a/ARF:** *locus* que codifica los genes supresores de tumores p16(Ink4a) y ARF
- IRES:** del inglés, secuencia de unión a ribosoma

LPS: lipopolisacárido

MMR: del inglés, reparación de apareamientos erróneos

NHEJ: del inglés, maquinaria de unión de extremos no homólogos

MYC: del inglés, oncogén identificado en el virus de mielocitomatosis aviar

NF- κ B: del inglés, factor nuclear estimulador de la cadena kappa de células B

NP-CGG: del inglés, *4-hydroxy-3-NitroPhenyl)-acetyl-Chicken Gamma Globulin*

P53: proteína supresora tumoral 53

Pax5: del inglés, *paired box gene 5*

PBS: del inglés, tampón fosfato salino

PCR: del inglés, reacción en cadena de la polimerasa

PE: del inglés, ficoeritrina

PerCP: proteína clorofila peridina

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PP: placa de Peyer

Promotor CAG: combinación del promotor de la β -actina de pollo y el *enhancer* del citomegalovirus

qRT-PCR: del inglés, PCR cuantitativa en tiempo real

RPA: del inglés, proteína A de replicación

rpm: revoluciones por minuto

RPMI: del inglés, medio *Roswell Park Memorial Institute*

S α , S μ , S γ 1, S γ 3: región de *switch* de la inmunoglobulina α , μ , γ 1 y γ 3

SHM: del inglés, hipermutación somática

T: timina

TC: translocación cromosómica

TCR: del inglés, receptor para el antígeno de células T

TGF β : del inglés, factor de crecimiento transformante β

UNG: del inglés, uracilo-N-ADN-glicosilasa

V(D)J: recombinación de segmentos V(variable), D (diversidad), J (del inglés, *Joining*)

WRC: secuencia donde, W: A o T y R: A o G

Introducción

La vida es aprendizaje, cuando dejes de aprender, mueres.

Tom Clancy

Sistema Inmune. Inmunidad Innata y Adaptativa

El sistema inmune es el responsable de que los organismos puedan defenderse del posible ataque de agentes patógenos. Esta protección es el resultado de una compleja interrelación de distintas células y tejidos. Se trata de un sistema altamente eficaz, ya que si bien estamos rodeados de microorganismos potencialmente patógenos, experimentamos enfermedades infecciosas con una frecuencia relativamente baja.

En vertebrados existen dos tipos complementarios de respuesta inmune, la innata y la adaptativa. La inmunidad innata o inespecífica constituye la primera línea de defensa contra agentes patógenos comunes. Nacemos con ella, actúa de modo casi inmediato, siempre de la misma forma y no genera memoria. Forman parte de ella barreras físicas y químicas externas, como son la piel y las mucosas, el pH ácido y diversas enzimas. Cuando los microorganismos consiguen atravesar las barreras externas, actúan los mecanismos inespecíficos internos formados por moléculas y células variadas, como citoquinas y fagocitos. La defensa innata combate eficazmente microorganismos que expresan en su superficie moléculas conservadas a lo largo de la evolución, comunes para una amplia variedad de gérmenes. Por ello, la respuesta innata no siempre puede eliminar los patógenos, ya que las moléculas de su superficie evolucionan con una gran rapidez existiendo muchos gérmenes que no es capaz de reconocer. En cambio, la inmunidad adaptativa es capaz de generar una respuesta de defensa altamente específica, tanto a nivel del reconocimiento del patógeno como de las acciones efectoras para su eliminación. Además, una respuesta inmunitaria adaptativa confiere protección frente a la re-infección por el mismo germen durante toda la vida, lo que se conoce como memoria inmunológica.

Las células efectoras de las respuestas adaptativas son los linfocitos o células B y T. Los linfocitos B reconocen los patógenos extracelulares, como son la mayoría de las bacterias, en cambio, los linfocitos T detectan patógenos intracelulares, como los virus, y además participan en la activación de otras células del sistema inmune. El reconocimiento, en ambos casos, es a través de receptores específicos de antígeno que expresan en su superficie, conocidos como BCR en los linfocitos B (del inglés, *B-Cell antigen Receptor*) y TCR en los linfocitos T (del inglés, *T-Cell antigen Receptor*). Actualmente, se entiende por antígeno cualquier sustancia que pueda ser reconocida por el sistema inmune adaptativo, normalmente proteínas o polisacáridos que forman parte de la estructura de microorganismos. Cada linfocito posee un receptor específico, existiendo mecanismos por los que se genera un repertorio virtualmente

ilimitado de recetores de antígeno, lo que posibilita la defensa contra cualquier tipo de infección.

Linfocitos B

Los linfocitos B se originan en la médula ósea a partir de progenitores hematopoyéticos pluripotentes, y es en ella donde maduran (Figura I-1). El resultado final de la diferenciación de los linfocitos B es la generación de un BCR funcional. El

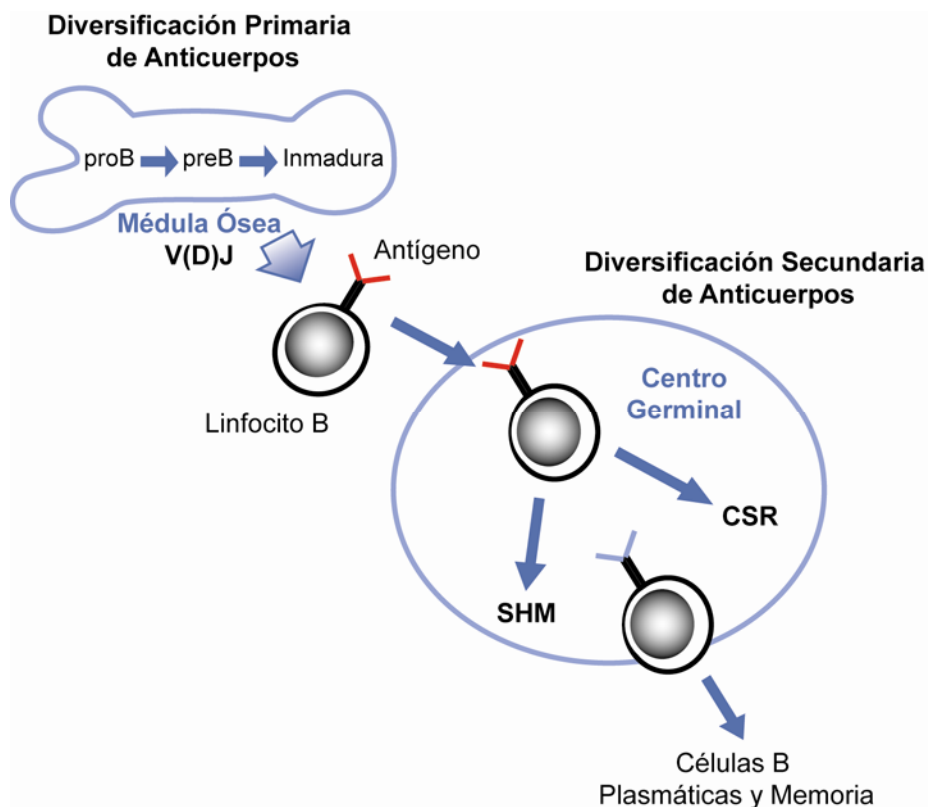


Figura I-1. Diferenciación de los linfocitos B y diversificación de anticuerpos. La diversificación primaria del repertorio de anticuerpos tiene lugar a través del reordenamiento somático de los genes de inmunoglobulinas, denominado recombinación V(D)J. La recombinación V(D)J ocurre en la médula ósea de manera independiente de antígeno y está acoplada a la diferenciación B en esta localización. Posteriormente, los linfocitos B maduros pueden llevar a cabo un proceso de diversificación secundaria en los centros germinales tras el encuentro con un antígeno en la periferia. La diversificación secundaria de anticuerpos ocurre a través de dos mecanismos moleculares independientes: hipermutación somática (SHM, del inglés, *Somatic Hypermutation*) y cambio de isotipo (CSR, del inglés, *Class Switch Recombination*). Como resultado de estos mecanismos, las células B pueden aumentar la afinidad de sus receptores por el antígeno y abandonar el centro germinal como células B plasmáticas productoras de anticuerpos o células B de memoria.

BCR está formado por una inmunoglobulina (Ig) unida a la membrana celular, responsable del reconocimiento antigénico, y el heterodímero $Ig\alpha/Ig\beta$ responsable de la transducción de señales. Las inmunoglobulinas se componen de dos cadenas ligeras (IgL, del inglés, *Immunoglobulin Light chain*) y dos pesadas (IgH, del inglés, *Immunoglobulin Heavy chain*) idénticas (Figura I-2). Las inmunoglobulinas, además de formar parte del BCR, son secretadas por las células plasmáticas, denominándose anticuerpo a esta forma soluble.

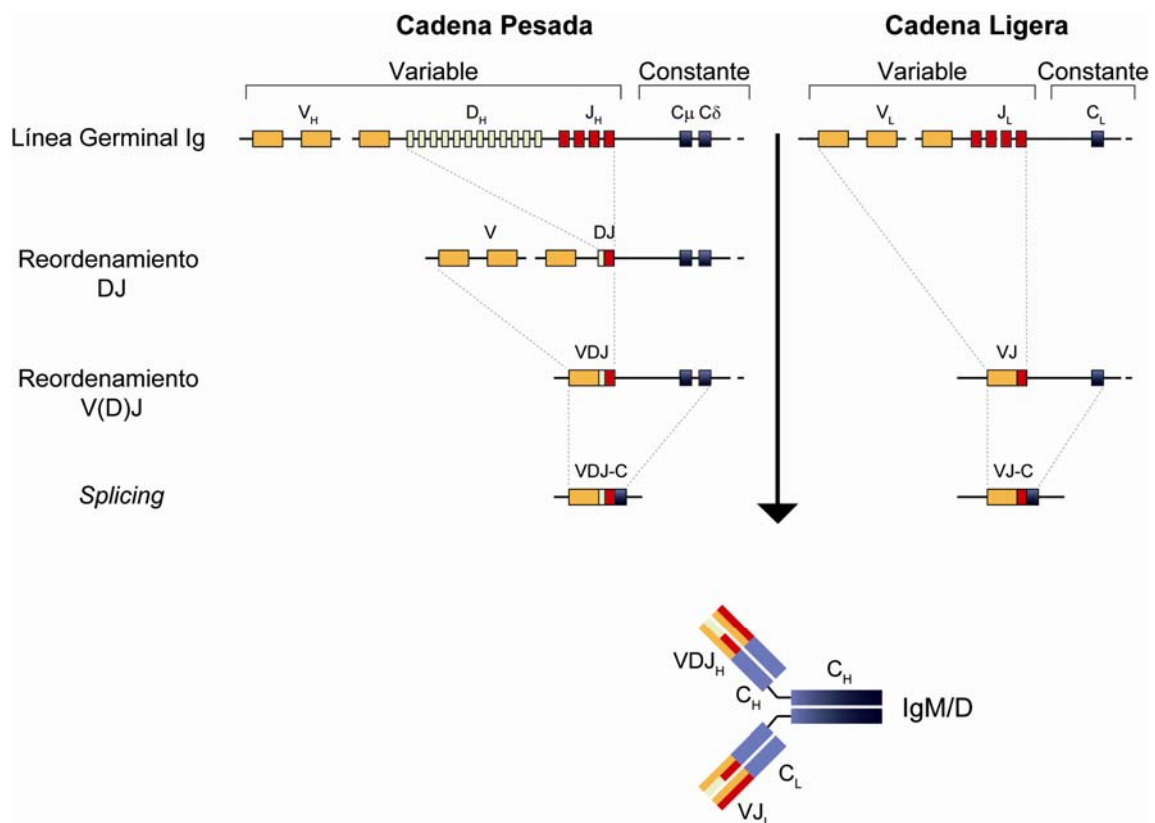


Figura I-2. Recombinación V(D)J. La recombinación V(D)J se basa en el reordenamiento de los genes de la cadena pesada (IgH) (diagrama izquierdo) y de la cadena ligera (IgL) (diagrama derecho) de las inmunoglobulinas. Los *loci* de las cadenas IgH e IgL están formados por una colección de segmentos V (variabilidad), D (diversidad, sólo IgH) y J (unión, del inglés *Joining*). La recombinación V(D)J yuxtapone un segmento de cada tipo mediante una reacción de recombinación mediada por las endonucleasas RAG1 y RAG2. Como consecuencia, la región variable de IgH está formada por el reordenamiento de tres tipos de segmentos génicos: V (rectángulo naranja), D (amarillo) y J (rojo). La región constante de IgH (C_{μ} y C_{δ} en linfocitos B *naïve*) se une a la región variable de IgH (VDJ_H) por *splicing* del ARNm. La región variable de IgL (V_L) se forma a través de la combinación de dos tipos de segmentos génicos: V (rectángulo naranja) y J (rojo). Su región constante (C_L) se une por *splicing* a la región variable de IgL (VJ_L). En la parte inferior se representa el anticuerpo codificado por los genes de inmunoglobulinas indicados en la parte superior, compuesto por dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas por puentes disulfuro.

La molécula de anticuerpo tiene dos funciones distintas. La primera, unirse al antígeno que desencadenó la respuesta inmune de forma específica. La segunda, reclutar distintas células y moléculas para destruir al patógeno una vez el anticuerpo se ha unido a él. Estas funciones están estructuralmente separadas en la molécula de anticuerpo, siendo la región variable la que reconoce de forma específica al antígeno y la región constante la que recluta los distintos mecanismos de eliminación del antígeno.

Una vez finalizada su diferenciación en la médula ósea, los linfocitos entran en la circulación sanguínea, desde la que migran a los órganos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfoides asociados a mucosas). Los patógenos pueden entrar en el organismo por múltiples rutas, pero serán transportados a los órganos linfoides periféricos donde serán presentados a los linfocitos B. Cuando un linfocito B entra en contacto con un antígeno del que su receptor es específico, experimenta un proceso de activación, proliferación y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos, que pueden eliminarlo de forma específica (Figura I-1).

Diversificación de anticuerpos

Diversificación primaria de anticuerpos y diferenciación temprana de los linfocitos B

La inmunidad adaptativa es responsable de la defensa altamente especializada contra patógenos que poseemos los animales vertebrados. La respuesta inmune adaptativa en células B es posible gracias a la existencia de un repertorio de receptores B para el antígeno de una diversidad virtualmente ilimitada. La generación de esta diversidad está acoplada al programa de diferenciación de los linfocitos B en la médula ósea y tiene lugar mediante un proceso de recombinación somática específico de secuencia conocido como reordenamiento V(D)J, homólogo al que genera el repertorio de receptores T en linfocitos T (revisado en Jung y col., 2004). La región variable de la inmunoglobulina está constituida por múltiples segmentos génicos, que se agrupan en tres grupos: variable (V), diversidad (D), unión (J, del inglés, *Joining*). Así, la región variable IgL únicamente contiene segmentos V_L y J_L , mientras que la IgH contiene los tres tipos de segmentos génicos (V_H , D_H y J_H). A través de la reacción de recombinación somática V(D)J aleatoria de los segmentos génicos se genera un fragmento continuo de ADN que codifica la región variable completa (revisado en Tonegawa, 1983; revisado en Bassing y col., 2002; revisado en Gellert., 2002) (Figura I-2). La diversidad que se genera proviene de las múltiples combinaciones de uniones

posibles y de la imprecisión en la reacción de unión. Esta reacción es iniciada por las endonucleasas RAG1 y RAG2 específicas de linfocitos (Schatz y col., 1989; Oettinger y col., 1990), y ocurre de un modo antígeno independiente.

Los estadios de desarrollo de las células B se definen por el reordenamiento y expresión secuencial de los genes de las cadenas pesada y ligera de las Ig (Hardy y col., 1991), y se caracterizan fenotípicamente por la expresión de distintas proteínas de superficie. Las células más tempranas del linaje B se conocen como células proB, pero es en la fase proB cuando se inicia la recombinación V(D)J. En las células proB tiene lugar el reordenamiento de los segmentos génicos de la cadena pesada de las Ig; el siguiente estadio corresponde a las células preB, donde tiene lugar el reordenamiento de la cadena ligera. La cadena IgH recombinada será expresada en la membrana junto con la cadena ligera, y el heterodímero transductor de señales $Ig\alpha/Ig\beta$. Las células que finalicen con éxito estos reordenamientos expresan una molécula de IgM en la superficie celular, y se denominan células B inmaduras. Estas células son sometidas a un proceso de selección, siendo eliminadas o inactivadas aquellas que reconocen moléculas propias. Los linfocitos B abandonan la médula ósea y se convierten en la periferia en células B maduras o *naive*, que pueden co-expresar IgM e IgD por un proceso de *splicing* alternativo.

Diversificación secundaria de anticuerpos

En la periferia, las células B pueden, en respuesta al reconocimiento antigénico y en presencia de una señal co-estimuladora de un linfocito T colaborador, llevar a cabo mecanismos de diversificación adicional en los genes que codifican para sus receptores antigénicos. Estos mecanismos de remodelación adicional tienen lugar en los centros germinales y consisten en dos reacciones independientes, la hipermutación somática (SHM, del inglés, *Somatic Hypermutation*) y el cambio de isotipo (CSR, del inglés, *Class Switch Recombination*) (Figura I-1). Los centros germinales son lugares de intensa proliferación de linfocitos B que se localizan en el interior de los folículos de los tejidos linfoides secundarios (bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfoides asociados a mucosas).

La SHM consiste en la introducción de mutaciones puntuales en la secuencia de la región variable de los genes de IgH e IgL (frecuencia de $10^{-3} - 10^{-4}$), que es la responsable del reconocimiento antigénico. Las células en las que la SHM da lugar a una molécula de anticuerpo con mayor afinidad por el antígeno, proliferan y son seleccionadas positivamente, mientras que aquellas en las que las mutaciones dan

lugar a un efecto deletéreo, son eliminadas por apoptosis. Este fenómeno se denomina maduración por afinidad (revisado en Maul y col, 2010) (Figura I-3).

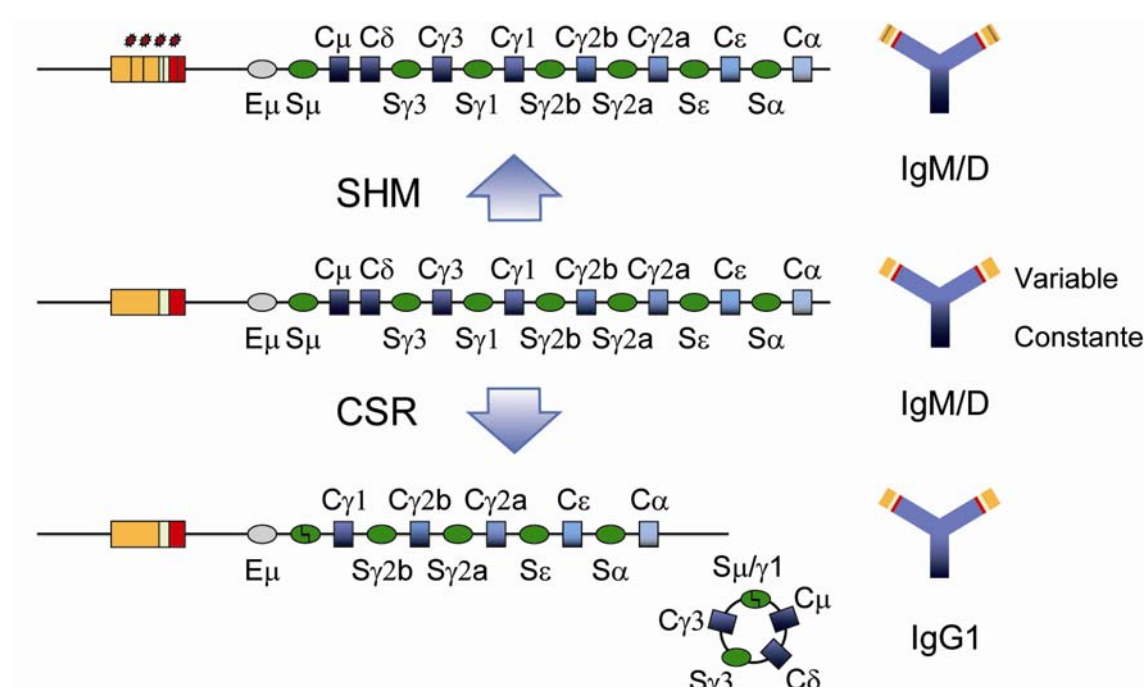


Figura I-3. Mecanismos moleculares de diversificación de anticuerpos: CSR y SHM. La cadena pesada (IgH) en las células B maduras (diagrama central) está constituida por una región V(D)J reordenada en 5', que codifica para la zona variable del anticuerpo, responsable del reconocimiento antigénico (rectángulos naranja, amarillo y rojo), y un número de genes constantes (rectángulos azules), que precedidos por regiones de *switch* altamente repetitivas (óvalos verdes), codifican para la zona constante del anticuerpo, responsable de la eliminación del antígeno. La SHM introduce mutaciones en la región variable de la cadena de inmunoglobulina (diagrama superior), lo que permite mejorar la afinidad del reconocimiento antigénico. El CSR (diagrama inferior) es una reacción de recombinación específica de región por la que se recombinan dos regiones de *switch* y se escinde la secuencia intermedia en forma de círculo. De esta manera la región constante original (C_{μ}/C_{δ}) se sustituye por otra con distintas funciones efectoras (la figura muestra el cambio de isotipo a IgG1). A la derecha se representan los anticuerpos codificados por los genes de inmunoglobulinas indicados a la izquierda (basada en una figura de "de Yebeles y col., 2006").

El CSR es una reacción de recombinación somática específica de región por la que las regiones constantes C_{μ} y C_{δ} de la cadena IgH son sustituidas por otra región constante posterior en el *locus* (C_{γ} , C_{ϵ} o C_{α}) que confiere al anticuerpo funciones efectoras específicas, mientras mantiene la misma especificidad antigénica. El linfocito B pasará de expresar los isotipos IgM y/o IgD, a expresar los isotipos IgG, IgE o IgA situados en el extremo 3' del *locus* de inmunoglobulina, cada uno con funciones efectoras distintas. La reacción de recombinación tiene lugar entre dos secuencias de ADN no codificantes altamente repetitivas que preceden a cada una de las regiones constantes (C_{μ} , C_{γ} , C_{ϵ} y C_{α}) y se denominan regiones de *switch*, a través de la

generación de una rotura en el ADN de doble cadena (DSB, del inglés, *Double Strand Break*) en esas regiones, ligación de ambas y liberación de la secuencia intermedia del *locus* en forma de círculo (Figura I-3) (revisado en Stavnezer y col., 2008). El entorno de citoquinas es responsable del isotipo particular a que da lugar el CSR, *in vivo* e *in vitro*.

El repertorio de anticuerpos que resulta de estas dos reacciones presenta una afinidad mejorada por el antígeno y una mayor diversidad funcional, imprescindibles para la respuesta inmune humoral (revisado en Hentges, 1994, revisado en Neuberger, 2008). En la resolución de los DSB asociados a CSR participan moléculas implicadas en la respuesta a daño en el ADN.

El resultado de la reacción de centro germinal es la generación de células B plasmáticas y células B de memoria. Las primeras son las responsables de la secreción de los anticuerpos específicos que se unen al antígeno y lo eliminan mediante distintos mecanismos en función del isotipo que presenten, como pueden ser la activación del sistema de complemento y opsonización para que los fagocitos lo endociten en el caso del isotipo IgG, la neutralización en el caso del isotipo IgA, o la sensibilización de mastocitos que liberan mediadores químicos inductores de reacciones físicas como los estornudos, que ayudan a expulsar gérmenes, en el caso del isotipo IgE. Las células B de memoria permanecen en estado de reposo después de la estimulación antigénica original durante períodos extensos de tiempo, de modo que responderán más rápida y eficazmente en caso de una nueva infección con el agente patógeno que se ha encontrado previamente.

El apéndice, las amígdalas, adenoides y placas de Peyer constituyen el tejido linfoide asociado al tubo digestivo (GALT, del inglés, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), el cual se encuentra en continua exposición a agentes infecciosos. En particular, las placas de Peyer son folículos linfoides localizados en la mucosa del intestino delgado donde las células B son inducidas a sintetizar IgA en los centros germinales de forma constitutiva, lo que genera una barrera protectora en la mucosa intestinal frente a agentes infecciosos (revisado en Fagarasan y col., 2003).

La Desaminasa Inducida por Activación (AID)

La Desaminasa Inducida por Activación (AID, del inglés, *Activation Induced Deaminase*) fue identificada por el laboratorio de Honjo partiendo de la hipótesis de que una recombinasa específica podría ser responsable de la reacción de cambio de isotipo. Se identificó mediante un análisis exhaustivo de los genes cuya expresión se induce específicamente en células B de la línea CH12F3 estimuladas a hacer CSR a IgA (Muramatsu y col., 1999).

Posteriormente se observó que los ratones deficientes en AID son incapaces de desarrollar procesos de CSR y SHM, y que por tanto AID es imprescindible para la diversificación secundaria de anticuerpos (Muramatsu y col., 2000). En ratón y humanos, la Desaminasa Inducida por Activación es la única enzima específica necesaria para desencadenar los procesos de hipermutación somática y cambio de isotipo, como demostró la reconstitución de ambas reacciones al tranfectarse fibroblastos con los sustratos adecuados (Yoshikawa y col., 2002; Okazaki y col., 2002).

Estructuralmente, la molécula humana de AID está formada por 198 aminoácidos y 24kDa de peso molecular, y contiene cuatro dominios estructurales: un dominio presumiblemente de localización nuclear en el extremo N-terminal, un dominio de dimerización, un dominio catalítico de desaminación y un dominio de exportación nuclear en el extremo C-terminal (Yadav y col., 2006; revisado en Maul y col., 2010).

El mecanismo a partir del cual AID induce las reacciones de SHM y CSR ha sido objeto de un intenso debate (revisado en Delker y col., 2009) centrado en la naturaleza de su sustrato: ARN o ADN. Actualmente, existen evidencias genéticas y bioquímicas que demuestran que AID inicia estas reacciones mediante la desaminación de nucleósidos de citosina en el ADN de la región variable, en el caso de la SHM, o en la región de *switch* del *locus* de Ig, en el caso del CSR. La eliminación del grupo amino de una citosina la convierte en uracilo (Petersen-Mahrt y col., 2002; Sohail y col., 2003; Ramiro y col., 2003; Dickerson y col., 2003; Chaudhuri y col., 2003; Pham y col., 2003) (Figura I-4); de modo que la actividad de AID sobre el ADN del *locus* de Ig convierte un par C:G en un desapareamiento de tipo U:G. Este desapareamiento puede procesarse a través de vías alternativas para resolverse en forma de mutación (SHM) o generando una rotura en el ADN de doble cadena (DSB, del inglés, *Double Strand Break*) que se reparará mediante un proceso de recombinación intracromosómica (CSR) (revisado en Longerich y col., 2006) (Figura I-5). Recientemente se han detectado residuos uracilo

en regiones variables y de *switch* de las cadenas de Ig de linfocitos B estimulados, reemplazando fundamentalmente citosinas, lo que termina de demostrar la actividad directa de AID sobre el ADN (Maul y col., 2011).

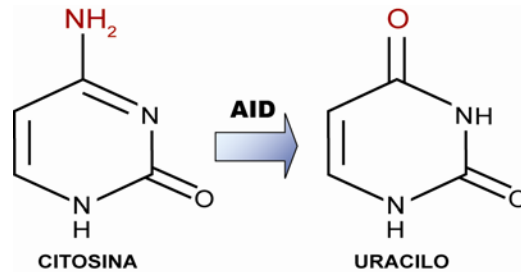


Figura I-4. Actividad citosina desaminasa de AID. AID elimina el grupo -NH₂ del anillo de la citosina transformándola en uracilo.

Las mutaciones que se introducen durante la SHM son el resultado de la resolución de las lesiones U:G generadas por AID a través de tres modos alternativos: (a) que la replicación del ADN ocurre antes de que el uracilo pueda ser escindido por la enzima UNG (del inglés, *Uracil-N-DNA-Glycosylase*), en ese caso se fijará una transición; (b) que actúe UNG, generándose un sitio abásico antes de la replicación del ADN, siendo posible que ocurran tanto transiciones (cambio de bases purina por purina o pirimidina por pirimidina) como transversiones (cambio de bases purina por pirimidina y viceversa); (c) que el uracilo sea reconocido por la maquinaria de reparación de errores (MMR, del inglés, *Mismatch Repair machinery*), en cuyo caso se pueden producir mutaciones en bases AT. Además, el sitio abásico generado por UNG puede ser sustrato para una endonucleasa apirimidínica, lo que conduce a una rotura en la hebra de ADN que contiene el sitio abásico. Esa rotura puede ser reparada, o bien puede ser procesada por la maquinaria de unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés, *Non-Homologous End Joining*) y conducir al cambio de isotipo (revisado en de Yébenes y col., 2006; revisado en Peled y col., 2008; revisado en Stavnezer y col., 2008) (Figura I-5).

Mucho antes de la identificación de AID como iniciador de las reacciones de SHM y CSR en el centro germinal, se sabía que la actividad transcripcional de las regiones variable y de *switch* era totalmente necesaria para que ambas reacciones se desarrollaran. Hoy, se acepta que este requerimiento está ligado mecánicamente a la función de AID, pues es necesaria la exposición transitoria de la hebra de cadena sencilla del ADN por la ARN polimerasa II durante la transcripción para que éste sea

accesible para AID (Chaudhuri y col., 2003; Pham y col., 2003; Ramiro y col., 2003; Shinkura y col., 2003; Chaudhuri y col., 2004), o dicho de otro modo, es necesaria la activación transcripcional del *locus* de Ig para que AID pueda acceder a él.

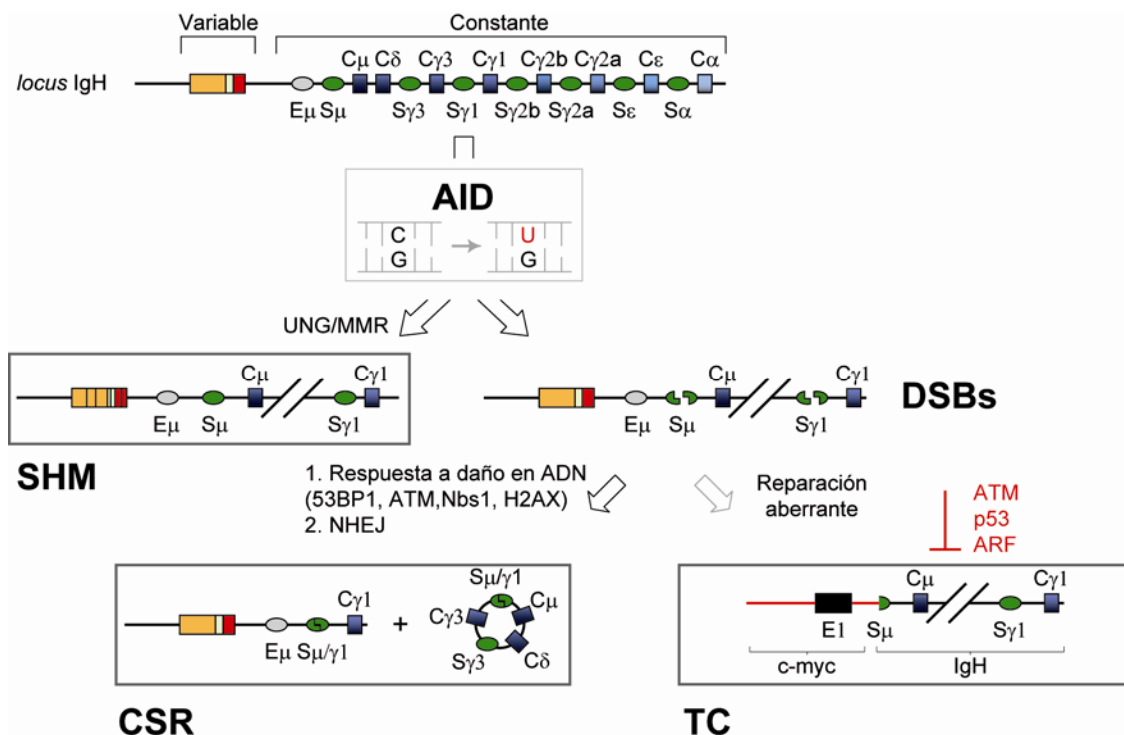


Figura I-5. Mecanismo de acción de AID. AID desamina residuos dC en las regiones variables y en las *switch* transcripcionalmente activas generando desapareamientos dU:dG. El procesamiento de esta lesión puede dar lugar a una mutación permanente en el caso de la SHM o bien una rotura de doble cadena (DSB) en el caso del CSR. Los DSBs generados en dos regiones de *switch* (en el diagrama, S_{μ} y $S_{\gamma 1}$) se unen entre sí mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ, del inglés, *Non Homologous End-Joining*) con la intervención de moléculas implicadas en la respuesta a daño en el ADN (53BP1, ATM, Nbs1, H2AX). Los DSBs generados por AID también pueden ser sustrato para translocaciones cromosómicas linfomagénicas, tales como *c-myc/IgH*, característica del linfoma de Burkitt. p53, ATM y ARF proveen mecanismos protectores contra este tipo de lesiones (basada en una figura de "Pérez-Durán y col., 2007").

La importancia de AID para el desarrollo de una correcta respuesta inmune en humanos se evidencia porque las mutaciones en el gen de AID están asociadas a una rara inmunodeficiencia (1/2000000) llamada Síndrome de Hiper-inmunoglobulinemia tipo 2 (HIGM2). Esta inmunodeficiencia se caracteriza generalmente por elevados niveles de IgM, ausencia de CSR y normal o disminuída SHM dependiendo del lugar donde se localicen las mutaciones (Revy y col., 2000). Estos pacientes son propensos a desarrollar infecciones bacterianas de los tractos digestivos y respiratorios e hipertrofia linfoide (Minegishi y col., 2000; Quartier y col., 2004).

Linfomas B y translocaciones cromosómicas

La proliferación celular desregulada es la característica principal de la transformación de las células sanas en tumorales. Se inicia a través de mutaciones que liberan a las células de los controles y restricciones normales durante su crecimiento. La disrupción de los controles de crecimiento normal está también, en muchas ocasiones, asociada a translocaciones cromosómicas (TC, del inglés, *Chromosomal Translocation*) en las que se fusiona un gen importante para el control del crecimiento celular con otro gen, pasando el primero a ser controlado por los elementos reguladores del segundo.

El 95% de los linfomas diagnosticados en el mundo occidental tienen su origen en células B, y de ellos, la mayoría derivan de células B maduras, es decir, de células B de centro germinal o post-germinales, por lo que los centros germinales parecen ser un ambiente especialmente propicio para la generación de procesos linfomagénicos. Los linfomas B se caracterizan por presentar translocaciones cromosómicas por las que un proto-oncogén se yuxtapone a uno de los *loci* de Igs. Algunos ejemplos de proto-oncogenes frecuentemente implicados en procesos linfomagénicos son MYC en linfoma de Burkitt humano y en tumor de células plasmáticas, o plasmacitoma, en ratón; BCL2 en linfomas foliculares; BCL6 en linfoma difuso folicular o BCL1 en linfoma del manto. Debido a la translocación, la expresión del proto-oncogén se desregula, generalmente por encontrarse bajo el control de elementos reguladores de la inmunoglobulina. En el caso de MYC y BCL1, proteínas implicadas en el control del ciclo celular de células sanas, su desregulación conlleva un aumento en la proliferación de los linfocitos B. En el caso de BCL2, una proteína que impide la muerte celular programada en linfocitos B, su expresión anormal permite a algunas células B sobrevivir y acumularse más allá de su tiempo normal de vida. BCL6 es un represor transcripcional de células B de centro germinal, su desregulación se relaciona, entre otras, con alteraciones en la activación, supervivencia, respuesta a daño en el ADN y diferenciación de los linfocitos B. Estas translocaciones tienen importancia etiológica en el desarrollo de la enfermedad ([revisado en Küppers y col, 2001](#); [revisado en Küppers, 2005](#)). Las translocaciones que implican a IgH son más comunes que las que implican al *locus* IgL. Los lugares de unión entre los cromosomas (en inglés, *breakpoints*) normalmente se agrupan en las regiones de *switch* o, con menos frecuencia, en las regiones variables.

Las translocaciones dan lugar a anomalías cromosómicas visibles microscópicamente durante la metafase. Sin embargo, el análisis microscópico no es

suficiente para detectar translocaciones poco frecuentes. Usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*), es posible detectarlas de un modo altamente sensible en diferentes muestras de tumores y tejidos. Inicialmente, las translocaciones c-myc/IgH se amplificaron usando una combinación de oligonucleótidos degenerados y dos rondas de PCR anidada (Janz y col., 1993; Muller y col., 1996). Más recientemente, se diseñó un nuevo protocolo de dos rondas de PCR anidada en el cual se emplean oligonucleótidos altamente específicos, hibridando unos en una de las regiones de *switch* de la Ig y los otros en un proto-oncogen (Kovalchuk y col., 1996; Ramiro y col., 2004). Este protocolo actualmente es el de elección por los diferentes laboratorios, incluido el nuestro.

Translocaciones cromosómicas inducidas por AID

Los ratones transgénicos para el gen de la interleuquina 6 (IL6Tg) desarrollan hiperplasias linfoides en las que se generan espontáneamente translocaciones t(12;15), homólogas a las translocaciones t(8;14) presentes en linfoma de Burkitt (Kovalchuk y col., 2002; revisado en Potter, 2003). En ausencia de AID no se desarrollan translocaciones c-myc/IgH (Ramiro y col., 2004; Dorsett y col., 2007), lo que indica que AID es necesaria para las translocaciones c-myc/IgH *in vivo*. Además, la sobre-expresión de AID en linfocitos B primarios promueve la generación de translocaciones c-myc/IgH *in vitro* (Ramiro y col., 2006a y revisado en Ramiro y col., 2006b).

Los proto-oncogenes también acumulan mutaciones en algunos linfomas, algunas presumiblemente mediadas por la actividad de AID (Pasqualucci y col., 2001; revisado en de Yébenes y col., 2006), aunque no se conoce bien su relevancia en linfomagénesis.

El cambio de isotipo y las translocaciones cromosómicas se inician por un mecanismo común que implica la generación de DSBs, previa actividad desaminasa de AID y eliminación del residuo dU por UNG (Ramiro y col., 2006a). Es probable que rutas alternativas de generación de DSBs, como los originados por agentes oxidantes producidos por los neutrófilos presentes en los granulomas inducidos por pristano (revisado en Potter, 2003; revisado en Klein y col., 2008), sean las responsables de las translocaciones c-myc/IgH atípicas en ratones deficientes en AID.

En condiciones fisiológicas, la frecuencia de translocaciones c-myc/IgH es extremadamente baja *in vitro* (Ramiro y col., 2006a) e *in vivo* (Roschke y col., 1997). Esto se explica porque la célula dispone de mecanismos de vigilancia en los que participan los genes supresores de tumores p53, ATM y ARF (p19) que impiden que los DSBs se resuelvan en forma de translocación (Ramiro y col., 2006a y revisado en Ramiro y col., 2006b). Las mutaciones que inactivan p53, ATM y ARF (p19) son frecuentes en linfomas de células B maduras como el linfoma de Burkitt o el linfoma difuso folicular (revisado en Küppers, 2005).

AID en linfomagénesis

Se han desarrollado distintos modelos murinos para tratar de entender el papel que juega AID en linfomagénesis.

Modelos de pérdida de función de AID

Los ratones transgénicos de IL6 (modelo de plasmacitoma IL6Tg) desarrollan hiperplasia de nódulos linfáticos en presencia de AID. La deficiencia en AID en estos ratones cursa con ausencia de translocaciones c-myc/IgH y retraso de la hiperplasia y la mortalidad (Ramiro y col, 2004).

Las neoplasias de células plasmáticas inducidas por inyección de pristano en ratones de fondo genético Balb/c ByJ son atípicas en ausencia de AID (modelo de plasmacitoma Bcl-xL/pristano). Los ratones no desarrollan ascitis, sus reordenamientos c-myc/IgH son inusuales y son tumores de baja frecuencia y prolongada latencia (Kovalchuk y col, 2007).

La deficiencia en AID en el modelo de linfoma B de centro germinal I μ HABCL6 (Cattoretti y col., 2005) genera una reducción significativa en la incidencia tumoral y un drástico cambio en el fenotipo de los linfomas que se desarrollan, siendo de células B maduras cuando AID está presente y de células B más inmaduras en ausencia de AID (Pasqualucci y col., 2008). La deficiencia en AID en el modelo de linfoma B que se desarrolla en estadios tempranos de la diferenciación B (μ MYC) (Kovalchuk y col., 2000) no afecta a la incidencia ni el fenotipo de los linfomas (Pasqualucci y col., 2008). Esto indica que AID participa en la generación de linfomas B maduros. Además, existen mutaciones en el proto-oncogén Pim1 en presencia de AID (Pasqualucci y col., 2008). Por tanto, AID participa en el inicio de los procesos linfomagénicos a través de

las translocaciones cromosómicas y en estadios más avanzados introduciendo mutaciones en proto-oncogenes como Pim1 (revisado en Pérez-Durán y col., 2007).

Además, se ha observado que la activación estocástica de myc (ratones $V\kappa$ Myc) mediante la actividad mutagénica de AID, conduce a la generación de mieloma múltiple (Chesi y col., 2008).

Modelos de ganancia de función de AID: ratones transgénicos de AID

Se han desarrollado distintos modelos de ganancia de función de AID mediante la generación de transgénicos que permiten la sobre-expresión de esta enzima, tanto de forma ubicua como de forma específica en linfocitos B. El transgénico de expresión ubicua de AID bajo el promotor CAG (combinación del promotor de la β -actina de pollo y el *enhancer* del citomegalovirus), desarrolla principalmente linfomas T y microadenomas de pulmón, y ocasionalmente hepatocarcinomas (Morisawa y col., 2008). Se observaron mutaciones, pero no se encontraron translocaciones (Okazaki y col., 2003; Kotani y col., 2005). También se observó desarrollo de linfomas T en un transgénico de AID donde se usa el promotor Ick (Rucci y col., 2006). Un segundo modelo de transgénico de AID desarrollado bajo el control ubico de la β -actina, permitía una baja actividad del transgén de AID (Shen y col., 2008). En todos los casos, estos modelos transgénicos no dieron lugar a la generación de linfomas B en ratones que expresan ubicuamente AID. Este resultado podría deberse a un inicio más tardío de estos linfomas estando su aparición enmascarada por otros tumores como los linfomas T, por ello se desarrollaron nuevos modelos de ratones transgénicos, en este caso específicos de células B.

Los transgénicos que expresan AID de forma específica en linfocitos B tras expresión de la recombinasa Cre bajo el promotor de CD19, no desarrollaron linfomas B en veinte meses. En este modelo la actividad del transgén es baja, medido como ineficiencia en las reacciones de CSR y SHM, pudiendo ser insuficiente la actividad de AID para promover acumulación de lesiones linfomagénicas. Los autores defienden que es posible que existan mecanismos reguladores negativos que específicamente restringen la actividad de AID en linfocitos B (Muto y col., 2006). Durante el desarrollo de este trabajo se han generado ratones transgénicos que expresan AID en células B bajo el control de los elementos reguladores de Igk. Estos animales sólo desarrollan linfomas B en ausencia del gen supresor de tumores p53. Se observó un significativo incremento en SHM en linfocitos B *naïve*, sin embargo no está asociado a la aparición

de translocaciones c-myc/IgH en ellos y se mantiene la especificidad de acción de AID (Robbiani y col., 2009). Estos resultados podrían indicar de nuevo que existen mecanismos de protección contra la actividad de AID, quizá activos en contextos celulares específicos.

Regulación de AID

Como hemos visto, la función de AID es crucial para el desarrollo de una respuesta inmune eficiente, pero a la vez supone un riesgo al introducir inestabilidad genómica en las células. Por ello, debe haber distintos mecanismos responsables de minimizar los efectos indeseados de los que AID es responsable. Los mecanismos reguladores de la actividad de AID conocidos son:

- **Regulación Transcripcional.** La expresión de AID se describió originalmente como exclusiva de linfocitos B activados de centros germinales (Muramatsu y col., 1999). Sin embargo, hoy sabemos que aunque su expresión está principalmente limitada a células B activadas, también existe expresión de AID en oocitos (Morgan y col., 2004) y espermatocitos (Schreck y col., 2006), en linfocitos B inmaduros de médula ósea (Mao y col., 2004; Crouch y col., 2007), en algunos carcinomas ajenos al linaje B (Matsumoto y col., 2007; Endo y col., 2007), en células preB infectadas con el virus Ab-MLV (Gourzi y col., 2006) y en células B *naive* infectadas con los virus de Epstein-Barr (He y col., 2003; Epeldegui y col., 2007) y virus de la hepatitis C (Machida y col., 2004; Machida y col., 2005). Sin embargo, la relevancia funcional de AID en estos tejidos todavía es controvertida.

La regulación espacio-temporal de la expresión de AID se relaciona con el conjunto de factores activadores y represores transcripcionales que son reclutados a elementos reguladores del gen de AID (*Aicda*), como son el factor nuclear κ B (NF- κ B), Pax5, E47, Blimp1, Id2, Id3, Irf8 y HoxC4 (Shaffer y col., 2002; Lin y col., 2002; Gonda y col., 2003; Sayegh y col., 2003; Dedeoglu y col., 2004; Sciammas y col., 2006). Sería también plausible pensar en una regulación de AID mediada por un mecanismo hormonal, ya que está descrita la participación de las hormonas en múltiples procesos fisiológicos (revisado en McDonnell y col., 2002). Durante la reacción de CSR, se remodela la cromatina por acetilación y metilación en el promotor basal y al *enhancer* intrónico del gen de AID (Crouch y col., 2007) (Figura I-6). Hay evidencias de la existencia de un

elemento conservado en la región 5' de AID (CNSVIII) y de uno en la región 3' con marcas epigenéticas características (Crouch y col., 2007) (Figura I-6). Por el momento no está claro cómo todos estos elementos limitan la transcripción de AID fundamentalmente a células B de centro germinal.

- **Regulación Post-Transcripcional.** Los microARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificante que regulan la expresión por degradación post-transcripcional o inhibición de la traducción de los transcritos diana de ARN mensajero (ARNm). Están implicados en la regulación de diversas rutas biológicas entre las que están la diferenciación celular, proliferación y apoptosis. Además, su expresión aberrante se ha relacionado con transformación celular y linfomagénesis. Se ha observado que al menos dos de ellos, miR155 y mir181b, actúan como mecanismos reguladores de AID al modular su expresión por unión directa al extremo 3' no transcrito de AID (Dorsett y col., 2008; Teng y col., 2008; de Yébenes y col., 2008) (Figura I-6).
- **Regulación Post-Traduccional y localización subcelular de AID.** La actividad de AID aumenta tras su fosforilación en la serina 38 por la proteína quinasa A y/o proteína quinasa C (PKA y/o C) (Basu y col., 2005; Pasqualucci y col., 2006; McBride y col., 2006; McBride y col., 2008), probablemente facilitando así la interacción de AID con la proteína A de replicación (RPA) y así su acceso al ADN de cadena sencilla (Basu y col., 2005; Chaudhuri y col., 2004) (Figura I-6).

Aunque AID actúa directamente en el ADN, la mayor parte de la proteína se encuentra en el citoplasma (Rada y col., 2002; Cattoretti y col., 2006). Su permanencia limitada en el núcleo está relacionada con la señal de exportación nuclear presente en su carboxilo terminal, que es reconocida por la exportina CRM1 (McBride y col., 2004; Ito y col., 2004; Brar y col., 2004), y con la degradación proteasomal nuclear del AID poli-ubiquitinado (Aoufouchi y col., 2008) (Figura I-6). Recientemente, se ha observado que la chaperona Hsp90 estabiliza a AID en el citoplasma, impidiendo su poli-ubiquitinación y posterior degradación proteasomal (Orthwein y col., 2010).

Se ha observado que el proceso de importación nuclear de AID es activo, a pesar de su pequeño tamaño. Además, existe en su extremo carboxilo terminal una secuencia de retención citoplasmática, que dificulta la difusión al núcleo,

siendo crucial para mantener la localización predominantemente citoplasmática de AID (Patenaude y col., 2009).

- **Targeting.** AID actúa preferencialmente sobre los *loci* de Igs, siendo baja su actividad en otros genes. Se desconocen los mecanismos que restringen la actividad de AID fundamentalmente a los genes de inmunoglobulinas (*targeting*), siendo el único requerimiento conocido para su actividad que la región diana se encuentre transcripcionalmente activa (Yoshikawa y col., 2002; Ramiro y col., 2003) (Figura I-6). AID introduce mutaciones preferentemente, aunque no exclusivamente, en motivos definidos por la secuencia trinucleotídica degenerada WRC (donde W: A o T y R: A o G) (revisado en Maizels, 2005) *in vivo* (Bransteitter y col., 2004) e *in vitro* (Xue y col., 2006). Sin embargo, la baja complejidad de este motivo hace que se encuentre diseminado por todo el genoma siendo, por tanto, insuficiente para limitar la actividad al *locus* de Ig. Debe existir algo más allá de la secuencia primaria de ADN que explique la especificidad de secuencia de AID. Se ha sugerido que AID podría actuar sobre una amplia proporción de genes transcripcionalmente activos pero que distintos mecanismos de reparación estarían implicados en neutralizar esta actividad mutagénica en la mayor parte de los casos (Liu y col., 2008). Recientemente, se ha relacionado la especificidad de secuencia de AID con los lugares donde se detiene la ARN polimerasa II, siendo reclutada AID a ellos a través de su interacción con el factor transcripcional de elongación Spt5 (Pavri y col., 2010). No obstante, la especificidad de las dianas de AID sigue siendo un tema de intenso estudio y debate.

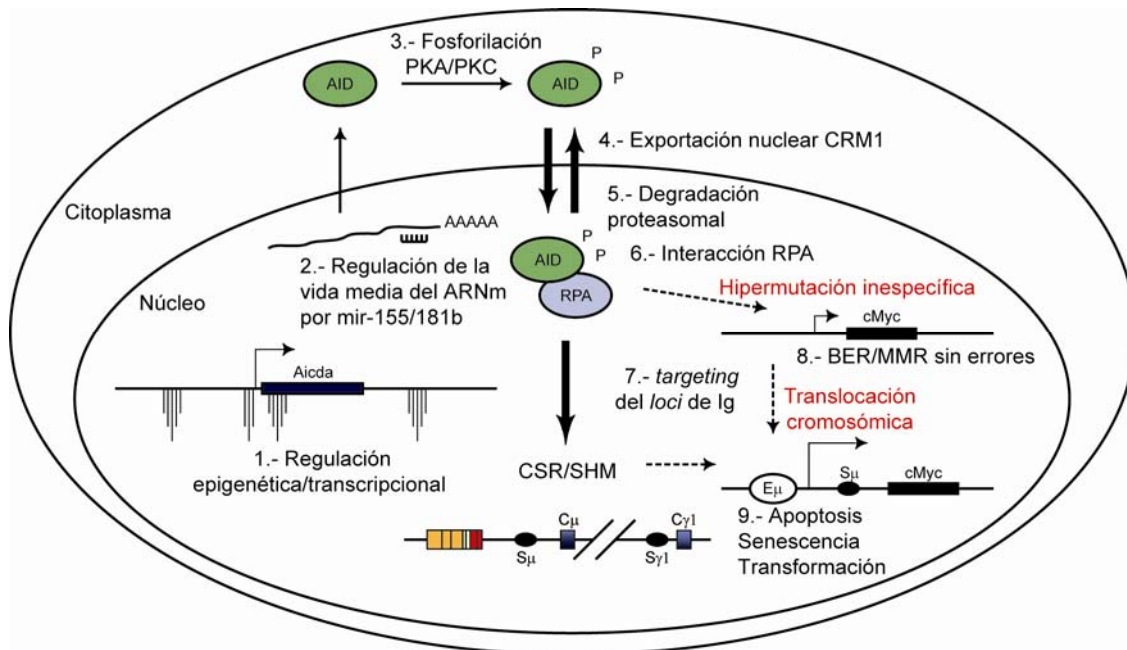


Figura I-6. Mecanismos reguladores de la actividad de AID. La expresión y actividad de AID están reguladas por distintos mecanismos, que presumiblemente evitan la introducción de daños no controlados en el genoma. Se conocen mecanismos reguladores a nivel transcripcional, post-transcripcional, post-traducciona l y de localización en el interior de la célula: 1. La expresión de AID es específica de linfocitos B activados; 2. Regulación por microARN de la vida media del ARNm de AID; 3. Proteína quinasa A (PKA) y/o proteína quinasa C (PKC) median la fosforilación de AID; 4. Exportación nuclear de AID mediada por CRM1; 5. Degradación proteasomal nuclear; 6. Accesibilidad al ADN transcrito a través de la interacción de AID con la proteína A de replicación (RPA); 7. Reclutamiento preferencial del complejo AID-RPA a los genes de inmunoglobulinas; 8. Hipermutación inespecífica en genes que no son inmunoglobulinas, como c-myc, contrarrestado por maquinaria de reparación BER/MMR (reparación por escisión de la base errónea y reparación de apareamientos erróneos, del inglés, *error-free Base Excision Repair and MisMatch Repair*); 9. p53 contrarresta la formación de translocaciones cromosómicas presumiblemente a través de diferentes rutas protectoras. Este sistema de seguridad también podría eliminar los linfocitos B que contengan un amplio daño en el ADN (basada en una figura de “Casellas y col., 2009”).

Por todo lo dicho, la regulación de AID tiene consecuencias profundas en el contexto de las lesiones linfomagénicas y de otras neoplasias, al limitar fisiológicamente las mutaciones inespecíficas y las translocaciones cromosómicas inducidas por AID para evitar la transformación celular (Figura I-6).

Como hemos visto, los linfocitos B del sistema inmune son susceptibles a sufrir eventos transformantes debido a los procesos de remodelación somática y a su elevada tasa de proliferación para generar una diversidad ilimitada. Por ello, además de la correcta regulación de AID, los mecanismos de respuesta de daño al ADN (DDR, del inglés, *DNA Damage Response*) y la regulación del ciclo celular también son muy importantes para mantener la homeostasis y evitar la progresión neoplásica. Uno de los más importantes representantes de la DDR es el gen supresor de tumores p53, que es activado por una serie de quinasas tras daño en el ADN. La activación de p53 puede conducir a un aumento de la reparación del ADN, parada transitoria del ciclo celular, senescencia o apoptosis dependiendo de la intensidad y persistencia de la señal de daño. En ratones con una copia extra de p53 (Superp53) se observa una DDR aumentada y una mayor protección contra el cáncer (García-Cao y col., 2002). Por otra parte, se ha observado que ratones deficientes en los genes supresores de tumores p16^{INK4a}-p19^{ARF} son propensos al desarrollo de linfomas B y sarcomas (Serrano y col., 1996). En nuestro laboratorio se ha observado que la protección contra las translocaciones c-myc/IgH mediadas por AID en ratones Superp53 es dependiente de Arf (Laura Belver, datos sin publicar). Estos mecanismos de vigilancia impiden que los DSBs se resuelvan en forma de translocación (Ramiro y col., 2006a y revisado en Ramiro y col., 2006b). Son frecuentes las mutaciones que inactivan genes supresores de tumores en linfomas de células B maduras (revisado en Küppers, 2005).

Ha pasado algo más de una década desde el descubrimiento de AID (Muramatsu y col., 1999) y se han hecho importantes avances hacia una mejor comprensión de su papel en la diversificación secundaria de anticuerpos y en la generación de lesiones linfomagénicas. Sin embargo, como en todas las áreas nuevas de conocimiento, sigue habiendo muchas preguntas sin respuesta. El objetivo de esta tesis doctoral ha sido continuar avanzando en el estudio de la función fisiológica y patogénica de AID, mediante el análisis de nuevos posibles mecanismos regulatorios de su actividad y el desarrollo de un modelo murino que nos permita estudiar su implicación en la alta propensión de los linfocitos B maduros a sufrir transformaciones malignas.

Objetivos

No es el conocimiento, sino el acto de aprendizaje, y no la posesión, sino el acto de llegar allí, que concede el mayor disfrute.

Carl Friedrich Gauss

El objetivo principal del trabajo experimental presentado en esta tesis ha sido estudiar los mecanismos reguladores de la actividad de la Desaminasa Inducida por Activación (AID). Este objetivo general se ha desglosado en tres particulares.

1. Evaluar el efecto de la dosis génica de AID. Se pretende analizar si los niveles de expresión de AID son limitantes para el desarrollo de su función.
 - a. Determinar si la cantidad de AID es limitante a nivel fisiológico.
 - b. Determinar si la cantidad de AID es limitante a nivel linfomagénico.

2. Estudiar el papel del estrógeno sobre la expresión de AID.
 - a. Identificar posibles elementos de respuesta a estrógeno
 - b. Determinar el efecto del estrógeno en la diversificación de anticuerpos y a nivel linfomagénico

3. Análisis de la actividad de AID en distintos estadios de la diferenciación B.
 - a. Generación y caracterización de un modelo inducible de sobre-expresión de AID *in vivo*.
 - b. Papel del contexto celular en la actividad de AID.
 - c. Papel de AID en linfomagénesis de células B.

Materiales y Métodos

Puede ser un héroe lo mismo el que triunfa que el que sucumbe, pero jamás el que abandona el combate.

Thomas Carlyle

Líneas de ratón

Los ratones con un solo alelo de AID ($AID^{+/-}$) se obtuvieron mediante el cruce de animales con fondo genético Balb/c con ratones Balb/c $AID^{-/-}$ (Ramiro y col., 2004). Los ratones Balb/c $AID^{-/-}$ fueron cedidos por el Dr. Nussenzweig, y derivan de los $AID^{-/-}$ del laboratorio del Dr. T. Honjo (Universidad de Kyoto, Kyoto, Japón) (Muramatsu y col., 2000). Los ratones $AID^{+/-}$ con una sóla copia de p53 ($p53^{+/-}AID^{+/-}$) proceden de cruzar machos C57BL/6J $p53^{-/-}$ (laboratorios Jackson) con hembras Balb/c $AID^{-/-}$. Las muestras de nódulos linfáticos de ratones IL6Tg $AID^{+/+}$, IL6Tg $AID^{+/-}$ e IL6Tg $AID^{-/-}$ fueron cedidas por el Dr. M. Nussenzweig (Universidad de Rockefeller, Nueva York, Estados Unidos) (Ramiro y col., 2004; Dorsett y col., 2007).

Los ratones con una copia extra de AID en linfocitos B se obtuvieron por el cruce de los ratones Rosa26 $AID^{ki/+}$ con ratones CD19-Cre $^{ki/+}$ (Rickert y col., 1997), en el caso de los Rosa26 $AID^{ki/+}$ CD19-Cre $^{ki/+}$, y de los ratones Rosa26 $AID^{ki/+}$ con ratones MB1-Cre $^{ki/+}$ (Hobeika y col., 2006), en el caso de los Rosa26 $AID^{ki/+}$ MB1-Cre $^{ki/+}$. Además, se obtuvieron ambos modelos, Rosa26 $AID^{ki/+}$ CD19-Cre $^{ki/+}$ y Rosa26 $AID^{ki/+}$ MB1-Cre $^{ki/+}$, en fondos deficientes en p53 (laboratorios Jackson) y deficientes en Ink4a/Arf (Serrano y col., 1996).

Para el genotipaje de todos los animales, se aisló ADN de cola usándose una solución de lisis (Tris-HCl 50mM pH8.0, NaCl 200mM, EDTA 10mM, SDS 1%) a la que se le añadió proteinasa K fresca (0.4mg/ml, Roche Applied Science) durante toda la noche a 55°C, posteriormente se extrajo el ADN con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sigma Aldrich), precipitación con etanol puro (Merck) durante al menos media hora a -20°C, lavado con etanol 75% y resuspensión en solución TE (Tris-Cl pH8 10mM, EDTA 1mM). Las muestras de ADN se conservaron a 4°C. Todos los ensayos de PCR se hicieron en un 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems) y los productos de PCR se separaron en geles de agarosa (Euroclone) mediante electroforesis. Los oligonucleótidos empleados en las distintas reacciones de amplificación se indican en la [Tabla I](#) y las condiciones usadas en la [Tabla II](#).

Los animales se mantuvieron en condiciones libre de patógenos tal y como indica la Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias de Animales de Laboratorio (FELASA). Todos los experimentos se realizaron siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Bioética y Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III (Madrid) o del *Cancer Research UK* (Londres).

Tabla I Oligonucleótidos para el análisis mediante PCR.

	Sentido		Antisentido		Uso	Especie
AID	alelo salvaje	5'-CTGAGATGGAACCCCTAACCTCAGCC-3'		5'CACGATTTTCTACAAAATGTTCCAGC-3'	Genotipaje	Ratón
	alelo <i>knock-out</i>	5'-GGGCCAGCTCATTCCTCCACTC-3'		5'CACGATTTTCTACAAAATGTTCCAGC-3'		
Rosa26 ^{AID}	alelo salvaje	5'-CAGACCTCCATCGCGCACTC-3'		5'-CCCTATTTAAAAAATCCCGACA-3'	Genotipaje	Ratón
	alelo <i>knock-in</i>	5'-CAAAAAGCAGCTCCGAAT-3'		5'-GCCGAAGTTGTCTGGTTAG-3'		
CD19-Cre	alelo salvaje	5'-AGGAGGCAATGTTGTGCT-3'		5'-CACTATCCCTCCACGTTCACT-3'	Genotipaje	Ratón
	alelo <i>knock-in</i>	5'-CCGGTTATTCAACTTGCAACC-3'		5'-CTGCATTACCCGGTCGATGCAAC-3'		
MB1-Cre	alelo salvaje	5'-CTGCGGGTAGAAGGGGGTC-3'		5'-CCTTGCAGAGGTCAAGGGGCC-3'	Genotipaje	Ratón
	alelo <i>knock-in</i>	5'-ACCTCTGATGAAGTCAGGAAGAAC-3'		5'-GGAGATGCTCTCACTCTGATTCT-3'		
p53	alelo salvaje	5'-ACAGCGTGGTGGTACCTTAT-3'		5'-TATACTCAGAGCCGGCCCT-3'	Genotipaje	Ratón
	alelo <i>knock-out</i>	5'-CTATCAGGACATAGCGTTGG-3'		5'-TATACTCAGAGCCGGCCCT-3'		
Ink4a/Arf	alelo salvaje	5'-TTAACAGCGGAGCTTCGTACA-3'		5'-CTGCACCCTAGTTGAGCAGAA-3'	Genotipaje	Ratón
	alelo <i>knock-out</i>	5'-TTAACAGCGGAGCTTCGTACA-3'		5'-GCCTACCCGCTTCCATTGCT-3'		
S ^H	primera ronda	5'-ATTGGATACCTCAGTGGTTTTAATGGTGGTTTA-3'		5'-GCGGCCCGGCTCATTCCAGTTCATTACAG-3'	Análisis SHM	Ratón
	segunda ronda	5'-ACTATGCTATGGACTACTGG-3'		5'-CTGGACTTTTCGGTTTGGTG-3'		
S ^I /3	primera ronda	5'-GGTCAA GGAACCTCAGTCA-3'		5'-TCTCTAGACAGCAACTAC-3'	Análisis SHM	Ratón
	segunda ronda	5'-TTGCAACTCTAAGAGGAAAGATCCC-3'		5'-CAGCCTGGTCCCTACACTCCTAACAAAC-3'		
CD95/Fas	primera ronda	5'-ACCACCGGGCTTTTTCGTGA-3'		5'-TATCTGTTCTGAAAGGCTGCAG-3'	Análisis SHM	Humano
	segunda ronda	5'-TGAGCTCGTCTCTGATCTCG-3'		5'-CGGAGCGGACCCTTTGGCT-3'		
c-m yc/IgH ^μ	primera ronda	5'-TGAGGACAGAGAGGGATAAAGAGAA-3'		5'-GGGAGGGGGTGTCAAAATAAAGA-3'	Análisis TCs	Ratón
	segunda ronda	5'-CACCTGCTATTTCCCTTGTGCTAC-3'		5'-GACACCTCCCTTACACTCTAAACCCG-3'		
c-m yc/IgH ^α	primera ronda	5'-CGTGAATCAGCAGCCGATTATCAC-3'		5'-GGGAGGGGGTGTCAAAATAAAGA-3'	Análisis TCs	Ratón
	segunda ronda	5'-GAGCTGACCAACAGTTCTGGCTGTATAGAC-3'		5'-GACACCTCCCTTACACTCTAAACCCG-3'		

Tabla II Condiciones de PCR.

AID		Condiciones amplificación		Tamaño amplicón (bp)		Enzima (compañía)	
AID	alelo salvaje	94°C, 5' +30 (94°C, 1' +65°C, 1' +72°C, 1' +72°C, 10'		sobre 600 bp	Taq (Roche)		
	alelo <i>knock-out</i>			sobre 700 bp			
Rosa26 ^{AID}	alelo salvaje	95°C, 5' +35 (94°C, 30'' +54°C, 30'' +72°C, 1' +72°C, 10'		sobre 450 bp	HotStar Taq (Qiagen)		
	alelo <i>knock-in</i>			sobre 650 bp			
CD19-Cre	alelo salvaje	94°C, 4' +35 (94°C, 30'' +66°C, 30'' +72°C, 30'' +72°C, 2'		sobre 250 bp	Taq (Roche)		
	alelo <i>knock-in</i>			sobre 500 bp			
MB1-Cre	alelo salvaje	94°C, 5' +30 (94°C, 30'' +55°C, 30'' +72°C, 130'' +72°C, 10'		sobre 500 bp	HotStar Taq (Qiagen)		
	alelo <i>knock-in</i>			sobre 530 bp			
p53	alelo salvaje	94°C, 5' +35 (94°C, 1' +55°C, 1' +72°C, 1' +72°C, 10'		sobre 450 bp	Taq (Roche)		
	alelo <i>knock-out</i>			sobre 550 bp			
Ink4a/Arf	alelo salvaje	94°C, 5' +32 (94°C, 30'' +60°C, 30'' +72°C, 1' +72°C, 10'		sobre 50 bp	Taq (Roche)		
	alelo <i>knock-out</i>			sobre 420 bp			
S μ	primera ronda	94°C, 2' +26-27 (92°C, 30'' +50°C, 30'' +68°C, 2' +72°C, 10'		560 bp	Pfu Ultra (Stratagene)		
	segunda ronda			543 bp			
S γ 3	primera ronda	95°C, 2' +9-11 (94°C, 30'' +55°C, 30'' +72°C, 130'' +72°C, 10'		750 bp	Pfu Turbo (Stratagene)		
	segunda ronda			750 bp			
CD95/Fas	primera ronda	Xue y col., 2006		sobre 750 bp	Pfu Turbo (Stratagene)		
	segunda ronda			variable			
c-myc/IgH μ	primera ronda	Muschen y col., 2000		variable	Long Expand (Roche)		
	segunda ronda			variable			
c-myc/IgH α	primera ronda	96°C, 5' +80°C, 5' (enzima) +25 (94°C, 5' +62°C, 5' +68°C, 7' +20'' ciclo) +68°C, 7'		variable	Long Expand (Roche)		
	segunda ronda			variable			

Análisis fenotípicos de poblaciones B

Los ratones se sacrificaron en cámara de CO₂ por hipoxia y posteriormente se extrajeron el bazo, las placas de Peyer, los fémures y sangre directamente del corazón. Se mantuvieron los órganos en RPMI-1640 (Sigma Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, del inglés, *Fetal Bovine Serum*) y los antibióticos penicilina (50 U/mL) y estreptomocina (50 µg/mL) (RPMI completo), sobre hielo hasta su procesamiento. Los bazos y las placas de Peyer se disgregaron sobre filtros de nylon de 70 µm de tamaño de poro en RPMI completo y las suspensiones celulares obtenidas, junto con las sangres, se centrifugaron 8 minutos a 1200 revoluciones por minuto en frío (8'/1200rpm/4°C). La médula ósea se obtuvo por perfusión con RPMI completo a través del conducto medular de los fémures y también se centrifugó (8'/1200rpm/4°C). Las células de placas de Peyer se resuspendieron en tampón fosfato salino 1X (PBS, *Phosphate Buffer Solution*) suplementado con 1% FBS (PBS-1% FBS) directamente tras la centrifugación. Las células de bazo, sangre y médula ósea se trataron con una solución de cloruro de amonio (ACK Lysing Buffer, BioWhittaker) durante 4 minutos a temperatura ambiente, con la que se produce la lisis de los glóbulos rojos. Pasado ese tiempo, se paró la reacción de lisis añadiendo RPMI completo frío y la suspensión celular se centrifugó de nuevo (8'/1200rpm/4°C), resuspendiéndose las células en PBS-1% FBS.

Para el análisis de distintas poblaciones B, las células obtenidas de médula ósea, bazo, placas de Peyer y sangre se marcaron con anticuerpos conjugados a distintos fluorocromos o biotinilados. Por cada tinción se marcaron 2×10^5 células: se centrifugaron (3'/1200rpm/4°C), se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS-1% FBS con los anticuerpos diluidos correspondientes en cada caso. Las células se incubaron protegidas de la luz y en hielo durante 15-20 minutos, tras los cuales se lavaron con PBS-1% FBS y se centrifugaron de nuevo (3'/1200rpm/4°C). Si los anticuerpos estaban directamente conjugados a un fluorocromo, tras el lavado, las células se resuspendieron en PBS-1% FBS para su análisis citométrico. Si los anticuerpos estaban biotinilados, se precisó de un segundo paso de marcaje en las mismas condiciones que el inicial pero en este caso con la dilución de la estreptavidina conjugada al fluorocromo correspondiente. Al igual que cuando el anticuerpo es directo, se realizó un lavado con PBS-1% FBS, y tras centrifugación (3'/1200rpm/4°C) se resuspendieron las células en PBS-1% FBS. Los anticuerpos empleados en los distintos marcajes se indican en la [Tabla III](#).

Tabla III Anticuerpos usados en citometría.

Anticuerpos	Compañía
B220-Vioblue	Miltenyi Biotec
CD138-PE	BD Biosciences Pharmingen
CD19-APC	BD Biosciences Pharmingen
Fas-PE	BD Biosciences Pharmingen
GL7-AlexaFluor647	eBioscience
GL7-FITC	BD Biosciences Pharmingen
IgA-PE	AbD Serotec
IgM-PE	Invitrogen
IgD-biotina	SouthernBiotech
IgG1-biotina	BD Biosciences Pharmingen
IgG3-biotina	BD Biosciences Pharmingen
Streptavidina-APC	BD Biosciences Pharmingen
Streptavidina-Percp Cy 5.5	BD Biosciences Pharmingen

Cultivos celulares y citometría de flujo

Cultivo de líneas celulares

Se cultivaron las líneas celulares 293T y 3T3 en un incubador en condiciones estándar de humedad, temperatura y dióxido de carbono (37°C / 95% humedad relativa / 5% CO₂) con medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de FBS y los antibióticos penicilina (50 U/mL) y estreptomycin (50 µg/mL) (DMEM completo). La línea humana HS13 (Ramos) se cultivó en RPMI-1640 y medio Glutamax (Invitrogen), en iguales condiciones de humedad, temperatura y CO₂.

Cultivo de linfocitos B primarios

Se aislaron linfocitos B de bazo en condiciones de esterilidad. Para ello se disgregaron sobre filtros de nylon de 70µm de tamaño de poro usando RPMI completo. Se centrifugaron las suspensiones celulares (8`/1200rpm/4°C), se lisaron los glóbulos rojos con cloruro de amonio y se paró la reacción con RPMI completo frío como se describió previamente. Posteriormente se centrifugaron (8`/1200rpm/4°C) y se incubaron a una concentración de 10x10⁶ células/ml con el anticuerpo anti-CD43 acoplado a micropartículas magnéticas (Miltenyi Biotec) diluido en PBS-1%FBS, durante 25 minutos en hielo y oscuridad. Las células se lavaron con PBS-1%FBS, centrifugaron (8`/1200rpm/4°C) y resuspendieron en PBS-1%FBS. La suspensión celular se hizo pasar por una columna magnética, en la cual queda retenida la fracción positiva, cayendo la fracción CD43 negativa donde se encuentran los linfocitos B. A

continuación se marcaron durante 20 minutos a 37°C con CFSE (5 μ m, Molecular Probes), para estudiar proliferación en las células AID^{+/+} y AID^{+/-} por dilución de este colorante que se incorpora en la membrana de las células, o bien durante 4 minutos a temperatura ambiente con PKH26 (*PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for general cell membrane labeling*, 2x10⁻⁶M, Sigma Aldrich) en los linfocitos B Rosa26^{AID^{ki/+}} CD19Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID^{+/+}} CD19Cre^{ki/+}, siguiendo las condiciones de lavado de los respectivos fabricantes. Posteriormente se cultivaron durante un máximo de seis días en RPMI completo con 2- β -mercaptoetanol (50 μ M, Gibco) y Hepes (10mM, Invitrogen), salvo en el caso de los experimentos con estrógeno, donde se usó un medio carente de hormonas (*Opti-MeM Reduced Serum Medium*, Invitrogen) en lugar de RPMI-1640.

Se estimularon con lipopolisacárido (LPS, 25 μ g/ml, Sigma Aldrich) para inducir cambio de isotipo a IgG3, con LPS e interleuquina 4 (IL4, 10-50ng/ml, PreproTech/R&D systems Europe Ltd) para inducirlo a IgG1 e IgE, con LPS y TGF β (TGF β 1 humano, 2ng/ml, R&D systems Europe Ltd) para inducirlo a IgA o con antiCD40 (500ng/ml, BD Pharmingen) o antiCD40 e IL4 para inducirlo a IgG1 según los experimentos, en algunos casos se añadió también BAFF/BLys/TNFSF13B recombinante de ratón (20ng/ml, R&D Systems Europe Ltd) para mejorar la supervivencia. El estrógeno (17- β -estradiol; Sigma Aldrich) se disolvió en DMSO usándose concentraciones fisiológicas en un rango entre 10⁻¹⁰ y 10⁻⁵ M según el experimento (la concentración final de DMSO nunca fue mayor del 0.1%) y se añadió junto con el LPS y las citoquinas. El estrógeno se añadió a las células cada 48 horas. Los porcentajes de células IgG1⁺ e IgG3⁺ se evaluaron con anticuerpos específicos (Tabla III) marcando las células como se indicó anteriormente a distintos tiempos de cultivo usando citometría de flujo. Se hicieron duplicados de todas las muestras.

Para el análisis de ADN y ARN de los cultivos, en los experimentos de la primera parte de resultados se aislaron las células B vivas mediante centrifugación en gradiente de Ficoll (Amersham Biosciences).

Citometría de flujo

Para los análisis citométricos se resuspendieron mediante pipeteo los linfocitos B primarios o levantaron con tripsina (Sigma Aldrich) las células adherentes 3T3 y 293T. Se lavaron con PBS-1% FBS, se centrifugaron (5'/1200rpm), se marcaron con los anticuerpos correspondientes según el caso (Tabla III) y se resuspendieron en PBS-1% FBS. Se analizó por citometría el porcentaje de células positivas, así como la intensidad de la fluorescencia, en cada caso.

Los análisis citométricos se llevaron a cabo en los equipos FACS Calibur™ y FACS Canto™ (Bekton Dickinson Biosciences) con los *softwares* FACSDiva (BD Biosciences) y FlowJo.

Obtención de sobrenadantes retrovirales y transducción de linfocitos B primarios

Se co-transfectaron células empaquetadoras 293T, con dos tipos de vectores diferentes para generar sobrenadantes retrovirales: un plásmido retroviral (pMXPIE) y un plásmido empaquetador de retrovirus (pCLEco). El vector pCLEco posee las secuencias codificantes de una cápsida retroviral con tropismo murino, pero no dispone de una secuencia de encapsidación funcional. Por su parte, el vector retroviral pMXPIE contiene la secuencia de encapsidación, el gen de interés que se pretende sobreexpresar, en este caso AID o bien AID catalíticamente inactivo en el caso de que se trate de un control negativo (AID^{E58Q}).

Se obtuvieron los sobrenadantes retrovirales por cotransfección transitoria con fosfato cálcico de células 293T. Se plaquearon 2.5×10^5 células en cada pocillo de placa de cultivo de 6 pocillos. Al día siguiente, se preparó el medio de transfección que contiene 10 μ L de CaCl₂ (2.5M), 90 μ L de agua destilada estéril, 2 μ g del vector pCL-Eco y 2 μ g del plásmido retroviral (pMXPIE-AID o pMXPIE-AID^{E58Q}) por cada pocillo. Se añadió por goteo esa mezcla sobre 100 μ L de buffer HeBS (0.28 M NaCl₂, 1.5 mM Na₂HPO₄, 50 μ M Hepes) al tiempo que se burbujeaba con una pipeta Pasteur y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la formación de los complejos ADN – fosfato cálcico. A continuación se distribuyó la mezcla sobre el cultivo celular por goteo y las células se crecieron durante 16 horas en presencia del medio de transfección. Tras ese tiempo se sustituyó el medio por RPMI completo y se mantuvo el cultivo durante 24 horas más, para que se acumularan partículas retrovirales. Finalmente se recogió el sobrenadante retroviral y se filtró (0.2 μ m) para eliminar posibles restos celulares.

A los cultivos de linfocitos B, estimulados durante 24 horas con LPS e IL4 como se describió previamente, se les retiró el medio y se les añadió el sobrenadante retroviral filtrado, en presencia de polibreno (8 μ g/ml, Sigma Aldrich). Las células se centrifugaron durante 2 horas a 1200 rpm para favorecer la transducción y se incubaron durante unas 20 horas en condiciones estándar. Tras ese tiempo se les retiró el sobrenadante retroviral, y se les añadió de nuevo medio RPMI completo. Se

recogieron los linfocitos B a las 48 horas de la transducción y se aislaron las células GFP⁺ con un FACS Aria™ (Becton-Dickinson). El porcentaje de células IgG1⁺ se evaluó con anticuerpos específicos (anti-IgG1biotina y Streptavidina-APC) (Tabla III) y el marcador de viabilidad 7-Amino-Actinomycin D (7AAD, BD Pharmingen) por citometría de flujo siguiendo los protocolos de marcaje ya indicados.

Análisis de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Se recogieron células B de bazo *naive* o estimuladas, aisladas de placas de Peyer o bien sangre. Se lavaron con PBS-1% FBS, centrifugaron (5´/1200rpm) y resuspendieron en PBS-1% FBS. Se extrajo ARN total de ellas con TRIzol (Invitrogen), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Se usó 1µl de poliacrilamida lineal (Ambion) como co-precipitante. Se generó el correspondiente ADN complementario (ADNc) mediante transcripción inversa (*Superscript II Reverse Transcriptase*, Invitrogen), usando hexámeros al azar (Applied Biosystems) y en las condiciones estándar indicadas por el fabricante.

Se empleó SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) para amplificar el ADNc obtenido en un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las condiciones para la amplificación fueron: 2´/ 50°C+ 10´+95°C+40ciclos (15´/95°C y 1´/60°C). Se analizó la expresión de AID y transcritos de γ 1 en diluciones seriadas de todas las muestras y se utilizaron los niveles de expresión de GAPDH en cada una para normalizar los resultados. También se analizó la expresión de círculos de *switch* de los isotipos IgG1, IgG3, IgA e IgE, tras tratamiento durante 72 horas con estrógeno de linfocitos B y las correspondientes citoquinas junto con LPS, e igualmente se usó GAPDH para normalizar. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para amplificar AID, GAPDH y los distintos transcritos de los círculos de la reacción de *switch* se indican en la [Tabla IV](#).

Las muestras de ARN se conservaron en condiciones de ultracongelación a -80°C, y las de ADN complementario a -20°C.

Tabla IV Anticuerpos usados en citometría. (A) Oligonucleótidos usados en la parte I y III de resultados. (B) Oligonucleótidos usados en la parte II de resultados.

	Sentido	Antisentido
AID _(A)	5'-ACCTTCGCAACAAGTCTGGCT-3'	5'-AGCCTTGCGGTCTTCACAGAA-3'
AID _(B)	5'-AACCCAATTTTCAGATCGCG-3'	5'-AGCGGTTCTGGCTATGATAAC-3'
Tráncritos γ 1	5'-TCGAGAAGCCTGAGGAATGTG-3'	5'-ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA-3'
Círculos IgG1	5'-TCGAGAAGCCTGAGGAATGTG-3'	5'-GAAGACATTTGGGAAGGACTGACT-3'
Círculos IgG3	5'-TGGGCAAGTGGATCTGAACA-3'	5'-AATGGTGCTGGGCAGGAAGT-3'
Círculos IgA	5'-CCAGGCATGGTTGAGATAGAGATAG-3'	5'-AATGGTGCTGGGCAGGAAGT-3'
Círculos IgE	5'-TTGGACTACTGGGGTCAAGG-3'	5'-CAGTGCCTTTACAGGGCTTC-3'
GAPDH _(A)	5'-TGAAGCAGGCATCTGAGGG-3'	5'-CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG-3'
GAPDH _(B)	5'-GCACAGTCAAGCCGAGAAT-3'	5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'

Generación del modelo murino Rosa26^{AIDki}

Construcción del vector de *targeting* Rosa26AID

Para introducir el ADNc de AID en el *locus* de Rosa26 se usó el sistema de recombinación homóloga *Gateway* (Invitrogen) (Hartley y col., 2000). Esta tecnología se basa en las propiedades de recombinación sitio específicas del bacteriófago *lambda* (revisado en Landy, 1989), el cual contiene sitios de recombinación bien caracterizados conocidos como att (del inglés, site-specific *ATTachment*). Se trata de un sistema de clonaje rápido, altamente eficiente y que no emplea ligasa, estando su uso ampliamente extendido como alternativa al método tradicional de clonaje basado en la ligasa T4. El sistema consiste en el clonaje del gen de interés, en este caso el ADNc de AID, en un vector de entrada (pCR8/GW/Topo, Invitrogen) que contiene dos secuencias de recombinación attL1 y attL2 que flanquearán al ADN de interés (pCR8-AID clon3). Posteriormente, mediante una reacción de recombinación catalizada por la enzima Clonasa se incorpora el ADNc de AID en un vector Gateway receptor que contiene dos lugares de recombinación attR1 y attR2. El sitio attL1 reacciona sólo con el attR1 y el attL2 sólo con el attR2. En este caso el plásmido receptor, además de los sitios de recombinación, contiene un stop transcripcional flanqueado por 2 sitios loxP, todo ello dentro del *locus* de Rosa26. La construcción además contiene una secuencia IRES y posteriormente la secuencia de GFP, lo que permite la sobre-expresión de un mensajero bicistrónico que codifica para las proteínas AID y GFP (Rosa26AID clon3-20C) (Figura R-14A). Se empleó el protocolo recomendado por la compañía para el

clonaje del ADNc de AID en el *locus* de Rosa26, siguiendo los pasos que se acaban de describir.

Testaje funcional del vector de *targeting*

Se comprobó si tras la expresión de una Cre recombinasa se induce la expresión de AID *in vitro* en células que contienen el vector Rosa26AID. Básicamente, para ello se nucleofectaron células 3T3 con esta construcción, y posteriormente se infectaron con la recombinasa Cre. Se analizó expresión de AID y porcentaje de células GFP positivas en estas células. Se describe con más detalle a continuación.

- **Nucleofección de células 3T3**

Por cada punto de nucleofección se resuspendieron 2×10^6 de células 3T3 en la solución MEF1 recién preparada (*MEF1 nucleofector kit*, Amaxa). Se añadieron 5 μ g del plásmido, en este caso Rosa26AID clon3-20C y se colocó la mezcla en una cubeta de nucleofección siguiendo el protocolo del fabricante. Tras la nucleofección en un Nucleofector Amaxa, se recogieron las células con mucho cuidado, se diluyeron en DMEM completo precalentado y distribuyeron en tres placas de cultivo p60.

Pasadas 24 horas de la nucleofección, se añadió el antibiótico G418 (1mg/ml, Gibco), para enriquecer la población de células que han incorporado el vector de *targeting*, ya que éste contiene un gen de resistencia al mismo. Se crecieron los distintos clones picados de las placas originales de p60 en pocillos de placa de 96 pocillos. Se siguieron creciendo, de modo que pasados unos veinte días los tuvimos en placa de cultivo de 6 pocillos. En ese momento se plaquearon células empaquetadoras 293T para generar los sobrenadantes retrovirales que contienen la recombinasa Cre, con los que posteriormente serán transducidos esos clones.

- **Obtención de sobrenadantes retrovirales y transducción de células 3T3**

Se obtuvo sobrenadante retroviral tras transfección con fosfato cálcico de células 293T tal y como se indicó más arriba con los vectores plasmídicos pBabe-Cre o pBabe-Vacío combinados con el plásmido pCLEco. Se transdujeron con el sobrenadante retroviral, y en presencia de polibreno, las células 3T3 nucleofectadas y seleccionadas con G418. Tras 20 horas de transducción se les retiró el sobrenadante retroviral, y se les añadió de nuevo medio DMEM completo.

Finalmente se seleccionaron las células que han sido transducidas con el vector pBabe-Cre o el control pBabe-Vacío, mediante la adición del antibiótico puromicina (0.4µg/ml) y se analizó el porcentaje e intensidad de células GFP positivas por citometría de flujo y la expresión de AID por qRT-PCR, siguiendo los protocolos indicados anteriormente.

Electroporación

Tras observar células GFP positivas por citometría y expresión de AID por qRT-PCR llegamos a la conclusión de que el vector Rosa26AID-3-20C era funcional. La unidad de ratones transgénicos del CNIO electroporó dicha construcción Rosa26AID-3-20 linearizada en células madre embrionarias G4 (F1, híbridas de 129S6/SvEvTac y C57BL/6Ncr) (George y col., 2007) de ratón.

Identificación por *southern blot* de clones con el vector de *targeting* integrado

La unidad de transgénicos nos entregó 266 clones de células madre electroporadas con la construcción Rosa26AID-3-20C en pocillos de placa de 96. Se crecieron usando placas tapizadas con gelatina 0.1% y un medio rico en factores de mantenimiento de su estado pluripotente (preparado por la Unidad de Transgénicos, CNIO), expandiendo cada uno de los clones del pocillo de placa de 96, hasta finalmente un pocillo de placa de 6. Para extraer el ADN, se lisaron las células directamente en el pocillo de la placa de 6 con una solución de lisis (Tris-HCl 20mM pH8.0, NaCl 100mM, EDTA 10mM, SDS 0.5%) con proteinasa K (0.4mg/ml, Roche Applied Science), se recogió el lisado e incubó durante toda la noche a 55°C, posteriormente se añadió NaCl saturado (>6M), se invirtió y centrifugó a máxima velocidad durante 15 minutos, se recogió el sobrenadante donde está el ADN que se precipitó con isopropanol frío durante al menos media hora a -20°C, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50µl de solución TE. Tras varios ciclos de frío y calor para su homogeneización, se midió concentración de ADN. Se digirieron unos 15-20µg del ADN de cada clon con 150 unidades de la enzima de restricción EcoRV (NEB), solución 3 10X (NEB), BSA (100µg/ml) y espermidina (1mM) durante una noche a 37°C, añadiendo la enzima en dos veces para conseguir una digestión más eficiente. Posteriormente, se efectuó la separación de las digestiones por electroforesis en geles de agarosa (SeaKem LE, Lonza) al 0.8% (p/v) durante toda una noche a 40 voltios, que luego se lavaron (1°. HCL 0.25M, 15min a temperatura ambiente y agitación; 2°.

Solución desnaturalizante, NaCl 1.5M y NaOH 0.5M, 45min a temperatura ambiente y agitación; 3°. Solución neutralizante, NaCl 1.5M y Tris-HCl 0.5M, 30min a temperatura ambiente y agitación) y se transfirieron a membrana de nylon (Hybond-XL, Amersham Biosciences) con una solución de SSC10X (NaCl 2M y CitratoNa 0.3M) durante toda la noche. Finalmente se pre-hibridaron las membranas a 65°C con la solución comercial *Rapid Hyb Buffer* (Amersham Biosciences) durante el tiempo de marcaje de 30-80ng de la sonda con α -P³²-dCTP (50microcurios, Perkin Elmer) usando el kit comercial *Rediprime™ II RandomPrime Labelling System* (Amersham Biosciences) y el protocolo del fabricante. Posteriormente la hibridación se realizó a 65°C añadiendo en la solución *Rapid Hyb Buffer* la sonda específica durante al menos 2 horas. Como sondas se usaron una parte del gen de neomicina (sonda Neo, 298 nucleótidos) y una región de GFP (sonda GFP, 184 nucleótidos). Se lavaron las membranas, y revelaron en una AGFA Curix 60 tras varios días de exposición.

Se identificaron dos clones de células madre (#167 y 267), de un total de 266 crecidos, que contenían, tras restricción con EcoRV, un fragmento del tamaño esperado de la correcta integración del vector Rosa26AID. Se eligió el clon #267 para continuar trabajando con él.

Testaje funcional del clon de células madre 267

Se crecieron las células del clon 267 usando el medio especial de células madre indicado previamente. Se generaron sobrenadantes retrovirales pBabe-Cre y pBabe-Vacío en células empaquetadoras 293T. Se transdujeron con esos sobrenadantes las células madre del clon 267. Finalmente se estudió porcentaje de células GFP positivas por citometría y expresión de AID por qRT-PCR, todo ello siguiendo los protocolos previamente indicados en los apartados anteriores.

Agregación e implantación

Técnicos de la unidad de ratones transgénicos (CNIO) usaron el clon 267, comprobada su funcionalidad *in vitro*, para generar los ratones quiméricos mediante su agregación e implantación en hembras CD1. Se obtuvieron catorce crías quiméricas.

Análisis de mutaciones

Para el análisis de mutaciones en la región S_{μ} de linfocitos B estimulados $AID^{+/+}$ y $AID^{+/-}$, se activaron células CD43 negativas de bazo en presencia de CFSE durante 96 horas con LPS e IL4. Se aislaron las células que habían sufrido 5 ó más divisiones con un FACS AriaTM. Para el análisis de S_{μ} en linfocitos B *naive* $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ y $Rosa26^{AIDki/+}$ $MB1-Cre^{ki/+}$ se aislaron linfocitos B de bazo, además también se analizaron mutaciones en la región S_{μ} de células B $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ y sus controles $Rosa26^{AID+/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ estimulados con anti-CD40 durante cinco días. Se extrajo ADN como previamente se describió y se amplificó con Pfu Ultra (Stratagene) usando los oligonucleótidos y condiciones incluidas en las **Tablas I y II**. Para análisis de mutaciones en la región S_{μ} de linfocitos B $AID^{+/+}$ y $AID^{+/-}$ se usaron 26 ciclos de amplificación, para el mismo análisis en los linfocitos $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ y $Rosa26^{AIDki/+}$ $MB1-Cre^{ki/+}$ se usaron 27 ciclos, además de incrementarse la concentración de Mg^{+2} hasta 3mM y añadirse glicerol:DMSO 10X para solucionar problemas técnicos asociados a la reacción de PCR.

Para el análisis de mutaciones en JH4, se aislaron células $Fas^{+}GL7^{+}$ de placas de Peyer de ratones $AID^{+/+}$ y $AID^{+/-}$ con un FACS AriaTM. Se extrajo ADN y amplificó con los oligonucleótidos y condiciones incluidas en las **Tabla I y II** durante 30 ciclos usando Pfu Ultra. En el caso de las mutaciones en JH4 de las placas de Peyer de los ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19Cre^{ki/+}$ se aislaron células $Fas^{+}GFP^{+}$ y Fas^{+} en los $Rosa26^{AIDki/+}$ y $Rosa26^{AID+/+}$ $CD19Cre^{ki/+}$, se extrajo ADN y amplificó aumentando en 2 ciclos la primera ronda de PCR, haciendo un total de 32 ciclos.

Para el análisis de mutaciones en la región $S_{\gamma 3}$ murina en presencia de estrógeno, se aislaron linfocitos B de bazo de ratones $AID^{+/-}$ y se trataron con DMSO sólo o estrógeno 10nM durante seis días. Para el análisis de mutaciones en la región humana CD95/Fas se crecieron (20 pases) células Ramos tratadas con estrógeno 100nM o con DMSO en medio carente de hormonas, comenzándose éste a usar 72 horas antes del tratamiento con estrógeno. Se aisló ADN y amplificó con los oligonucleótidos y condiciones indicados en las **Tablas I y II**.

Los productos de amplificación se purificaron en columna (Quiagen), clonaron en el vector PGEMTeasy (Promega) y secuenciaron con el oligonucleótido SP6 (PGEMTeasy). El análisis de las secuencias se hizo usando el *software Lasergene*.

Detección de translocaciones c-myc/IgH por PCR y *southern blot*

En los ratones p53^{+/-} y en los Rosa26^{AIDki/+} CD19Cre^{ki/+} se recogieron linfocitos B de bazo tras 72 ó 96 horas de activación con LPS e IL4. En los ratones IL6Tg la muestra procede de nódulos linfáticos hiperplásicos. Se aisló ADN usándose la solución de lisis con proteinasa K descrita para aislar ADN de cola de ratón, y tras dos rondas de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y posterior precipitación con etanol como se describió previamente, se obtuvo la muestra. Se homogeneizó con ciclos frío-calor, se ajustó su concentración a 200ng/μl y se analizó mediante PCR anidada (Ramiro y col., 2004; Kovalchuk y col., 1997). Consiste en dos rondas de PCR usando una polimerasa de largo rango de amplificación y baja tasa de errores (Expand Long, Roche Applied Science). Se usaron 5x10⁴-4x10² células (500-4ng ADN) por reacción de PCR de cada una de las muestras de nódulos linfáticos IL6Tg y 1x10⁵ células (1μg ADN) por reacción de PCR en el caso de los p53^{+/-} y los Rosa26^{AIDki/+} CD19Cre^{ki/+}. Se analizaron translocaciones proximales (c-myc/IgHμ) y distales (c-myc/IgHα). Los oligonucleótidos para la amplificación de ambos tipos de translocaciones y las condiciones de la PCR se indican en las Tablas I y II (Kovalchuk y col., 1997).

En el caso de las muestras p53^{+/-} y los Rosa26^{AIDki/+} CD19Cre^{ki/+}, se realizó hibridación por *southern blot* de los productos de amplificación. Se separaron las translocaciones en geles de agarosa (Euroclone) al 0.8% (p/v) a 90 voltios y desnaturalizaron durante 20 minutos en NaOH 0.4N antes de transferirlos con esa misma solución a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences) durante toda la noche. Se pre-hibridó durante el tiempo de marcaje de la sonda, empleando la solución comercial Rapid Hyb Buffer a 42°C en presencia de ADN de esperma de salmón desnaturalizado para bloquear (200mg/ml). Para la hibridación se cambió la citada solución comercial por una limpia en la que se añadió la sonda ya marcada, también a 42°C durante al menos 2 horas. Como sondas se emplearon oligonucleótidos específicos, uno para c-myc (5`-GCAGCGATTTCAGCACTGGGTGCAGG-3`) y otro para IgH (5`-CCTGGTATACAGGACGAAACTGCAGCAG-3`), marcándose 1μl (10μM) de sonda con γ-P³²-ATP (50 μCi, Perkin Elmer) usando 20 unidades de la enzima Polinucleotido Quinasa (Roche Applied Science). Se lavaron y revelaron en una AGFA Curix 60 tras 24 horas de exposición.

Los productos de PCR se purificaron en columna, clonaron en el vector PGEMTeasy, y secuenciaron para confirmar las translocaciones y definir el lugar de unión entre los dos cromosomas. La secuenciación se hizo con los oligonucleótidos SP6 y T7

(PGEMTeasy) y con oligonucleótidos internos situados en la secuencia de c-myc para llegar al lugar de unión (5'-AGGGATACCCGCGGATCCCAAGTAGGAATGTGAGG-3' o bien 5'-GTGTCAAAGGCACAGGAATGG-3'). Para el análisis de las secuencias se empleó el programa de alineamiento SeqMan del *software* Lasergene.

Análisis del promotor de AID

Bioinformático

Para estudiar la posibilidad de que el promotor de AID contuviera lugares de unión directos para el estrógeno, se usó el programa AliBaba2.1 de predicción de elementos de respuesta a factores transcripcionales, empleándose para la construcción de las matrices la base de datos Transfac 4.0 en la que se recogen lugares de unión a factores de transcripción.

Ensayo luciferasa

Se analizaron los posibles lugares de unión, predichos bioinformáticamente, del promotor humano de AID a estrógeno mediante ensayo luciferasa. Para ello se usó como plásmido reportero el vector pE1BLuc cedido por G. Akusjärvi (Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia), que contiene el origen de replicación para la enzima luciferasa y una región promotora mínima. Se clonaron fragmentos desde el lugar de inicio de la transcripción del promotor de AID aproximadamente cada 500 nucleótidos en el vector pE1BLuc (regiones A-E, [figura R-8](#)).

Se transfectaron 3 μ g de ADN de cada uno de los vectores reporteros con su fragmento del promotor de AID en células SiHa usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo el protocolo del proveedor. Tras 24 horas de transfección, las células se trataron con 17- β -estradiol 100nM durante 4 horas y se analizó la señal de bioluminiscencia inducida por la luciferasa con un kit comercial (*Dual Luciferase Reporter Assay System*, Promega) en un luminómetro Glomax (Promega). Como control interno de la eficiencia de la transfección se emplearon las células SiHa transfectadas con el vector Renilla luciferasa conteniendo el promotor CMV.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para obtenerse suero, se extrajo sangre directamente de corazón de ratones recién sacrificados, se mantuvo durante 1 hora a 37°C y toda la noche a 4°C para retraer el coágulo, finalmente se centrifugó durante 20 minutos a máxima velocidad. Las muestras de suero se conservaron a -80°C. Se determinaron los títulos de inmunoglobulinas en suero de ratones inmunizados durante quince días con una emulsión del inmunógeno NP-CGG (50µg/ml, Biosearch Technologies) en adyuvante completo de Freund (laboratorios Difco) inyectado en las plantas de las patas traseras de los ratones. También, como control negativo de la inmunización, se les inyectó PBS a varios ratones. Se analizaron títulos de IgG totales en suero con un sistema de ELISA IgG específico (Roche Applied Science), haciendo duplicados y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis estadísticos

Los niveles de CSR, la frecuencia de SHM y la expresión por qRT-PCR se evaluó usando el *test t de Student*, de datos desapareados, con el cual se comparó la variable continua (CSR, SHM, expresión) entre los dos grupos (*GraphPad software*).

La frecuencia de translocaciones se analizó con el *test de Fisher* de dos colas (*GraphPad software*), construyendo una tabla de contingencia 2x2 con los números de las translocaciones positivas y negativas halladas en cada genotipo.

Resultados

Es de importancia para quien desee alcanzar una certeza en su investigación, el saber dudar a tiempo.

Aristóteles

Parte I. Análisis del efecto de la dosis génica en la actividad de AID

AID inicia las reacciones de CSR y SHM (Muramatsu y col., 2000; Revy y col., 2000; Okazaki y col., 2002; Yoshikawa y col., 2002), que garantizan la diversificación secundaria de anticuerpos. Además, AID es responsable de la acumulación de translocaciones c-myc/IgH linfomagénicas *in vivo* y promueve dichas translocaciones *in vitro* (Ramiro y col., 2004; Ramiro y col., 2006a; Dorsett y col., 2007). Para determinar si la cantidad de AID es limitante para su función, se evaluó el efecto de la dosis génica de AID en ratones que tienen uno o dos alelos funcionales del gen que codifica para AID (gen *Aicda*), ratones AID^{+/-} y AID^{+/+}, respectivamente. Se usaron animales deficientes en AID, AID^{-/-}, como control negativo. Se realizaron los siguientes análisis: i) Estudio del efecto de la dosis génica de AID en la eficiencia del CSR y la SHM; ii) Estudio del efecto de la dosis génica de AID en la generación de translocaciones cromosómicas c-myc/IgH *in vivo* e *in vitro*.

Caracterización de los animales AID^{+/-}

Para estudiar el efecto de la dosis génica de AID se generaron ratones con una sola copia de AID (AID^{+/-}) Balb/c ByJ, a partir del cruce de ratones Balb/c ByJ con AID^{-/-} Balb/c ByJ. Se usaron ratones congénicos Balb/c ByJ (Ramiro y col., 2004) para minimizar las variaciones entre cepas. Primeramente quisimos determinar si la delección de un alelo de AID en ratones AID^{+/-} daba lugar a una reducción en los niveles de expresión de AID en comparación con los de un ratón AID^{+/+}. Es posible simular *in vitro* la activación de células B que tiene lugar en el centro germinal mediante la estimulación de linfocitos B esplénicos con las citoquinas apropiadas, que promueven tanto la expresión de AID como la activación transcripcional del *locus* de Ig. Para analizar la expresión de AID en linfocitos B AID^{+/-}, se aislaron células B de bazo de ratones normales (AID^{+/+}), con una sola copia de AID (AID^{+/-}) y sin AID (AID^{-/-}), y tras estimulación *in vitro* en presencia de lipopolisacárido (LPS) e interleuquina 4 (IL4) durante tres días, se analizaron los niveles de ARNm de AID por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR, del inglés, *Quantitative Real Time PCR*). En ratones AID^{-/-} no se detectan transcritos de AID. En el caso de animales AID^{+/-}, la expresión del mensajero se encuentra reducida aproximadamente a un 50% de los niveles de los ratones AID^{+/+} (Figura R-1A).

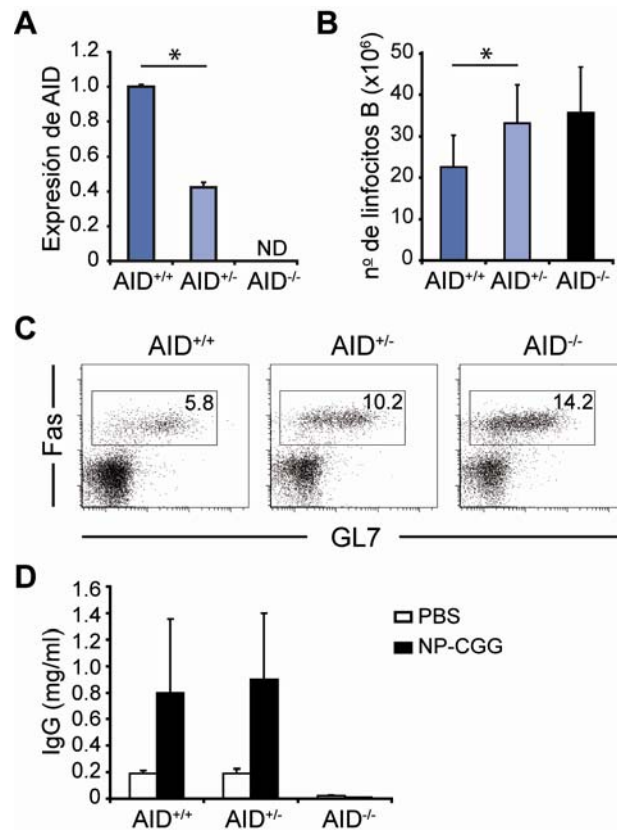


Figura R-1. Expresión reducida de AID y fenotipo hiperactivado en linfocitos B AID^{+/-}. (A) Los niveles de AID están reducidos en ratones AID^{-/-}. Se estimularon linfocitos B de bazo de ratones AID^{+/+}, AID^{+/-} y AID^{-/-} durante 3 días en presencia de LPS y de IL4. Se aisló ARN y se analizó la expresión de AID mediante qRT-PCR. Las barras representan la expresión de ARNm de AID relativa a los linfocitos B AID^{+/+}. Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes; n (AID^{+/+})= 6, n (AID^{+/-})= 6 y n (AID^{-/-})= 3; *t test* p (AID^{+/+} vs AID^{+/-})= 1x10⁻⁴. ND, no detectable. (B) Los bazos AID^{+/-} contienen un mayor número de linfocitos B. Las barras representan el número de células B de bazo. Se muestran las medias y sus desviaciones estándar; n (AID^{+/+})=18, n (AID^{+/-})=16 y n (AID^{-/-})=9; *t test* p (AID^{+/+} vs AID^{+/-})=6x10⁻⁴. (C) El número de células Fas⁺GL7⁺ en los linfocitos B de placas de Peyer de ratones AID^{-/-} es intermedio. Se tiñeron las células de placas de Peyer de ratones AID^{+/+}, AID^{+/-} y AID^{-/-} con anticuerpos anti-Fas y anti-GL7 y se analizaron mediante citometría de flujo. Se indican los porcentajes de células Fas⁺GL7⁺. Se muestra un experimento representativo; n=3; *t test* p (AID^{+/+} vs AID^{+/-})= 8x10⁻⁴. (D). Los niveles totales de IgG séricos no están alterados en ratones AID^{+/-} inmunizados. Se inocularon ratones AID^{+/+} (n=5), AID^{+/-} (n=5) y AID^{-/-} (n=3) con NP-CGG (barras negras) o PBS (barras blancas) y se cuantificó la concentración de IgG totales mediante ELISA quince días después. Se muestran las medias y desviaciones estándar. (A-D) Las diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0.05) se indican con un asterisco (*). Se usó el test *t de Student* de doble cola de datos despareados.

En ausencia de AID, los linfocitos B se diferencian normalmente pero se acumulan en bazo dando lugar a una esplenomegalia moderada y a un aumento en el número de células activadas en placas de Peyer (Muramatsu y col., 2000; Revy y col., 2000). Para evaluar el efecto de la dosis de AID sobre el número de linfocitos B esplénicos, se determinó el número de células B de bazo en ratones AID^{+/+}, AID^{+/-} y AID^{-/-}. En la figura se incluyen los resultados obtenidos del conteo de entre 9 y 18 ratones por genotipo. Observamos que los ratones AID^{+/-} tienen ligeramente incrementado el

número de linfocitos B en bazo comparado con los AID^{+/+} (Figura R-1B). Además, *in vivo* en placas de Peyer, en donde existe activación constitutiva de linfocitos B y consecuente formación de centros germinales, observamos que los ratones AID^{+/-} contienen una mayor proporción de células B activadas, medido mediante citometría de flujo por los marcadores de activación Fas y GL7 (Figura R-1C).

Los linfocitos B de centro germinal se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos o en células B memoria. Las células B productoras de anticuerpos secretan Igs específicas en respuesta a un antígeno concreto. El NP-CGG (del inglés, *(4-hydroxy-3-NitroPhenyl)-acetyl-Chicken Gamma Globulin*) es un antígeno T dependiente, que estimula el inicio de la reacción de centro germinal. Para averiguar si la expresión reducida de AID en linfocitos B AID^{+/-} implica una reducción en los niveles de Igs en suero, se inmunizaron ratones AID^{+/+}, AID^{+/-} y AID^{-/-} con NP-CGG y analizó la concentración de IgG en suero dos semanas después. De acuerdo con lo previamente publicado (Muramatsu y col., 2000), no encontramos diferencias significativas en concentración de IgG entre el suero de ratones AID^{+/-} y AID^{+/+} (Figura R-1D), presumiblemente debido a la alta variabilidad en el título de Igs.

Estos resultados demuestran que los linfocitos B AID^{+/-} expresan niveles reducidos del ARNm de AID y muestran unas características de hiperactivación intermedias entre linfocitos B AID competentes (AID^{+/+}) y AID deficientes (AID^{-/-}).

Efecto de la dosis génica de AID en el cambio de isotipo (CSR)

Para evaluar el efecto de la dosis génica de AID en la eficiencia de la reacción de CSR, se monitorizó la generación de célula IgG1 e IgG3 tras la activación de las células B *in vitro* en presencia de citoquinas. Diferentes citoquinas inducen la reacción de CSR a los diferentes isotipos. Así, con LPS se promueve mayoritariamente CSR a IgG3 y con la combinación de LPS e IL4 a IgG1. Para analizar el CSR, se aislaron linfocitos B de bazo de ratones AID^{+/+}, AID^{+/-} y AID^{-/-} y se estimularon con LPS sólo o LPS e IL4, tras marcaje con el marcador de proliferación CFSE (5-(6) Carboxifluoresceín Diacetato Succinimidil Éster). El análisis por citometría de flujo dos días después de la estimulación demuestra que los linfocitos B AID^{+/-} tienen reducida su capacidad para la reacción de CSR a IgG1 (Figura R-2A), de manera paralela a la reducción observada en los niveles de ARNm de AID (Figura R-1A). De acuerdo con lo previamente descrito, la ausencia de AID resulta en un bloqueo total del CSR (Muramatsu y col., 2000). La reducción en la eficiencia del CSR en linfocitos AID^{+/-},

comparada con AID^{+/+}, se puede observar a lo largo de la duración del cultivo (Figura R-2B), tanto para el isotipo IgG1 (estimulación con LPS e IL4, gráfica de la izquierda) como para el IgG3 (estimulación con LPS, gráfica de la derecha).

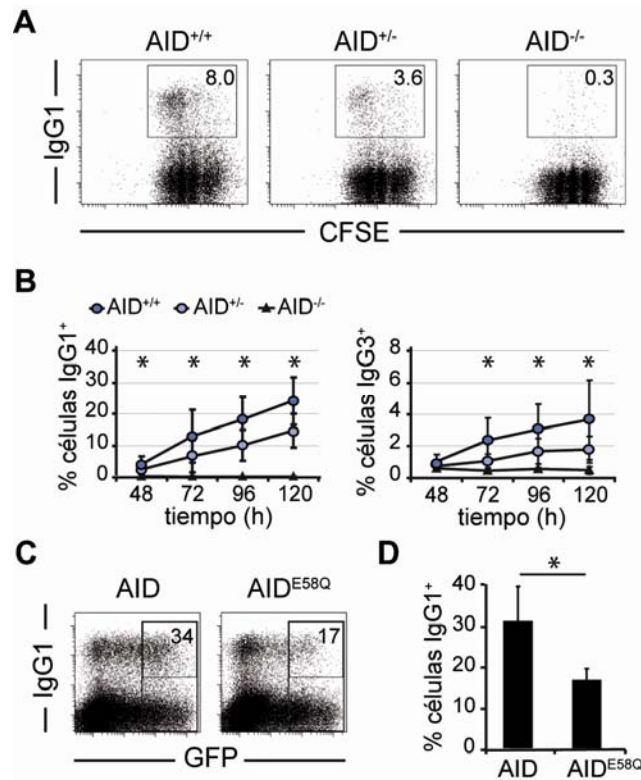


Figura R-2. AID es haploinsuficiente para el CSR. (A-B) La eficiencia del CSR está reducida en linfocitos B AID^{+/-}. Se estimularon linfocitos B de bazo de ratones AID^{+/+}, AID^{+/-} y AID^{-/-} con LPS e IL4 o sólo con LPS y se midió el CSR a IgG1 e IgG3 respectivamente mediante citometría de flujo. (A) Se muestran imágenes representativas de expresión de IgG1 y marcaje con CFSE dos días después de comenzar el estímulo. Se indica el porcentaje de células IgG1⁺. (B) Análisis de CSR a lo largo del tiempo. Se analizó CSR a IgG1 e IgG3 a los tiempos indicados (eje X) tras la estimulación con LPS e IL4 o sólo con LPS. Se indican los porcentajes de células IgG1⁺ e IgG3⁺ medidos por citometría (eje Y). Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 7 experimentos independientes; n (AID^{+/+})=15, n (AID^{+/-})= 13 y n (AID^{-/-})= 7; *t test* p (AID^{+/+} vs AID^{+/-}) para IgG1: 48h, 0.04; 72h, 0.03; 96h, 6x10⁻³; 120h, 3x10⁻³; y *t test* p (AID^{+/+} vs AID^{+/-}) para IgG3: 48h, 0.1; 72h, 8x10⁻³; 96h, 0.02; 120h, 0.02. (C-D) El CSR aumenta tras sobre-expresión de AID. Linfocitos B de ratones AID^{+/+} se transdujeron con vectores retrovirales codificantes de la forma silvestre de AID (AID) o una catalíticamente inactiva (AID^{E58Q}). Se monitorizó la transducción con la expresión de la proteína GFP. Se midió CSR a IgG1 a los dos días de la transducción. (C) Se muestra una imagen representativa obtenida por citometría de flujo. Se indican los porcentajes de células IgG1⁺ dentro de la población GFP⁺. (D) Las barras representan el número de células IgG1⁺ dentro de las células GFP⁺ transducidas con el vector AID o AID^{E58Q}. Se muestran las medias y desviaciones estándar de 2 experimentos independientes; n=4; *t test* p (AID vs AID^{E58Q})= 0.01. (A-D) Las diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0.05) se indican con un asterisco (*). Se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados.

La reacción de CSR está vinculada a la proliferación celular, es decir, la proporción de células que han llevado a cabo CSR aumenta con el número de divisiones (Reina-San-Martín y col., 2003). Para determinar si el efecto de la dosis génica de AID en la eficiencia de CSR está relacionada con la proliferación celular, se analizó, a través del marcaje con CFSE, el nivel de CSR en cada división. El CFSE es un colorante que se incorpora en la membrana celular, y cuando la célula se divide se distribuye en la progenie, de modo que la dilución de CFSE medida mediante citometría de flujo permite establecer el número de divisiones que han tenido lugar en una población de células. Se analizó el porcentaje de células que hacen CSR en cada división en seis ratones AID^{+/-} y AID^{+/+}. Tal y como se representa en la figura, no se apreciaron diferencias significativas entre linfocitos B AID^{+/-} y AID^{+/+} (Figura R-3). Observamos que la reducción de CSR en presencia de un único alelo de AID, frente a cuando existen los 2 alelos, es constante en cada división, es decir, la reducción de CSR en ratones AID^{+/-} no está asociada a un defecto en la proliferación (Figura R-2A y R-3).

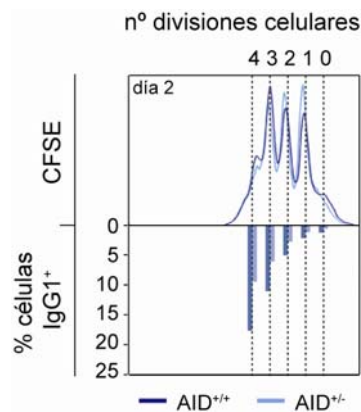


Figura R-3. La reducción en CSR en ratones AID^{+/-} es independiente de la proliferación celular. Se estimularon linfocitos B de bazo de ratones AID^{+/+} (n=6), AID^{+/-} (n=6) y AID^{-/-} (n=3) con LPS e IL4 y se marcaron con CFSE. La división celular se mide por dilución de CFSE usando citometría de flujo. Los histogramas muestran perfiles representativos de CFSE (línea azul oscuro, AID^{+/+} y línea azul claro, AID^{+/-}) tras dos días de activación. El porcentaje de CSR a IgG1 en cada una de las divisiones celulares indicadas se muestra en el panel inferior (barra azul oscuro, AID^{+/+} y barra azul claro, AID^{+/-}). Se muestran datos de un experimento representativo, de un total de 3 independientes.

Nos preguntamos si sobrepasar los niveles fisiológicos de expresión de AID daría lugar, a la inversa, a un aumento en la eficiencia de la reacción de CSR. Para evaluar esta posibilidad se sobre-expresó AID mediante transducción de linfocitos B de bazo de ratones AID^{+/+} con retrovirus codificantes para AID o para un mutante catalíticamente inactivo de AID (AID^{E58Q}) junto con la proteína verde fluorescente GFP (del inglés, *Green Fluorescent Protein*), que permite identificar las células transducidas. En la figura se incluyen los resultados de dos experimentos

independientes de transducción, con dos ratones de cada genotipo en cada uno, donde medimos CSR a IgG1 dos días después de la transducción. Observamos que la sobre-expresión de AID, pero no la de AID^{E58Q}, promueve un incremento en la eficiencia del CSR, medido por el porcentaje de células IgG1⁺ tras la estimulación en presencia de LPS e IL4 (Figura R-2C y R-2D), lo que indica que el aumento de los niveles fisiológicos de AID aumenta la eficiencia del CSR.

Estos resultados demuestran que la dosis génica de AID afecta a la eficiencia del CSR en linfocitos B primarios, lo cual implica que AID es haploinsuficiente para la reacción de CSR. Este resultado es independiente de proliferación.

Efecto de la dosis génica de AID en la hipermutación somática (SHM)

Para estudiar si la haploinsuficiencia de AID es también evidente en su actividad en la reacción de SHM analizamos la acumulación de mutaciones mediadas por AID mediante dos aproximaciones distintas. La primera, consistió en analizar la frecuencia de mutaciones en la región 5' de la región de *switch* μ (S_{μ}). La actividad de AID durante el CSR lleva emparejada la generación de mutaciones en S_{μ} ; presumiblemente porque una parte de las lesiones introducidas por AID en esta región no generan DSBs, sino que se resuelven en forma de mutación. Por ello se considera que la frecuencia de mutaciones en S_{μ} es un reflejo de la actividad mutagénica de AID. Para determinar la actividad de SHM en S_{μ} , se estimularon linfocitos B de bazo de ratones AID^{+/+} y AID^{+/-} marcados con CFSE en presencia de LPS e IL4 durante cuatro días. A continuación, se aislaron mediante citometría preparativa las células que se habían dividido 5 ó más veces, en las que se encuentra enriquecida la población de células que han llevado a cabo CSR, y se determinó la frecuencia de mutaciones en S_{μ} mediante PCR, clonaje y secuenciación. Encontramos que la frecuencia de mutaciones en la región S_{μ} era ligeramente inferior en linfocitos AID^{+/-} que en linfocitos AID^{+/+} (1.23×10^{-4} vs 1.96×10^{-4}) (Figura R-4A). La segunda estrategia de análisis de SHM se realizó en células de centro germinal generadas *in vivo* en placas de Peyer. Las células B presentes en este tejido reciben señales constitutivas de activación que resultan en la formación de células de centro germinal en las que tiene lugar SHM y CSR a IgA. Para analizar la frecuencia de SHM *in vivo* se aislaron células de centro germinal Fas⁺GL7⁺ de placas de Peyer AID^{+/+} y AID^{+/-} mediante citometría preparativa, y se amplificó, clonó y secuenció la región intrónica 3' del gen JH4, que se encuentra inmediatamente después de la región variable reordenada en el *locus* de cadena pesada de Igs y por ello es susceptible de sufrir SHM. En la figura se

incluyen los resultados obtenidos del análisis de dos ratones de cada genotipo en los que se secuenciaron más de 50 clones en cada caso. Nuestros resultados indican que los linfocitos B de ratones AID^{+/-} contienen menos mutaciones que los de ratones AID^{+/+} (0.96×10^{-3} vs 3.16×10^{-3}) (Figura R-4B).

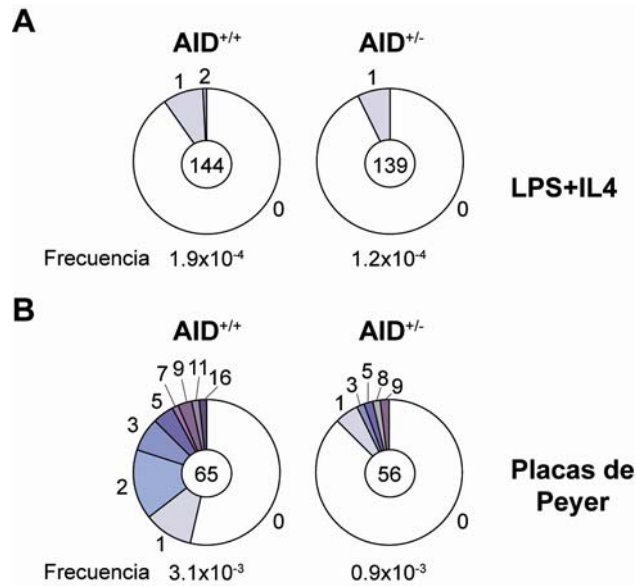


Figura R-4. AID es haploinsuficiente para SHM. (A) La frecuencia de mutaciones en S μ está disminuida en linfocitos B AID^{+/-} estimulados. Se cuantificó la frecuencia de mutación en S μ en linfocitos B marcados con CFSE, que habían sufrido 5 ó más divisiones tras cuatro días de activación con LPS e IL4. *t test* p (AID^{+/+} vs AID^{+/-})= 0.171. (B) La frecuencia de mutaciones en la región intrónica 3' de JH4 en células de centro germinal AID^{+/-} está reducida. Se analizaron mutaciones en la región intrónica 3' de JH4 en linfocitos B Fas⁺GL7⁺ aislados de placas de Peyer de ratones AID^{+/+} y AID^{+/-}. *t test* p (AID^{+/+} vs AID^{+/-})= 0.011. (A-B) El área de los sectores de las gráficas es proporcional al número de secuencias de S μ o JH4 que contienen el número de mutaciones indicado en los laterales. En el centro se indica el número total de secuencias independientes analizadas, mientras que la frecuencia total de mutaciones se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Para el análisis estadístico se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados.

La frecuencia de mutaciones reducida que observamos *in vivo* e *in vitro* en linfocitos B AID^{+/-}, nos permiten concluir que AID es haploinsuficiente para la reacción de SHM. Estos datos, junto con los descritos anteriormente para la reacción de CSR, indican que los niveles fisiológicos de expresión de AID son limitantes para la diversificación secundaria de anticuerpos.

Efecto de la dosis génica de AID en la generación de translocaciones c-myc/IgH *in vivo*

Además de iniciar el CSR y la SHM, AID también es necesaria para la generación de translocaciones oncogénicas c-myc/IgH *in vivo* (Ramiro y col., 2004; Dorsett y col., 2007), como se indicó previamente. Para analizar el efecto de la dosis génica de AID en la generación de estas translocaciones *in vivo* se usó el modelo de ratón transgénico para la interleuquina 6 (IL6Tg).

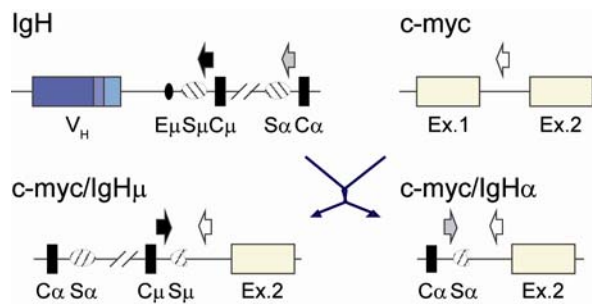


Figura R-5. Esquema de detección de translocaciones cromosómicas c-myc/IgH por PCR. Representación de los genes IgH y c-myc (parte superior) y de las translocaciones proximales y distales (c-myc/IgHμ y c-myc/IgHα, parte inferior) entre ambos genes. Los genes variables (V_H) y constantes (C_μ y C_α) se representan en rectángulos azules y negros, respectivamente. Las regiones de *switch* y el *enhancer* μ (E_μ) se muestran como elipses ralladas y negra, respectivamente. Los exones de c-myc se representan como rectángulos amarillos. Las flechas muestran la posición de los oligonucleótidos usados en la PCR.

Los ratones transgénicos para IL6 desarrollan espontáneamente hiperplasia linfóide, que en un 60% de los casos da lugar a la generación de plasmacitomas (Suematsu y col., 1992; Kovalchuk y col., 2002). Se cree que la IL6 tiene este efecto debido a la atenuación de la apoptosis y aceleración de los procesos de proliferación y diferenciación de linfocitos B maduros (Morse y col., 1997). Los tejidos linfoides hiperplásicos de ratones IL6Tg están enriquecidos en linfocitos B que poseen translocaciones cromosómicas que implican al *locus* de IgH y al proto-oncogen c-myc (c-myc/IgH) (Suematsu y col., 1992; Kovalchuk y col., 2002), análogas a las encontradas en el linfoma de Burkitt humano. En ausencia de AID, los linfocitos B de los ratones IL6Tg no desarrollan translocaciones c-myc/IgH y el comienzo de la hiperplasia linfóide se retrasa (Ramiro y col., 2004; Dorsett y col., 2007). Los lugares de unión (*breakpoints*) de las translocaciones cromosómicas c-myc/IgH en ratones IL6Tg se agrupan en una pequeña región, que comprende parte de su primer exón y su primer intrón. Sin embargo, los lugares de unión encontrados en el *locus* IgH se

distribuyen mayoritariamente en las regiones de *switch* del *locus* de IgH (Kovalchuk y col., 2002; Ramiro y col., 2004; Dorsett y col., 2007). Esta distribución es reflejo de los lugares donde se producen roturas en el ADN de doble cadena (DSBs) iniciados por AID durante la reacción de CSR y, en ocasiones, durante la reacción de SHM (revisado en Pérez-Durán y col., 2007).

Para estudiar si la dosis génica de AID influye en la frecuencia o distribución de las translocaciones c-myc/IgH *in vivo*, se analizaron translocaciones en linfocitos B de nódulos linfáticos hiperplásicos de ratones IL6TgAID^{+/-} e IL6TgAID^{+/+}. Se usó PCR anidada para la detección de las translocaciones c-myc/IgH. Se combinaron oligonucleótidos que hibridan en la región de *switch* μ (S μ) o en la región de *switch* α (S α) con un oligonucleótido que hibrida en c-myc, para detectar translocaciones proximales (c-myc/IgH μ) o distales (c-myc/IgH α), respectivamente (Kovalchuk y col., 1997; Ramiro y col., 2004) (Figura R-5). Las translocaciones distales son eventos mucho menos frecuentes que las proximales, probablemente estando asociadas a fases más avanzadas de la patología (Kovalchuk y col., 1997). En la figura se muestran geles de agarosa representativos, tras aislar ADN genómico y amplificar translocaciones c-myc/IgH μ y c-myc/IgH α de ratones de ambos genotipos (Figura R-6A izquierda TCs proximales y R-6A derecha TCs distales). La identidad de las translocaciones se verificó mediante *southern blot*, y también con clonaje y secuenciación de los productos amplificados. Observamos que la frecuencia total de translocaciones c-myc/IgH, calculada por dilución seriada del número de linfocitos B de nódulos hiperplásicos analizados por reacción de PCR (desde 50.000 hasta 400 células), está reducida en linfocitos B IL6TgAID^{+/-} (0.77×10^{-4}) comparado con los IL6TgAID^{+/+} (1.90×10^{-4}) (Figura R-6B izquierda).

La frecuencia de translocaciones c-myc/IgH μ , también calculada por dilución seriada, se encuentra ligeramente reducida en linfocitos IL6TgAID^{+/-} (0.77×10^{-4}), comparado con los IL6TgAID^{+/+} (1.11×10^{-4}) (Figura R-6B medio). En cambio, no observamos translocaciones c-myc/IgH α en IL6TgAID^{+/-}, comparado con los IL6TgAID^{+/+} (0.86×10^{-4}) donde sí se encontraron aunque con una frecuencia menor que la de proximales (Figura R-6B derecha).

Se mapeó la posición de los *breakpoints* de las translocaciones proximales IL6TgAID^{+/+} e IL6TgAID^{+/-} (Figura R-6C y Tabla V). Observamos que los *breakpoints* en el gen c-myc se agrupan al final del primer exón y el comienzo del primer intrón,

independientemente del genotipo analizado (Figura R-6C). Los *breakpoints* en el *locus* de IgH se encuentran ligeramente más próximos al *enhancer* μ ($E\mu$) en los linfocitos IL6TgAID^{+/-} (Figura R-6C), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. La frecuencia de mutación en las cercanías de los *breakpoints* de las translocaciones y el número de microhomologías es similar en linfocitos B IL6TgAID^{+/+} e IL6TgAID^{+/-}.

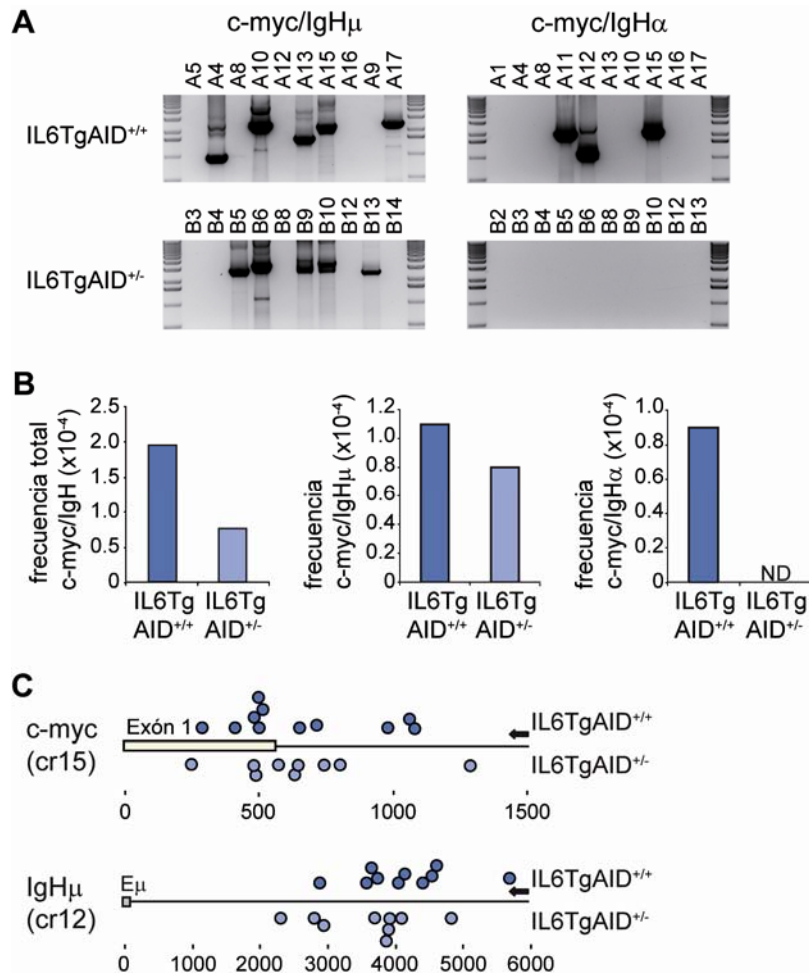


Figura R-6. La frecuencia de translocaciones cromosómicas *c-myc/IgH* está reducida en ratones IL6TgAID^{+/-}. (A) Translocaciones *c-myc/IgH* proximales *c-myc/IgH μ* (izquierda) y distales *c-myc/IgH α* (derecha) detectadas en linfocitos B de nódulos linfáticos hiperplásicos de ratones IL6TgAID^{+/+} (geles superiores) y IL6TgAID^{+/-} (geles inferiores). Para la amplificación se usaron las condiciones descritas en materiales y métodos y los oligonucleótidos representados en la figura R-5. Se muestran productos de amplificación representativos de 10 animales diferentes en geles teñidos con bromuro de etidio. (B) Frecuencia de translocaciones *c-myc/IgH* en ratones IL6TgAID^{+/+} (n=16) y IL6TgAID^{+/-} (n=13). Se determinó mediante PCR de diluciones seriadas de las muestras de ADN. Las barras representan la frecuencia de translocaciones totales (izquierda), proximales *c-myc/IgH μ* (medio) y distales *c-myc/IgH α* (derecha). ND, no detectable. Fisher test p (IL6TgAID^{+/+} vs IL6TgAID^{+/-}) ≥ 0.05 . (C) Representación de los lugares de fusión de los genes *c-myc* e IgH en las translocaciones encontradas en linfocitos B IL6TgAID^{+/+} y IL6TgAID^{+/-}. Se clonaron y secuenciaron los productos de amplificación de las translocaciones proximales *c-myc/IgH μ* . Los lugares de fusión en el gen *c-myc* (diagrama superior) e IgH (diagrama inferior) se representan como círculos azules oscuros (IL6TgAID^{+/+}) y azules claros (IL6TgAID^{+/-}). El exón 1 y el $E\mu$ de IgH se representan como rectángulos amarillos y la distancia a estos elementos se indica en la parte inferior (pares de bases). Las flechas de la derecha indican la posición de los oligonucleótidos usados para la PCR de amplificación.

Estos datos nos permiten concluir que, *in vivo*, la reducción en los niveles de AID en ratones IL6TgAID^{+/-} da lugar a una menor frecuencia de translocaciones c-myc/IgH. Aunque el número de muestras analizadas no nos permite concluir que la ausencia de translocaciones distales es absoluta en ratones IL6TgAID^{+/-}, sí se puede decir que son muy infrecuentes.

Tabla V Translocaciones c-myc/IgH en ratones IL6Tg. (A) Translocación cromosómica c-myc/IgH proximal (IgH μ) o distal (IgH α). (B) Identificación del ratón de igual modo que en los geles de la figura R-6. (C) Secuencia de c-myc adyacente a la fusión de la translocación; las mutaciones se representan en letra minúscula. (D) Microhomologías en los lugares de fusión de los dos cromosomas (secuencias que no es posible asignar a c-myc o Ig). (E) Secuencia reversa complementaria de IgH adyacente a la fusión de ambos cromosomas; las mutaciones se representan en letra minúscula.

Derivativo 12 ^(A)	ID ^(B)	Genotipo	c-myc ^(C)	Fusión ^(D)	IgH ^(E)
IgH μ	A1	AID ^{+/+}	AAACAGCTCGAGGAaCTCTTTTCAG	G	GCTGGGGTGAGCTGAGCTGAGCTGG
IgH μ	A2	AID ^{+/+}	CTTTCCTCTGTCATCTTGACAAGTC		CTGAGCTGGGTGAGCTGAGCTGAAC
IgH μ	A3	AID ^{+/+}	GCCTTCAAACAGCTCGAGGAGCTCT		CTGGATTGAACTGAGCTGTGTGAgC
IgH μ	A4-1	AID ^{+/+}	AATCCAGCCTTCAAACAGCTCGAGG	AGC	CCTGCCTGCCTTAAGAGTAGCAACA
IgH μ	A4-2	AID ^{+/+}	GGACGGGTTGCGATCGCCGctGGGG		TGAGCTGGGGTGAGCTGAGCTGGGG
IgH μ	A10	AID ^{+/+}	TTGGGGAGAGTGGGCGGCAGGCTCG		TGGGATGAGGTAGGCTGGGATGAGC
IgH μ	A11	AID ^{+/+}	AGAGCTGATCGCGGGCAGAGGCAGA	G	GCTGGCCTGGCTGATGAGCTAAGCT
IgH μ	A13	AID ^{+/+}	AGCCTGGGGAGTCTGTCTGGCTC	GC	TGGGGTGAGCTGAGCTGAGCTGAGC
IgH μ	A15	AID ^{+/+}	TAAAAGGCTCAGGGACGGTTGCGA		GAGCTGAGCTGGGTGAGCTGAGCT
IgH μ	A17	AID ^{+/+}	ACTCTTGAGAAAAGTGCAAAAaCA	C	TGGGGTGAGCTGAGCTGAGCTGAGC
IgH μ	B2	AID ^{+/-}	CTAGCAATTCAGGGCGCGAGGCAT	A	GCTGAGCTGAGCTGAGCTGGGTGAG
IgH μ	B5	AID ^{+/-}	CTCTTGAGAAAAGTGCAAAAGTAC	A	aCTGAGCTGAGCTGAGCTGGGGTGA
IgH μ	B6	AID ^{+/-}	CACTCCAGAGCTGCCTTCTTAGGTC	GC	TGAGCTGGGGTGAGCTGGGCTGAGC
IgH μ	B7	AID ^{+/-}	AAGAACACAGGGAAAGACCACCAGA		GCTGGGGTGAGCTGAGCTGAGCTGG
IgH μ	B9	AID ^{+/-}	TCAAATGCATCCCGTTTTTCCCT	T	GGGCTGAGCTGGGTTGGGAGACCAT
IgH μ	B10	AID ^{+/-}	CTCTTTTCAGGAGAGCTGATCGCGG	GC	TGGGGTGAGgTgaGCTGAGCTGGGG
IgH μ	B11	AID ^{+/-}	AAAGCACAGGAATGGAAGAAAGACT	G	CTGAGCTGGGGTGAGCTGAGCTGAG
IgH μ	B13	AID ^{+/-}	CAAGAATGTCCAACCGCCGGGTCA	G	AGCTGAGCTGGGGTGAGCTGAGCTG
IgH α	A11	AID ^{+/+}	ATCTTGACAAGTCGCTCTACCCCGA	CT	GAGCTAGACTTANGGTGNAATGGGC
IgH α	A12	AID ^{+/+}	GGGATTGGCGGGCGGGACGCACCTC	C	TAGgCTGGGGTGAATTAGCATGACT
IgH α	A15	AID ^{+/+}	AACCGCGCTACATTCNAGACGCA	G	CTGGGCTGAGCTGGAATGAGCTGGG

Efecto de la dosis génica de AID en la generación de translocaciones c-myc/IgH *in vitro*

La hiperplasia linfoide presente en los ratones IL6Tg es una patología de larga latencia que presumiblemente implica eventos selectivos complejos los cuales pueden afectar al número y naturaleza de las translocaciones encontradas en animales enfermos. Por ello, para estudiar el efecto de la dosis génica de AID en la iniciación de translocaciones cromosómicas, se analizó la frecuencia de estos eventos tras cortos períodos de cultivo *in vitro* de linfocitos B primarios.

Las translocaciones c-myc/IgH se inician en linfocitos B mediante la actividad de AID y la generación de DSBs, por lo que se pueden mimetizar *in vitro* mediante la estimulación de linfocitos B de bazo en presencia de LPS e IL4 (Ramiro y col., 2006b). La frecuencia de translocaciones en linfocitos B AID^{+/+} es extremadamente baja (menor de una translocación cada diez millones de linfocitos), pero aumenta en ausencia de p53, Arf o ATM. En particular, la protección mediada por p53 contra las translocaciones c-myc/IgH inducidas por AID es evidente incluso en ratones p53^{+/-} en los que la frecuencia de translocaciones es muy superior a la existente en los animales control (Ramiro y col., 2006b).

Decidimos explotar la alta frecuencia de translocaciones c-myc/IgH de los linfocitos B p53^{+/-} para determinar si la dosis génica de AID tiene impacto en que ocurran estas lesiones linfomagénicas. Para asegurarnos de que el genotipo p53^{+/-} o el hecho de trabajar con una cepa de fondo genético mixto (AID^{-/-} son Balb/c ByJ y p53^{-/-} son C57BL/6) no interfiere en la haploinsuficiencia de AID previamente descrita, se generaron ratones AID^{+/-}p53^{+/-} y AID^{+/+}p53^{+/-} y se analizó la eficiencia de la reacción de CSR en cultivos de linfocitos B estimulados con LPS e IL4. Observamos que los linfocitos B AID^{+/-}p53^{+/-} tienen mermada la eficiencia de la reacción de CSR, comparado con los AID^{+/+}p53^{+/-}, a los diferentes tiempos a los que se hicieron los análisis de expresión de IgG1 (Figura R-7A). Esta reducción es comparable a la observada en ratones p53^{+/+}Balb/c ByJ (Figura R-2A y R-2B), e indica que la haploinsuficiencia de AID se manifiesta de manera equivalente en animales p53^{+/-} de fondo mixto Balb/c ByJ C57BL/6.

Estudiamos la frecuencia de translocaciones proximales c-myc/IgH_μ en linfocitos B de bazo estimulados durante tres días con LPS e IL4 de ratones AID^{+/+}p53^{+/-} y AID^{+/-}p53^{+/-}. Se aislaron linfocitos B de bazo de diez ratones distintos (cinco ratones por genotipo),

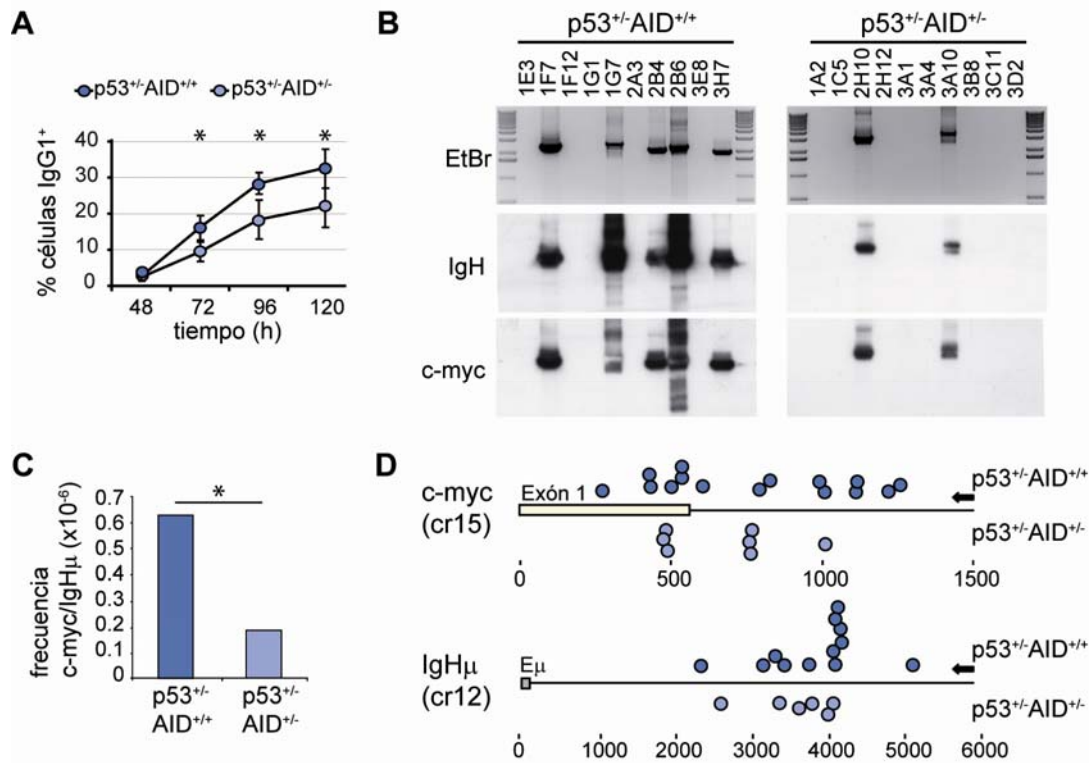


Figura R-7. La frecuencia de translocaciones cromosómicas c-myc/IgH está reducida en linfocitos B AID^{+/-} activados. (A) La eficiencia del CSR está reducida en linfocitos B AID^{+/-}p53^{+/-}. Se estimularon linfocitos B de bazo de ratones AID^{+/+}p53^{+/-} (n=4) y AID^{+/-}p53^{+/-} (n=4) en presencia de LPS e IL4. Se indican los porcentajes de células IgG1⁺ a los tiempos indicados. Se muestran las medias y sus desviaciones estándar. *t test* p (AID^{+/+}p53^{+/-} vs AID^{+/-}p53^{+/-}): 48h, 0.7; 72h, 0.01; 96h, 6x10⁻³; 120h, 0.03. Se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados para el análisis estadístico. (B) Translocaciones c-myc/IgH μ detectadas en linfocitos B de ratones AID^{+/+}p53^{+/-} (geles izquierda) y AID^{+/-}p53^{+/-} (geles derecha). Las células B se estimularon *in vitro* en presencia de LPS e IL4 durante tres días. Para la amplificación se usaron las condiciones descritas en materiales y métodos y los oligonucleótidos representados en la figura R-5. Se muestran productos de amplificación representativos en geles teñidos con bromuro de etidio (panel superior). La especificidad de los productos de amplificación se determinó por *southern blot*, se hibridó con una sonda para IgH (panel medio) y otra para c-myc (panel inferior). Se indica la identificación de cada translocación en la parte superior de cada gel. (C) Frecuencia de translocaciones c-myc/IgH μ en linfocitos B AID^{+/+}p53^{+/-} y AID^{+/-}p53^{+/-}. Las barras representan la frecuencia de translocaciones/número de células. *Fisher test* p (AID^{+/+}p53^{+/-} vs AID^{+/-}p53^{+/-})= 2x10⁻³. (D) Representación de los lugares de fusión de los genes c-myc e IgH en las translocaciones encontradas en linfocitos B AID^{+/+}p53^{+/-} y AID^{+/-}p53^{+/-} estimulados. Se clonaron y secuenciaron los productos de amplificación de las translocaciones proximales c-myc/IgH μ . Los lugares de fusión en el gen c-myc (diagrama superior) e IgH (diagrama inferior) se representan como círculos azules oscuros (AID^{+/+}p53^{+/-}) y azules claros (AID^{+/-}p53^{+/-}). El exón 1 y el E μ de IgH se representan como rectángulos amarillos y la distancia a estos elementos se indica en la parte inferior (pares de bases). Las flechas de la derecha indican la posición de los oligonucleótidos usados para la PCR de amplificación. (A-D) n=5, proveniente de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas (p \leq 0.05) se indican con un asterisco (*).

RESULTADOS

y se analizó la presencia de translocaciones c-myc/IgH μ por PCR anidada (Figura R-5) en 45 millones de células de cada genotipo tras tres días de estimulación. Los productos de amplificación se verificaron mediante *southern blot* con sondas específicas para IgH y para c-myc (Figura R-7B, geles de agarosa representativos) y también mediante clonaje y secuenciación. Nuestros resultados indican que la frecuencia de translocaciones c-myc/IgH μ es significativamente menor en linfocitos B AID^{+/-}p53^{+/-} (0.19×10^{-6}), comparado con los controles AID^{+/+}p53^{+/-} (0.61×10^{-6}) (Figura R-7C).

Tabla VI Translocaciones c-myc/IgH generadas *in vitro* en ratones p53^{+/-}. (A) Translocación cromosómica c-myc/IgH μ proximal. (B) Identificación del ratón de igual modo que en los geles de la figura R-7. (C) Secuencia de c-myc adyacente a la fusión de la translocación; las mutaciones se representan en letra minúscula. (D) Microhomologías en los lugares de fusión de los dos cromosomas (secuencias que no es posible asignar a c-myc o Ig). (E) Secuencia reversa complementaria de IgH adyacente a la fusión de ambos cromosomas; las mutaciones se representan en letra minúscula.

Derivativo 12 ^(A)	ID ^(B)	Genotipo	c-myc ^(C)	Fusión ^(D)	IgH ^(E)
IgH μ	1F7	AID ^{+/+}	AGACTGTCTTAACCGGCCGCTACAT	T	GAGCTGAGCTGGGGTGGAGCTGAGCT
IgH μ	1G5	AID ^{+/+}	AGACAAAAATTCCTCCCGGAGCC	TG	AGCTGGGTGAGCTGAGCTGGGGTGA
IgH μ	2G7	AID ^{+/+}	CCGCGGATCCCAAGTAGGAATGTaA	GG	GGTGAGCTGGGGTGGAGCTGAGCTGA
IgH μ	6H5	AID ^{+/+}	AAATTTTACTACGATCACTATTTTT		TGAGCTGAGCTGGGGTGGAGCTGAGC
IgH μ	6H8	AID ^{+/+}	GTCGGTCCCAGGCTGTCAGAAATGC		TGAACTGAATGAGTTTCACCAGGCC
IgH μ	8B6	AID ^{+/+}	AATGTCCAACCGACCGGGTCAGCGT		GTGAGCTGAGCTGAGCTAGGGTGGAG
IgH μ	10G5	AID ^{+/+}	ACCGGGGTTTCCAACGCCCAAGGA		GCTGAGCTGGGGTGGAGCTGGGGTGA
IgH μ	10G12	AID ^{+/+}	ACAGCTCGAGGAGCTCTTTTCAGct	GAGCTGA	GCTGAGCTGAGCTGAGCTGAGCTGG
IgH μ	10H5	AID ^{+/+}	GGTTTCCCCAAGTCAACGAATCGG	T	GAGCTGaGcTGgGgTGAGCTGAGCT
IgH μ	11F4	AID ^{+/+}	AACAGCTCGAGGAGCTCTTTTCAGc		TGAGCTGAGcGAGCTGAGCTGAGC
IgH μ	11H7	AID ^{+/+}	GAAATGCACCAAGCTGAAATTTAAA		GGGGTGGAGCTGAGCTAGGGTGAAGT
IgH μ	3C9	AID ^{+/-}	GTCGGTCCCAGGCTGTCAGAAACGC		TGAGCTTgGCTGAGCTAGgGTGAGC
IgH μ	7D3	AID ^{+/-}	AGTAACCTCGGGAACCCCGCTTCAA		TGAGCTGgGgTGAGCTGaGCTGAGC
IgH μ	8G5	AID ^{+/-}	TCTTTTCAGGAGAGCTGATCGCGGG		TGAGCTGAGCTGAGCTGGGGTGGAGC
IgH μ	8H10	AID ^{+/-}	AGCTCTTTTCAGGAGAGCTGATCGC	GGG	TGAGCTGAGCTGAGCTGGGGTGGAGC
IgH μ	9A4	AID ^{+/-}	AGTAACCTCGGGAACCCCGCTTCAA		TGAGCTGGGGTGGAGCTGAGCTGAGC
IgH μ	9C3	AID ^{+/-}	TGAGAAAAGTGTCAAAAGCACaGA	A	GCTGAGCTGAGCTGGGGTGGAGCTGg
IgH μ	10A10	AID ^{+/-}	GAGAGCTGATCGCGGGCAGAGGCAG		GAGCTGGAG-TGAGCTGAGCTGGGGT

Al igual que en las translocaciones encontradas en animales IL6Tg, se mapeó la posición de los *breakpoints* de las translocaciones de células AID^{+/-}p53^{+/-} frente a las de los controles AID^{+/+}p53^{+/-}. No encontramos diferencias significativas en la distribución de los *breakpoints* ni en c-myc ni en IgH (mapeado en Figura R-7D), tampoco en mutaciones o microhomologías en las uniones (Tabla VI).

Estos resultados nos permiten concluir que la expresión reducida de AID por los ratones que portan un único alelo del gen *Aicda* (AID^{+/-}) da lugar a una disminución en la frecuencia de translocaciones c-myc/IgH. Por tanto, AID es haploinsuficiente para la generación de estas lesiones linfomagénicas.

En resumen, en esta primera parte se ha realizado un análisis exhaustivo de las consecuencias de una reducción en los niveles de AID *in vivo* e *in vitro* utilizando animales AID^{+/-}, en los que la expresión de AID está reducida a la mitad. Nuestros datos demuestran que esta reducción tiene consecuencias funcionales, tanto para la actividad fisiológica de AID (SHM y CSR), como para su actividad linfomagénica (generación de translocaciones c-myc/IgH). Por tanto, demostramos que AID es haploinsuficiente, lo que sugiere que los niveles de expresión de AID están regulados finamente para mantener su actividad dentro de un rango que permite el desarrollo de una respuesta inmune eficiente y al mismo tiempo minimizar el riesgo de lesiones con capacidad transformante (ver discusión).

Parte II. Estudio de la regulación de la expresión de AID mediada por hormonas

AID introduce lesiones en el ADN, necesarias para la diversificación secundaria de anticuerpos (CSR y SHM) pero como subproducto de esta actividad también introduce mutaciones y translocaciones potencialmente deletéreas. Por ello, la actividad de AID debe estar estrechamente regulada. AID, además de estar regulada por rutas dependientes de la activación de los linfocitos B, también lo está por rutas independientes (por ejemplo, proteínas E-box (Sayegh y col., 2003), Pax5 (Gonda y col., 2003) y NF- κ B (Dedeoglu y col., 2004)), siendo las hormonas posibles candidatos reguladores de su actividad ya que está descrita su participación en multitud de procesos fisiológicos (revisado en McDonnell y col., 2002).

La prevalencia de los síndromes autoinmunes humanos de linfocitos B suele ser mayor en mujeres que en hombres (revisado en Whitacre, 2001; revisado en Rider y col., 2001; revisado en Nalbandian y col., 2005; revisado en Peeva y col., 2005; Li y col., 2007), relacionándose con la actividad de las hormonas sexuales (revisado en Whitacre, 2001). Además se han observado expresiones aumentadas de AID en modelos murinos de autoinmunidad (Bombardieri y col., 2007; Hsu y col., 2007; Jiang y col., 2007). Otras patologías no inmunes, como el cáncer de mama o de ovario, están también influenciadas por la actividad de hormonas sexuales (Hulka y col., 1995; Shang y col., 2006). Para determinar si AID puede estar regulada por hormonas sexuales, se evaluó el efecto de los estrógenos en la expresión y función de AID. Este proyecto ha sido desarrollado en colaboración con el laboratorio del Dr. Petersen-Mahrt (*Cancer Research UK*, Inglaterra).

Identificación de elementos de respuesta hormonal en el promotor de AID

Las hormonas, como es el caso de los estrógenos, ejercen su función biológica mediante la unión a sus receptores citoplasmáticos y posterior entrada del complejo hormona-receptor al núcleo, dónde actúan como factores de transcripción (Tsai y col., 1994).

Para determinar si la expresión de AID está regulada por hormonas, se analizó si el gen de AID (*Aicda*) puede ser una diana directa de regulación hormonal vía estrógeno. Mediante análisis bioinformático, se identificó una serie de posibles elementos de respuesta a estrógeno (EREs) en el contexto de otros elementos de unión, como los del NF- κ B (Figura R-8A). Para comprobar si las predicciones bioinformáticas eran

correctas se realizó un ensayo luciferasa. Se clonaron los fragmentos A-E que contienen las potenciales regiones de respuesta a estrógeno (Figura R-8A) inmediatamente antes del gen de la luciferasa y se transfectaron en células humanas SiHa; un día después se trataron con el estrógeno 17- β -estradiol o DMSO durante cuatro horas, y se analizó la actividad luciferasa. Observamos que el fragmento C del promotor de AID contiene el elemento de respuesta a estrógeno, pues fue el de mayor respuesta en el ensayo luciferasa (Figura R-8B). Este fragmento también contiene los dos lugares de unión de NF- κ B al promotor de AID (Dedeoglu y col., 2004).

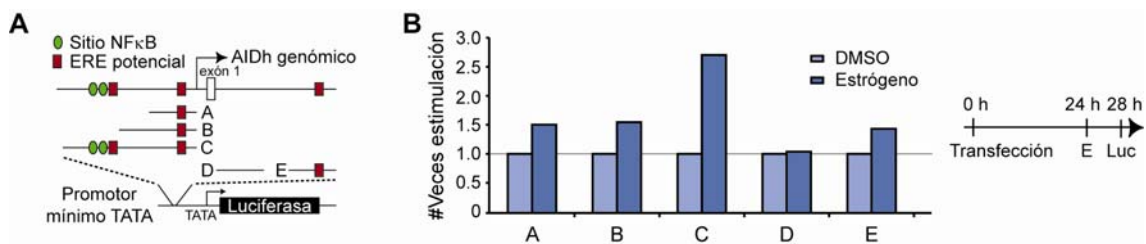


Figura R-8. Análisis de los elementos de respuesta a estrógeno en el promotor humano de AID. (A) Representación esquemática de los elementos de respuesta a estrógeno (EREs) potenciales (rectángulos rojos) y los elementos de respuesta a NF- κ B (óvalos verdes) en el *locus* humano de AID. Las regiones del promotor de AID indicadas (marcadas de A-E) se clonaron inmediatamente antes del gen reportero de la luciferasa. (B) El fragmento C contiene los elementos de respuesta a estrógeno. Se transfectaron los vectores que contienen las distintas regiones del promotor de AID (marcadas de A-E) en células SiHa y se incubaron durante 24 horas, a continuación se trataron durante 4 horas con 17- β -estradiol y se analizó la actividad luciferasa. Se representa la actividad luciferasa relativa tras tratamiento con estrógeno referida al DMSO. Se indica el esquema del tratamiento a la derecha de la gráfica.

Este resultado nos permite concluir que el promotor de AID contiene sitios de respuesta a estrógeno, próximos a los lugares de unión a NF- κ B previamente descritos.

Efecto del estrógeno en la expresión de AID

A continuación se analizó si la presencia de estrógenos afecta a la expresión de AID, lo que sería razonable dada la presencia de elementos de respuesta a estrógeno en el gen de AID. Para analizar la expresión de AID en presencia de estrógeno, se aislaron linfocitos B de bazo y se estimularon con LPS e IL4. Se añadieron distintas concentraciones fisiológicas de 17- β -estradiol y se analizó la expresión de AID por qRT-PCR tras ocho horas. El tratamiento con estrógeno se hizo durante un período corto de tiempo para evitar la inducción máxima de AID causada por una estimulación larga con LPS e IL4. Observamos que el tratamiento con concentraciones fisiológicas de estrógeno incrementa hasta tres veces los niveles de ARNm de AID en linfocitos B

estimulados, comparado con los controles tratados con dimetil sulfóxido (DMSO) (Figura R-9A).

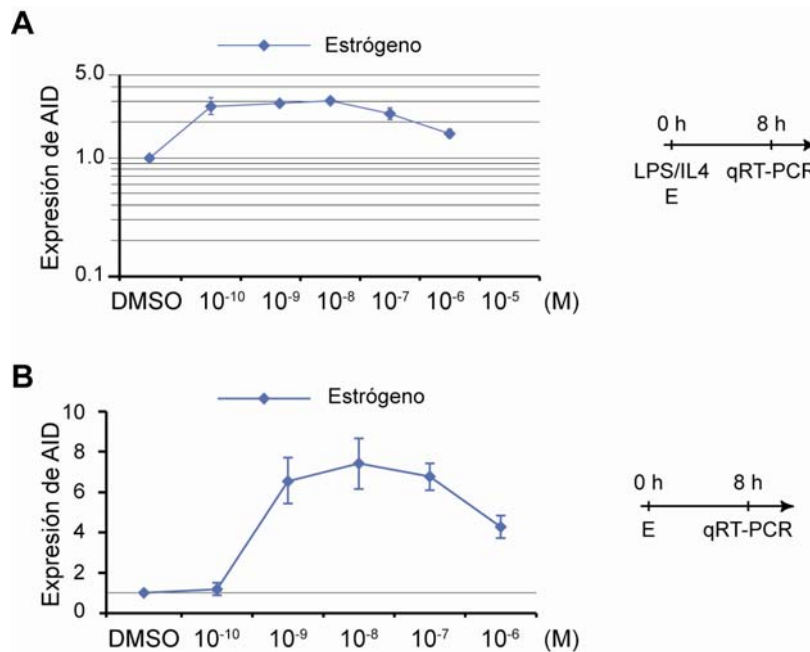


Figura R-9. Efecto del estrógeno en el ARNm de linfocitos B. (A) La expresión de AID en respuesta a estrógeno aumenta en linfocitos B activados. Se estimularon linfocitos B de bazo con LPS e IL4 y se trataron con diferentes concentraciones fisiológicas de estrógeno durante 8 horas. (B) La expresión de AID en respuesta a estrógeno en linfocitos B no estimulados aumenta tras 8 horas de tratamiento con concentraciones fisiológicas de estrógeno. (A-B) Se aisló ARN y se analizó expresión de AID mediante qRT-PCR. Se indica el esquema de los tratamientos a la derecha de cada gráfica. Se muestran las medias y desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. Se ajusta el DMSO a las 0 horas al valor de 1, y los tratamientos se representan como cambios relativos referidos al DMSO.

Los linfocitos B de bazo no estimulados o *naive* expresan niveles bajos de AID (unas 10 veces menos que los activados, dato no mostrado). Para determinar el efecto del estrógeno en la expresión de AID en linfocitos B *naive*, se aislaron células B de bazo y se trataron durante ocho horas con concentraciones fisiológicas de estrógeno. Los niveles de ARNm de AID se inducen hasta siete veces tras tratamiento con estrógeno de linfocitos B *naive*, comparado con los linfocitos tratados con DMSO (Figura R-9B).

Estos resultados demuestran que el estrógeno incrementa los niveles de expresión de ARNm de AID en linfocitos B activados y linfocitos B *naive*.

Efecto del estrógeno en las reacciones de CSR y SHM

Para evaluar el efecto del estrógeno en la eficiencia de la reacción de CSR, se analizó uno de los eventos tempranos de este proceso, la generación de transcritos procedentes de los círculos de *switch* escindidos de la reacción de CSR. Estos círculos de *switch* se generan durante el CSR, al recombinarse dos secuencias de *switch* y escindirse en forma de círculo la región intermedia del *locus* de Ig. Estos círculos de ADN contienen una unidad transcripcional y por ello generan transcritos que pueden detectarse mediante qRT-PCR. Se aislaron células B de bazo, y tras estimulación con las citoquinas apropiadas *in vitro* y tratamiento con 17- β -estradiol, se analizaron los transcritos de círculos de *switch* a IgG1, IgG3, IgA e IgE. El análisis por qRT-PCR dos días después de la estimulación demuestra que los linfocitos B tratados con estrógeno tienen aumentada su capacidad para la reacción de CSR (Figura R-10A), de manera paralela al incremento observado en los niveles de ARNm de AID (Figura R-9A).

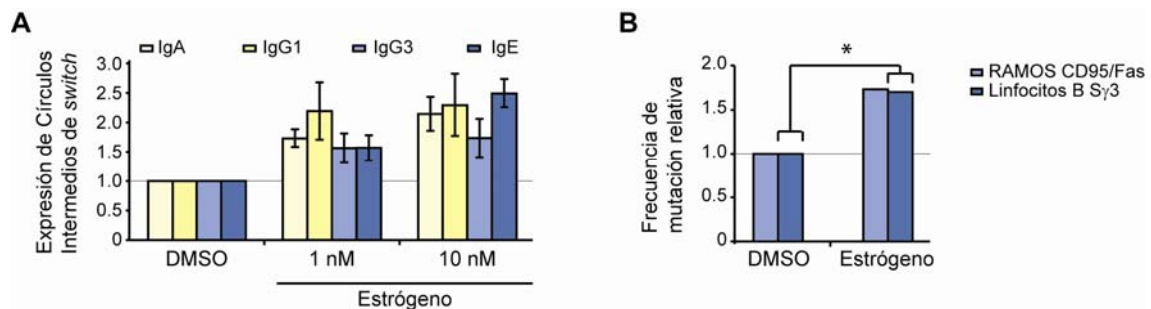


Figura R-10. El estrógeno induce CSR y SHM. (A) La eficiencia del CSR está aumentada en linfocitos B tratados con estrógeno. Se estimularon linfocitos B de bazo durante dos días con LPS e IL4 (para el isotipo IgG1 e IgE), con LPS y TGF- β (para el isotipo IgA) y con LPS (para el isotipo IgG3). Se añadió el estrógeno junto con el LPS y las citoquinas. Se determinó la eficiencia de CSR mediante la detección de los transcritos de los círculos de *switch* correspondientes a cada isotipo por qRT-PCR. Los datos se representan como cambios relativos referidos al DMSO. Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 3 experimentos independientes. (B) El estrógeno aumenta la frecuencia de mutaciones en la región CD95/Fas de células Ramos y en la S γ 3 en linfocitos B de bazo. Se cuantificó la frecuencia de mutación en la región CD95/Fas de células Ramos crecidas en presencia de 100nM de estrógeno durante alrededor de 20 pases. También se analizaron mutaciones en la región S γ 3 de linfocitos B de bazo tratados durante seis días con LPS y 10nM de estrógeno. Las frecuencias de mutación se normalizaron usando sus respectivos controles tratados con DMSO. *t test* p CD95/Fas (estrógeno vs DMSO) > 0.05 y *t test* p S γ 3 (estrógeno vs DMSO) < 0.02. Las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) se indican con un asterisco (*). Se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados.

Para estudiar si el efecto del estrógeno es también evidente en la función de AID en SHM se analizó la frecuencia de mutación en la región de *switch* $\gamma 3$ ($S\gamma 3$) de linfocitos B primarios. La actividad de AID durante el CSR lleva emparejada la generación de mutaciones en las regiones de *switch*. Por ello se puede usar la acumulación de mutaciones en estas regiones como indicadores de la actividad mutagénica de AID. Para determinar la SHM en $S\gamma 3$, se estimularon células B de bazo durante seis días con LPS y 10nM de 17- β -estradiol. En el histograma se incluyen los resultados obtenidos del análisis de unos ciento treinta clones de cada tratamiento. Encontramos incrementada la frecuencia de mutación en la región $S\gamma 3$ de linfocitos B tratados con estrógeno, comparado con los controles tratados con DMSO (6.5×10^{-4} vs 3.8×10^{-4}) (*t test* $p < 0.02$) (Figura R-10B, barras azul oscuro).

AID puede actuar sobre genes que no sean inmunoglobulinas (Müschen y col., 2000; Pasqualucci y col., 2001; Kuppers y col., 2001; Liu y col., 2008). Para analizar si el estrógeno puede inducir a AID a actuar de forma aberrante, se estudió la frecuencia de mutaciones en el gen CD95/Fas en células Ramos. La frecuencia de mutación espontánea de este gen es muy baja (de 100 a 1000 veces menor que en genes de inmunoglobulina (Muschen y col., 2000)). Secuenciamos unos 80 clones de cada genotipo. Observamos un incremento en la frecuencia de mutación del gen CD95/Fas, al igual que ocurrió con la SHM fisiológica, tras tratamiento con estrógeno comparado con el control con DMSO (1.9×10^{-4} vs 1.1×10^{-4}) (Figura R-10B, barras azul claro).

Estos resultados demuestran que el estrógeno afecta a la eficiencia del CSR y de la SHM en linfocitos B primarios. Además, el incremento de mutaciones en genes que no son inmunoglobulinas, como es el caso de CD95/Fas, indica que el estrógeno puede ejercer un efecto genotóxico en oncogenes o genes supresores de tumores.

Efecto del estrógeno en la generación de translocaciones c-myc/IgH

Los niveles de AID influyen directamente en la frecuencia de translocaciones c-myc/IgH (Figura R-6B y R-7C). Previamente se ha demostrado que el estrógeno puede inducir a AID a actuar de forma aberrante, mediante la detección del incremento de la frecuencia de mutaciones en genes distintos de los de inmunoglobulinas (Figura R-10B, barras azul claro). Para determinar si la actuación aberrante de AID, inducida por estrógeno, se traduce en un incremento de las translocaciones cromosómicas entre IgH y proto-oncogenes, se analizó la generación de translocaciones c-myc/IgH en linfocitos B primarios de ratones $p53^{+/-}$ cultivados *in vitro* en presencia de esta

hormona, usándose el fondo $p53^{+/-}$ porque es más propenso al desarrollo de estas lesiones que el $p53^{+/+}$ (Ramiro y col., 2006b). Para asegurarnos de que el genotipo $p53^{+/-}$ no interfiere en el efecto del estrógeno sobre AID previamente descrito, se analizó la expresión de AID y la eficiencia de la reacción de CSR en cultivos de linfocitos B con LPS y estrógeno a lo largo del tiempo. Observamos un incremento en la expresión de AID y de los círculos de *switch* $S\gamma 3$ en presencia de estrógeno (Figura R-11A), lo que indica que su efecto es equivalente en animales $p53^{+/-}$ al observado en los $p53^{+/+}$.

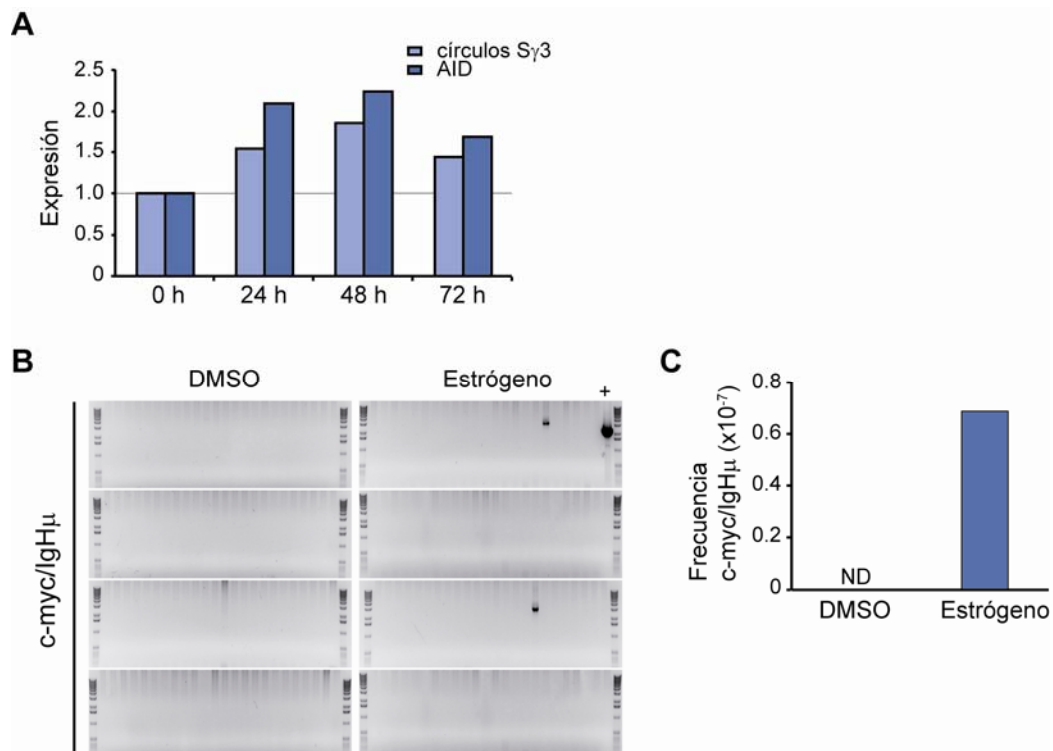


Figura R-11. El estrógeno induce translocaciones cromosómicas $c\text{-myc/IgH}\mu$ en células B activadas. (A) Los niveles de AID y de los círculos de *switch* $S\gamma 3$ aumentan tras la administración de estrógeno en células B $p53^{+/-}$. Se estimularon linfocitos B de bazo de ratones $p53^{+/-}$ durante tres días con LPS, al mismo tiempo que se añadió estrógeno 50nM. Se aisló ARN y se analizó la expresión de AID y de círculos de *switch* $S\gamma 3$ a lo largo del tiempo mediante qRT-PCR. Las barras representan la expresión (azul oscuro, de AID; azul claro, de círculos de *switch* $S\gamma 3$) relativa a la de los linfocitos B sin estimular. (B) Translocaciones $c\text{-myc/IgH}\mu$ detectadas en presencia de estrógeno en linfocitos B $p53^{+/-}$. Se estimularon *in vitro* con LPS durante tres días, en presencia (geles izquierda) o ausencia (geles derecha) de estrógeno. Para la amplificación se usaron las condiciones descritas en materiales y métodos y los oligonucleótidos representados en la figura R-5. Se muestran productos de amplificación representativos en geles teñidos con bromuro de etidio. Se usó ADN de un ratón IL6Tg como control positivo. La especificidad de los productos de amplificación se determinó por *southern blot*, mediante hibridación con una sonda para $c\text{-myc}$. (C) Frecuencia de translocaciones $c\text{-myc/IgH}\mu$ en linfocitos B de ratones $p53^{+/-}$ tratados con estrógeno. Las barras representan la frecuencia de translocaciones/número de células analizadas (7×10^7 células por condición). $n=4$, de 2 experimentos independientes. *Fisher test* p (estrógeno vs DMSO) = 0.06.

Estudiamos la frecuencia de translocaciones proximales c-myc/IgH μ en linfocitos B de bazo estimulados durante tres días con LPS y 50nM de 17- β -estradiol. Se aislaron linfocitos B de ocho ratones distintos (cuatro ratones por genotipo), y se analizó la presencia de translocaciones c-myc/IgH μ por PCR anidada (Figura R-5) en 146 millones de células (73 millones por genotipo) tras tres días de estimulación. En la figura se muestran geles de agarosa representativos, tras aislar ADN genómico y amplificar las translocaciones c-myc/IgH μ (Figura R-11B). Las translocaciones encontradas en los geles de agarosa se verificaron mediante *southern blot* con una sonda específica para c-myc. Nuestros resultados indican que la frecuencia de translocaciones c-myc/IgH μ es mayor en linfocitos B tratados con estrógeno (0.69×10^{-7}) que en los controles tratados con DMSO (no detectadas) (Figura R-11C).

Este resultado demuestra que el estrógeno promueve la generación de translocaciones c-myc/IgH en células B primarias.

En conjunto, los datos presentados en esta segunda parte nos permiten concluir que el estrógeno regula los niveles de expresión de AID y afecta a la frecuencia de translocaciones cromosómicas. Estos resultados sugieren que los fenómenos autoinmunes y tumorigénicos promovidos por estrógenos, pueden estar mecanísticamente ligados con la inestabilidad genómica mediada por AID (ver discusión).

Parte III. Análisis del efecto de la expresión de AID en distintos estadios de la diferenciación B

AID no sólo inicia las reacciones de diversificación secundaria de anticuerpos, SHM y CSR, sino que además es responsable de la generación de translocaciones cromosómicas con potencial linfomagénico. En este sentido, se ha descrito en diversos modelos de pérdida de función *in vivo* que la falta de AID retrasa o bloquea el inicio de procesos linfomagénicos, en particular aquellos que se originan a partir de células B activadas (Ramiro y col., 2004; Kovalchuk y col., 2007; Pasqualucci y col., 2008), revelando así que AID juega un papel en el desarrollo de neoplasias linfoides. Por otra parte, como se ha descrito anteriormente en este trabajo, AID es haploinsuficiente, lo que indica que la regulación de sus niveles de expresión es crítica para la actividad de AID en estos procesos. Estos resultados permiten predecir que un aumento en los niveles de expresión de AID *in vivo* podría potenciar la generación de linfomas. Sin embargo, los modelos de ganancia de función de AID *in vivo* generados hasta el momento no han sido totalmente concluyentes (Okazaki y col., 2003; Kotani y col., 2005; Muto y col., 2006; Shen y col., 2008; Morisawa y col., 2008; Robbiani y col., 2009). Son modelos de transgénicos en los que la sobre-expresión de AID ocurre de forma ubicua o específica de células B, y en ninguno de los casos se ha detectado la generación espontánea de linfomas B; éstos sólo se han observado en uno de los modelos en ausencia del gen supresor de tumores p53 (Robbiani y col., 2009). Estos datos pueden reflejar la existencia de mecanismos reguladores de la actividad de AID en contextos celulares específicos, aunque no se pueden descartar problemas técnicos derivados de la utilización de transgénicos.

Para explorar de manera sistemática el papel de AID en procesos linfomagénicos decidimos generar un modelo que nos permitiera promover la sobre-expresión de AID *in vivo* con dos premisas: i) sin depender de un transgén, para evitar los efectos secundarios de sitio de inserción y ii) de manera condicional, de modo que nos permitiera elegir el linaje o contexto celular donde tiene lugar la expresión. Para ello decidimos introducir por recombinación homóloga una copia del ADN complementario de AID (ADNc) en el *locus* endógeno Rosa26 inducible mediante un sistema basado en la recombinasa Cre. Hemos utilizado este sistema para inducir la sobre-expresión de AID en dos estadios de la diferenciación B.

Generación de un modelo murino de sobre-expresión inducida de AID

Para generar el ratón Rosa26^{AIDki/+} se utilizó un vector que contiene los brazos de homología del gen Rosa26 y un stop transcripcional flanqueado por dos sitios loxP. Elegimos el gen Rosa26 porque es un gen endógeno que se expresa ubicuamente, y su eliminación no tiene consecuencias funcionales (Friedrich y col., 1991; Zambrowicz y col., 1997; Soriano y col., 1999). El ADNc de AID se clonó a continuación del stop transcripcional en un casete que también incluye una secuencia de unión a ribosoma (IRES, del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*) y la secuencia codificante de la proteína GFP, lo que permite monitorizar la expresión de AID. La expresión de la recombinasa Cre, una enzima que reconoce, corta y vuelve a unir específicamente las secuencias cortas palindrómicas conocidas como sitios loxP (Sauer y col., 1988; revisado en Kilby y col., 1993), elimina el stop transcripcional lo que permite inducir la expresión de AID (Figura R-12A).

Este vector de *targeting* se testó *in vitro* en células 3T3 en las que se introdujo el vector de *targeting* Rosa26AID. Encontramos que la expresión de Cre en estas células inducía tanto la expresión de GFP como la de AID (dato no mostrado). A continuación, la construcción Rosa26AID se electroporó en células madre embrionarias de ratón y, tras análisis por *southern blot*, identificamos 2 clones (167 y 267) que contenían un fragmento del tamaño esperado, como resultado de la correcta integración del vector (dato no mostrado). Para verificar la construcción integrada en el clon 267 se transdujo con un vector retroviral que codifica la recombinasa Cre. Observamos que un 35% de las células transducidas con Cre, pero no con el vector vacío, expresan GFP (Figura R-12B). Asimismo, la expresión de AID analizada mediante qRT-PCR está incrementada respecto a las transducidas con el vector vacío (Figura R-12C). Se usó este clon para generar los ratones quiméricos Rosa26^{AIDki/+} mediante su agregación e implantación en hembras CD1.

Se analizó la transmisión de la construcción usando dos de los machos quiméricos generados mediante análisis por *southern blot*, usando sondas para una región del gen de neomicina y para una de GFP. Este análisis reveló que el ratón quimérico número tres transmitía la construcción (Figura R-12D), por lo que se utilizó ese macho para generar la descendencia. Todos los experimentos que se van a detallar se realizaron con ratones que poseen el fondo genético mixto Sv129-C57BL/6. Actualmente estamos generando ratones congénicos Rosa26^{AIDki/+} C57BL/6, para minimizar las variaciones relacionadas con la cepa.

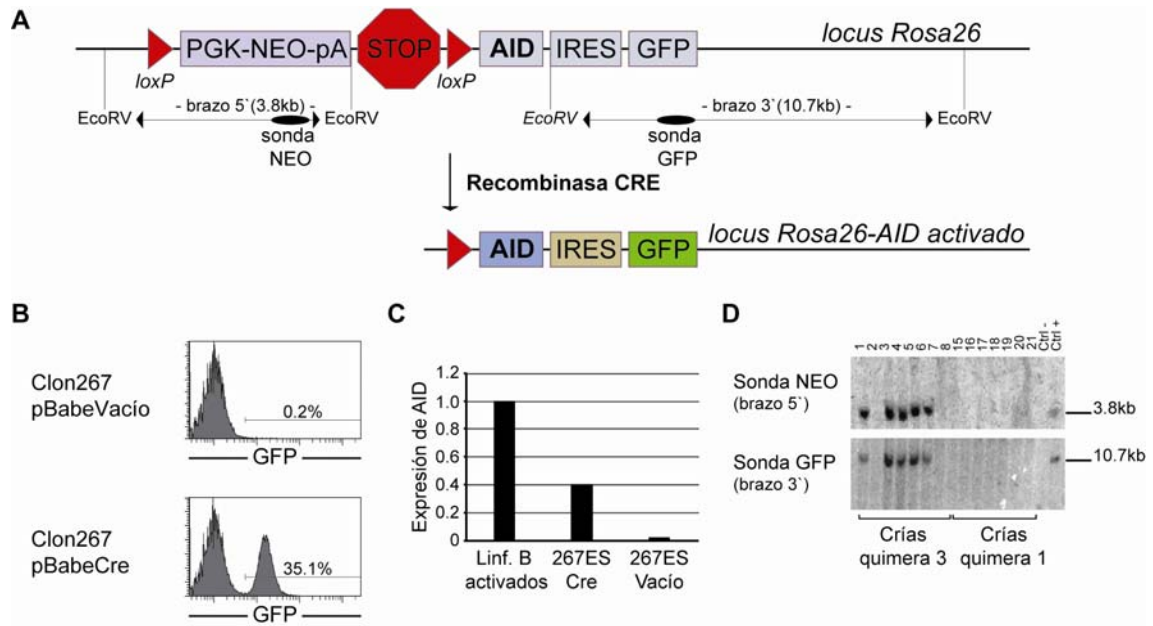


Figura R-12. Sobre-expresión inducible de AID en el *locus* de *Rosa26*. (A) Representación esquemática del vector de *targeting* R26AID integrado por recombinación homóloga en células madre. El vector contiene los brazos de homología del gen *Rosa26* y un stop transcripcional flanqueados por 2 sitios *loxP*, posteriormente el ADN complementario de AID, seguido de la secuencia *Ires* y de GFP. Se indica la localización de las 2 sondas (una en el extremo 5', identificada como Neo, y otra en el extremo 3', identificada como GFP) empleadas para hacer el análisis por *southern blot* de las células madre electroporadas con este vector. Las sondas están situadas entre los lugares de restricción de la enzima *EcoRV*. El tamaño de los fragmentos se encuentra entre paréntesis. El vector se activa al eliminar el stop transcripcional con una Cre recombinasa. (B) Células madre GFP positivas tras transducción del clon 267 con el plásmido pBabe-Cre. Se crecieron células del clon 267, se transdujeron con los vectores pBabe-Cre o pBabe-Vacío y a las 24 horas se les añadió puromicina. Se midió GFP por citometría de flujo siete días tras la transducción. Se indica el porcentaje de células GFP positivas. (C) Las células del clon 267 transducidas con pBabe-Cre expresan AID. Se aisló ARN de las células provenientes del experimento descrito en el apartado (B) y se analizó la expresión de AID mediante qRT-PCR. Las barras representan la expresión de ARNm de AID relativa a linfocitos B activados con LPS e IL4 durante tres días. (D) Transmisión del vector R26AID en la descendencia del ratón quimérico 3. *Southern blot* del ADN genómico obtenido de las crías de los ratones quiméricos 1 y 3, tras digestión con la enzima de restricción *EcoRV*. Las hibridaciones se hicieron con las sondas indicadas en el apartado (A). Las bandas esperadas y su tamaño se indican con una línea horizontal. En la parte superior están enumerados los ratones. El control positivo es ADN del clon 267, y el control negativo es ADN de un ratón salvaje Balb/c.

Expresión de GFP y diferenciación en médula de ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$

En primer lugar, y con el fin de analizar el papel de la sobre-expresión de AID en células B maduras, se generaron ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$, mediante el cruce de ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ con $CD19-Cre^{ki/+}$ (Rickert y col., 1997). Los ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ contienen en el *locus* de *Rosa26* una copia de AID precedida por dos sitios *loxP*, que flanquean un stop transcripcional. Los animales $CD19-Cre^{ki/+}$ expresan la recombinasa Cre bajo el promotor del gen que codifica para CD19, cuya expresión

es específica del linaje B (Zhou y col., 1991). La recombinación mediada por CD19-Cre ocurre de forma progresiva desde estadios tempranos de la diferenciación B y llega a ser máxima en células B *naive* (revisado en Schmidt-Suppran y col., 2007).

Para caracterizar la expresión de GFP en los ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} se extrajeron médula ósea y bazo de animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y de controles, Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}, y se marcaron las suspensiones celulares con anticuerpos específicos para las moléculas B220, CD19, IgM e IgD, que permiten caracterizar las distintas poblaciones B. Se analizó el porcentaje de células GFP⁺ en cada población. Observamos, de acuerdo con publicaciones previas (Hobeika y col., 2006; revisado en Schmidt-Suppran y col., 2007), que la expresión de GFP mediada por CD19-Cre es residual en células pre-proB, y minoritaria hasta el estadio de células B inmaduras, pero llega a ser de un 85% en células B maduras en bazo y un 90% en células B recirculantes en médula (Figura R-13). Además, observamos que la expresión de GFP es específica de linfocitos B (dato no mostrado).

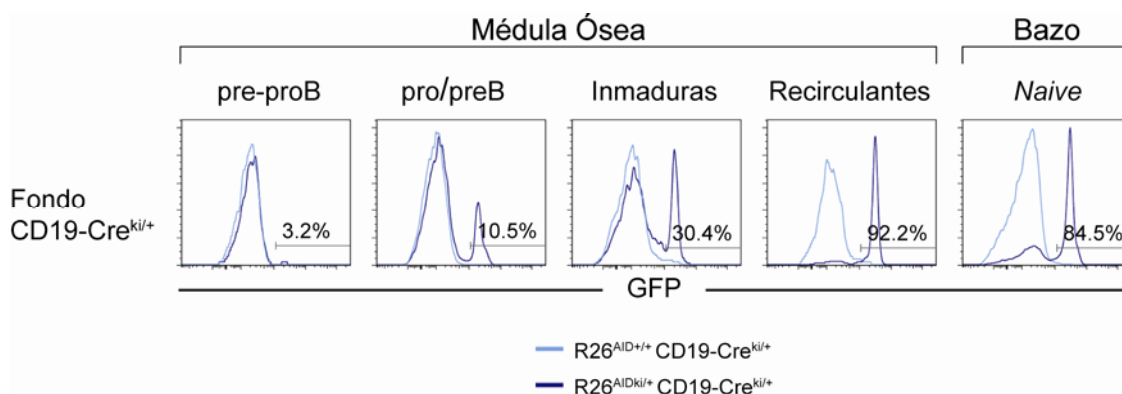


Figura R-13. Expresión de GFP durante la diferenciación B en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se extrajeron médula ósea y bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y de sus respectivos controles, Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se disgregaron y lisaron glóbulos rojos. Se midió GFP en células pre-proB (B220⁺CD19⁻, médula ósea), pro/preB (B220⁺CD19⁺IgM⁻, médula ósea), inmaduras (B220⁺CD19⁺IgM⁺, médula ósea), recirculantes (B220⁺CD19⁺IgM⁺/IgD⁺, médula ósea) y *naive* (B220⁺, bazo) mediante citometría de flujo. Se muestran imágenes representativas de los niveles de GFP de cada una de las poblaciones citadas. Se indica el porcentaje de células GFP positivas. En azul oscuro se representan los ratones que sobre-expresan AID (Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}) y en azul claro los controles (Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}). n = 5.

Para analizar las posibles alteraciones en la diferenciación B asociadas a la presencia de una copia extra de AID, se estudiaron las poblaciones de linfocitos B en médula ósea de ratones de ambos genotipos. No observamos diferencias significativas en los porcentajes de células pre-proB (B220⁺CD19⁻), pro/preB (B220⁺CD19⁺IgM⁻), inmaduras (B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD⁻) y recirculantes (B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD⁺) en médula ósea de los

ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ comparado con los controles $Rosa26^{AID+/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ (Figura R-14).

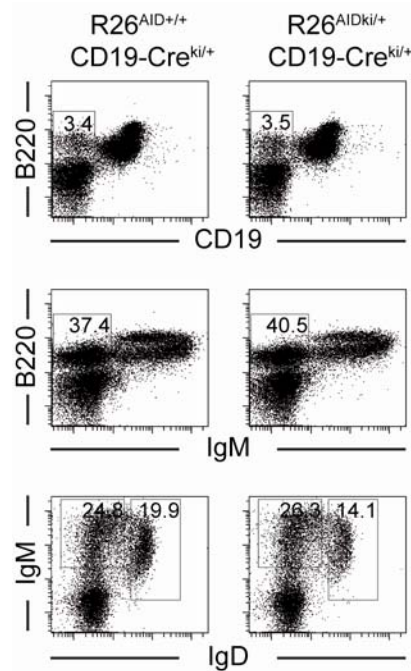


Figura R-14. Diferenciación B normal en médula ósea de ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$. Análisis de las poblaciones de linfocitos B de médula ósea de animales $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ (paneles derecha) y $Rosa26^{AID+/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ (paneles izquierda). Se extrajeron células de médula ósea, marcaron con los anticuerpos indicados y analizaron por citometría de flujo. En la figura se incluyen imágenes representativas de las células pre-proB (B220⁺CD19⁻) (paneles superiores), pro/preB (B220⁺CD19⁺IgM⁻) (paneles intermedios), inmaduras (B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD⁻) (paneles inferiores) y recirculantes (B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD⁺) (paneles inferiores). Se indica el porcentaje de células de cada población. n=5.

De estos resultados concluimos que la sobre-expresión de AID es estable y compatible con un desarrollo normal de la médula ósea en los ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$.

Expresión de AID en ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$

A continuación, quisimos determinar si la introducción de un alelo extra de AID en ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ da lugar a un incremento en los niveles de expresión de AID en comparación con los de un ratón $Rosa26^{AID+/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$, tal y como parece indicar la expresión de GFP (Figura R-13). AID se expresa fundamentalmente en células B estimuladas de centro germinal (Muramatsu y col., 1999). En condiciones fisiológicas, la expresión de AID en linfocitos B *naive* de bazo es muy baja (unas 10 veces menor que en linfocitos B activados, dato no mostrado). Para analizar la expresión de AID en el modelo $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ se aislaron linfocitos B de bazo de ratones $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ y $Rosa26^{AID+/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ y se cuantificó la expresión de AID por qRT-PCR en células *naive* y en células activadas durante tres

días en presencia de LPS e IL4. Los resultados indican que los niveles de ARNm de AID están incrementados más de 10 veces en linfocitos B *naïve* de ratón comparado con los controles Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} (Figura R-15A). En cuanto a los linfocitos B activados, la expresión de AID es 1.5-2 veces mayor en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} que en los controles Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} (Figura R-15A). A continuación se analizó la expresión de AID en centros germinales *in vivo* procedentes de placas de Peyer, en donde hay activación constitutiva de células B y CSR a IgA (Rhee y col., 2005). Se aislaron células de centro germinal de placas de Peyer Fas⁺GFP⁺ de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Fas⁺ de los Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} mediante citometría de flujo preparativa, y se analizó en ellas la expresión de AID por qRT-PCR. Observamos una expresión de AID aumentada 2 veces en centros germinales *in vivo* de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}, en comparación con la de animales Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} (Figura R-15B). La expresión de AID aumentada se mantiene en linfocitos B que salen a sangre de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} (Figura R-15C).

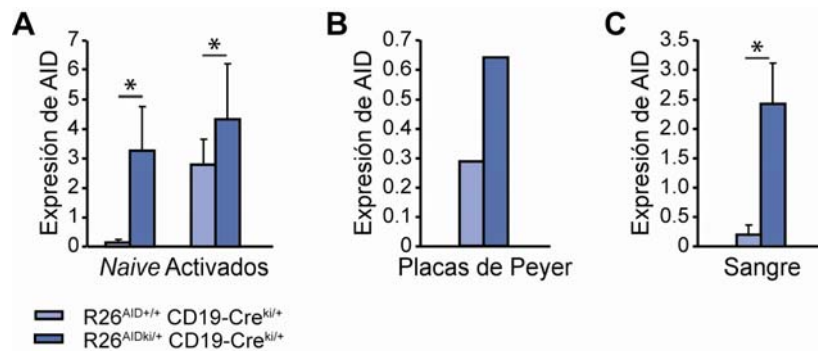


Figura R-15. Expresión aumentada de AID en linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}. (A) Los niveles de AID están aumentados en linfocitos B *naïve* y activados de bazo en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se aislaron linfocitos B de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} y estimularon durante tres días en presencia de LPS e IL4. Se aisló ARN y analizó la expresión de AID mediante qRT-PCR. Se muestran las medias y sus desviaciones estándar. Células *naïve*: n= 8; *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+})= 1x10⁻⁴. Células activadas: n= 11, de 5 experimentos independientes; *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+})= 0.02. (B) Los niveles de AID están aumentados en células B de centro germinal de placas de Peyer. Se extrajeron placas de Peyer de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se aislaron células Fas⁺GFP⁺ de un grupo de 3 ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y células Fas⁺ de un grupo de 3 ratones Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se aisló ARN y se analizó la expresión de AID mediante qRT-PCR. (C) Los niveles de AID están aumentados en sangre. Se extrajo sangre de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}, se lisaron glóbulos rojos y aisló ARN. Se analizó la expresión de AID mediante qRT-PCR. Se muestran las medias y las desviaciones estándar; n=3; *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+})= 5x10⁻³. (A-C) Las barras representan la expresión de ARNm de AID relativa a la de linfocitos B Balb/c activados durante tres días con LPS e IL4, ajustada a 1. Las diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0.05) se indican con un asterisco (*). Se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados.

Como se indicó antes, en ausencia de AID, los linfocitos B se acumulan en bazo dando lugar a una moderada esplenomegalia (Muramatsu y col., 2000; Revy y col., 2000). Y la disminución en los niveles de AID en linfocitos B $AID^{+/-}$ da lugar a un aumento del número de linfocitos B en bazo y de las células de centro germinal Fas^+GL7^+ en placas de Peyer, respecto a los controles $AID^{+/+}$ (Figura R-1B y R-1C). Aunque los ratones $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ no presentan alteraciones significativas en el número de células B de bazo (dato no mostrado), sí observamos una disminución significativa del número de placas de Peyer, así como un menor tamaño de las mismas, en ratones $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$, comparado con los controles $Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}$ (Figura R-16A). En cuanto a las células de centro germinal, no encontramos diferencias significativas en la proporción de células Fas^+GL7^+ ni en la de células IgA^+ de ratones $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ (Figura R-16B y R-16C).

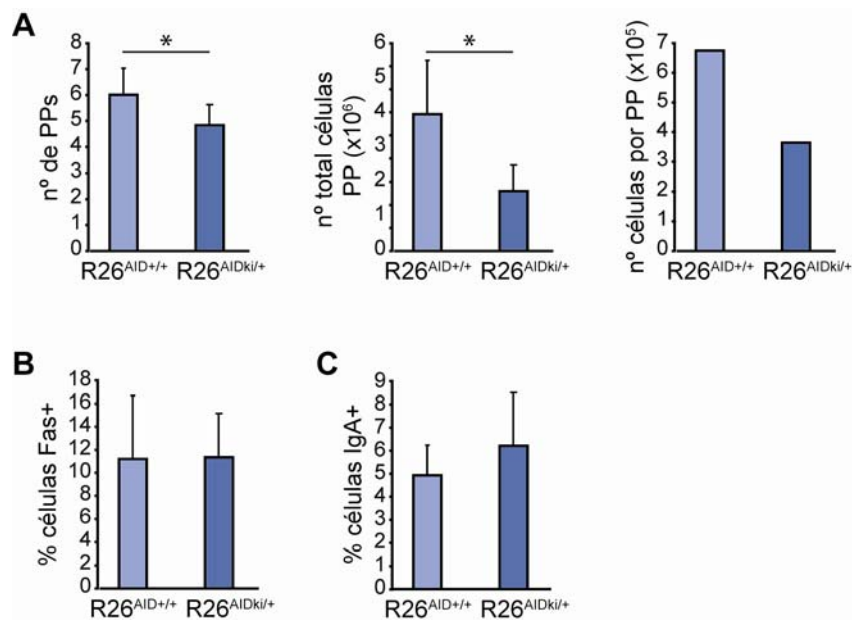


Figura R-16. Caracterización de las placas de Peyer de los ratones $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$. Se extrajeron las placas de Peyer del intestino de ratones $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ y ratones control $Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}$. (A) Las placas de Peyer de los ratones $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ son más pequeñas. Se contó el número de placas de Peyer por ratón (gráfica de la izquierda), *t test* p ($Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ vs $Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}$) = 0.02. Se disgregaron y se contó el número total de células de placas de Peyer en cada ratón (gráfica del medio), *t test* p ($Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ vs $Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}$) = 2×10^{-3} . Se estimó el número de células en cada placa de Peyer (gráfica de la derecha) mediante la relación entre el número total de células y el número de placas por ratón. n = 8-9. (B) No se aprecian diferencias en el número de células B de centro germinal de ratones $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$. Se midió el porcentaje de células Fas^+ dentro de la población B ($CD19^+$) por citometría de flujo. n = 7. (C) Ligeramente incrementadas las células IgA^+ en placas de Peyer de ratones $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$. Se midió el porcentaje de células IgA^+ dentro de los linfocitos B ($CD19^+$) por citometría de flujo. n = 14-15; *t test* p ($Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ vs $Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}$) = 0.06. (A-C) Las diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) se indican con un asterisco (*). Se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados.

Estos resultados demuestran que los ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} tienen niveles aumentados de AID en linfocitos B *naive in vivo*, y de centro germinal *in vivo* e *in vitro*. Además, el número y el tamaño de las placas de Peyer está disminuido en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}.

Reacciones de CSR y SHM en linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}

Para evaluar el efecto de poseer una copia extra de AID en la eficiencia de la reacción de CSR, se monitorizó la expresión de IgG1 e IgG3 tras estimulación *in vitro* de linfocitos B de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}. El análisis por citometría de flujo dos días después de la estimulación demuestra que los linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} tienen aumentada su capacidad para la reacción de CSR a IgG1 (Figura R-17A), lo que correlaciona con el aumento observado en los niveles de ARNm de AID en células B activadas Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} (Figura R-15A). El aumento en la eficiencia del CSR en linfocitos Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}, comparada con Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}, se puede observar a lo largo

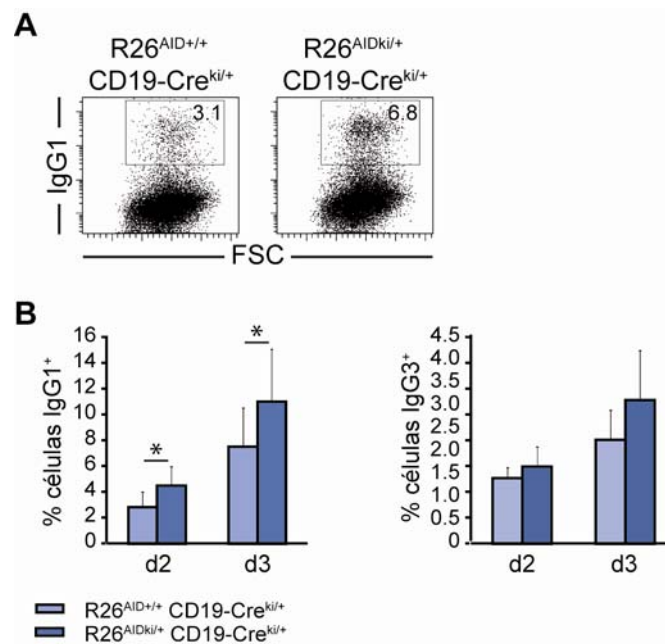


Figura R-17. CSR aumentado en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se aislaron y estimularon linfocitos B de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} con LPS e IL4, o sólo con LPS. Se midió CSR por citometría de flujo, a IgG1 e IgG3 respectivamente. (A) Se muestran imágenes representativas de expresión de IgG1 frente al tamaño celular (FSC, del inglés, *Forward Scatter*) a los dos días. Se indica el porcentaje de células IgG1⁺. (B) Análisis de CSR a IgG1 e IgG3. Se analizó CSR a IgG1 e IgG3 a los tiempos indicados tras estimulación con LPS e IL4 o sólo con LPS, respectivamente. Se indican los porcentajes de células IgG1⁺ e IgG3⁺ medidos por citometría. Se muestran las medias y sus desviaciones estándar; n (IgG1)=11, de 5 experimentos independiente; n (IgG3) = 5, de 2 experimentos independientes. *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}) para IgG1: 48h, 6x10⁻³; 72h, 0.03; y *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}) para IgG3: 48h, 0.3; 72h, 0.2. Las diferencias estadísticamente significativas (p≤ 0.05) se indican con un asterisco (*). Se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados.

de la duración del cultivo (Figura R-17B), tanto para el isotipo IgG1 (estimulación con LPS e IL4, gráfica de la izquierda) como para el IgG3 (estimulación con LPS, gráfica de la derecha).

Para estudiar si el efecto de introducir una copia extra de AID en linfocitos B es también evidente en su actividad en la reacción de SHM se analizó la acumulación de mutaciones *in vivo* en células B de placas de Peyer. Para analizar la reacción de SHM, se aislaron mediante citometría de flujo preparativa células de centro germinal Fas⁺ GFP⁺ de placas de Peyer Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Fas⁺ de los controles, Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se amplificó, clonó y secuenció la región intrónica 3' del gen JH4. Tras analizar unos 30 clones por genotipo, nuestros resultados indican que las células B de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} presentan una mayor frecuencia de mutaciones que las de ratones Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} (2.17×10^{-3} vs 1.33×10^{-3}) (Figura R-18).

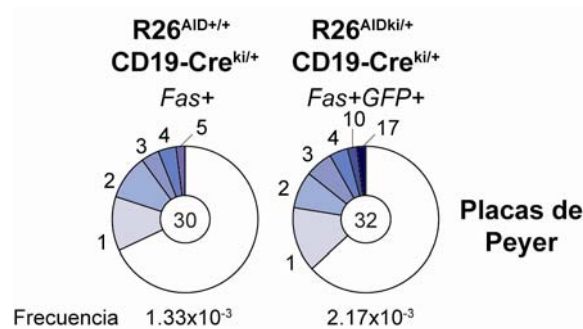


Figura R-18. SHM aumentada en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}. La frecuencia de mutaciones en la región intrónica 3' de JH4 está aumentada en células B de centro germinal de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se cuantificó la frecuencia de mutaciones en la región intrónica 3' de JH4 en linfocitos B Fas⁺GFP⁺ aislados de placas de Peyer de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Fas⁺ de Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se aislaron células de un grupo de 3 animales por genotipo. *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}) = 0.129. El área de los sectores de las gráficas es proporcional al número de secuencias JH4 que contienen el número de mutaciones indicado en los laterales. En el centro se indica el número total de secuencias independientes analizadas, mientras que la frecuencia total de mutaciones se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Para el análisis estadístico se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados.

Estos datos demuestran que los linfocitos B primarios de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} tienen aumentada la eficiencia del CSR y de SHM o, en otras palabras, que la copia extra de AID que poseen estos ratones es funcional.

Translocaciones c-myc/IgH en linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}

La frecuencia de translocaciones c-myc/IgH se relaciona directamente con los niveles de AID (Figura R-6B y R-7C). Para determinar si la presencia de una copia extra de AID se traduce en un incremento de translocaciones aberrantes entre IgH y un proto-oncogén, se analizó la generación de translocaciones c-myc/IgH en linfocitos B primarios de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} cultivados *in vitro* durante tres días con LPS e IL4. Se aislaron linfocitos B de seis ratones distintos (tres ratones por genotipo), y se analizó la presencia de translocaciones c-myc/IgH μ por PCR anidada (Figura R-5) en 20 millones de células (10 millones por genotipo). En la figura se muestran geles de agarosa representativos de translocaciones c-myc/IgH verificadas mediante *southern blot* (Figura R-19A). Los resultados indican que la frecuencia de translocaciones c-myc/IgH μ es mayor en células B activadas de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} (0.23×10^{-5}), comparado con los controles Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} (0.07×10^{-5}) (Figura R-19B).

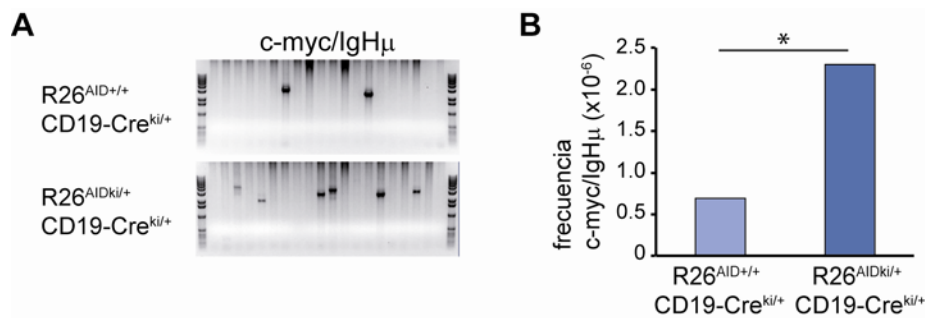


Figura R-19. La frecuencia de translocaciones cromosómicas c-myc/IgH está aumentada en linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} activados. (A) Translocaciones c-myc/IgH μ detectadas en linfocitos B de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} (gel inferior) y Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} (gel superior). Se estimularon células B *in vitro* en presencia de LPS e IL4 durante tres días. Para la amplificación se usaron las condiciones descritas en materiales y métodos y los oligonucleótidos representados en la figura R-5. Se muestran productos de amplificación representativos en geles teñidos con bromuro de etidio. La especificidad de los productos de amplificación se determinó por *southern blot* mediante hibridación con una sonda para c-myc. (B) Frecuencia de translocaciones c-myc/IgH μ en linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}. Las barras representan la frecuencia de translocaciones/número de células. n=3; Fisher test p (Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+})= 3×10^{-3} . La diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) se indica con un asterisco (*).

Por tanto, la sobre-expresión controlada de una copia extra de AID incrementa la frecuencia de translocaciones c-myc/IgH en linfocitos B activados alrededor de tres veces.

Análisis de mutaciones en la región S_{μ} de linfocitos B *naive* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}

En condiciones fisiológicas, AID se expresa a niveles altos en células B activadas, en las que tienen lugar las reacciones de SHM y CSR, mientras que los linfocitos B *naive* presentan sólo trazas de expresión de AID (dato no mostrado). Sin embargo, las células B *naive* de animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} expresan niveles de AID comparables a los de una célula B activada (Figura R-15A), lo que nos da la oportunidad de evaluar la actividad de esta enzima en un contexto celular en el que normalmente no se expresa. Para evaluar si AID es activa en células B *naive* de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}, se analizó la acumulación de mutaciones en la región de *switch* S_{μ} . Como ya se ha mencionado, AID introduce mutaciones en la región S_{μ} durante la reacción de CSR. A diferencia del resto de las regiones de *switch*, que se transcriben en respuesta a estímulos específicos de CSR, la región de *switch* S_{μ} se encuentra transcripcionalmente activa en células B *naive* (Reina-San-Martín y col., 2003). Para analizar la actividad mutagénica de AID en S_{μ} de linfocitos B *naive*, se aislaron linfocitos B de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y control Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} (cuatro animales de cada genotipo), se amplificó S_{μ} mediante PCR usando una enzima de alta fidelidad, y los productos se clonaron y secuenciaron. El análisis de las secuencias de unos 75 clones por genotipo reveló una frecuencia de mutaciones inferior a 10^{-4} para ambos genotipos (Figura R-20), muy próxima al fondo de mutaciones observado en animales AID^{-/-} (Reina-San-Martín y col., 2003), y que debe adscribirse a errores de fidelidad de la reacción de PCR.

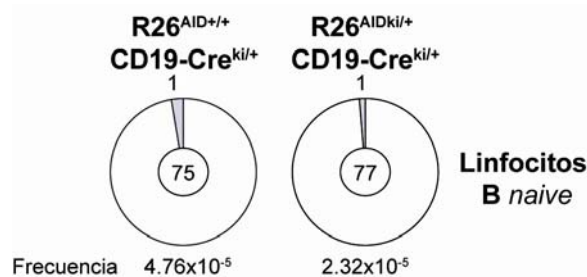


Figura R-20. Ausencia de mutaciones en S_{μ} en linfocitos B *naive* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}. Se cuantificó la frecuencia de mutación en S_{μ} en células B *naive* de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y de sus respectivos controles, Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}. n=4. El área de los sectores de las gráficas es proporcional al número de secuencias de S_{μ} que contienen el número de mutaciones indicado en los laterales. En el centro se indica el número total de secuencias independientes analizadas, mientras que la frecuencia total de mutaciones se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Para el análisis estadístico se usó el *test t de Student* de doble cola de datos despareados.

Estos resultados indican que la región S μ de células B *naive* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} no acumula mutaciones, y por tanto que la expresión de AID en estas células, aunque equivale a la observada en células B activadas, no es suficiente para que se produzca su actividad.

Análisis del potencial linfomagénico de AID en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}

Para determinar si la sobre-expresión de AID en el modelo Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} tiene potencial linfomagénico, se generó una cohorte de unos cincuenta animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y unos cincuenta animales Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} control y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos (Tabla VII). Estos animales se han observado durante un período de once meses y hasta el momento no presentan síntomas de desarrollo de linfomas (dato no mostrado). Asimismo, se generaron animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} Ink4a/Arf^{-/-} y Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} p53^{-/-} para evaluar si estos genes supresores de tumores proveen un mecanismo supresor de la linfomagénesis de este modelo (Tabla VII). También, para evaluar si la tumorigénesis es dependiente de la activación de las células B, se inmunizaron estos animales con antígenos T dependientes (Tabla VII). Estos experimentos todavía no han finalizado, pero en un futuro próximo esperamos que nos permitan concluir si el aumento de los niveles de expresión de AID en ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} contribuye a la formación de linfomas.

Tabla VII Envejecimiento de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}. Cohortes de ratones generados para estudio de desarrollo de tumores: (A) Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y sus controles Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} (fondo mixto); (B) Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y sus controles en ausencia de genes supresores de tumores. Hay 2 grupos, uno con un fondo Ink4a/Arf^{-/-} y otro con un fondo p53^{-/-}; (C) Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y sus controles inmunizados con NP-CGG a una edad comprendida entre las 9 y las 14 semanas. Se indica, en todos los casos, el número de animales en cada grupo, así como la fecha de nacimiento del mayor y del más joven.

	R26 ^{+/+} CD19-Cre ^{ki/+}		R26 ^{AIDki/+} CD19-Cre ^{ki/+}	
	número	nacimiento	número	nacimiento
Fondo mixto^(A)	49	27.02 a 16.04.2010	44	21.0215.04.2010
Genes supresores de tumores^(B)				
Fondo Ink4a/Arf ^{-/-}	66	1.07 a 14.12.2010	62	9.07 a 14.12.2010
Fondo p53 ^{-/-}	14	30.09 a 13.12.2010	22	30.09 a 3.12.2010
Inmunización (de 9-14 semanas)^(C)				
	10	27.04 a 4.05.2010	10	22.04 a 4.05. 2010
	14	12.07 a 25.07.2010	10	8.07 a 2.08.2010

En resumen, los animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} sobre-expresan AID en los últimos estadios de la diferenciación B. Concretamente es mayoritaria a partir del estadio de linfocito B *naive* y estable a partir de ese momento. El incremento de la expresión de AID tiene consecuencias funcionales en células B activadas, tanto para la diversificación secundaria de anticuerpos (SHM y CSR) como en la introducción de lesiones linfomagénicas (translocaciones c-myc/IgH). Sin embargo, la sobre-expresión de AID en células B *naive* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}, en las que en condiciones fisiológicas sus niveles son residuales, no es suficiente para que actúe (ver discusión).

Generación y análisis funcional de animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}

En segundo lugar, se generaron animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}, mediante el cruce de ratones Rosa26^{AIDki/+} con MB1-Cre^{ki/+}, lo que permite sobre-expresar AID desde estadios tempranos de la diferenciación B. Esta parte del trabajo se ha realizado en colaboración con la Dra. M^a Pilar Delgado (Grupo de Hipermutación de ADN y Cáncer, CNIO, Madrid). Los ratones Rosa26^{AIDki/+}, como se indicó previamente, contienen una copia extra de AID en el *locus* de Rosa26, precedida por dos sitios loxP, que flanquean al stop transcripcional. Los animales MB1-Cre^{ki/+} expresan la recombinasa Cre bajo el promotor del gen que codifica para MB1, cuya expresión es específica del linaje B, ya que codifica para una subunidad del BCR (revisado en Rajewsky, 1996; revisado en Manis y col., 2002). La expresión de MB1 se inicia en el estadio proB (Hobeika y col., 2006). Está descrito que los ratones MB1-Cre median una recombinación altamente eficiente desde estadios muy tempranos de la diferenciación B (Hobeika y col., 2006).

Para verificar la delección mediada por MB1-Cre en los animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} se analizó la expresión de GFP en distintos estadios de la diferenciación B. Como se indicó anteriormente, el desarrollo de los linfocitos B en médula ósea se puede caracterizar mediante análisis fenotípicos de los marcadores B220, CD19, IgM e IgD. Se extrajeron médula ósea y bazo de animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} y controles Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}, se marcaron las suspensiones celulares con anticuerpos específicos para las moléculas B220, CD19, IgM e IgD y se analizó el porcentaje de células GFP⁺ en cada población. Observamos que la expresión de GFP mediada por MB1-Cre se inicia en células pre-proB, y es prácticamente completa en linfocitos pro/preB (Figura R-21). El análisis por citometría de flujo de otros órganos demostró que la expresión de GFP es específica de linfocitos B (dato no mostrado). Estos datos indican que el modelo Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} permite adelantar la activación del *locus* Rosa26, y por tanto la expresión de AID, a estadios más

tempranos de la diferenciación B, incluyendo la expresión eficiente en células pro/preB.

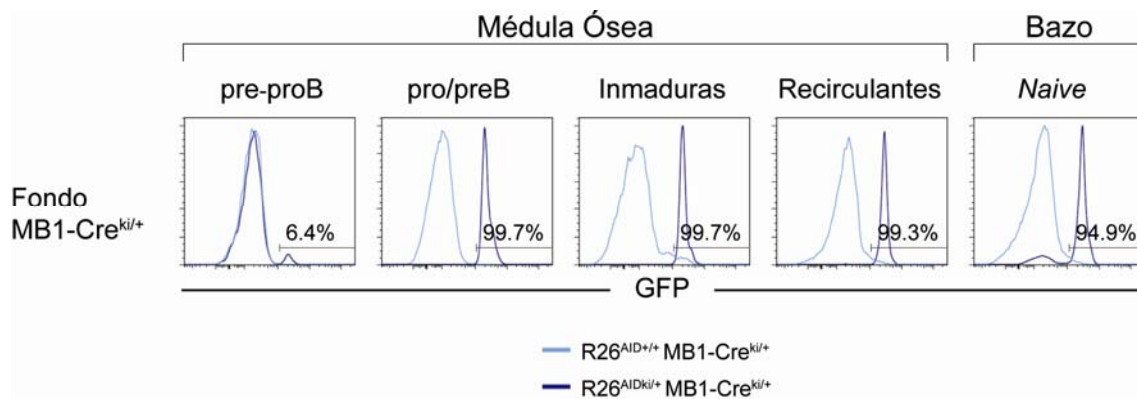


Figura R-21. Expresión de GFP durante la diferenciación B en ratones $Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}$. Se extrajeron médula ósea y bazo de ratones $Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}$ y de sus respectivos controles, $Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}$. Se disgregaron y lisaron glóbulos rojos. Se midió GFP en células pre-proB ($B220^+CD19^-$, médula ósea), pro/preB ($B220^+CD19^+IgM^-$, médula ósea), inmaduras ($B220^+CD19^+IgM^+IgD^-$, médula ósea), recirculantes ($B220^+CD19^+IgM^+IgD^+$, médula ósea) y *naive* ($B220^+$, bazo) mediante citometría de flujo. Se muestran imágenes representativas de los niveles de GFP de cada una de las poblaciones citadas. Se indica el porcentaje de células GFP positivas. En azul oscuro se representan los ratones que sobre-expresan AID ($Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}$) y en azul claro los controles ($Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}$). n = 4.

Para analizar las posibles alteraciones en la diferenciación B asociadas a la presencia de una copia extra de AID, se estudiaron las poblaciones de linfocitos B en médula ósea de ratones de ambos genotipos. Al igual que en el modelo $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$, no observamos diferencias significativas en los porcentajes de células pre-proB ($B220^+CD19^-$), pro/preB ($B220^+CD19^+IgM^-$), inmaduras ($B220^+CD19^+IgM^+IgD^-$) y recirculantes ($B220^+CD19^+IgM^+IgD^+$) en médula ósea de los ratones $Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}$ comparada con los controles $Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}$ (Figura R-22).

Para determinar si la introducción de una copia extra de AID en ratones $Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}$ da lugar a un incremento en los niveles de expresión de AID, se analizó la expresión de AID mediante qRT-PCR en células B *naive* y en células B activadas durante tres días con LPS e IL4. Los resultados indican que los niveles de ARNm de AID están incrementados unas 10 veces en linfocitos B *naive* y alrededor de 1.5 veces en linfocitos B activados $Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}$, comparado con los controles $Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}$ (Figura R-23).

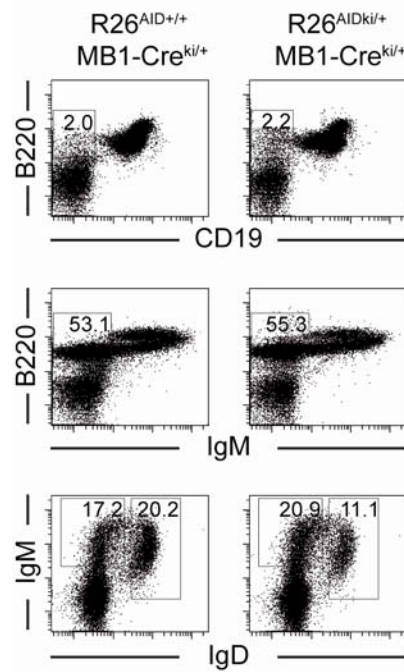


Figura R-22. Diferenciación B normal en médula ósea de ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}. Análisis de las poblaciones de linfocitos B de médula ósea de animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} (paneles derecha) y Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+} (paneles izquierda). Se extrajeron células de médula ósea, marcaron con los anticuerpos indicados y analizaron por citometría de flujo. En la figura se incluyen imágenes representativas de las células pre-proB (B220⁺CD19⁻) (paneles superiores), pro/preB (B220⁺CD19⁺IgM⁻) (paneles intermedios), inmaduras (B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD⁻) (paneles inferiores) y recirculantes (B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD⁺) (paneles inferiores). Se indica el porcentaje de células de cada población. n=4.

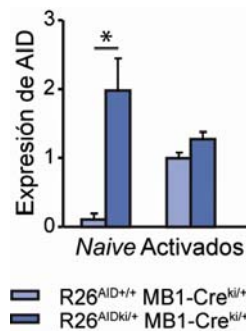


Figura R-23. Expresión aumentada de AID en linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}. Los niveles de AID están aumentados en linfocitos B *naive* y *activados* de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}. Se aislaron linfocitos B de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+} y estimularon durante tres días en presencia de LPS e IL4. Se aisló ARN y analizó la expresión de AID mediante qRT-PCR. Se muestran las medias y sus desviaciones estándar. Células *naive*: n= 2; *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+})= 0.03. Células *activadas*: n= 2, *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+})= 0.08. Las barras representan la expresión de ARNm de AID relativa a la de linfocitos B control Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+} *activados* durante tres días con LPS e IL4, ajustada a 1. Las diferencias estadísticamente significativas (p< 0.05) se indican con un asterisco (*). Se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados.

Para comprobar si la sobre-expresión de AID es funcional en animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}, se estudió si existe una mayor eficiencia de la reacción de CSR. Para ello, se monitorizó la expresión de IgG1 tras estimulación *in vitro* de linfocitos B de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}. El análisis por citometría de flujo dos días tras la estimulación con LPS e IL4, demuestra que los linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} tienen aumentada su capacidad para la reacción de CSR a IgG1 (Figura R-24A). Observamos el aumento en la eficiencia del CSR en linfocitos Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}, comparada con la de los Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}, a lo largo de la duración del cultivo (Figura R-24B). El incremento en CSR es paralelo al aumento observado en los niveles de ARNm de AID en células B activadas Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} (Figura R-23). Estos resultados indican que la sobre-expresión de AID en animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} es funcional.

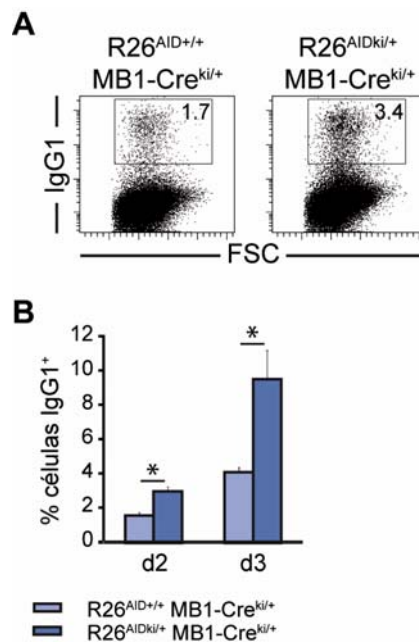


Figura R-24. CSR aumentado en ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}. Se aislaron y estimularon linfocitos B de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+} con LPS e IL4. Se midió CSR a IgG1 por citometría de flujo. (A) Se muestran imágenes representativas de expresión de IgG1 frente al tamaño celular (FSC) a los dos días. Se indica el porcentaje de células IgG1⁺. (B) Análisis de CSR a IgG1. Se analizó CSR a los tiempos indicados tras estimulación con LPS e IL4. Se indican los porcentajes de células IgG1⁺ medidos por citometría. Se muestran las medias y sus desviaciones estándar; n=2. *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}) para IgG1: 48h, 0.01; 72h, 0.04. Las diferencias estadísticamente significativas (p ≤ 0.05) se indican con un asterisco (*). Se usó el *test t de Student* de doble cola de datos desapareados.

De estos resultados concluimos que la activación del *locus* Rosa26AID en los ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} es completa en estadios tempranos de la diferenciación B y ésta es compatible con un desarrollo normal en médula ósea. Esta activación da lugar a un incremento en los niveles de AID y de la función en CSR en células B maduras equivalente a los observados en animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} (Figura R-15A y R-17B).

Análisis de mutaciones en la región S μ de linfocitos B *naive* Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}

Los resultados anteriores demuestran que el modelo Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} permite la sobre-expresión temprana de AID y un incremento funcional de la enzima en células B activadas. Como en el caso de los animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}, las células B *naive* de los ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} tienen niveles de expresión de AID muy superiores a los niveles fisiológicos en este estadio de diferenciación, y similares a los encontrados en células B activadas de ratones control. Para abordar la funcionalidad de AID en este contexto celular, se analizó la acumulación de mutaciones en S μ en células B *naive* de bazo de animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}. Para ello, se amplificó un fragmento de S μ de dos animales de cada genotipo con una enzima de alta fidelidad, se clonó y se secuenciaron más de 50 clones de cada genotipo. Observamos una frecuencia de mutaciones 3 veces incrementada en los ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} (1.98×10^{-4}), comparada con la de los ratones control Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+} (6.38×10^{-5}), en los que las mutaciones observadas presumiblemente se deban a errores de fidelidad de la reacción de PCR (Figura R-25).

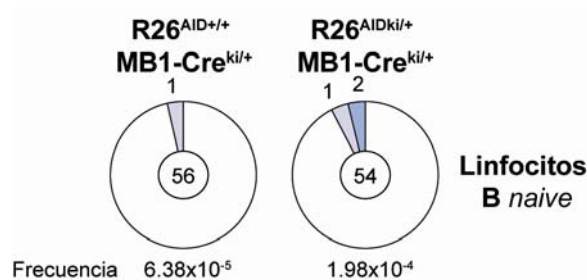


Figura R-25. Presencia de mutaciones en S μ en linfocitos B *naive* Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}. Se cuantificó la frecuencia de mutación en S μ en células B *naive* de bazo de ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} y de sus respectivos controles, Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}. n=2; *t test* p (Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} vs Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+})=0.223. El área de los sectores de las gráficas es proporcional al número de secuencias de S μ que contienen el número de mutaciones indicado en los laterales. En el centro se indica el número total de secuencias independientes analizadas, mientras que la frecuencia total de mutaciones se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Para el análisis estadístico se usó el *test t de Student* de doble cola de datos despareados.

Efecto de la proliferación en células B *naive* Rosa26^{AIDki/+} CD19Cre^{ki/+}

El resultado anterior indica una diferencia en la frecuencia de mutaciones acumuladas en la región S μ de células B *naive* de ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}. Ambos modelos presentan niveles equivalentes de expresión de AID en este compartimento y en estadios más maduros, sin embargo el inicio de la expresión del *locus* Rosa26 es muy anterior en ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}, en donde la totalidad de células preB presentan niveles altos de expresión de GFP. Por ello razonamos que posiblemente las mutaciones observadas en células *naive* Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} pueden haberse introducido en estadios anteriores de la diferenciación en médula ósea, en particular en la ventana temporal en la que la expresión de GFP se observa preferencialmente en este último modelo. Esta hipótesis se está testando mediante secuenciación de S μ en poblaciones de médula ósea. Las células preB, a diferencia de las células B inmaduras o las células *naive*, tienen una altísima tasa proliferativa. Nos preguntamos si la actividad de AID está vinculada a la proliferación celular, lo que explicaría que su expresión en células *naive* quiescentes no sea suficiente para promover la acumulación de mutaciones, pero sí en células preB.

Para comprobar esta hipótesis, buscamos unas condiciones de estimulación en las que las células B *naive* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} proliferen en ausencia de otros fenómenos asociados con el CSR, tales como la inducción de AID y la transcripción de S γ 1 en línea germinal, y en esa situación analizar cuál es la frecuencia de mutaciones en S μ . Recientemente se ha observado que el estímulo con anti-CD40 permite inducir proliferación de forma independiente a la reacción de CSR (Hasham y col., 2010), aunque esta estimulación no se ha caracterizado en detalle. En primer lugar se analizaron los efectos de este protocolo de estimulación en linfocitos B de cuatro ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y cuatro controles, Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}, en dos experimentos independientes, que se marcaron con PKH26 y se estimularon *in vitro* con anti-CD40. El PKH26 es un colorante fluorescente vital de membrana, de modo que cuando la célula se divide se distribuye homogéneamente en la progenie, por lo que medimos proliferación por dilución de PKH26. Observamos por citometría que las células B estimuladas con anti-CD40 proliferan, aunque de forma más lenta que las células estimuladas con anti-CD40 e IL4 (Figura R-26A) –incluidas como control-. No observamos diferencias significativas entre las células Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y las Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+} en proliferación (Figura R-26A). A diferencia del estímulo con anti-CD40 e IL4, el tratamiento con anti-CD40 no induce CSR a IgG1 (Figura R-26B),

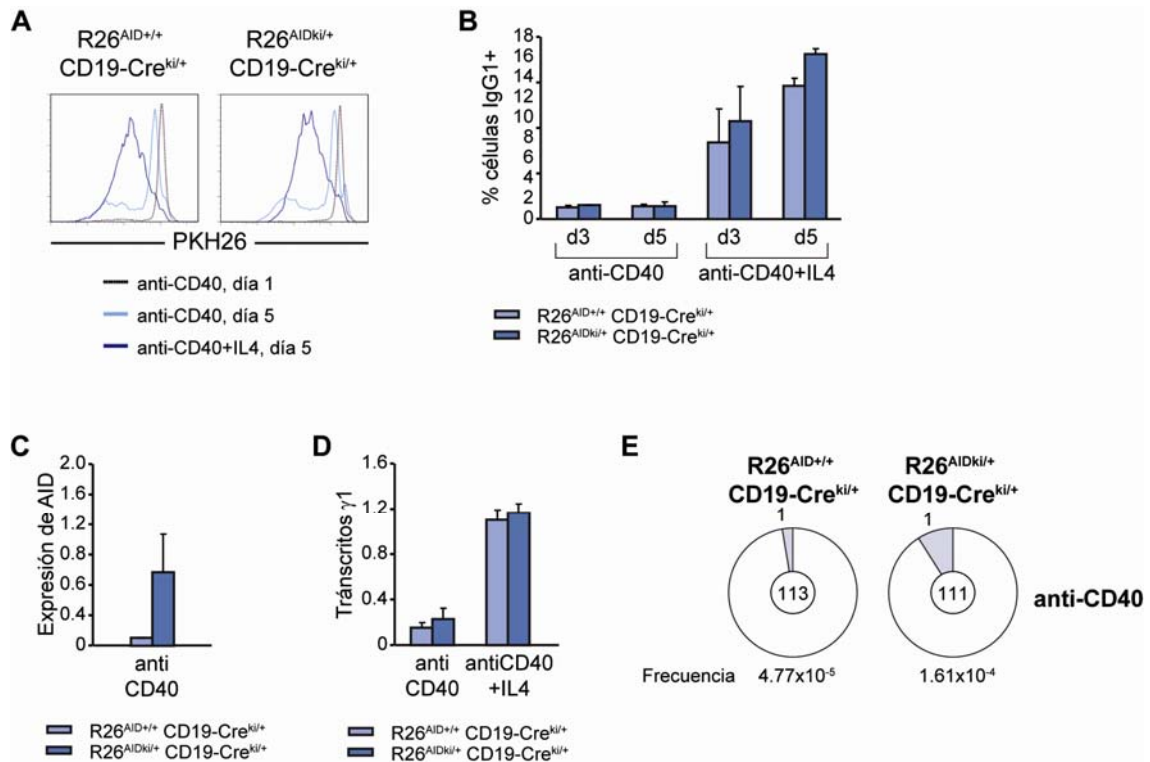


Figura R-26. La proliferación de linfocitos B $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ induce mutaciones en S_{μ} . Se aislaron, marcaron con PKH26 y estimularon linfocitos B de bazo de ratones $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ y $Rosa26^{AID+/+} CD19-Cre^{ki/+}$ con anti-CD40 y con anti-CD40 e IL4. (A) Proliferación tras estimulación con anti-CD40. La división celular se mide por dilución de PKH26 usando citometría de flujo. Los histogramas muestran perfiles representativos de PKH26 a día 1 y día 5 de estimulación (línea azul oscuro, anti-CD40 e IL4 día 5, línea azul claro, anti-CD40 día 5, línea discontinua negra, anti-CD40 día 1). (B) Ausencia de CSR en linfocitos B proliferativos estimulados con anti-CD40. Se midió CSR a IgG1 mediante citometría de flujo a los tiempos indicados (eje X) tras estimulación con anti-CD40 sólo o con anti-CD40 e IL4. (C) Expresión de AID tras estimulación con anti-CD40. Se aisló ARN y analizó la expresión de AID mediante qRT-PCR en los linfocitos B estimulados durante cinco días con anti-CD40 sólo. Se muestra la media y su desviación estándar. Las barras representan la expresión de ARNm de AID relativa a la de los linfocitos B activados durante tres días con LPS e IL4, ajustada a 1. (D) Ausencia de transcritos $\gamma 1$ tras estimulación con anti-CD40. Se aisló ARN y analizó la expresión de transcritos de línea germinal $\gamma 1$ mediante qRT-PCR en los linfocitos B estimulados durante cinco días con anti-CD40 sólo y anti-CD40 e IL4. Se muestran las medias y sus desviaciones estándar. (E) Presencia de mutaciones en S_{μ} en linfocitos B $Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}$ en condiciones de proliferación. Se cuantificó la frecuencia de mutación en S_{μ} en linfocitos B tras cinco días de activación con anti-CD40. $n=4$, de 2 experimentos independientes; t test p ($Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}$ vs $Rosa26^{AID+/+} MB1-Cre^{ki/+}$)=0.04. El área de los sectores de las gráficas es proporcional al número de secuencias de S_{μ} que contienen el número de mutaciones indicado en los laterales. En el centro se indica el número total de secuencias independientes analizadas, mientras que la frecuencia total de mutaciones se muestra en la parte inferior de cada gráfica. Para el análisis estadístico se usó el test t de Student de doble cola de datos desapareados.

ni a ningún otro isotipo (dato no mostrado). Este comportamiento proliferativo y de ausencia de CSR fue estable a lo largo de la duración del cultivo con anti-CD40 en

ambos genotipos. Tras cinco días de estimulación con anti-CD40 se analizó la expresión de AID mediante qRT-PCR y observamos que este estímulo no induce expresión significativa de AID en células de ratones control Rosa26^{AID^{+/+}} CD19-Cre^{ki/+}. Por el contrario, las células Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} presentan niveles de AID equivalentes a los observados en células *naive*, como consecuencia de la activación del *locus* Rosa26 (Figura R-26C). Finalmente, se analizó la transcripción en línea germinal de S γ 1, la cual es imprescindible para que tenga lugar el CSR a IgG1. No se detectan niveles significativos de transcritos γ 1 en los linfocitos Rosa26^{AID^{+/+}} CD19-Cre^{ki/+} o Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} activados con anti-CD40 (Figura R-26D), mientras que el estímulo con anti-CD40 e IL4 –incluido como control positivo– induce niveles altos de transcritos γ 1. Esta caracterización indica que la estimulación con anti-CD40 permite inducir la proliferación de células B *naive* sin promover CSR, y que presumiblemente la ausencia de CSR se debe a que anti-CD40 no estimula la expresión de AID ni la transcripción en línea germinal de S γ 1. Por tanto, disponemos de un sistema *in vitro* apropiado para estudiar si las mutaciones detectadas en linfocitos B *naive* Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} pueden estar asociadas a la proliferación de las células que contienen AID. Se analizó la frecuencia de mutaciones en la región 5' S μ de las células B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} que habían sido estimuladas con anti-CD40 durante cinco días. Tras posterior PCR, clonaje y secuenciación de más de 110 clones por genotipo, observamos que la inducción de proliferación en linfocitos B *naive* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} conlleva un incremento de 3 veces en la frecuencia de mutaciones en S μ comparado con los controles Rosa26^{AID^{+/+}} CD19-Cre^{ki/+} (1.61x10⁻⁴ vs 4.77x10⁻⁵) (Figura R-26E), siendo la frecuencia de SHM comparable a la observada *in vivo* en ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} (Figura R-25).

Por tanto, este resultado indica que la proliferación celular puede ser un requerimiento determinante para permitir la actividad de AID y la acumulación de mutaciones.

Análisis del potencial linfomagénico de AID en ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}

De forma paralela a los estudios linfomagénicos iniciados con animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}, se están generando cohortes de animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}, incluyendo cruces con líneas deficientes en genes supresores de tumores (p53 e Ink4a/Arf). Además, los resultados que vinculan la actividad de AID con proliferación celular nos han llevado a abordar el potencial linfomagénico de estos animales en un contexto proliferativo *in vivo*, a través de la inmunización de los animales de este modelo con antígenos T dependientes. Esperamos que esta combinación de

abordajes nos permita determinar el papel pro-linfomagénico de AID en distintos contextos celulares.

En resumen, los animales $Rosa26^{AIDki/+}$ $MB1-Cre^{ki/+}$ sobre-expresan AID en estadios tempranos de la diferenciación B en médula ósea. Al igual que en el modelo $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$, el incremento de la expresión de AID tiene consecuencias funcionales en linfocitos B activados. En este caso, y a diferencia de lo que ocurre en el modelo $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$, las células B *naive* $Rosa26^{AIDki/+}$ $MB1-Cre^{ki/+}$ contienen mutaciones en la región transcripcionalmente activa S_{μ} . De estos resultados se deduce que probablemente dichas mutaciones provengan de un estadio previo de la diferenciación B en la médula ósea. La inducción de mutaciones en S_{μ} en células B $Rosa26^{AIDki/+}$ $CD19-Cre^{ki/+}$ en condiciones proliferativas *in vitro*, nos hace pensar que la actividad de AID dependiente de contexto celular está asociada a proliferación celular (ver discusión).

Discusión

La discusión razonada es el alma de la ciencia.

Carl Sagan

AID inicia las reacciones de SHM y CSR a través de la desaminación de citosinas de los *loci* de inmunoglobulinas (Muramatsu y col., 2000; Revy y col., 2000; Okazaki y col., 2002; Yoshikawa y col., 2002). El papel fundamental de esta enzima en la respuesta inmune queda reflejado en que la ausencia de AID da lugar a un síndrome de inmunodeficiencia en humanos (Revy y col., 2000). Sin embargo, AID también puede generar lesiones no deseadas en el ADN, tales como translocaciones cromosómicas potencialmente linfomagénicas (Ramiro y col., 2004; Ramiro y col., 2006a; Dorsett y col., 2007). Dada esta ambivalencia en la actividad de AID, deben existir mecanismos reguladores que garanticen su función en la diversificación secundaria de anticuerpos minimizando el riesgo de daño en el genoma. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de algunos de estos mecanismos.

Papel de la dosis génica de AID en la diversificación secundaria de anticuerpos y en la generación de translocaciones cromosómicas c-myc/IgH

Para estudiar si existe un papel regulatorio de la actividad de AID relacionado con la dosis que contiene una célula hemos restringido la dosis de AID *in vivo*. Se generaron ratones que contienen un único alelo de AID, lo que se tradujo en una expresión reducida a la mitad de los niveles de AID. Esta reducción se debe a una disminución de los niveles totales de AID en cada célula, ya que la transcripción de AID es bialélica (Takizawa y col., 2008).

Los animales AID^{+/-} tienen limitada su eficiencia para efectuar *in vitro* la reacción de cambio de isotipo en un 50%, lo que está de acuerdo con los datos publicados por otros laboratorios en el mismo período de tiempo (McBride y col., 2008; Takizawa y col., 2008). Este resultado indica que la eficiencia de la reacción de CSR, responsable de la diversidad funcional del repertorio de anticuerpos para eliminar patógenos, es dosis dependiente de los niveles de AID. Además, este efecto de dosis dependencia está reforzado por la observación de que la sobre-expresión de AID con un vector retroviral da lugar a un incremento en la reacción de CSR en las células que contienen más AID. Por otra parte, los animales AID^{+/-} tienen limitada *in vitro* e *in vivo* su eficiencia para desarrollar la reacción de hipermutación somática responsable de dotar a los anticuerpos de una afinidad mejorada para reconocer al antígeno. Estos resultados indican que las reacciones responsables de la diversificación secundaria de

anticuerpos están limitadas por la dosis génica de AID, o dicho de otro modo, que AID es haploinsuficiente para las reacciones de CSR y SHM, entendiéndose por haploinsuficiencia la existencia de cambios fenotípicos asociados a una reducción de la dosis génica del 50%. Estos resultados indican que para el desarrollo de una respuesta inmune secundaria eficiente las células B deben poseer su dosis génica completa de AID.

El Síndrome de Hiper-inmunoglobulinemia tipo 2 (HIGM2) en humanos está asociada con mutaciones en el gen que codifica AID y es una enfermedad considerada autosómica recesiva (Revy y col., 2000; Kasahara y col., 2003; Zhu y col., 2003; Quartier y col., 2004). Se puede explicar esta aparente discrepancia entre los datos sobre la haploinsuficiencia de AID observada en ratones y los datos en humanos por el hecho de que los pacientes HIGM2 poseen un fenotipo clínico relativamente suave y variable, presumiblemente por la contribución de distintos factores genéticos y ambientales (Revy y col., 2000; Quartier y col., 2004; Imai y col., 2005). Entre los primeros, es importante mencionar que se han identificado numerosas mutaciones diferentes en el gen de AID de los pacientes HIGM2, de penetrancia muy variable en las reacciones de CSR y SHM, siendo lo más habitual que ambas estén alteradas y que los niveles de IgM sean normales o incrementados y muy bajos o ausentes los de IgG, IgA e IgE (Revy y col., 2000; Ta y col., 2003; Quartier y col., 2004; Imai y col., 2005). Por otra parte el número de pacientes HIGM2 bien caracterizados es muy pequeño (revisado en Durandy y col., 2005), lo cual dificulta el establecimiento de las relaciones entre genotipo y fenotipo. Por ello, cabría esperar que los individuos heterocigotos no presenten manifestaciones clínicas, o que éstas sean muy poco severas.

Los ratones transgénicos para la IL6 en presencia de AID desarrollan hiperplasia de nódulos linfáticos y posteriormente plasmacitomas como resultado de la desregulación del gen *c-myc* por translocación al *locus* de IgH. La deficiencia en AID en estos ratones cursa con ausencia de translocaciones *c-myc*/IgH y retraso de la hiperplasia y la mortalidad (Ramiro y col, 2004). Observamos que los ratones IL6Tg que poseen una sólo copia de AID (IL6TgAID^{+/-}) tienen una frecuencia disminuida de este tipo de lesiones en sus nódulos linfáticos hiperplásicos. Además, no detectamos ninguna translocación entre el proto-oncogen *c-myc* y la región más distal del *locus* de IgH (*c-myc*/IgH α). Aunque el número de muestras analizadas no permite concluir que la ausencia de este tipo de lesiones es absoluta, este resultado indica que las translocaciones que implican a la región de *switch* α (S α) son infrecuentes cuando

disminuye la cantidad de AID. Éste dato se relaciona con la observación de que la frecuencia de mutaciones en $S\alpha$ es mucho menor que en $S\mu$ (Xue y col., 2006) y podría indicar que, en presencia de una única copia de AID, y dado que en general la accesibilidad de AID a la región $S\alpha$ es baja, las lesiones que originan una rotura en el ADN de doble cadena (DSB) en esta región son muy raras, cayendo fuera de nuestro límite de detección. Además, la generación de translocaciones distales (c-myc/IgH α) está asociada a los estadios más avanzados de la patología, siendo presumiblemente su aparición secundaria a la de las translocaciones proximales (c-myc/IgH μ) (Kovalchuk y col., 1997).

El análisis de translocaciones c-myc/IgH en linfocitos B AID^{+/-} estimulados *in vitro*, en un fondo genético propenso al desarrollo de las translocaciones como es el p53^{+/-}, nos permitió afianzar el resultado observado *in vivo* con el modelo de ratones IL6TgAID^{+/-}. Además, el análisis *in vitro* permite analizar la frecuencia real de estas lesiones sin la contribución de los procesos selectivos presentes en el modelo *in vivo*. Nuestros datos demuestran sin lugar a dudas que la reducción en los niveles de AID da lugar a una disminución significativa de la frecuencia de las translocaciones c-myc/IgH. Esta reducción no está acompañada por modificaciones en la localización o naturaleza de las fusiones entre los dos cromosomas, lo cual indica que la reducción de la dosis de AID afecta sólo a la frecuencia del *targeting*, pero no a su especificidad. Por tanto, estos resultados demuestran que la generación de lesiones linfomagénicas se encuentra limitada por la dosis génica de AID, es decir, que AID también es haploinsuficiente para promover translocaciones cromosómicas c-myc/IgH *in vivo* e *in vitro*.

Además, previamente se ha descrito que la frecuencia de translocaciones c-myc/IgH aumenta exponencialmente con la sobre-expresión de AID en linfocitos B primarios. Concretamente, un incremento de 10 veces en los niveles de proteína AID se relaciona con un aumento del orden de 1000 veces en la frecuencia de estas translocaciones (Ramiro y col., 2006a). Ésto parece indicar que al sobrepasar un umbral de expresión de AID, los mecanismos que protegen de este tipo de lesiones se saturan y se dispara el número de lesiones linfomagénicas de un modo no lineal. Además, en estudios previos se ha observado una mayor supervivencia de ratones IL6TgAID^{+/-} comparado con los controles IL6TgAID^{+/+} (7.9 meses vs 5.5 meses) (Ramiro y col., 2004; Dorsett y col., 2007) y, más recientemente, se ha publicado que en los ratones AID^{+/-} en un fondo transgénico Bcl-xL existe un retraso en la generación

de plasmacitomas tras la inyección de pristano (Takizawa y col., 2008). Todas estas observaciones indican que la haploinsuficiencia de AID es relevante en la progresión tumoral en ratones.

En resumen, en esta parte hemos demostrado que la presencia de un sólo alelo de AID reduce la eficiencia de los procesos de diversificación secundaria de los anticuerpos así como la introducción de lesiones linfomagénicas. Esto indica que la dosis génica de AID es limitante para el desarrollo de su función, es decir, que AID es haploinsuficiente. La condición de haploinsuficiencia es excepcional en genes que codifican para actividades enzimáticas, como es el caso de AID, lo que refuerza la importancia de los mecanismos que regulan su actividad. Estos resultados sugieren que la restricción de los niveles fisiológicos de AID puede ser un mecanismo que asegura un balance óptimo entre una función inmune eficiente y un riesgo minimizado de inestabilidad genómica (Figura D-1).

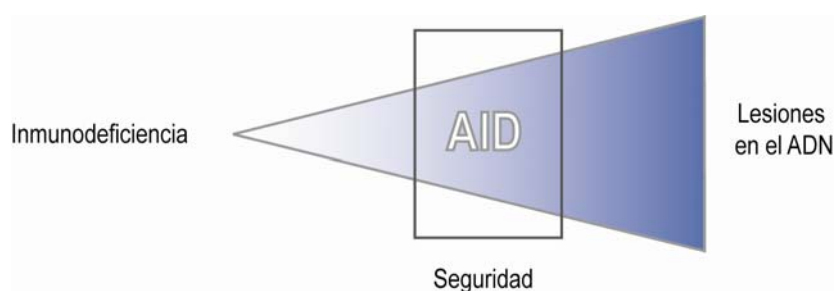


Figura D-1. Niveles de expresión de AID como mecanismo regulador de su actividad. Los niveles de AID deben estar perfectamente controlados para el correcto desarrollo de la respuesta inmune, a la vez que para evitar concurrir en fenómenos de inmunodeficiencia y lesiones linfomagénicas.

Regulación de AID mediada por estrógeno

La participación de las hormonas en múltiples procesos fisiológicos y patogénicos está bien documentada (revisado en McDonnell y col., 2002; revisado en Whitacre, 2001; Hulka y col., 1995; Shang y col., 2006). Existen varias hipótesis que relacionan el desarrollo de patologías con hormonas, la mayoría se deben a que median una proliferación exacerbada, una diferenciación desregulada, alteraciones en la reparación del ADN o represión de la apoptosis (revisado en Roy y col., 1999). Aquí proponemos un nuevo mecanismo por el cual la hormona sexual femenina 17- β -estradiol puede mediar inestabilidad genómica a través de la inducción directa de la

actividad desaminasa de AID. El estrógeno promueve la activación de la expresión de AID, por unión a sus elementos de respuesta identificados en el promotor de AID (Figura D-2). Esta activación tiene como consecuencia un aumento moderado de la eficiencia de las reacciones de SHM y CSR, siendo más pronunciado el efecto en la inducción de translocaciones c-myc/IgH. Además, el tratamiento con estrógeno produce un aumento en la frecuencia de mutaciones en genes que no son potenciales dianas de la actividad de AID, tales como CD95/Fas. Estos resultados indican que la actividad de AID está regulada transcripcionalmente vía estrógeno. Posteriormente se ha descrito que la hormona sexual progesterona suprime la activación transcripcional de AID (Pauklin y col., 2009), también por unión directa a su promotor. La combinación de estos resultados indica que la expresión de AID forma parte de un complejo sistema regulado hormonalmente.

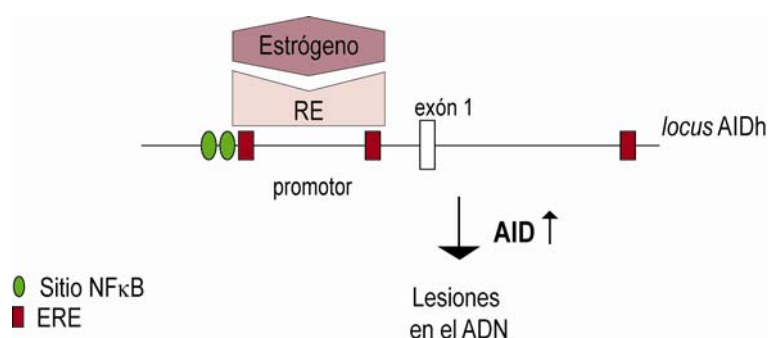


Figura D-2. Inestabilidad genómica mediada por estrógeno. El tratamiento con estrógeno conlleva un notable incremento de las lesiones en el ADN por activación directa de la expresión de AID, además de observarse un moderado aumento de las reacciones de CSR y SHM. Este dato sugiere que, al menos en parte, los procesos autoinmunes y oncogénicos inducidos por estrógeno podrían derivar de la inestabilidad genómica mediada por AID.

Estudios clínicos y epidemiológicos indican que las mujeres son más propensas a desarrollar patologías autoinmunes que los hombres (revisado en Nalbandian y col., 2005; revisado en Peeva y col., 2005; Li y col., 2007). Son enfermedades en las que existen una gran variedad de factores implicados, sin conocerse hasta la fecha todos ellos. La expresión de AID se relaciona con patologías autoinmunes. Así, los pacientes de lupus eritematoso poseen niveles aumentados de la proteína AID (revisado en Grimaldi, 2006). Además, en modelos murinos de autoinmunidad se ha observado producción de auto-anticuerpos y sobre-expresión de AID en animales BXD2 (Hsu y col., 2007) y una disminución drástica de los problemas renales en el modelo de lupus MRL/lpr en ausencia de AID (Jiang y col., 2007). Todas estas observaciones introducen un nuevo factor en la ecuación de las posibles causas de la autoinmunidad

y de su mayor prevalencia en mujeres, siendo una posible hipótesis que el estrógeno estimule la expresión de AID, y facilite la generación de anticuerpos patogénicos con alta afinidad por proteínas propias.

El estrógeno se ha relacionado con varios tipos de tumores, como son el de mama, el de ovario y el endometrial. Sin embargo, el estrógeno no tiene capacidad mutagénica directa, sólo inductora de mitosis y consecuente división celular. Se han identificado dos mecanismos por los cuales el estrógeno puede conducir a tumorigénesis ([revisado en Yager y col., 2006](#)): i) producción de metabolitos mutagénicos como consecuencia del metabolismo del estrógeno, o bien ii) expresión alterada de distintos genes por unión del estrógeno. Si uno de ellos es el que codifica para AID, el estrógeno actuaría como inductor de la actividad mutagénica ilegítima de esta enzima sobre distintos genes, como por ejemplo el CD95/Fas, cuyas mutaciones se asocian con autoinmunidad y con linfomas de células B ([revisado en Goodnow, 2007](#)).

En resumen, hemos demostrado la existencia de un nuevo mecanismo por el que el estrógeno puede inducir inestabilidad genómica a través de la activación de AID. Estos datos sugieren que, la autoinmunidad y tumorigénesis asociadas a esta hormona podrían estar, al menos en parte, mediadas por la actividad lesiva de AID.

Generación de un modelo murino de sobre-expresión inducible de AID para comprender su papel en linfomagénesis

En los distintos modelos murinos de pérdida de función de AID descritos se observa que su ausencia está asociada a un retraso o bloqueo de la transformación tumoral ([Ramiro y col., 2004](#); [Kovalchuk y col., 2007](#); [Pasqualucci y col., 2008](#)). Sin embargo, en los modelos previos de ganancia de función de AID, que son transgénicos donde la expresión de AID es ubicua o específica de células B, no se ha observado desarrollo espontáneo de linfomas B ([Okazaki y col., 2003](#); [Kotani y col., 2005](#); [Muto y col., 2006](#); [Shen y col., 2008](#); [Morisawa y col., 2008](#); [Robbiani y col., 2009](#)). Recientemente, y durante el desarrollo de este trabajo predoctoral, se ha publicado un nuevo modelo transgénico IgkAID en el que sí se generan linfomas B, pero únicamente en ausencia del gen supresor de tumores p53 ([Robbiani y col., 2009](#)). La ausencia de linfomas B en los modelos de ganancia de función de AID, podría explicarse porque i) los linfomas B son patologías de lento desarrollo, por lo que es posible que en los experimentos con modelos de expresión ubicua los animales generen otras neoplasias letales antes de

que puedan desarrollarse linfomas de origen B, ii) pueden existir problemas técnicos inherentes a la utilización de transgénicos, tales como efectos derivados del sitio de inserción o silenciamiento, y iii) pueden existir mecanismos reguladores de la actividad de AID que interfieran con su actividad en el contexto específico de las células B maduras (Muto y col., 2006).

El modelo basado en la expresión de AID en el *locus* de Rosa26 presentado aquí aporta las siguientes novedades: i) es un sistema que permite la inducción de la expresión de AID y es condicional, de modo que, tras la expresión de la recombinasa Cre en un tejido o estadio específicos, se elimina el stop transcripcional que mantiene apagada la expresión de la construcción Rosa26AID, y se expresa AID; ii) es un sistema no transgénico, por lo que se introduce exactamente una copia extra de AID en el *locus* Rosa26 por recombinación homóloga; iii) es una construcción bicistónica que codifica para AID y GFP, lo que permite usar la proteína reportera GFP como marcador de las células en las que se ha activado la expresión de AID.

Usando este sistema hemos inducido la expresión de AID en estadios tardíos (ratones Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}) o tempranos (ratones Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}) de la diferenciación B en médula ósea. En consecuencia, estos dos modelos permiten analizar las posibles diferencias de expresar una copia extra de AID de forma estable en las últimas etapas de desarrollo de las células B o de adelantarla a las primeras etapas de la misma, respectivamente.

La diferenciación B normal en médula ósea de animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}, indica que el desarrollo B es independiente de AID. Lo que resulta ventajoso para estudiar el posible efecto de expresar una copia extra de esta enzima de forma independiente al desarrollo B. De acuerdo con estudios previos (Mao y col., 2004), hemos detectado niveles bajos de expresión fisiológica de AID en células B inmaduras (dato no mostrado), no estando claro hasta la fecha cuál es su función. Estos modelos animales podrían contribuir a esclarecer esta pregunta. La expresión fisiológica de AID se produce fundamentalmente en células B activadas de centro germinal (Muramatsu y col., 2000), siendo sus niveles en linfocitos B *naïve* residuales. En cambio en los modelos Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} la expresión de AID en linfocitos B *naïve* está aumentada unas 10 veces, es decir, alcanza niveles sólo ligeramente inferiores a los observados en linfocitos B activados *in vitro*. En ambos modelos, la inducción de la expresión de AID en células B activadas *in vitro* es comparable con la observada en linfocitos B *naïve*, siendo entre 1.5-2 veces

superior a la de los controles estimulados. Esta es la cantidad de AID que cabría esperar de combinar la expresión procedente del *locus* endógeno (en las muestras Rosa26^{AID^{+/+}} día tres) con la que se genera a partir del *locus* Rosa26 (muestras Rosa26^{AID^{ki/+}} día cero), que no debe variar con la estimulación. La copia extra de AID introducida en el *locus* Rosa26 es funcional, lo que se deduce de la estimulación de los procesos de diversificación secundaria en estos animales. Concretamente, aumenta la eficiencia de las reacciones de CSR *in vitro* y de SHM *in vivo* entre 1.5-2 veces. La funcionalidad de la copia extra de AID, se está evaluando también en células B carentes del AID endógeno (AID^{-/-}), con el fin de analizar más cuidadosamente si existe algún mecanismo de regulación negativa de la actividad de AID como se ha sugerido (Muto y col., 2006). Estos resultados indican que la diversificación de anticuerpos aumenta de forma lineal con el incremento de AID, lo que está de acuerdo con los ensayos realizados con ratones AID^{+/-} comentados previamente.

El hecho de que la haploinsuficiencia de AID sea relevante en la progresión tumoral en ratones, junto con los datos que demuestran que la frecuencia de translocaciones c-myc/IgH aumenta exponencialmente con la sobre-expresión de AID en linfocitos B primarios (Ramiro y col., 2006a), nos llevó a estudiar cuál es el efecto de la introducción de una copia extra de AID a nivel de lesiones linfomagénicas. Nuestros datos demuestran que existe un incremento significativo de alrededor de 3 veces en la frecuencia de las translocaciones c-myc/IgH en células Rosa26^{AID^{ki/+}} CD19-Cre^{ki/+} estimuladas *in vitro*. Esta frecuencia incrementada de lesiones parece comenzar a desviarse de la linealidad, ya que una sobre-expresión de AID de 1.5-2 veces se traduce en un incremento de la frecuencia de translocaciones de 3 veces en células B primarias estimuladas *in vitro*. Este dato sugiere que la sobre-expresión de AID en estos modelos podría comenzar a saturar los mecanismos protectores que presumiblemente impiden que se dispare el número de lesiones linfomagénicas.

Las células B *naive* de animales Rosa26^{AID^{ki/+}} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID^{ki/+}} MB1-Cre^{ki/+} expresan unos niveles de AID similares a los que en condiciones normales expresa un linfocito B primario activado. Esta observación nos ha permitido estudiar la actividad de AID en un contexto celular en el que habitualmente no se expresa. La ausencia de mutaciones en la región S_μ de linfocitos B *naive* Rosa26^{AID^{ki/+}} CD19-Cre^{ki/+}, indica que la alta expresión de AID en estas células no es suficiente para garantizar su actividad. Sin embargo, observamos mutaciones en la región S_μ de linfocitos B *naive* Rosa26^{AID^{ki/+}} MB1-Cre^{ki/+}, lo que está de acuerdo con la presencia de mutaciones en la

región S μ de células *naïve* del transgénico IgkAID (Robbiani y col., 2009). Los animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} expresan unos niveles similares de AID en la población B *naïve*, sin embargo la sobre-expresión de AID en el modelo Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} ocurre mucho antes que en el modelo Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} lo que indica que probablemente las mutaciones observadas en S μ en las células B *naïve* Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} han sido introducidas durante la diferenciación B en médula ósea, en la ventana de diferenciación en la que AID se expresa en animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} pero no en Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}. Actualmente estamos verificando formalmente esta hipótesis mediante el análisis de mutaciones en células pre-proB, preB e inmaduras de animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}.

Durante esta ventana de diferenciación en la que AID se expresa en animales Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} pero no en Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} ocurre una enorme expansión proliferativa que está asociada al estadio preB, y forma parte del proceso de diferenciación de este linaje, inmediatamente después del reordenamiento y la expresión de la cadena pesada de Ig (Hardy y col., 1991). En este trabajo quisimos testar la hipótesis de que la generación de mutaciones mediadas por AID fuese dependiente de un contexto celular proliferativo. Para ello se estimuló la proliferación en células *naïve* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}, que como hemos visto son refractarias a la actividad mutagénica de AID. Demostramos que el protocolo de estimulación utilizado induce la proliferación celular en ausencia de CSR y otros fenómenos asociados con él (expresión de AID endógeno y expresión de transcritos S γ 1 de línea germinal). La actividad de AID observada en células B Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} en condiciones proliferativas *in vitro* es similar a la observada *in vivo* en linfocitos B Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}. Este resultado explica que la expresión de AID en células *naïve* quiescentes no sea suficiente para que se acumulen mutaciones, pero sí en células pre-B. Hasta la fecha, el único requerimiento imprescindible conocido para la actividad de AID era la activación transcripcional del ADN diana (Chaudhuri y col., 2003; Pham y col., 2003; Ramiro y col., 2003; Shinkura y col., 2003; Chaudhuri y col., 2004), en este caso, del *locus* de Ig. Además, la reacción de CSR se había asociado a proliferación celular (Reina-San-Martín y col., 2003), aunque se desconocía la relevancia funcional de esta observación. Nuestros datos revelan por primera vez que la proliferación celular es otro requerimiento necesario para la actividad de AID. Por el momento desconocemos el mecanismo molecular responsable de este requerimiento. Una posible hipótesis es que aunque en ambos contextos celulares la accesibilidad de AID a la región S μ está garantizada –se encuentra transcripcionalmente activa-, no sea posible en linfocitos B

naive quiescentes la fijación de la mutación, vía replicación del ADN sobre la lesión U:G (Figura I-5). Esta hipótesis es compatible con la observación de que la mayoría de las mutaciones detectadas en células Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} *naive* son transiciones (dato no mostrado). Otra posible hipótesis es que las lesiones de desaminación que se introduzcan en células *naive* quiescentes no den lugar a mutaciones, sino que sean reparadas por mecanismos de escisión de la base nitrogenada (BER, del inglés, *Base Excision Repair*, y MMR, del inglés, *MisMatch Repair*) (Figura I-5). Por el contrario, en células preB algunas de las lesiones introducidas por AID se escaparían de los mecanismos de reparación debido a su elevada tasa proliferativa, y darían lugar a células *naive* portadoras de mutaciones. Esta situación sería equivalente a la que tiene lugar en los centros germinales, o en ensayos de estimulación *in vitro*, en los que las células B proliferan activamente. Esta hipótesis implicaría que los mecanismos de reparación se encuentran regulados de manera dependiente del ciclo celular y/o replicación del ADN. Alternativamente, también existe la posibilidad de que AID sea capaz de introducir mutaciones en células *naive*, pero que en este contexto celular este tipo de lesiones desencadenen una respuesta al daño en el ADN y la eliminación de las células que las han sufrido. Esta posibilidad estaría de acuerdo con el hecho de que las células de centro germinal tienen niveles bajos de p53 (Phan y col., 2004), lo que podría disminuir esta respuesta al daño en el ADN y generar un entorno permisivo a este tipo de lesiones y potencialmente a la generación de linfomas (ver más abajo). Sin embargo, es importante recordar que la generación de mutaciones por AID no siempre conlleva un daño detectable por p53 (a través de ATM), por lo que la contribución de esta vía podría ser minoritaria. La contribución de los mecanismos de reparación y la respuesta al daño en la actividad de AID en distintos contextos proliferativos están siendo explorados en nuestro laboratorio.

El 5% de los tumores humanos se relacionan con transformación linfoide, estando la gran mayoría originados a partir de células B maduras. Nuestros resultados demuestran que la sobre-expresión de AID en animales Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} produce un incremento de las lesiones en el ADN. Sin embargo no ha sido suficiente para causar linfomas B al menos durante los 10 meses de observación de estos animales, lo que está de acuerdo con los estudios previos hechos con transgénicos (Okazaki y col., 2003; Kotani y col., 2005; Muto y col., 2006; Shen y col., 2008; Morisawa y col., 2008; Robbiani y col., 2009). Como se indicó previamente, existen distintas explicaciones para estos resultados. Así, una posibilidad es que el desarrollo de este tipo de tumores sea lento, por lo que no descartamos su aparición a más largo plazo. Otra explicación, a la vista de los datos que relacionan la actividad de AID con

la proliferación celular, es que exista un distinto potencial linfomagénico en función del contexto celular donde se exprese AID. Los experimentos de inmunización nos permitirán estudiar en un contexto proliferativo *in vivo* el potencial linfomagénico de estos animales. Otra alternativa, como se ha sugerido en un trabajo publicado durante el desarrollo de estos modelos animales (Robbiani y col., 2009), es que sea necesario un escenario en el que el daño mediado por la sobre-expresión de AID en los linfocitos B no sea detenido por genes supresores de tumores. Concretamente, los ratones IgκAID sólo desarrollan linfomas B en ausencia de p53 (Robbiani y col., 2009) y además, es común que los pacientes de linfomas B de células maduras posean mutaciones o deleciones en este tipo de genes (revisado en Küppers, 2005).

En resumen, demostramos que la proliferación celular puede ser determinante para la actividad de AID usando los modelos Rosa26^{AID^{ki/+}} CD19-Cre^{ki/+} y Rosa26^{AID^{ki/+}} MB1-Cre^{ki/+}, en los que se sobre-expresa AID en estadios diferentes de la diferenciación B. La posibilidad de un diferente potencial linfomagénico en función del contexto celular donde se expresa AID está siendo objeto de estudio, combinado también con la ausencia de genes supresores de tumores.

Comentario final

En conjunto, los datos presentados en este trabajo sugieren que los niveles de AID y el contexto celular donde se expresa son determinantes para la actividad de esta enzima, presumiblemente para asegurar la generación de una respuesta inmune eficiente sin comprometer la estabilidad genómica de los linfocitos B. La identificación de los mecanismos de control de esta enzima con actividad pro-linfomagénica es de gran interés para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de los linfomas B.

Conclusiones

Esperando, el nudo se deshace y la fruta madura.

Federico García-Lorca

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. Las reacciones de CSR y SHM están reducidas en linfocitos B AID^{+/-}.
2. La frecuencia de translocaciones c-myc/IgH en ratones AID^{+/-} está reducida *in vivo* e *in vitro*.
3. Se han identificado elementos de respuesta para estrógeno en la región promotora de AID.
4. El estrógeno 17-β-estradiol incrementa los niveles de expresión de AID y su función fisiológica.
5. La frecuencia de translocaciones c-myc/IgH está incrementada en presencia de estrógeno.
6. Se ha desarrollado un modelo de sobre-expresión inducible de AID *in vivo* que se activa mediante la expresión de la recombinasa Cre.
7. Se han generado las líneas Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+}, que sobre-expresan AID mayoritariamente a partir del estadio de células B *naive*, y Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+}, que sobre-expresan AID desde el estadio pro/preB en médula ósea.
8. La sobre-expresión de AID en animales Rosa26^{AIDki/+} es funcional. Promueve un aumento de CSR, SHM y translocaciones c-myc/IgH en células B activadas.
9. La sobre-expresión de AID en linfocitos B *naive* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} no es suficiente para que AID introduzca mutaciones en la región S_μ. En cambio, los linfocitos B *naive* Rosa26^{AIDki/+} MB1-Cre^{ki/+} contienen mutaciones en S_μ.
10. La proliferación de células B *naive* Rosa26^{AIDki/+} CD19-Cre^{ki/+} promueve la introducción de mutaciones en S_μ.

Bibliografía

- Aoufouchi, S.**, Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.C., Reynaud, C.A. (2008). Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J Exp Med* 205, 1357-68.
- Basu, U.**, Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F. W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438, 508-11.
- Bassing, C.H.**, Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* 109 Suppl, S45-55.
- Bombardieri, M.**, Barone, F., Humby, F., Kelly, S., McGurk, M., Morgan, P., Challacombe, S., De Vita, S., Valesini, G., Spencer, J., and Pitzalis, C. (2007). Activation-induced cytidine deaminase expression in follicular dendritic cell networks and interfollicular large B cells supports functionality of ectopic lymphoid neogenesis in autoimmune sialoadenitis and MALT lymphoma in Sjögren's syndrome. *J Immunol* 179, 4929-38.
- Bransteitter, R.**, Pham, P., Calabrese, P., and Goodman, M.F. (2004). Biochemical analysis of hypermutational targeting by wild type and mutant activation-induced cytidine deaminase. *J Biol Chem* 279, 51612-21.
- Brar, S.S.**, Watson, M., and Diaz, M. (2004). Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks. *J Biol Chem* 279, 26395-401.
- Casellas, R.**, Yamane, A., Kovalchuk, A.L., and Potter, M. (2009). Restricting activation-induced cytidine deaminase tumorigenic activity in B lymphocytes. *Immunology* 126, 316-28.
- Cattoretti, G.**, Pasqualucci, L., Ballon, G., Tam, W., Nandula, S.V., Shen, Q., Mo, T., Murty, V.V., and Dalla-Favera, R. (2005). Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* 7, 445-55.
- Cattoretti, G.**, Büttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., and Niedobitek, G. (2006). Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 107, 3967-75.
- Chaudhuri, J.**, Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726-30.
- Chaudhuri, J.**, Khuong, C., and Alt, F.W. (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* 430, 992-8.
- Chesi, M.**, Robbiani, D.F., Sebag, M., Chng, W.J., Affer, M., Tiedemann, R., Valdez, R., Palmer, S.E., Haas, S.S., Stewart, A.K., Fonseca, R., Kremer, R., Cattoretti, G., and Bergsagel, P.L. (2008). AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell* 13, 167-80.
- Crouch, E.E.**, Li, Z., Takizawa, M., Fichtner-Feigl, S., Gourzi, P., Montañó, C., Feigenbaum, L., Wilson, P., Janz, S., Papavasiliou, F.N., and Casellas, R. (2007). Regulation of AID expression in the immune response. *J Exp Med* 204, 1145-56.
- Dedeoglu, F.**, Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F.W., and Geha, R.S. (2004). Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol* 16, 395-404.
- Delker, R.K.**, Fugmann, S.D., and Papavasiliou, F.N. (2009). A coming-of-age story: activation-induced cytidine deaminase turns 10. *Nat Immunol* 10, 1147-53.
- de Yébenes, V.G.**, and Ramiro, A.R. (2006). Activation-induced deaminase: light and dark sides. *Trends Mol Med* 12, 432-9.

de Yébenes, V.G., Belver, L., Pisano, D.G., González, S., Villasante, A., Croce, C., He, L., and Ramiro, A.R. (2008). miR-181B negatively regulates activation-induced cytidine deaminase in B cells.

Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., and Papavasiliou, F.N. (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med* 197, 1291-6.

Dorsett, Y., Robbiani, D.F., Jankovic, M., Reina-San-Martin, B., Eisenreich T,R., and Nussenzweig, M.C. (2007). A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med* 204, 2225-32.

Dorsett, Y., McBride, K.M., Jankovic, M., Gazumyan, A., Thai, T.H., Robbiani, D.F., Di Virgilio, M., Reina-San-Martin, B., Heidkamp, G., Schwickert, T.A., Eisenreich, T., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M.C. (2008). MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* 28, 630-8.

Durandy, A., Revy, P., Imai, K., and Fischer, A. (2005). Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. *Immunol Rev* 203, 67-79.

Endo, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Morisawa, T., Sakurai, T., Okazaki, I.M., Watashi, K., Shimotohno, K., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NP-kappaB signaling. *Oncogene* 26, 5587-95.

Epeldegui, M., Hung, Y.P., McQuay, A., Ambinder, R.F., and Martínez-Maza, O. (2007). Infection of human B cells with Epstein-Barr virus results in the expression of somatic hypermutation-inducing molecules and in the accrual of oncogene mutations. *Mol Immunol* 44, 934-42.

Fagarasan, S., and Honjo, T. (2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 3, 63-72.

Friedrich, G., and Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 5, 1513-23.

García-Cao, I., García-Cao, M., Martín-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.C., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2002). "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 21, 6225-35.

Gellert, M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71,101-32.

George, S.H., Gertsenstein, M., Vintersten, K., Korets-Smith, E., Murphy, J., Stevens, M.E., Haigh, J.J., and Nagy, A. (2007). Developmental and adult phenotyping directly from mutant embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4455-60.

Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y., and Shimizu, A., (2003). The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med* 198, 1427-37.

Goodnow, C.C. (2007). Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell* 130, 25-35.

Gourzi, P., Leonova, T., and Papavasiliou, F.N. (2006). A role for activation-induced cytidine deaminase in the host response against a transforming retrovirus. *Immunity* 24, 779-86.

Grimaldi, C.M. (2006). Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol* 18, 456-61.

- Hardy, R.R.**, Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* *173*, 1213-1225.
- Hartley, J.L.**, Temple, G.F., and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* *10*, 1788-95.
- Hasham, M.G.**, Donghia, N.M., Coffey, E., Maynard, J., Snow, K.J., Ames, J., Wilpan, R.Y., He, Y., King, B.L., and Mills, K.D. (2010). Widespread genomic breaks generated by activation-induced cytidine deaminase are prevented by homologous recombination. *Nat Immunol* *11*, 820-6.
- He, B.**, Raab-Traub, N., Casali, P., and Cerutti, A. (2003). EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J Immunol* *171*, 5215-24.
- Hentges, F.** (1994). B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. *Clin Exp Immunol* *97*, 3-9.
- Hobeika, E.**, Thiemann, S., Storch, B., Jumaa, H., Nielsen, P.J., Pelanda, R., and Reth, M. (2006). Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice. *Proc Natl Acad Sci USA* *103*, 13789-94.
- Hsu, H.C.**, Wu, Y., Yang, P., Wu, Q., Job, G., Chen, J., Wang, J., Accavitti-Loper, M.A., Grizzle, W.E., Carter, R.H., and Mountz, J.D. (2007). Overexpression of activation-induced cytidine deaminase in B cells is associated with production of highly pathogenic autoantibodies. *J Immunol* *178*, 5357-65.
- Hulka, B.S.**, and Stark, A.T. (1995). Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* *346*, 883-7.
- Imai, K.**, Zhu, Y., Revy, P., Morio, T., Mizutani, S., Fischer, A., Nonoyama, S., and Durandy, A. (2005). Analysis of class switch recombination and somatic hypermutation in patients affected with autosomal dominant hyper-IgM syndrome type 2. *Clin Immunol* *115*, 277-85.
- Ito, S.**, Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., and Honjo, T. (2004). Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci USA* *101*, 1975-80.
- Janz, S.**, Muller, J., Shaughnessy, J., and Potter, M. (1993). Detection of recombinations between c-myc and immunoglobulin switch alpha in murine plasma cell tumors and preneoplastic lesions by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* *90*, 7361-5.
- Jiang, C.**, Foley, J., Clayton, N., Kissling, G., Jokinen, M., Herbert, R., and Diaz, M. (2007). Abrogation of lupus nephritis in activation-induced deaminase-deficient MRL/lpr mice. *J Immunol* *178*, 7422-31.
- Jung, D.**, and Alt, F.W. (2004). Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* *116*, 299-311.
- Kasahara, Y.**, Kaneko, H., Fukao, T., Terada, T., Asano, T., Kasahara, K., and Kondo, N. (2003). Hyper-IgM syndrome with putative dominant negative mutation in activation-induced cytidine deaminase. *J Allergy Clin Immunol* *112*, 755-60.
- Kilby, N.J.**, Snaith, M.R., and Murray, J.A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet* *9*, 413-21.
- Klein, U.**, and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* *8*, 22-33.

Kotani, A., Okazaki, I.M., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Begum, N.A., Nakajima, T., Saito, H, and Honjo, T. (2005). A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activation-induced cytidine deaminase expression. *Proc Natl Sci USA* *102*, 4506-11.

Kovalchuk, A.L., Potter, M., and Janz, S. (1996). DNA sequence analysis of the genetic recombination between Igh6 and Myc in an uncommon BALB/c plasmacytoma, TEPC 1194. *Immunogenetics* *44*, 151-6.

Kovalchuk, A.L., Müller, J.R., and Janz, S. (1997). Deletional remodeling of c-myc-deregulating chromosomal translocations. *Oncogene* *15*, 2369-77.

Kovalchuk, A.L., Qi, C.F., Torrey, T.A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S.S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., Bornkamm, G.W., Janz, S., and Morse, H.C. 3rd (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med* *192*, 1183-90.

Kovalchuk, A.L., Kim, J.S., Park, S.S., Coleman, A.E., Ward, J.M., Morse, H.C. 3rd, Kishimoto, T., Potter, M., and Janz, S. (2002). IL-6 transgenic mouse model for extraosseous plasmacytoma. *Proc Natl Acad Sci USA* *99*, 1509-14.

Kovalchuk, A.L., duBois, W., Mushinski, E., McNeil, N.E., Hirt, C., Qi, C.F., Li, Z., Janz, S., Honjo, T., Muramatsu, M., Ried, T., Behrens, T., and Potter, M. (2007). AID deficient Bcl-xL transgenic mice develop delayed atypical plasma cell tumors with unusual Ig/Myc chromosomal rearrangements. *J Exp Med* *204*, 2989-3001.

Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* *20*, 5580-94.

Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* *5*, 251-62.

Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* *58*, 913-49.

Li, J., and McMurray, R.W. (2007). Effects of estrogen receptor subtype-selective agonists on autoimmune disease in lupus-prone NZB/NZW F1 mouse model. *Clin Immunol* *123*, 219-26.

Lin, K.I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T.C., and Calame, K. (2002). Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol* *22*, 4771-80.

Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* *451*, 841-5.

Longerich, S., Basu, U., and Storb, U. (2006). AID in somatic hypermutation and class switch recombination. *Curr Opin Immunol* *18*, 164-74.

Machida, K., Cheng, K.T., Sung, V.M., Shimodaira, S., Lindsay, K.L., Levine, A.M., Lai, M.Y., and Lai, M.M. (2004). Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc Natl Sci USA* *101*, 4262-7.

Machida, K., Cheng, K.T., Pavio, N., Sung, V.M., and Lai, M.M. (2005). Hepatitis C virus E2-CD81 interaction induces hypermutation of the immunoglobulin gene in B cells. *J Virol* *79*, 8079-89.

Maizels, N. (2005). Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet* *39*, 23-46.

Manis, J.P., Tian, M., and Alt, F.W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* *23*, 31-9.

- Mao, C.**, Jiang, L., Melo-Jorge, M., Puthenveetil, M., Zhang, X., Carroll, M.C., and Imanishi-Kari, T. (2004). T cell-independent somatic hypermutation in murine B cells with an immature phenotype. *Immunity* 20, 133-44.
- Matsumoto, Y.**, Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Kou, T., Morisawa, T., Azuma, T., Okazaki, I.M., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med* 13, 470-6 .
- Maul, R.W.**, and Gearhart, P.J. (2010). AID and somatic hypermutation. *Adv Immunol* 105, 159-191.
- Maul, R.W.**, Saribasak, H., Martomo, S.A., McClure, R.L., Yang, W., Vaisman, A., Gramlich, H.S., Schatz, D.G., Woodgate, R., Wilson, D.M. 3rd, and Gearhart, P.J. (2011). Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions. *Nat Immunol* 12, 70-6.
- McBride, K.M.**, Barreto, V., Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., and Nussenzweig, M.C. (2004). Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependt nuclear export of activation-induced deaminase. *J Exp Med* 199, 1235-44.
- McBride, K.M.**, Gazumyan, A., Woo, E.M., Barreto, V.M., Robbiani, D.F., Chait, B.T., and Nussenzweig, M.C. (2006). Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 8798-803.
- McBride, K.M.**, Gazumyan, A., Woo, E.M., Schwickert, T.A., Chait, B.T., and Nussenzweig, M.C. (2008). Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J Exp Med* 205, 2585-94.
- McDonnell, D.P.**, and Norris, J.D. (2002). Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Scienc* 296, 1642-4.
- Minegishi, Y.**, Lavoie, A., Cunningham-Rundles, C., Bedard, P.M., Hebert, J., Cote, L., Dan, K., Sedlak, D., Buckley, R.H., Fischer, A., Durandy, A., and Conley, M.E. (2000). Mutations in activation-induced cytidine deaminase in patients with hyper IgM syndrome. *Clinical Immunology* 97 203-210.
- Morgan, H.D.**, Dean, W., Coker, H.A., Reik, W., and Petersen-Mahrt, S.K. (2004). Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 279, 52353-60.
- Morisawa, T.**, Marusawa, H., Ueda, Y., Iwai, A., Okazaki, I.M., Honjo, T., and Chiba, T. (2008). Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer* 123, 2735-40.
- Morse, L.**, Chen, D., Franklin, D., Xiong, Y., and Chen-Kiang, S. (1997). Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6. *Immunity* 6, 47-56.
- Muller, J.R.**, Jones, G.M., Potter, M., and Janz, S. (1996). Detection of immunoglobulin/c-myc recombinations in mice that are resistant to plasmacytoma induction. *Cancer Res* 56, 419-23.
- Muramatsu, M.**, Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274, 18470-6.
- Muramatsu, M.**, Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potencial RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-63.

- Müschen, M.**, Re, D., Jungnickel, B., Diehl, V., Rajewsky, K., and Küppers, R. (2000). Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med* 192, 1833-40.
- Muto, T.**, Okazaki, I.M., Yamada, S., Tanaka, Y., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., and Honjo, T. (2006). Negative regulation of activation-induced cytidine deaminase in B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2752-7.
- Nalbandian, G.**, and Kovats, S. (2005). Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. *Immunol Res* 31, 91-106.
- Neuberger, M.S.** (2008). Antibody diversification by somatic mutation: from Burnet onwards. *Immunol Cell Biol* 86, 124-32.
- Oettinger, M.A.**, Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523.
- Okazaki, I.M.**, Kinoshita, K., Muramatsu, M., Yoshikawa, K., and Honjo, T. (2002). The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature* 416, 340-5.
- Okazaki, I.M.**, Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K., and Honjo, T. (2003). Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med* 197, 1173-81.
- Orthwein, A.**, Patenaude, A.M., Affar el, B., Lamarre, A., Young, J.C., and Di Noia, J.M. (2010). Regulation of activation-induced deaminase stability and antibody gene diversification by Hsp90. *J Exp Med* 207, 2751-65.
- Pasqualucci, L.**, Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341-6.
- Pasqualucci, L.**, Kitaura, Y., Gu, H., and Dalla-Favera, R. (2006). PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 395-400.
- Pasqualucci, L.**, Bhagat, G., Jankovic, M., Compagno, M., Smith, P., Muramatsu, M., Honjo, T., Morse, H.C. 3rd, Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2008). AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* 40, 108-12.
- Patenaude, A.M.**, Orthwein, A., Hu, Y., Campo, V.A., Kavli, B., Buschiazzo, A., and Di Noia, J.M. (2009). Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nat Struct Mol Biol* 16, 517-27.
- Pauklin, S.**, and Petersen-Mahrt, S.K. (2009). Progesterone inhibits activation-induced deaminase by binding to the promoter. *J Immunol* 183, 1238-44.
- Pavri, R.**, Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., Reina-San-Martin, B., Barreto, V., Nieland, T.J., Root, D.E., Casellas, R., Nussenzweig, M.C. (2010). Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* 143, 122-33.
- Peeva, E.**, and Zouali, M. (2005). Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett* 101, 123-43.
- Peled, J. U.**, Kuang, F. L., Iglesias-Ussel, M. D., Roa, S., Kalis, S. L., Goodman, M. F., and Scharff, M. D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* 26, 481-511.

- Pérez-Durán, P.**, de Yébenes, V.G., and Ramiro, A.R. (2007). Oncogenic events triggered by AID, the adverse effect of antibody diversification. *Carcinogenesis* 28, 2427-2433.
- Petersen-Mahrt, S.K.**, Harris, R.S., and Neuberger, M.S. (2002). AID mutates E.coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418, 99-103.
- Pham, P.**, Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 424, 103-7.
- Phan, R.T.**, and Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432, 635-9.
- Potter, M.** (2003). Neoplastic development in plasma cells. *Immunol Rev* 194, 177-95.
- Quartier, P.**, Bustamante, J., Sanal, O., Plebani, A., Debre, M., Deville, A., Litzman, J., Levy, J., Ferman, J.P., Lane, P., Horneff, G., Aksu, G., Yalcin, I., Davies, G., Tezcan, I., Ersoy, F., Catalan, N., Imai, K., Fischer, A., and Durandy, A. (2004) Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM syndrome due to Activation-Induced Cytidine Deaminase deficiency. *Clinical Immunology* 110, 22-29.
- Rada, C.**, Jarvis, J.M., and Milstein, C. (2002). AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 7003-8.
- Rajewsky, K.** (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-8.
- Ramiro, A.R.**, Stavropoulos, P., Jankovic, M., and Nussenzweig, M.C. (2003). Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat Immunol* 4, 452-6.
- Ramiro, A.R.**, Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118, 431-8.
- Ramiro, A.R.**, Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.T., McBride, K.M., Eisenreich, T.R., Chen, J., Dickins, R.A., Lowe, S.W., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2006a). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-IgH translocations. *Nature* 440: 105-9.
- Ramiro, A.R.**, Nussenzweig, M.C., and Nussenzweig, A. (2006b). Switching on chromosomal translocations. *Cancer Res* 66, 7837-9.
- Reina-San-Martin, B.**, Difilippantonio, S., Hanitsch, L., Masilamani, R.F., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2003). H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. *J Exp Med* 197, 1767-78.
- Revy, P.**, Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeau, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., and Durandy, A. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565-575.
- Rhee, K.J.**, Jasper, P.J., Sethupathi, P., Shanmugam, M., Lanning, D., and Knight, K.L. (2005). Positive selection of the peripheral B cell repertoire in gut-associated lymphoid tissues. *J Exp Med* 201, 55-62.
- Rickert, R.C.**, Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 25, 1317-8.

Rider, V., and Abdou, N.I. (2001). Gender differences in autoimmunity: molecular basis for estrogen effects in systemic lupus erythematosus. *Int Immunopharmacol* 1, 1009-24.

Robbiani, D.F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., McBride, K.M., Klein, I.A., Stone, G., Eisenreich, T.R., Ried, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2009). AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol Cell* 36, 631-41.

Roschke, V., Kopantzev, E., Dertzbaugh, M., and Rudikoff, S. (1997). Chromosomal translocations deregulating c-myc are associated with normal immune responses. *Oncogene* 14, 3011-6.

Roy, D., and Liehr, J.G. (1999). Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat Res* 424, 107-15.

Rucci, F., Cattaneo, L., Marrella, V., Sacco, M.G., Sobacchi, C., Lucchini, F., Nicola, S., Della Bella, S., Villa, M.L., Imberti, L., Gentili, F., Montagna, C., Tiveron, C., Tatangelo, L., Facchetti, F., Vezzoni, P., and Villa, A. (2006). Tissue-specific sensitivity to AID expression in transgenic mouse models. *Gene* 377, 150-8.

Sauer, B., and Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 5166-70.

Sayegh, C.E., Quong, M.W., Agata, Y., and Murre, C. (2003). E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat Immunol* 4, 586-93.

Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.

Schmidt-Suppran, M., and Rajewsky, K. (2007). Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol* 8, 665-8.

Schreck, S., Buettner, M., Kremmer, E., Bogdan, M., Herbs, H., and Niedobitek, G. (2006). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is expressed in normal spermatogenesis but only infrequently in testicular germ cell tumours. *J Pathol* 210, 26-31.

Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* 25, 225-36.

Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85, 27-37.

Shaffer, A.L., Lin, K.I., Kuo, T.C., Yu, X., Hurt, E.M., Rosenwald, A., Giltnane, J.M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K., and Staudt, L.M. (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17, 51-62.

Shang, Y. (2006). Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 360-8.

Shen, H.M., Bozek, G., Pinkert, C.A., McBride, K., Wang, L., Kenter, A., and Storb, U. (2008). Expression of AID transgene is regulated in activated B cells but not in resting B cells and kidney. *Mol Immunol* 45, 1883-92.

Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat Immunol* 4, 435-441.

Sohail, A., Klapacz, J., Samaranyake, M., Ullah, A., and Bhagwat, A.S. (2003). Human activation-induced cytidine deaminase causes transcription-dependent, strand-biased C to U deaminations. *Nucleic Acids Res* 31, 2990-4.

- Soriano, P.** (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-1.
- Stavnezer, J.,** Guikema, J.E., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26, 261-292.
- Suematsu, S.,** Matsusaka, T., Matsuda, T., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1992). Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 232-5.
- Ta, V.T.,** Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S., Tashiro, J., Ikegawa, M., Ito, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M., and Honjo, T. (2003). AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors. *Nat Immunol* 4, 843-8.
- Takizawa, M.,** Tolarová, H., Li, Z., Dubois, W., Lim, S., Callen, E., Franco, S., Mosaico, M., Feigenbaum, L., Alt, F.W., Nussenzweig, A., Potter, M., and Casellas, R. (2008). AID expression levels determinate the extent of cMyc oncogenic translocations and the incidence of B cell tumor development. *J Exp Med* 205, 1949-57.
- Teng, G.,** Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., and Papavasiliou, F.N. (2008). MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* 28, 621-9.
- Tonegawa, S.** (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Tsai, M.J.,** and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63, 451-86.
- Whitacre, C.C.** (2001). Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2, 777-80.
- Xue, K.,** Rada, C., and Neuberger, M.S. (2006). The in vivo pattern of AID targeting to immunoglobulin switch regions deduced from mutation spectra in *msh2*^{-/-} *ung*^{-/-} mice. *J Exp Med* 203, 2085-94.
- Yadav, A.,** Olaru, A., Saltis, M., Setren, A., Cerny, J., and Livák, F. (2006). Identification of a ubiquitously active promoter of the murine activation-induced cytidine deaminase (AICDA) gene. *Mol Immunol* 43, 529-41.
- Yager, J.D.,** and Davidson, N.E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 354, 270-82.
- Yoshikawa, K.,** Okazaki, I.M., Eto, T., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H., and Honjo, T. (2002). AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science* 296, 2033-6.
- Zambrowicz, B.P.,** Imamoto, A., Fiering, S., Herzenberg, L.A., Kerr, W.G., and Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3789-94.
- Zhou, L.J.,** Ord, D.C., Hughes, A.L., and Tedder, T.F. (1991). Structure and domain organization of the CD19 antigen of human, mouse, and guinea pig B lymphocytes. Conservation of the extensive cytoplasmic domain. *J Immunol* 147, 1424-32.
- Zhu, Y.,** Nonoyama, S., Morio, T., Muramatsu, M., Honjo, T., and Mizutani, S. (2003). Type two hyper-IgM syndrome caused by mutation in activation-induced cytidine deaminase. *J Med Dent Sci* 50, 41-6.

Anexo

PUBLICACIONES

Pauklin, S., **Sernández, I.V.**, Bachmann, G., Ramiro, A.R., and Petersen-Mahrt S.K. (2009). Estrogen directly activates AID transcription and function. *J Exp Med* 206, 99-111.

Sernández, I.V., de Yébenes, V.G., Dorsett, Y., and Ramiro, A.R. (2008). Haploinsufficiency of activation-induced deaminase for antibody diversification and chromosome translocations both in vitro and in vivo. *PLoS One* 3, e3927.