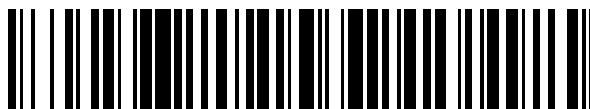


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 973**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2008** **PCT/US2008/065528**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2009** **WO09029315**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2008** **E 08828508 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2152861**

54 Título: **Mutagénesis inducible de genes diana**

30 Prioridad:

31.05.2007 US 932672 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.08.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF WASHINGTON (100.0%)
4311 11th Avenue NE, Suite 500
Seattle, WA 98105-1608, US

72 Inventor/es:

MAIZELS, NANCY;
CUMMINGS, W., JASON y
YABUKI, MUNEHISA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 628 973 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutagénesis inducible de genes diana

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a la mutagénesis de genes diana que aprovecha las capacidades mutagénicas naturales de las células B y mejora dichas capacidades al poner bajo control el proceso de diversificación. La invención proporciona un método para generar rápida e inductivamente mutaciones puntuales y otros tipos de diversificación en genes expresados, tales como genes de anticuerpos. Este método puede acoplarse con una selección para identificar clones de células B que producen, por ejemplo, anticuerpos de alta afinidad o especificidad. El proceso de diversificación puede ser modulado, acelerado, detenido, conmutado entre métodos de mutagénesis y similares. La modulación de la diversificación de acuerdo con la invención es inducible y reversible. La invención proporciona un medio de desarrollo rápido y factible de un repertorio de variantes de inmunoglobulinas y otros polipéptidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los anticuerpos son moléculas que proporcionan una defensa clave contra la infección en seres humanos. Se utilizan como terapéutica en el tratamiento de una variedad de enfermedades, desde enfermedades infecciosas hasta cáncer. También se utilizan como reactivos de diagnóstico en una gran variedad de pruebas realizadas diariamente en laboratorios clínicos y de investigación.

La especificidad y la afinidad de los anticuerpos se modifican *in vivo* por procesos de mutación, dirigidos a regiones específicas dentro de los genes que codifican anticuerpos. Los anticuerpos son codificados por dos genes, denominados genes de cadena pesada y liviana de inmunoglobulina (Ig). Las cadenas pesadas y livianas de polipéptidos codificados por los genes Ig interactúan para formar una molécula tetramérica que se expresa sobre la superficie celular como un receptor. Las moléculas de anticuerpo son bifuncionales: un dominio reconoce el antígeno, el otro promueve la eliminación del antígeno del cuerpo. El dominio de reconocimiento, denominado región variable (V), se crea tras la interacción de los polipéptidos de cadena pesada y liviana en anticuerpos naturales. De hecho, es variable en secuencia de un anticuerpo a otro. La variabilidad en la secuencia primaria de la región V (y por lo tanto la estructura tridimensional y la especificidad del antígeno) es el resultado de procesos que alteran la secuencia de la región V causando cambios genéticos irreversibles. Estos cambios se programan durante el desarrollo de células B, y también pueden ser inducidos en el cuerpo en respuesta a las señales ambientales que activan las células B. Varios mecanismos genéticos contribuyen a esta variabilidad. Dos subvías del mismo mecanismo conducen a dos resultados mutagénicos diferentes, denominados hipermutación somática y conversión génica (revisado (Maizels, 2005)). La hipermutación somática inserta mutaciones puntuales. La hipermutación somática proporciona la ventaja de permitir que se produzca esencialmente cualquier mutación, de modo que una colección de regiones V mutadas ha muestreado esencialmente una gran variedad de posibles mutaciones. La conversión de genes inserta mutaciones que son "moldeadas" por secuencias relacionadas pero no idénticas. La conversión génica proporciona la ventaja de crear un repertorio basado en información ya almacenada en el genoma, que puede optimizarse mediante la selección evolutiva.

El receptor de antígeno modificado es el objetivo para la selección. La Ig se expresa en la superficie celular, lo que permite la selección clonal de células B con la especificidad o afinidad deseada en un contexto fisiológico o dentro de células cultivadas. La Ig de superficie celular se puede detectar fácilmente mediante citometría de flujo de células teñidas con anti-Ig. La unión de moléculas de Ig a compuestos específicos puede detectarse como interacción con derivados fluorescentes de dichos compuestos, analizados por citometría de flujo; y las células B que se unen a compuestos específicos también se pueden recuperar tras la clasificación por citometría de flujo. También se pueden seleccionar células B que se unen a compuestos específicos en soportes sólidos que llevan dichos compuestos. Por el contrario, la unión a soporte sólido también permite la eliminación de células B con especificidades de unión no deseadas. Los ciclos repetitivos de unión y liberación permiten el enriquecimiento para una unión de alta afinidad.

La mutación y la orientación génica se producen en la línea de células DT40 B. DT40 es una línea de células B de pollo que prolifera fácilmente en cultivo. La DT40 se ha documentado ampliamente por llevar a cabo la mutagénesis constitutiva de sus genes de inmunoglobulina de cadena pesada y liviana (Reynaud et al., 1987, Thompson and Neiman, 1987, Reynaud et al., 1989). La mutagénesis se dirige a las regiones V. Las mutaciones se modelan normalmente copiando segmentos de genes V no funcionales relacionados, denominados genes "pseudo-V", que están presentes en una disposición lineal corriente arriba de cada región V funcional. El modelado es evidente como tramos de secuencia compartidos entre el objetivo V mutado y uno de los genes pseudo-V. Se ha demostrado que las alteraciones genéticas de DT40 causan un cambio de mutagénesis modelada a mutagénesis no modelada, lo que da como resultado una hipermutación somática, por una vía esencialmente idéntica a la hipermutación somática que altera las secuencias de regiones V en células B humanas (Sale et al., 2001). La DT40 también ha sido ampliamente documentada por apoyar la recombinación homóloga muy eficiente, o la orientación génica

(Buerstedde et al., 2002, Sale, 2004). Esto permite la creación de derivados en los que genes específicos o regiones genómicas se han modificado o seccionado; o en los que una región genética ha sido sustituida por otra.

El documento WO03/061363 describe un método para la inducción de mutaciones en genes expresados en células eucariotas, que pueden ser útiles para producir anticuerpos con mayor afinidad o especificidad para antígenos expresando un gen de citidina desaminasa inducido por activación en las células.

La EP1568765 describe células B genéticamente modificadas con actividad de conversión de genes de inmunoglobulina, capaces de diversificación genética dirigida y selectiva de un ácido nucleico diana mediante hipermutación o por hipermutación y conversión génica.

El documento WO01/59092 describe un método para fabricar bacterias hipermutables.

El documento WO02/100998 describe un método para preparar una línea celular capaz de hipermutación constitutiva dirigida de una región de ácido nucleico diana.

Los documentos WO96/01313 y WO94/29442 se dirigen en general al sistema de expresión génica controlado con tetraciclina.

El documento WO96/01313 describe una proteína de fusión del activador transcripcional que se une a las secuencias del operador tet y estimula la transcripción de un gen unido al operador tet en presencia, pero no en ausencia, de la tetraciclina.

El documento WO94/29442 describe animales transgénicos que portan dos transgenes, codificando el primero para una proteína fusión de transactivador que comprende un represor tet y un polipéptido que se activa directa o indirectamente en células eucariotas y el segundo que comprende un gen unido operativamente a al menos una secuencia operadora tet.

Debido a las limitaciones y desafíos planteados por los enfoques actualmente disponibles para la mutagénesis dirigida, existe una necesidad en la técnica para el desarrollo de métodos y construcciones alternativos. La presente invención satisface esta necesidad, y proporciona además otras ventajas relacionadas.

RESUMEN DE LA INVENCION

El objeto para el que se busca protección es como se define en las reivindicaciones.

En particular, la invención proporciona una célula B modificada para inducir reversiblemente la diversificación de un gen diana, comprendiendo la célula B:

(a) un elemento regulador cis ligado operativamente a un gen diana, en el que el gen diana comprende un promotor y una región codificadora; y

(b) un constructo de fusión que codifica un factor de fijación fusionado a un factor de diversificación, en el que el factor de fijación se une específicamente al elemento regulador cis de (a) y el factor de diversificación induce reversiblemente la diversificación de la región codificadora.

La invención satisface estas necesidades y otras proporcionando materiales y métodos para la diversificación de secuencias diana. La invención proporciona una célula B modificada para permitir la inducción reversible de la diversificación de un gen diana. La célula comprende un elemento regulador cis ligado operativamente a un gen diana de interés. Un factor que modula la diversificación puede entonces fusionarse con un factor de fijación que se une al elemento regulador cis, uniendo así el factor de diversificación a la región que controla la expresión del gen diana. La célula B puede ser una célula B de DT40 de pollo u otra célula B de vertebrado, con una célula B humana o una célula B de DT40 de pollo que contiene genes de inmunoglobulina (Ig) humanizados (en los que IgH e IgL humanos reemplazan IgH e IgL de pollo) preferido para algunas realizaciones.

Típicamente, el gen diana comprende un promotor y una región codificadora. En una realización, el gen diana comprende un gen de inmunoglobulina (Ig), en el que el gen Ig comprende una región potenciadora y codificante del gen Ig. El gen Ig puede ser todo o parte de un gen IgL y/o IgH. La región codificadora puede ser nativa del gen Ig, o un gen heterólogo. En algunas realizaciones, el gen diana es o contiene un dominio diana no Ig para la diversificación, así como dominios que permiten la visualización del producto génico sobre la superficie de la célula B, incluyendo un dominio transmembrana y una cola citoplásmica. La región codificadora del gen diana en la célula B de la invención no necesita comprender una región codificadora completa. En algunas realizaciones, una región o dominio particular se dirige para la diversificación, y la región codificadora puede codificar opcionalmente solamente una parte que incluye la región o dominio de interés.

El elemento regulador cis proporciona una almohadilla de aterrizaje en la región que controla la diversificación y/o expresión del gen diana. Esta almohadilla de aterrizaje es un lugar al que un factor de fijación puede unirse de una manera específica de secuencia a esta región del ADN. En una realización típica, el elemento regulador cis es un operador de lactosa polimerizado (LacO). En una realización, el elemento comprende aproximadamente 80-100 repeticiones de LacO. En otra realización, el elemento regulador cis es un operador de tetraciclina único o multimerizado (TetO). Se puede usar una variedad de moléculas como un elemento regulador cis, siempre y cuando el elemento sirva a la función de almohadilla de aterrizaje de proporcionar un lugar al cual un factor de fijación (una proteína de unión a ADN específica de secuencia) puede unirse al ADN y traer un factor de diversificación, fusionado al factor de fijación, en suficiente proximidad de la región codificadora de manera que la diversificación de la región codificadora sea capaz de una regulación reversible.

Un factor de fijación es aquel que se une al elemento regulador cis de una manera específica de secuencia. En las realizaciones en las que LacO actúa como un elemento regulador cis, el represor de Lac, LacI, puede servir como factor de conexión, y su unión al elemento regulador cis, LacO, puede regularse mediante isopropil- β -D-tiogalactosida (IPTG). En ausencia de IPTG, LacI se une a LacO y la diversificación se acelera (o se regula de otro modo) por la presencia del factor de diversificación. Se puede añadir IPTG en el caso de que se desee detener o reducir la actividad del factor de diversificación. En realizaciones en las que TetO actúa como elemento regulador cis, TetR puede ser un factor de fijación adecuado, y la actividad del factor de diversificación puede ser regulada por tetraciclina o doxiciclina.

En algunas realizaciones, el factor de diversificación es un regulador transcripcional, una proteína asociada a la heterocromatina, una chaperona de histonas, un remodelador de cromatina, un componente del complejo de poros nucleares, un regulador génico o una combinación de los mismos. Otras moléculas que pueden servir como un factor de diversificación incluyen, pero no se limitan a, un factor de reparación del ADN, un factor de replicación del ADN, una resolvasa, una helicasa, un regulador del ciclo celular, un factor de ubiquitación, un factor de sumoilación o una combinación de los mismos. En una realización, el regulador transcripcional es VP16 o E47 (codificado por E2A). Una proteína típica asociada a la heterocromatina para su uso como factor de diversificación es HP1. Un representante de histona chaperona es HIRA.

También se proporciona un método para producir un repertorio de polipéptidos que tienen secuencias variantes de un polipéptido de interés a través de la diversificación de secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido. Típicamente, el método comprende cultivar la célula B de la invención en condiciones que permiten la expresión del factor de diversificación, en el que el gen diana de la célula B contiene la región codificadora del polipéptido de interés, permitiendo de este modo la diversificación de la región codificadora. El método puede comprender además mantener el cultivo en condiciones que permitan la proliferación de la célula B hasta que se obtenga una pluralidad de polipéptidos variantes y el repertorio deseado.

En otra realización, la invención proporciona un método para producir células B que producen un polipéptido optimizado de interés. El método comprende cultivar una célula B de la invención en condiciones que permiten la expresión del factor de diversificación, en el que el gen diana de la célula B contiene la región codificadora del polipéptido de interés y en el que la célula B expresa el polipéptido de interés en su superficie. El método comprende además seleccionar células del cultivo que expresan el polipéptido de interés en la superficie de células B seleccionando células que se unen a un ligando que se une específicamente al polipéptido de interés. Estas etapas de cultivo y selección pueden repetirse hasta que se seleccionen células que tengan una afinidad deseada para el ligando que se une específicamente al polipéptido de interés. En las realizaciones en las que el polipéptido de interés es una Ig, tal como una IgL, IgH o ambas, el ligando puede ser un polipéptido, producido por medios recombinantes u otros, que representa un antígeno. El ligando puede unirse o enlazarse a un soporte sólido para facilitar la selección, por ejemplo, mediante la selección de células activadas magnéticamente (MACS). En otro ejemplo, el ligando puede enlazarse o unirse a una etiqueta fluorescente, para permitir la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente la adición de una molécula reguladora al cultivo, en donde la molécula reguladora modula la unión del factor de fijación al elemento regulador cis, modulando así la diversificación de la región codificadora. En los ejemplos discutidos anteriormente, IPTG, tetraciclina y doxiciclina sirven como moléculas reguladoras. Los expertos en la técnica son conscientes de otras moléculas reguladoras que pueden usarse con un factor de fijación particular para regular la actividad de diversificación.

La molécula reguladora puede modular la diversificación de la región codificadora en una variedad de formas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula reguladora se añade al cultivo para efectuar la modulación y la modulación puede resultar en la reducción o detención de la diversificación, o en la mejora o aceleración de la diversificación, dependiendo de si la molécula reguladora particular es una que aumenta o disminuye el enlazamiento del factor de fijación al elemento regulador cis y si este cambio particular en la unión tiene el efecto de aumentar o disminuir la actividad de diversificación. En otras realizaciones, la modulación, ya sea reducción, parada o mejora o aceleración de la modulación, se efectúa extrayendo o eliminando la molécula reguladora del cultivo. Del mismo modo, la modulación de la diversificación puede efectuarse añadiendo un gen o eliminando un gen de la célula B, o aumentando o disminuyendo la expresión de un gen en la célula B. Un experto en la técnica puede

apreciar fácilmente todas las permutaciones disponibles expuestas anteriormente, cada una de las cuales tiene el efecto de alterar el nivel o presencia de una molécula reguladora en la célula B y, a su vez, alterar la fijación del factor de diversificación al elemento cis-regulador y alterando así la actividad de diversificación.

También se proporciona un kit que se puede usar para llevar a cabo los métodos de la invención. El kit comprende una célula B de la invención y construcciones de fusión que expresan los correspondientes factores de fijación y diversificación. Por ejemplo, la célula B comprende un elemento regulador cis ligado operativamente a un gen diana, en el que el gen diana comprende un promotor y una región codificadora. El kit comprende además uno o más recipientes, con una o más construcciones de fusión almacenadas en los recipientes. Cada constructo de fusión comprende un polinucleótido que puede expresarse en la célula B y que codifica un factor de fijación fusionado a un factor de diversificación, en el que el factor de fijación se une específicamente al elemento cis regulador de la célula B. La célula B puede incluir una pluralidad de elementos reguladores cis para uso con una pluralidad de construcciones de fusión.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ilustración esquemática de la hipermutación somática de anticuerpos. Panel superior: las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un antígeno de contacto de molécula de Ig. Panel inferior: las mutaciones se concentran en las regiones genómicas que codifican las CDR.

Figura 2. Gráfico de barras que muestra el efecto de los reguladores cis atados sobre la diversificación de genes de Ig en células de PoliLacO λ DT40. Las tasas de diversificación clonal se compararon en presencia y ausencia de IPTG.

Figura 3. Ilustración esquemática de cómo evolucionan las especificidades de anticuerpos durante la expansión de un clon de células B. El anticuerpo se expresa en la superficie celular. La selección de una población que inicialmente expresa múltiples especificidades (superior izquierda) se enriquece sucesivamente para una especificidad deseada (círculos dobles delgados, centro) y mayor afinidad (círculos gruesos, abajo a la derecha).

Figura 4A-B. Demostración de que E2A se asocia con el locus de Ig λ reordenado. Figura 4A: Esquema de los loci de Ig λ reordenados y no reordenados en la línea de linfoma de células B de pollo, DT40. Se muestran las regiones promotora (P), líder (L), variable (V), uniéndose (J) y constante (C λ); la región putativa de unión a la matriz (M) en el intrón J-C; el potenciador 3' (E-3'); y el más proximal (ψ V1) y distal (ψ V25) de las regiones pseudo-variables no funcionales de arriba que son plantillas para la conversión génica. Los alelos reordenados y no reordenados se pueden distinguir fácilmente por PCR, usando cebadores indicados por flechas. Figura 4B: Análisis de ChIP del enriquecimiento de E2A en los λ R reordenados y los locus λ U no reordenados en células DT40, con respecto al amplicón de control génico de ovoalbúmina (Ova). El enriquecimiento en dobles se muestra a continuación. NTC, ningún control de plantilla.

Figura 5A-F. E2A actúa en cis para regular la diversificación de genes Ig λ . Figura 5A: Esquema del locus de Ig λ reordenado marcado con PoliLacO. PoliLacO está integrado entre ψ V17-20; Otras nociones como en la figura 4A.

Figura 5B: Perfil de ciclo celular de células DT40 y DT40 PoliLacO- λ R. Figura 5C: Acumulación de variantes de pérdida de slgM por células DT40 y DT40 PoliLacO- λ R. Las frecuencias de las variantes de pérdida de slgM en 24 subclones de cada línea se cuantificaron mediante citometría de flujo después de 6 semanas de expansión clonal. Las frecuencias mostradas se normalizaron a DT40; las frecuencias medias de pérdidas de slgM fueron 0.8% y 0.9%, respectivamente. Figura 5D: Perfil del ciclo celular de las células PoliLacO- λ R GFP-LacI y DT40 PoliLacO- λ R E47-LacI de DT40. Figura 5E: Análisis por RT-PCR de la expresión de ARNm de Ig λ , AID o β -actina en DT40 PoliLacO- λ R GFP-LacI y DT40 PoliLacO- λ R E47-LacI transfectantes. Los triángulos indican 30, 10, 3 y 1x concentraciones relativas de plantillas de cDNA. Figura 5F: Pérdida media de slgM de los transfectantes DT40 PoliLacO- λ R GFP-LacI (n=13) y DT40 PoliLacO- λ R E47-LacI (n=19), cultivados durante 3 semanas en ausencia o presencia de IPTG 100 μ M. Los valores se normalizaron a DT40 PoliLacO- λ R GFP-LacI células cultivadas sin IPTG.

Figura 6A-B. El radio nuclear se correlaciona con el ciclo celular. Figura 6A: Imágenes representativas de células enriquecidas en G1 y G2/M. Las células G1 (izquierda) y G2/M (derecha) se tiñeron con Hoechst 33342 (10 μ M, Molecular Probes) y luego se clasificaron en base al contenido de ADN. Barra, 10 μ m. Figura 6B: Perfil de ciclo celular representativo de células PoliLacO- λ R de DT40. Radios medios $\pm$ s.d. se muestran como barras horizontales dentro del perfil representativo. Las líneas verticales punteadas indican los puntos de corte para G1 y G2 utilizados en los análisis experimentales: G1, $r < 4 \mu$ m; G2, $r > 5.2 \mu$ m.

Figura 7A-D. E2A se localiza en λ R en la fase G1 del ciclo celular. Figura 7A: Imagen representativa de colocalización de λ R y E2A en células DT40 PoliLacO- λ R GFP-LacI. El perímetro nuclear determinado por tinción con DAPI se delinea mediante la línea blanca discontinua. Barra, 5 μ m. Figura 7B: Fracción de colocalizaciones de λ R/E2A que se producen en cada fase del ciclo celular en células DT40 PoliLacO- λ R GFP-LacI. Figura 7C: Imagen representativa de colocalización de λ R y Pol II activa (P*-Pol II) en células DT40 PoliLacO- λ R GFP-LacI. Notaciones

como en 7A. Figura 7D: Fracción de colocalizaciones de λ R/P*-Pol II que se producen en cada fase del ciclo celular en células DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI.

Figura 8A-F. La expresión de Id1 inhibe λ R/E2A colocalizaciones en fase G1. Figura 8A: Transferencia Western que ensaya la expresión de Id1 en células DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI (izquierda) y DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI Id1 (derecha). Tamaños del polipéptido marcador (kDa) a la izquierda. Figura 8B: Perfil del ciclo celular de las células Id1 de PoliLacO- λ R RFP-LacI DT40 y DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI. Figura 8C: Pérdida media de sIgM de los transfectantes DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI Id1 clonales independientes (n=6), cultivados durante 6 semanas. Los valores se normalizaron a células DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI. Figura 8D: La expresión de Id1 no altera los niveles de transcripción de Ig λ o AID. Análisis por RT-PCR de la expresión de ARNm de control de Ig λ , AID o β -actina en células RFP-LacI de DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI y DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI Id1. Figura 8E: Efecto de la expresión de Id1 sobre la dependencia del ciclo celular de colocalizaciones de λ R/E2A en células RFP-LacI de PoliLacO- λ R de DT40 y un derivado que expresa de forma estable Id1 (Id1 - y +, respectivamente). El porcentaje de colocalizaciones en cada etapa del ciclo celular se muestra. Figura 8F: Efecto de la expresión de Id1 sobre la dependencia del ciclo celular de colocalizaciones de colocalizaciones de λ R/P*-Pol II y en células DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI y un derivado que expresa de forma estable Id1. Detalles como en 8E.

Figura 9A-B. Modificación de la cromatina en el locus Ig λ de DT40. Figura 9A: Diagrama esquemático del locus de Ig λ de pollo reordenado, mostrando las regiones de 25 ψ V λ y el gen de V λ R reordenado (líder, región variable de L, región constante de V λ -J λ , región de C λ) Figura 9B: Resumen de un experimento representativo de transferencia de cromatina, ensayando la acetilación N-terminal de las histonas H3 y H4 (AcH3 y AcH4). Los sitios interrogados fueron: una región aproximadamente 1 kb corriente arriba de la matriz ψ V λ (flanco), la región entre ψ V λ 5 y V λ , ψ V λ 1, ψ V λ 5, ψ V λ 13, ψ V λ 18; ψ V λ 124; ψ V λ 25 y los alelos V λ R reordenados y no reordenados. La barra indica la desviación estándar.

Figura 10A-B. Fijación reversible de GFP-LacI a la matriz ψ V λ en DT40 PoliLacO- λ R. Figura 10A: Diagrama esquemático del locus de Ig λ de pollo reordenado en DT40, con operador de lactosa polimerizado (PoliLacO) insertado entre ψ V λ 17-20. Notaciones como en la Figura 9. Figura 10B: Imágenes fluorescentes de transfectantes DT40 GFP-LacI y DT40 PoliLacO-V λ R GFP-LacI transfectantes cultivados en ausencia de IPTG (izquierda); o en presencia de IPTG 100 μ M durante la noche (derecha).

Figura 11A-C. El HP1 atado disminuye las modificaciones características de la cromatina activa. Figura 11A: Imágenes fluorescentes representativas de transfectantes DT40 PoliLacO-V λ R LacI-HP1 únicos, teñidos con anticuerpos anti-LacI (izquierda); DAPI (centro); o imagen fusionada (derecha). Figura 11B: Enriquecimiento de H3 (AcH3) y H4 (AcH4) acetilado en ψ V λ 17R en transfectantes LacI-HP1 de PoliLacO-V λ R GFP-LacI y DT40 PoliLacO-V λ R de DT40. Después de CHIP, dúplex PCR se llevó a cabo con cebadores OVA y ψ V λ 17R. El enriquecimiento se expresa en relación con el control total de entrada de ADN, $\pm$ desviación estándar de cuatro amplificaciones separadas de cantidades crecientes de ADN plantilla. Figura 11C: Histograma que muestra el enriquecimiento de AcH3 y AcH4 en ψ V λ 17R (del panel B) y el promotor pol ϵ en los transfectantes LacI-HP1 de PoliLacO-V λ R GFP-LacI y DT40 PoliLacO-V λ R de DT40. Las barras indican la desviación estándar.

Figura 12A-C. El HP1 atado no afecta a la expresión de Ig λ . Figura 12A: Enriquecimiento relativo de AcH3 y AcH4 a V λ R en DT40 PoliLacO-V λ R GFP-LacI y DT40 PoliLacO-V λ R LacI-HP1 transfectantes. Los valores de enriquecimiento se normalizaron con el control DT40 PoliLacO-V λ R GFP-LacI. Las barras indican la desviación estándar de cuatro amplificaciones independientes de cantidades crecientes de ADN plantilla. Figura 12B: Intensidad relativa de la expresión de IgM de superficie celular (sIgM) en los transfectantes PoliLacO- λ R GFP-LacI (GFP-LacI) y DT40 PoliLacO- λ R LacI-HP1 (LacI-HP1) DT40 cultivados en presencia y ausencia de IPTG 250 μ M. Los niveles de sIgM se cuantificaron midiendo la intensidad de la tinción con anticuerpo IgM de ratón antipollo y normalizándose al nivel en los transfectantes DT40 PoliLacO- λ R GFP-LacI. Detalles como en 12A. Figura 12C: Niveles relativos de los transcritos V λ R en los transfectantes de PoliLacO- λ R GFP-LacI (GFPLacI) DT40 y DT40 PoliLacO- λ R LacI-HP1 (LacI-HP1). Los niveles de transcripción se cuantificaron mediante RT-PCR y se normalizaron al nivel en transfectantes DT40 PoliLacO- λ R GFP-LacI. Detalles como en 12A.

Figura 13A-B. El HP1 atado disminuye la acetilación de histona a través de la matriz ψ V λ . Figura 13A: Resumen de un experimento de transferencia de cromatina, ensayando la acetilación N-terminal de la histona H3 en cromatina de la línea celular DT40 PoliLacO-V λ R LacI-HP1 cultivada durante 3 días en presencia y ausencia de IPTG 250 μ M. Los valores de enriquecimiento CHIP (véase el Ejemplo 4) se normalizaron a los valores obtenidos a partir de un análisis paralelo de cromatina a partir de células PoliLacO-V λ R GFP-LacI de DT40. Las barras indican la desviación estándar de cuatro amplificaciones independientes de cantidades crecientes de ADN plantilla. Figura 13B: Resumen de un experimento de transferencia de cromatina, ensayando la acetilación con N-terminal de las histonas H4 en cromatina de la línea celular DT40 PoliLacO-V λ R LacI-HP1 cultivada durante 3 días en presencia y ausencia de IPTG 250 μ M. Detalles como en 13A.

Figura 14A-E. Mutación no planificada y con plantilla promovida por HP1 atado. Figura 14A: ensayo de fluctuación de pérdidas de sIgM de paneles de DT40 PoliLacO-V λ R GFP-LacI (n=27) independiente y DT40 PoliLacO-V λ R LacI-HP1 (n=16). La figura muestra datos combinados de al menos dos transfectantes independientes para cada

constructo de fusión. Las tasas medias de diversificación se muestran a continuación. Figura 14B: Resumen del análisis de secuencias de regiones Vλ que llevan mutaciones únicas, a partir de los transfectantes PoliLacO-VλR GFP-LacI (n=78) y DT40 PoliLacO-VλR LacI-HP1 (n=36), analizados por PCR de célula única. Se reunieron las secuencias de dos transfectantes independientes.

Figura 15. Alineación de secuencia de clones de LacI-HP1 de PoliLacO-λR DT40 Mutadas. Secuencias de 14 regiones Vλ únicas, mutadas a partir de células LacI-HP1 de PoliLacO-λR DT40 diversificadas. Las cajas de color azul describen las secciones de conversión de genes; los círculos rojos denotan mutaciones puntuales; las cajas punteadas negras indican inserciones no planificadas; los triángulos anaranjados denotan eliminaciones. Se presenta la secuencia madre de la región DT40 (SEQ ID NO: 31), indicándose los lugares de mutación.

Figura 16A-E. La conversión de genes Ig es acelerada por VP16 atada a la matriz ψVλ. Figura 16A: Diagrama esquemático del locus de Igλ de pollo reordenado en DT40, con operador de lactosa polimerizado (PoliLacO) insertado entre ψVλ17-20. Líder, L; región variable reordenada, Vλ-Jλ; región constante, Cλ. Figura 16B: Análisis de transferencia Western de expresión de GFP-LacI o GFP-LacI-VP16 en los transfectantes indicados. La expresión se ensayó mediante transferencia con anticuerpos anti-LacI, en relación con el control de la β-acción. Figura 16C: Perfil del ciclo celular de los transfectantes PoliLacO-λ GFP-LacI DT40 y DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI-VP16. Figura 16D: Cuantificación de la comparación de RT-PCR de los niveles de transcripción de Vλ en DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI y DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI-VP16 transfectante, normalizado a DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI. Figura 16E: Imagen fluorescente de transfectantes DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI-VP16. Las flechas indican GFP-LacI-VP16 unido a Igλ. Los núcleos se contrastaron con DAPI (azul).

Figura 17A-C. Los niveles de Ach3 y Ach4 se incrementan y la conversión de genes Ig es acelerado por VP16 atado a la matriz ψVλ. Figura 17A: Enriquecimiento de H3 (Ach3) acetilado a Igλ en transfectantes de PoliLacO-λ GFP-LacI-VP16 de DT40. Después de ChIP, dúplex PCR se llevó a cabo con cebadores OVA y ψVλ17R. El enriquecimiento se expresa en relación con el control total de entrada de ADN, ± desviación estándar de cuatro amplificaciones separadas de cantidades crecientes de ADN plantilla. Figura 17B: Enriquecimiento de H4 (Ach4) acetilado a Igλ en transfectantes de PoliLacO-λ GFP-LacI-VP16 de DT40. Notaciones como en 17A. Figura 17C: Pérdida mediana de slgM en paneles de transfectantes independientes DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI-VP16, normalizados a los transfectantes DT40 PoliLacO-Vλ GFP-LacI. La figura muestra datos combinados de al menos dos transfectantes independientes para cada constructo de fusión. A continuación se muestra el aumento de pliegue con respecto a los transfectantes DT40 PoliLacOVA GFP-LacI de control.

Figura 18A-B. La variante de histona H3.3 se enriquece en el locus IgA de DT40. Figura 18A: Diagrama esquemático del locus de Igλ de pollo reordenado en DT40. Notaciones como en la Figura 16A. Figura 18B: Resumen de un experimento de transferencia de cromatina representativo, ensayando la variante de histona H3.3. Los sitios interrogados fueron: una región aproximadamente 1 kb corriente arriba de la matriz ψVλ (flanco); La región entre ψVλ5 y Vλ; ψVλ1; ψVλ5; ψVλ13; ψVλ18; ψVλ24; ψVλ25; y el alelo VλR reordenado. Las barras indican la desviación estándar.

Figura 19A-E. La conversión del gen Ig es acelerada por HIRA atada a la matriz ψVλ. Figura 19A: Análisis de transferencia Western de expresión de GFP-LacI o HIRA-LacI en los transfectantes indicados. La expresión se ensayó mediante transferencia con anticuerpos anti-LacI, en relación con el control de la β-acción. Figura 19B: Perfil del ciclo celular de los transfectantes PoliLacO-λ GFP-LacI de DT40 y DT40 PoliLacO-λ HIRA-LacI. Figura 19C: Cuantificación de la comparación de RT-PCR de los niveles de transcripción de Vλ en los transfectantes PoliLacO-λ GFP-LacI de DT40 y DT40 PoliLacO-λ HIRA-LacI, normalizados a DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI. Figura 19E: Imagen fluorescente de los transfectantes DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI-VP16. Las flechas indican GFP-LacI-VP16 unido a Igλ. Los núcleos se contrastaron con DAPI (azul).

Figura 20A-C. La variante de histona H3.3 se enriquece y la conversión de genes se acelera por HIRA anclada en DT40 PoliLacO-λ. Figura 20A: Enriquecimiento de H3.3 (verde) y pan H3 (azul) en ψVλ17R en células DT40 PoliLacO-λ y DT40 PoliLacO-λ HIRA-LacI que expresan H3.3-FLAG. Se muestran los resultados para dos líneas independientes de DT40 PoliLacO-λ HIRALacI. El enriquecimiento de DT40 PoliLacO-λ se normaliza a un valor de "1". Las barras se muestran con ± desviaciones estándar de cuatro amplificaciones independientes de cantidades crecientes de ADN plantilla. Figura 20B: Citometría de flujo de células slgM+ en poblaciones representativas de células PoliLacO-GFP-LacI de DT40 y células PoliLacO-λ HIRA-LacI de DT40. Figura 20C: Pérdida mediana de slgM en paneles de transfectantes independientes DT40 PoliLacO-λ HIRA-LacI y DT40 HIRA, normalizados a los transfectantes DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI. La figura muestra datos combinados de al menos dos transfectantes independientes para cada constructo de fusión. A continuación se muestra el aumento de pliegues con respecto a los transfectantes DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI de control.

Figura 21A-B. Distintos efectos de la cromatina de HIRA y VP16. Figura 21A: Análisis de transferencia Southern de la región PoliLacO en los transfectantes PoliLacO-λ GFP-LacI, DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI-VP16 y DT40 PoliLacO-λ HIRALacI de DT40, después de la digestión de la cromatina con nucleasa micrococcica (MNasa). No MNasa, (-). Los números a la derecha denotan multímeros nucleosómicos. Figura 20B: Modelo de cómo la deposición elevada de histonas podría ser responsable de un patrón de "escalamiento" acentuado de la cromatina. Las puntas de flecha

indican posibles sitios de escisión de MNasa. Las puntas de flecha oscura indican un rango restringido de ADN escindible, y las puntas de flecha gris sugieren una amplia gama de ADN escindible para generar desviaciones del producto predicho de división de ~150 pb.

Figura 22. Secuencias de regiones V mutadas a partir de células DT40 PoliLacO-λ GFP-LacI-VP16. Las regiones V se amplificaron a partir de células slgM individuales y luego se secuenciaron. Las casillas azules claras describen los eventos de conversión génica de largo tracto; las cajas con sombreado azul describen los eventos de conversión génica de tracto corto; círculos rojos denotan mutaciones puntuales; las cajas punteadas negras indican las inserciones; los quilates denotan supresiones.

Figura 23. Secuencias de regiones V mutadas a partir de células DT40 PoliLacO-λ HIRA-LacI. Notaciones como en la Figura 22.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el desarrollo de líneas de células B en las que la mutagénesis de un gen de inmunoglobulina diana es inducible. La inmunoglobulina se expresa en la superficie celular, permitiendo la selección de clones que expresan moléculas de inmunoglobulina con especificidades particulares, afinidades incrementadas, y/o nuevas actividades. Esto puede llevarse a cabo con genes de inmunoglobulina y también no inmunoglobulina en el sitio diana.

DEFINICIONES

Todos los términos científicos y técnicos usados en esta solicitud tienen significados comúnmente usados en la técnica a menos que se especifique lo contrario. Tal como se utiliza en esta solicitud, las siguientes palabras o frases tienen los significados especificados.

Tal como se usa en el presente documento, "polipéptido" incluye proteínas, fragmentos de proteínas y péptidos, ya sea aislados de fuentes naturales, producidos por técnicas recombinantes o sintetizados químicamente. Los péptidos de la invención típicamente comprenden al menos aproximadamente 6 aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, la "diversificación" de un gen diana significa un cambio o mutación en secuencia o estructura del gen diana. La diversificación incluye los procesos biológicos de hipermutación somática, la conversión génica y la recombinación de conmutación de clase, que pueden dar como resultado mutación puntual, eliminación del ADN de mutación con plantilla e inserción de ADN. Los factores de diversificación de la invención pueden inducir, mejorar o regular cualquiera de estos métodos de diversificación.

Una "mutación" es una alteración de una secuencia polinucleotídica, caracterizada por una alteración en una o más bases de nucleótidos, o por una inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, o por una eliminación de uno o más nucleótidos de la secuencia, o una combinación de estos.

Como se usa en el presente documento, un "elemento regulador cis" es una secuencia de ADN posicionada en una región que controla la expresión o diversificación de un gen. Un factor de fijación se une de una manera específica de secuencia a esta región del ADN. Los elementos cis-reguladores representativos incluyen, pero no se limitan a, LacO y TetO.

Tal como se usa en el presente documento, un "factor de fijación" es una molécula que se une al elemento regulador cis de una manera específica de la secuencia. Un ejemplo de un factor de fijación es un "represor", una proteína que es sintetizada por un gen regulador y se une a un locus del operador, bloqueando la transcripción de ese operón. Ejemplos de factores de fijación incluyen, pero no se limitan a, LacI y TetR.

Tal como se utiliza en el presente documento, un "factor de diversificación" se refiere a una molécula que acelera o regula la diversificación o la hipermutación. Los factores de diversificación representativos incluyen algunos identificados inicialmente como reguladores transcripcionales (por ejemplo, VP16 o E47), una proteína asociada a heterocromatina (por ejemplo, HP1), una chaperona de histonas (HIRA), un remodelador de cromatina, un componente del complejo de poros nucleares (NUP153), un regulador génico o una combinación de los mismos. Otras moléculas que pueden servir como un factor de diversificación incluyen, pero no se limitan a, un factor de reparación del ADN, un factor de replicación del ADN, una resolvasa, una helicasa, un regulador del ciclo celular, un factor de ubiquitilación, un factor de sumoilación o una combinación de los mismos.

Como se usa en el presente documento, "promotor" significa una región de ADN, generalmente corriente arriba (5') de una región codificadora, que controla al menos en parte la iniciación y el nivel de transcripción. La referencia en este documento a un "promotor" debe tomarse en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras transcripcionales de un gen genómico clásico, incluyendo una caja TATA o un promotor de caja no TATA, así como elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias activadoras, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión génica en respuesta a estímulos de desarrollo y/o ambientales, o de una manera específica de tejido o de

tipo celular. Un promotor está normalmente, pero no necesariamente, situado corriente arriba o 5', de un gen estructural, cuya expresión regula. Además, los elementos reguladores que comprenden un promotor se sitúan habitualmente dentro de los 2 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen, aunque también pueden estar a muchos kb de distancia. Los promotores pueden contener elementos reguladores específicos adicionales, situados más distales al sitio de inicio para mejorar adicionalmente la expresión en una célula, y/o para alterar el tiempo o la inducibilidad de la expresión de un gen estructural al que está conectado operativamente.

Tal como se usa en el presente documento, "conectado operativamente" o "unido operativamente" y similares significa un enlace de elementos polinucleotídicos en una relación funcional. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Unida operativamente significa que las secuencias de ácido nucleico que están unidas son típicamente contiguas y, cuando es necesario unirse a dos regiones codificadoras de proteínas, contiguas y en el marco de lectura. Por "unión operativa" de un promotor a un polinucleótido transcribible se entiende colocar el polinucleótido transcribible (por ejemplo, la proteína que codifica el polinucleótido u otro transcrito) bajo el control regulador de un promotor, que controla entonces la transcripción y opcionalmente la traducción de ese polinucleótido.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de cadena sencilla o doble, y a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan con ácidos nucleicos de una manera similar a nucleótidos naturales.

Tal como se utiliza en el presente documento, "un" o "una" significa al menos uno, a menos que se indique claramente lo contrario.

Células B

La invención proporciona una célula B modificada para permitir la inducción reversible de la diversificación de un gen diana. La célula comprende un elemento regulador cis ligado operativamente a un gen diana de interés. Un factor que modula la diversificación puede fusionarse entonces con un factor de fijación que se une al elemento regulador cis, uniendo así el factor de diversificación a la región que controla la expresión del gen diana. La célula B puede ser una célula B de DT40 de pollo u otra célula B de vertebrado, con una célula B humana o una célula B de DT40 de pollo que contiene genes de inmunoglobulina (Ig) humanizados (en los que IgH e IgL humanos reemplazan IgH e IgL de pollo) preferido para algunas realizaciones.

Las células B son productores naturales de anticuerpos, haciéndolas una célula atractiva para la producción de anticuerpos mejorados y proteínas y polipéptidos no inmunoglobulinas mejoradas. Las células DT40 B son un punto de partida efectivo para la evolución de anticuerpos específicos y de alta afinidad por ciclos iterativos de hipermutación y selección (Cumbers et al., 2002; Seo et al., 2005). Las células DT40 tienen varias ventajas sobre otros vehículos probados para este propósito. DT40 diversifica constitutivamente sus genes de Ig en cultivo, y se dirige a mutaciones a las CDR de las moléculas de anticuerpo expresadas. DT40 prolifera más rápidamente que las líneas de células B humanas (tiempo de generación de 10-12 h, en comparación con las 24 h); las poblaciones clonales pueden aislarse fácilmente debido a que las células son fácilmente clonadas por dilución limitante, sin adición de factores especiales o capas de alimentación; y DT40 lleva a cabo la identificación de genes homólogos eficientes (Sale, 2004), por lo que se pueden reemplazar loci específicos a voluntad, permitiendo manipular factores que regulan la hipermutación.

La invención proporciona una nueva plataforma para generar anticuerpos de alta afinidad. En una realización, el vehículo para la evolución de anticuerpos es una línea de células B, DT40, que produce anticuerpos de manera natural, y que ha sido modificada genéticamente para hacer acelerar e inducir la hipermutación del gen de la inmunoglobulina. Al igual que otras células B, DT40 expresa anticuerpos en la superficie celular, permitiendo la selección clonal conveniente para alta afinidad y especificidad optimizada, por fluorescencia o clasificación de células activadas magnéticamente. En la línea celular DT40, la hipermutación se lleva a cabo por la misma vía que se ha perfeccionado durante millones de años de evolución de vertebrados a la hipermutación del gen Ig en un contexto fisiológico. Esta vía altamente conservada se dirige a las mutaciones preferentemente (aunque no exclusivamente) a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), los subdominios de las regiones variables (V) que hacen contacto con el antígeno (Figura 1).

Hasta ahora, el uso de DT40 (y otras líneas de células B cultivadas) para la selección de anticuerpos ha sido limitado debido a que la velocidad de hipermutación es muy lenta, aproximadamente 0.1%-1% de la hipermutación fisiológica. Para acelerar la hipermutación, los principales sitios y factores reguladores han sido manipulados, aprovechando nuestra sofisticada comprensión actual de los mecanismos moleculares de la hipermutación.

Aunque las células B de DT40 de pollo ofrecen muchas ventajas, en algunas realizaciones puede ser deseable utilizar células B humanas. Alternativamente, se pueden emplear genes Ig humanizados con las células B DT40 de pollo. Mediante la humanización de los genes de la inmunoglobulina DT40, la utilidad de esta plataforma para

terapéutica puede ampliarse, ya que los anticuerpos generados en la plataforma DT40 podrían usarse directamente para el tratamiento.

Existe una amplia documentación sobre la utilidad de los genes de anticuerpos humanizados y varios enfoques validados para la humanización, tal como se ha revisado recientemente (Waldmann y Morris, 2006; Almagro y Fransson, 2008). La humanización se efectúa mediante la sustitución de los genes Ig humanos por los genes Ig de pollo, y esto se hace fácilmente en DT40 aprovechando el alto rendimiento de la dirección génica homóloga. Las sustituciones se llevan a cabo por procedimientos análogos a los descritos en los ejemplos a continuación para insertar elementos reguladores cis, pero utilizando diferentes construcciones de orientación que están diseñadas para modificar partes distintas de los loci de cadena pesada y liviana. La sustitución podría producir derivados de DT40 que generan anticuerpos completamente humanizados, intercambiando regiones V(D)J y C; o anticuerpos quiméricos (regiones C humanizadas pero no regiones V). Estos reemplazos no alterarán los elementos cis-reguladores adyacentes ni afectarán su capacidad para acelerar la hipermutación. Los mecanismos conservados que promueven la hipermutación dirigirán la mutagénesis a las CDR de las secuencias humanizadas. La línea humanizada puede usarse así para el desarrollo acelerado de monoclonales humanos en cultivo celular, proporcionando una plataforma doble para la producción rápida de anticuerpos útiles para propósitos terapéuticos o diagnósticos.

Además, se puede optimizar la función efectora del anticuerpo mediante la sustitución de la región C. La inmunoterapia basada en anticuerpos es un enfoque poderoso para la terapia, pero este enfoque hasta ahora ha sido limitado en parte por la disponibilidad de anticuerpos específicos con propiedades efectoras útiles (Hung et al., 2008; Liu et al., 2008). La región constante (C) de un anticuerpo determina la función efectora. Pueden prepararse sustituciones de regiones C humanas nativas o modificadas por ingeniería genética mediante la orientación de genes homólogos en el vehículo DT40 para generar anticuerpos con la función efectora deseada.

Genes diana

Típicamente, el gen diana comprende un promotor y una región codificadora. La región codificadora del gen diana en la célula B de la invención puede ser aquella que codifica cualquier proteína o péptido de interés, y no necesita comprender una región codificadora completa. En algunas realizaciones, una región o dominio particular se dirige para la diversificación, y la región codificadora puede codificar opcionalmente sólo una porción que incluye la región o dominio de interés.

En una realización, el gen diana comprende un gen de inmunoglobulina (Ig), en el que el gen Ig comprende una región potenciadora y codificadora del gen Ig. El gen Ig puede ser todo o parte de un gen IgL y/o IgH. La región codificadora puede ser nativa del gen Ig, o un gen heterólogo. En algunas realizaciones, el gen diana es o contiene un dominio diana no Ig para la diversificación, así como dominios que permiten la visualización del producto génico sobre la superficie de la célula B, incluyendo un dominio transmembrana y una cola citoplásmica.

Elemento cis-regulador

El elemento regulador cis proporciona una almohadilla de aterrizaje en la región que controla la expresión del gen diana. Esta almohadilla de aterrizaje proporciona un lugar al que un factor de fijación puede unirse de una manera específica de secuencia a esta región del ADN. Se puede utilizar una variedad de moléculas como elementos reguladores cis, siempre y cuando el elemento sirva a la función de almohadilla de aterrizaje de proporcionar un lugar al cual un factor de fijación (una proteína de unión a ADN específica de secuencia) puede unirse al ADN y aportar una diversificación, fusionado al factor de fijación, en suficiente proximidad de la región codificadora de manera que la diversificación de la región codificadora sea capaz de una regulación reversible. En una realización típica, el elemento regulador cis es un operador de lactosa polimerizado (LacO). En una realización, el elemento comprende aproximadamente 80-100 repeticiones de LacO. En otra realización, el elemento regulador cis es un operador de tetraciclina (TetO).

Factores de fijación y diversificación

Un factor de fijación es aquel que se une al elemento regulador cis de una manera específica de la secuencia. En algunas realizaciones, la regulación de la diversificación se logra utilizando un factor de fijación caracterizado por la unión regulable al elemento regulador cis. En las realizaciones en las que LacO actúa como un elemento regulador cis, el represor de Lac, LacI, puede servir como factor de conexión, y su unión al elemento regulador cis, LacO, puede regularse mediante isopropil- β -D-tio-galactosida (IPTG). En ausencia de IPTG, LacI se une a LacO y la diversificación se acelera (o se regula de otro modo) por la presencia del factor de diversificación. IPTG puede ser añadido en el caso de que una suspensión o reducción de la actividad del factor de diversificación se desea, por lo que el proceso de mutagénesis es reversible. En realizaciones en las que TetO actúa como elemento regulador cis, TetR puede ser un factor de fijación adecuado, y la actividad del factor de diversificación puede ser regulada por tetraciclina o doxiciclina.

Un factor de diversificación es aquel que permite la modulación de la mutagénesis en la célula B. Los ejemplos a continuación describen los efectos del atar y liberar varios factores reguladores. Uno, la proteína heterocromatina HP1, hipermutación acelerada 5.6 veces (Ejemplo 4); otro, E47-Lacl (E47 es una isoforma del regulador E2A, crítica para el desarrollo de células B), hipermutación acelerada 4.5 veces (Ejemplo 3); y otros dos modificadores de estructura de cromatina de hipermutación acelerada 8.4 veces y 11.0 veces (Figura 2). Además, se ha dirigido un sitio de fijación al locus de cadena pesada de Ig expresado. La doble regulación de la hipermutación en IgH e IgL puede acelerar la hipermutación de 25 a 100 veces, permitiendo la producción rápida de nuevos anticuerpos.

Diversificación de genes de inmunoglobulina se mueven dentro del núcleo en el curso del ciclo celular, y este movimiento se correlaciona con y es necesario para la diversificación. La unión a los poros nucleares mediante la expresión de NP153-Lacl en células DT40 PoliLacO-λ (utilizando métodos descritos en los ejemplos a continuación) acelera la diversificación 5.7 veces. Este resultado predice que otros factores que regulan la posición del gen también regulan la diversificación, incluyendo otras proteínas de poros nucleares y otros factores que determinan o regulan la posición del gen en el núcleo.

La estructura de cromatina regula la diversificación también. Los datos del Ejemplo 4 muestran que la expresión de la proteína heterocromatina HP1 fusionada a Lacl acelera la diversificación y que este efecto es reversible por IPTG. Este hallazgo se ha extendido a la histona chaperona, HIRA.

Los reguladores de la expresión o función génica también sirven como factores de diversificación. El Ejemplo 3 siguiente muestra que la expresión del factor regulador E2A (expresado como la isoforma E47, como una fusión Lacl) acelera la diversificación, y que este efecto es reversible por IPTG. El dominio regulador VP16 del virus del herpes acelera la diversificación, y que este efecto es reversible por IPTG.

La desaminación también acelera la mutagénesis, pero no es inducible. La AID es la desaminasa de ADN específica de células B que inicia la diversificación de genes de Ig. El Ejemplo 2 siguiente muestra que la unión de AID (AID-Lacl) en DT40 PoliLacO-λ promueve la mutagénesis, pero que IPTG no supera este efecto. Por lo tanto, parece que los efectos mutagénicos son de todo el genoma, haciendo este factor inadecuado, sin más modificaciones.

En algunas realizaciones, el factor de diversificación es un regulador transcripcional, una proteína asociada a la heterocromatina, una chaperona de histonas, un remodelador de cromatina, un componente del complejo de poro nuclear, un regulador de gen o una combinación de los mismos. Otras moléculas que pueden servir como un factor de diversificación incluyen, pero no se limitan a, un factor de reparación del ADN, un factor de replicación del ADN, una resolvasa, una helicasa, un regulador del ciclo celular, un factor de ubiquitilación, un factor de sumoilación o una combinación de los mismos. En una realización, el regulador transcripcional es VP16 o E47 (codificado por E2A). Una proteína típica asociada a la heterocromatina para su uso como factor de diversificación es HP1. Un representante de histona chaperona es HIRA.

Tabla 1: Factores de diversificación representativos

Activadores transcripcionales

VP16	NeuroD	TFIIB	A13, B1,
E47	NPAS	TFIID	B2, B3
E12	OLIG	TFIIE	B4, B5, B6,
Myc	TAL1	TFIIF	B7,
c-Fos	Twist	TFIIH	B8, B9, B13,
c-Jun	USF1	GFI1	C4,
BACH	MAX	HIC	C5, C6, C8,
BATF	MITF	HIVEF	C9,
BLZF1	MNT	IKZF C10,	C11,
C/EBP	MLX	ILF	C13, D1, D3,
CREB	MXI1	KLF	D4, D8, D9
CREM	SREBP	MTF1	D10, D11,

ES 2 628 973 T3

	DBP	AP-2	MYT1	D12, D13
	DDIT3	CAR	OSR1	HOPX
5	GABPA	FXR	Sp1	MEIS
	HLF	LXR	Zbtb7	MEOX2
10	MAF	PPAR	ZB1	MNX1
	NFE	PXR	HIVEP1 MSX	
	NRL	RAR	AIRE	NANOG
15	NRF1	ROR	DIDO1	NKX
	XBP1	Rev-ErbA	GRLF1	PHF
20	ATOH1	HNF4	ING	POU dominio
	AhR	PNR	JARID	proteínas
	AHRR	RXR	JMJD1B	OTX
25	ARNT	NUR	ARX	PDX
	ASCL1	GCNF	CDX	PAX
30	BHLHB2	DAX1	CRX	E2F (1-5)
	BMAL	GATA	CUTL1	proteínas FOX
	CLOCK	ATBF1	DLX	HSF
35	EPAS1	CTCF	EMX2	ELF
	HAND	E4F1	EN	EGF
40	HES	EGR	FHL	ELK
	HEY	ERV3	ESX1	ERF
	HIF	ATBF1	HHEX	ERG
45	ID	BCL	HLX	ETS
	LYL1	CTCF	Homobox	ETV
50	MXD4	E4F1	(A1, A3, A4,	FLI1
	MYCL1	EGR	A5,	MYB
	MYCN	ERV3	A7, A9, A10	MYBL2
55	MyoD	TFIIA	A11	NF-κB
	NFAT	SRY	RBL2	NFI
60	STAT	SSRP1	Apetala 2	NFY
		CSDA	EREBP	Rho/Sigma
	Mef2	YBX1	B3	R-SMAD
65	SRF	CBF	ARID	

ES 2 628 973 T3

	HNF (1A, 1B)	HMGA	CAP	
		HBP1	IFI	
5	LEF1	Rb	MLL	
	SOX	RBL1	MNDA	
10	Proteínas asociadas a la heterocromatina		Chaperonas de histona ^o	
			Proteínas Polycomb	Cromatina
	HP1a			
15	HP1a		Proteínas Trithorax	Remodeladores
	HP1b		HIRA	Nucleolin
20	HP1c		ASF1a	Rtt106
			ASFb	NAP1
			CAF1	NAP2
25			Spt6	
	Reparación del ADN		XRCC2	HAP1 CSB
30	BRG1		DMC1	APE1 XPV
	BAF		RAD52	ADN EndoV
	PBAF		RecA	polimerasa MSH2
35	BRM		RecB	b MSH3
	Rdh54		RecC	ADN Ligasa MSH5
40	XRCC3		RecD	I MSH6
	FANCD2		MRE11	XRCC1 MLH1
	FANCI		RAD50	PARP PMS2
45	CtIP		XRS2/NBS1	XPA EXO1
	Rad54		KU70	XPB POLH
50	Rad51		KU80	XPC POLI
	BRCA1		SAE2	XPD REV1
	BRCA2		DNA-PK	XPE POLQ
55	RAD51 B		DNA Ligasa	XPF
	RAD51C		iV	XPG
60	RAD51 D		UNG	CSA
	Replicación del ADN	Resolvasas y Helicasas		Reguladores del ciclo celular
	PCNA			
65	RPA	RuvC		CHK1

ES 2 628 973 T3

	Smc1	RusA	CHK2
	Smc3	RuvB	p53
5	Rad21/Mcd1/Sccl	RuvC	p27
	Estromalina/Sccl	RecQ	
10	Sccl	hRECQ5	
	Sccl	WRN	
	Pds5	BLM	
15	Eco1	Srs2	
	Rec8	hRECQ1/L	
20		RTS/hRECQ4	
	Gen	HASPIN	MLL3 SET1A
	Regulación	MLL1	MLL4 SET1 B
25	CARM1	MLL2	MLL5 SET7/9
	ASH1	JMD2A/JHDM	NSD1 Sc ESA1
30	LSD/BHC110	3A	MYD2 SIRT2
	PRMT5	JMJD2B	SET2 SIR2
	SUV39H1	JMJD2C/GAS	JHDM1a SUV4-20H1
35	SUV39H2	C1	JHDM1b SUV4-20H2
	SETDB1/ESE	JMJ2D2D	Sc RTT109 PR-SET7/8
40	T	JHDM2a	DOT1 SET9
	EuHMT-asa/GL	JHDM2b	CKII Bmi/Anillo 1A
	P	AuroraB	PRMT4 MST1
45	G9a	CBP/p300	PRMT5 RNF20/RNF40
	CLL8	EZH2	HBO1 UbcH6
	RIZ1	MSK1	Sc HAT1
50	PCAF	MSK2	TIP60
	GCN5	FPR4	HOB1
55	Complejo de poros nucleares		
	Nup153		
60	Nup98		
	CRM1		
	otros componentes de poros estables y dinámicos		
65	Ubiquitilación	IAP	

	E1	Cdc34	
	E2	Rbx1	Sumoilación
5	E3	NEDD8/Rub1	Ubc9
	26S proteasoma	SCF/Grr1	SAE1/Aos1
	E6	SCF/Met30	SAE2/Uba2
10	VHL	SCF/Fbw7/hCdc4	SUMO E2
	MDM2	Cue1p	PIAS
15	BAP1	Ubc7p	Ulp1
	BARD1	Ubc1p	Siz1
	CBL	CHIP	Siz2
20	SCF/Skp2	Hsp/c70/90	SUMO E1
	Skp1	Parkin	SUMO E3
25	Cul1/Cdc53	NEDD4-2	Nse2 (Mms21)
	DUB	Csn5	Ulp2

30 Constructos de fusión

La fijación de un factor de diversificación al elemento regulador *cis* se consigue mediante la fusión del factor de diversificación con un factor de fijación. Los constructos de fusión que codifican esta combinación de factores pueden estar presentes y ser expresadas por la célula B de la invención y también pueden proporcionarse separadamente para añadirse a la célula B en el momento deseado y al seleccionar los factores deseados para un objetivo particular.

Los constructos de fusión se pueden preparar generalmente usando técnicas estándar. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican los componentes peptídicos pueden ser ensambladas por separado, y ligadas en un vector de expresión apropiado. Las secuencias de ADN ligadas están unidas operativamente a elementos reguladores transcripcionales o de traducción adecuados. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente peptídico se liga, con o sin un enlazante peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente peptídico de manera que los marcos de lectura de las secuencias están en fase. Esto permite la traducción en una única proteína de fusión que retiene la actividad biológica de ambos péptidos componentes.

Se puede emplear una secuencia enlazante peptídica para separar el primer y el segundo componentes peptídicos a una distancia suficiente para asegurar que cada péptido se pliegue en sus estructuras secundarias y terciarias. Dicha secuencia enlazante peptídica se incorpora en la proteína de fusión usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Las secuencias enlazantes peptídicas adecuadas pueden elegirse basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pudiera interactuar con regiones funcionales sobre el primer y segundo péptidos; y (3) la falta de residuos hidrófobos o cargados que podrían reaccionar con las regiones funcionales peptídicas. Las secuencias enlazantes peptídicas preferidas contienen residuos Gly, Asn y Ser. Otros aminoácidos casi neutrales, tales como Thr y Ala también pueden usarse en la secuencia enlazante.

55 Métodos y usos de la invención

La invención proporciona un método para producir un repertorio de polipéptidos que tienen secuencias variantes de un polipéptido de interés a través de la diversificación de secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido. Típicamente, el método comprende cultivar la célula B de la invención en condiciones que permiten la expresión del factor de diversificación, en el que el gen diana de la célula B contiene la región codificadora del polipéptido de interés, permitiendo de este modo la diversificación de la región codificadora. El método puede comprender además mantener el cultivo en condiciones que permitan la proliferación de la célula B hasta que se obtenga una pluralidad de polipéptidos variantes y el repertorio deseado. Debido a que las células B expresan los polipéptidos en la superficie externa, se puede determinar la naturaleza y extensión del repertorio. El repertorio puede utilizarse entonces para la selección de polipéptidos que tienen propiedades deseadas.

En otra realización, la invención proporciona un método para producir células B que producen un polipéptido optimizado de interés. El método comprende cultivar una célula B de la invención en condiciones que permiten la expresión del factor de diversificación, en el que el gen diana de la célula B contiene la región codificadora del polipéptido de interés y en el que la célula B expresa el polipéptido de interés en su superficie. El método comprende además seleccionar células del cultivo que expresan el polipéptido de interés en la superficie de células B seleccionando células que se unen a un ligando que se une específicamente al polipéptido de interés. Estas etapas de cultivo y selección pueden repetirse hasta que se seleccionen células que tengan una afinidad deseada para el ligando que se une específicamente al polipéptido de interés. La evolución de las especificidades de anticuerpos durante la expansión de un clon de células B se ilustra en la Figura 3. La selección de una población que expresa inicialmente múltiples especificidades (superior izquierda) enriquece sucesivamente para una especificidad deseada (centro) y afinidad superior (abajo a la derecha).

En las realizaciones en las que el polipéptido de interés es una Ig, tal como una IgL, IgH o ambas, el ligando puede ser un polipéptido, producido por medios recombinantes u otros, que representa un antígeno. El ligando puede unirse o enlazarse a un soporte sólido para facilitar la selección, por ejemplo, mediante la selección de células activadas magnéticamente (MACS). En otro ejemplo, el ligando puede unirse o enlazarse a una etiqueta fluorescente, para permitir la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los expertos en la técnica aprecian que otros métodos de etiquetado y selección de células son conocidos y pueden usarse en este método.

Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente la adición de una molécula reguladora al cultivo, en donde la molécula reguladora modula la unión del factor de fijación al elemento regulador cis, modulando así la diversificación de la región codificadora. En los ejemplos discutidos anteriormente, IPTG, tetraciclina y doxiciclina sirven como moléculas reguladoras. Los expertos en la técnica son conscientes de otras moléculas reguladoras que pueden usarse con un factor de fijación particular para regular la actividad de diversificación.

La molécula reguladora puede modular la diversificación de la región codificadora de una variedad de maneras. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula reguladora se añade al cultivo para efectuar la modulación y la modulación puede resultar en la reducción o detención de la diversificación, o en la mejora o aceleración de la diversificación, dependiendo de si la molécula reguladora particular es una que aumenta o disminuye la unión del factor de fijación al elemento regulador cis y si este cambio particular en la unión tiene el efecto de aumentar o disminuir la actividad de diversificación. En otras realizaciones, la modulación, ya sea reducción, parada, mejora o aceleración de la modulación, se efectúa retirando o eliminando la molécula reguladora del cultivo. Del mismo modo, la modulación de la diversificación puede efectuarse añadiendo un gen o eliminando un gen de la célula B, o aumentando o disminuyendo la expresión de un gen en la célula B. Un experto en la técnica puede apreciar fácilmente todas las permutaciones disponibles expuestas anteriormente, cada una de las cuales tiene el efecto de alterar el nivel o presencia de una molécula reguladora en la célula B y, a su vez, alterar la fijación del factor de diversificación al elemento cis-regulador y alterando así la actividad de diversificación.

Usos adicionales de los métodos de la invención incluyen hipermutación inducible de dianas de genes de Ig en Igλ. La línea de células DT40 PoliLacO-λ LacI-HP1 (véase el Ejemplo 4 a continuación) puede usarse para alterar la secuencia de cualquier gen de Ig corriente abajo de la matriz pseudo-V de Vλ. La estructura genómica en los loci Ig ha evolucionado para promover la mutagénesis de la región V, pero no la región constante de una molécula de Ig.

La alteración de la secuencia del gen Ig en el contexto de un locus de Ig aprovecha eso para asegurar que el producto de mutagénesis retiene una región constante funcional. La facilidad de la sustitución de genes en DT40 permite cambios útiles en ese gen. Por ejemplo, el gen de pollo (región variable y constante) podría ser reemplazado por un gen de anticuerpo humano (ya sea cadena pesada o liviana), para generar anticuerpos con aplicación terapéutica. Esto también se puede usar para generar anticuerpos terapéuticos para otras especies. Esto proporcionará un sistema rápido para la mutagénesis de una única cadena de un anticuerpo heterodimérico; o para la cadena única de anticuerpos de cadena única.

Los usos de este enfoque incluyen: hipermutación para generar clones de células B que producen Ig de alta afinidad; hipermutación para alterar la reactividad cruzada de anticuerpos, manteniendo al mismo tiempo el reconocimiento de un epítipo específico; hipermutación para identificar secuencias de la región V con alta afinidad por compuestos específicos. Esto se puede hacer en un único locus de Ig, o en ambos.

La hipermutación inducible también puede realizarse en IgH. El locus IgH en DT40 es un sitio eficiente de mutagénesis, al igual que Igλ. Las líneas celulares derivadas, hechas por técnicas paralelas, permiten la mutagénesis tanto en IgH como en Igλ, o en cada alelo por separado. La inserción de PoliLacO en IgH, para crear el derivado DT40 PoliLacO-λ PoliLacO-H LacI-HP1, permite la hipermutación en ambos genes de cadena H y L. La adición de IPTG al medio de cultivo libera algunos de los efectos inhibitorios que disminuyen los eventos con plantilla y aumentan la hipermutación no planificada. De este modo, variando la presencia y ausencia de IPTG, se puede alternar entre mutagénesis templada y no planificada de los genes que codifican ambas cadenas de un anticuerpo.

Se puede hacer un derivado que combine la regulación con IPTG de Lac Repressor (LacI) en un alelo con tetraciclina de la represión de Tet (TetR) en el otro alelo. Este derivado TetR permitirá la regulación independiente de

la diversificación en los alelos IgH e IgL; y utilizando diferentes mecanismos simultáneamente para regular la diversificación en el locus IgL e IgH.

La invención también proporciona un vehículo para la selección de receptores de células T. La inmunoterapia basada en células T tiene un gran potencial (Blattman and Greenberg, 2004). La especificidad y afinidad del receptor de células T se rige por los contactos CDR (Chlewicki et al., 2005). La selección inducible acelerada para la especificidad o receptores de células T de alta afinidad puede llevarse a cabo en un vehículo DT40 PoliLacO, que ha sido modificado por sustitución de receptores de células T (regiones V o genes enteros) para los loci Ig.

La producción de Igs catalíticas es otro aspecto de la invención. Los métodos relacionados con Ig de la invención no se limitan simplemente a la producción de Ig para la unión y el reconocimiento, ya que la Ig diana también podría usarse para la catálisis. Después del desarrollo de una molécula estable que imita el estado de transición de una reacción enzimática, las células DT40 PoliLacO- λ LacI-HP1 pueden usarse para desarrollar un anticuerpo que se une y estabilice el estado de transición química real. Después de identificar clones que producen una Ig capaz de unirse al intermedio, el sistema puede usarse de nuevo para cribar la actividad catalítica de Igs sobre el sustrato real en cultivo. Una vez que se ha demostrado cierta actividad en este sistema, la optimización de la actividad puede proceder por una evolución ulterior de los loci Ig a través de mutagénesis. Por lo tanto, la invención no requiere inmunización animal (un paso lento), inmortalización por tecnología de hibridoma, y la ineficiencia de tener que cribar hibridomas posteriormente para detectar anticuerpos que demuestran actividad catalítica.

La hipermutación inducible de dianas génicas no Ig en Ig λ o IgH es otro aspecto de la invención. La estructura genómica en los loci Ig ha evolucionado para promover la mutagénesis de 1-1.5 kb corriente abajo del promotor. Este sistema puede ser aprovechado para mutar regiones cortas de genes. La selección clonal basada en la expresión de la proteína superficial puede incorporarse por fusión de la región de interés a una porción de un gen que expresa elementos que median la expresión superficial. Ejemplos de elementos para la expresión superficial incluyen una péptida señal, un dominio transmembrana y una cola citoplásmica a partir de una proteína expresada en la superficie de las células B (Chou et al., 1999; Liao et al., 2001).

La invención también se puede utilizar para la producción de matrices de reconocimiento. La capacidad de desarrollar células que albergan receptores con afinidades para un amplio espectro de antígenos permite el desarrollo de matrices de reconocimiento. La combinación de esta tecnología con las respuestas intracelulares/señalización de la estimulación del receptor en DT40 (como la medición de Ca²⁺ por aequorina (Rider et al., 2003) o el uso de la transcripción de genes reportero) crearía un biosensor útil. Clones diversificados se manchan en arreglos o placas de 96 pozos, y se exponen a las muestras. Cada muestra produciría una "huella digital" de estimulación. Las matrices permitirían comparaciones cualitativas de muestras biológicas/médicas, ambientales y químicas. El análisis no necesita estar limitado al análisis de proteínas, como es el caso de las técnicas comparativas como los geles 2D, ya que todas las formas de compuestos pueden tener propiedades antigénicas. Además, las matrices conducirían a la identificación de componentes sin conocimiento de su presencia de antemano.

Kits

En un aspecto, se proporciona un kit que comprende

(a) una célula B modificada para inducir reversiblemente la diversificación de un gen diana, comprendiendo la célula B un elemento regulador cis ligado operativamente a un gen diana, en el que el gen diana comprende un promotor y una región codificadora; y

(b) uno o más recipientes; y

(c) uno o más constructos de fusión almacenados en un contenedor de (b), en el que cada constructo de fusión es expresable en la célula B y codifica un factor de fijación fusionado a un factor de diversificación, en el que el factor de fijación se une específicamente al elemento regulador cis de (a) y el factor de diversificación induce reversiblemente la diversificación de la región codificadora.

Para uso en los métodos descritos en el presente documento descriptiva, los kits también están dentro del alcance de la invención. Dichos kits pueden comprender un portador, envase o recipiente que está compartimentado para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, cada uno de los recipientes que comprende uno de los elementos separados (por ejemplo, células, constructos) para utilizar en el método.

Típicamente, el kit comprende una célula B de la invención y construcciones de fusión que expresan los correspondientes factores de fijación y diversificación. Por ejemplo, la célula B comprende un elemento regulador cis ligado operativamente a un gen diana, en el que el gen diana comprende un promotor y una región codificadora. El kit comprende además uno o más recipientes, con una o más construcciones de fusión almacenadas en los recipientes. Cada constructo de fusión comprende un polinucleótido que puede expresarse en la célula B y que codifica un factor de fijación fusionado a un factor de diversificación, en el que el factor de fijación se une

específicamente al elemento regulador cis de la célula B. La célula B puede incluir una pluralidad de elementos reguladores cis para uso con una pluralidad de construcciones de fusión.

El kit de la invención comprenderá típicamente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes que comprenden materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas e insertos de paquete con instrucciones de uso. Además, se puede proporcionar una etiqueta en el recipiente para indicar que la composición se usa para una aplicación terapéutica o no terapéutica específica, y también puede indicar instrucciones de uso. Direcciones u otra información también se pueden incluir en un inserto que se incluye con el kit.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar la presente invención y para ayudar a un experto en la fabricación y uso de la misma.

Ejemplo 1: Mutación y direccionamiento en la línea de células DT40 B

Este ejemplo ilustra una realización de la invención, preparada en dos etapas.

(1) DT40 PoliLacO- λ . Primero se construyó este derivado de la línea de células B de pollo DT40 que contiene un elemento genético que permite la regulación en cis en el locus Ig λ . En DT40 PoliLacO- λ , se inserta un operador de lactosa polimerizado (LacO) justo corriente arriba de la matriz pseudo-V λ en el lugar de la cadena liviana Ig λ . Esta es una extensión de un sistema desarrollado por Straight y Belmont, en el que PoliLacO consta de aproximadamente 80 repeticiones del sitio de unión LacO de 20 pb (Straight et al., 1996; Belmont, 2001). Hemos demostrado que esto no afecta al proceso normal de mutagénesis plantilla. El constructo de DT40PoliLacO- λ se describe en detalle en el Ejemplo 2 siguiente.

LacO está unido por un represor de la lactosa (LacI) con una afinidad muy alta: $<10^{-12}$ M. Este mecanismo regula la expresión del operón para el metabolismo de la lactosa en *E. coli*, y también puede usarse en una variedad de contextos celulares. Hemos demostrado que LacI se une a PoliLacO en DT40 PoliLacO- λ , mediante la generación de transfectantes estables que expresan LacI fusionado a la proteína fluorescente (GFP, RFP, YFP o CFP), y mostrando por microscopía de inmunofluorescencia que la proteína atada puede ser visualizada como una sola mancha en el núcleo de DT40 PoliLac que prolifera normalmente que expresa de manera estable GFP-LacI, RFP-LacI, YFP-LacI o CFP-LacI.

IPTG es una molécula pequeña que causa la liberación de LacI de LacO, tanto *in vitro* como en células cultivadas. El cultivo de DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI con un IPTG de poco más de 10 μ M causa la liberación de GFP-LacI de PoliLacO. El cultivo con IPTG no afecta a la proliferación celular.

(2) DT40 PoliLacO- λ LacI-HP1. A continuación construimos este derivado de DT40 PoliLacO- λ , en el que se produce un cambio a la hipermutación somática cuando *Drosophila melanogaster* HP1 (de L. Wallrath, Universidad de Iowa), un modificador de la estructura de la cromatina, está atado a PoliLacO. El fijación se consiguió utilizando el par muy bien caracterizado de cis y trans-reguladores, *E. coli* LacO/LacI. El HP1 es una proteína heterocromatina no histona bien caracterizada que funciona en el silenciamiento génico heterocromático y en la diseminación de heterocromatina, y en LacI HP1 atado con *Drosophila* se ha demostrado que promueve una estructura de cromatina cerrada y la inactivación de genes informadores vecinos a una repetición laco (Li et al., 2003; Danzer and Wallrath, 2004). Hemos demostrado que sujetar HP1 causa una transición de las secuencias de donante de un abierto a no estado de permiso, medida por ChIP; y causó V λ a sufrir mutagénesis por hipermutación somática en lugar de la conversión génica. Esto es funcionalmente equivalente a la eliminación de la matriz pseudo-V λ , que se ha demostrado que causa un cambio de mutagénesis plantilla a hipermutación somática (Arakawa et al., 2004). La caracterización adicional de DT40 PoliLacO- λ LacI-HP1 se documenta en el Ejemplo 4 siguiente.

(3) DT40 PoliLacO- λ VP16-LacI. Seguidamente utilizamos el plásmido de expresión p3'ss-EGFP-VP16 (de A. Belmont, Universidad de Illinois) para unir VP16-LacI a PoliLacO. VP16 es un fuerte activador de la transcripción, y se ha demostrado que reclutar complejos de histona acetiltransferasa (Tumbar et al., 1999). Hemos demostrado que la fijación de VP16 creó una estructura más permisiva de la cromatina, medida por ChIP; y causó V λ para someterse a mutagénesis por una estimulación de la conversión génica sobre los niveles de tipo salvaje.

Ejemplo 2: Aceleración de la mutagénesis mediante fijación de genes al poro nuclear

Descubrimos que la diversificación de los genes de la inmunoglobulina se mueve dentro del núcleo en el transcurso del ciclo celular, que este movimiento se correlaciona con los pasos de la ruta de diversificación y que la diversificación se inicia en la periferia nuclear. La desaminasa inducida por activación (AID), la enzima que inicia la diversificación, lleva una señal de exportación nuclear y es transportada constantemente fuera del núcleo a través del poro nuclear, por lo que sus concentraciones pueden ser más altas en la periferia del núcleo. Esto sugirió que podría ser posible acelerar la diversificación al aumentar la proximidad genética al poro nuclear. Hemos demostrado

que este es el caso mediante el uso de una fusión de la proteína de poro nuclear, Nup153, Lac repressor (LacI) para atar el locus IgH en DT40PoliLacO al poro nuclear. Se encontró que esto aceleró la tasa de diversificación clonal 5.7 veces. Los experimentos de control mostraron que el sujetar a PoliLacO era crítico para la aceleración de la mutagénesis. Este método es general y depende de la señal de exportación nuclear de AID y localización de genes para promover la mutagénesis de una diana. Por lo tanto, este método puede ampliarse para promover la mutagénesis de genes no Ig en células B, sujetándolos al poro; y se amplía adicionalmente para promover la mutagénesis de genes en células no B, expresando AID en esas células.

Ejemplo 3: E2A actúa en cis en la fase G1 del ciclo celular para promover la diversificación del gen Ig

Este ejemplo describe la regulación dependiente del ciclo celular de la diversificación del gen Ig en el núcleo. Los genes Ig reorganizados experimentan diversificación en secuencia y estructura iniciada por la desaminase de ADN, AID. Los genes Ig deben ser transcritos para que se produzca la diversificación, pero no se ha establecido si hay requisitos adicionales para la activación cis. Este ejemplo muestra, por transferencia de cromatina, que el factor regulador E2A se asocia con el gen de Ig λ R reordenado en la línea de células DT40 B de pollo, que lleva a cabo la diversificación constitutiva de genes de Ig. Mediante la obtención directa de imágenes de un derivado de DT40 en el que el operador de lactosa polimerizado marca el gen λ R reordenado, mostramos que las colocalizaciones de λ R/E2A son más prominentes en la fase G1 del ciclo celular. Demostramos además que la expresión del antagonista de E2A Id1 previene la colocalización de λ R/E2A en la fase G1 e impide la diversificación pero no la transcripción de λ R (a continuación, el gen Ig λ R se denomina a veces Ig λ o λ). Por lo tanto, E2A actúa en cis para promover la diversificación de genes Ig, y la fase G1 es la ventana crítica para la acción E2A.

Los cambios regulados en la secuencia genómica y la estructura que tienen lugar en los loci de Ig reflejan tanto el direccionamiento al ADN del daño a estos genes como el escape de la reparación fiel. La hipermutación somática, la recombinación de conmutación de clase y la conversión genética son iniciadas por la enzima específica de células B, la desaminasa inducida por activación (AID) (5-8). La AID desamina la citosina en uracilo, con clara preferencia por el ADN monocatenario (9-11). La transcripción es un requisito previo para la diversificación, que puede reflejar la preferencia de la AID para sustratos monocatenarios. El uracilo en el ADN es una lesión común, que puede ser reparada fielmente por vías altamente conservadas y eficientes (12). Sin embargo, los loci Ig pueden escapar de la reparación fiel y someterse a la reparación por vías propensas a error (13).

E2A, un miembro de la familia E de las proteínas bHLH, es un regulador crítico de muchos aspectos del desarrollo de linfocitos (14-17). Las proteínas E dimerizan para unirse al motivo de la caja E, CANNTG, y su función es antagonizada por las proteínas Id, que se heterodimerizan con las proteínas E para prevenir la unión al ADN. E2A es inducida en células B murinas activadas, donde regula la recombinación por conmutación de clase (18), así como la expresión del gen que codifica AID (19). En las células B de pollo, la inactivación del gen E2A perjudica la diversificación del gen Ig λ pero no la transcripción (20, 21); mientras que, a la inversa, la expresión ectópica de E47 (una de dos isoformas funcionalmente equivalentes codificadas por E2A) promueve la diversificación del gen de Ig λ , pero no afecta los niveles de transcripción de Ig λ (22).

La posibilidad de que E2A pudiera regular la diversificación del gen Ig mediante la unión a sitios en cis se sugirió primero por la evidencia de que las cajas E multimerizadas estimulan la hipermutación pero no la transcripción de un transgén de Ig en ratones (23). Esta posibilidad ha sido apoyada por la demostración de que las cajas E multimerizadas pueden promover la diversificación de genes Ig pero no la transcripción en las células B de pollo (24). Sin embargo, la resolución clara de la cuestión de si E2A actúa directamente en los genes Ig para promover la diversificación ha sido difícil, por varias razones. E-cajas funcionan como sitios para la regulación E2A-dependiente sólo en contextos específicos, por lo que la presencia de una Caja E no garantiza la función E2A en un sitio; el consenso suelto y la aparición frecuente de motivos E de Caja impide el análisis mutacional de cada sitio individual; y en algunos loci E2A es reclutado por proteína-proteína en lugar de interacción proteína-ADN, por lo que una Caja Eno es siempre requisito previo para la regulación E2A-dependiente (25).

Se ha establecido ahora que E2A actúa en cis en los genes Ig para promover la diversificación, en experimentos que aprovechan los derivados de la línea de células B de pollo de diversificación constitutivamente, DT40, en la que el alelo de Ig λ reordenado está marcado con el operador de lactosa polimerizada (DT40 PoliLacO- λ R). Por transferencia de cromatina (ChIP), mostramos que E2A se asocia con el alelo de Ig λ reordenado pero no sin reordenar en la línea parental, DT40. Este ejemplo demuestra que, en células PoliLacO- λ R de DT40, la diversificación se acelera tras la expresión de una proteína de fusión E47-LacI, que efectivamente enlaza E47 a λ R; y que el efecto estimulador de la expresión de E47-LacI no es evidente en células cultivadas con IPTG, por lo que la unión en cis es necesaria para promover la diversificación. Mediante la obtención de imágenes directas del gen λ R reordenado en células DT40 PoliLacO- λ R GFP-LacI, se muestra que la colocalización de λ R/E2A predominan en la fase G1; y que la expresión del antagonista de E2A, Id1, dificulta la diversificación y disminuye la colocalización de λ R/E2A específicamente en la fase G1, pero no afecta a los niveles de transcripción λ o la localización de λ R a las fábricas de transcripción activas. Estos resultados muestran que E2A actúa en cis en la fase G1 para promover la diversificación de genes Ig.

Materiales y métodos

Cultivo celular, transfección, ensayo de pérdida de slgM y análisis del ciclo celular

La línea de linfoma de bursal de pollo DT40 y su derivado DT40 PoliLacO- λ R se mantuvieron y transfectaron como se describe (26, 27). El constructo de expresión de E47-LacI se generó por subclonación de ADNc E47 a partir del plásmido S003 E47 (28) (proporcionado por Cornelis Murre, Universidad de California, San Diego, California) en el plásmido p3'SS-GFP-LacI (proporcionado por Andrew Belmont, Universidad de Illinois, Urbana, Illinois). El constructo de expresión Id1 (29) fue proporcionado por Barbara Christy (Universidad de Texas, San Antonio, Texas). El ensayo de pérdida de slgM se llevó a cabo como se describe (26, 30), y los resultados se compararon utilizando la prueba U de Mann-Whitney con el paquete de software R (<http://www.r-project.org>). Para los perfiles de ciclo celular basados en el contenido de ADN, se suspendieron 1×10^6 células que crecen exponencialmente en Triton X-100 al 0.1%, se trataron con 200 μ g/ml de RNasa A y 50 μ g/ml de yoduro de propidio y se analizaron como se describe (26).

Análisis de ChIP

Se preparó cromatina y se inmunoprecipitó como se describe (27, 31, 32); usando anticuerpo anti-E2A (ab11176; Abcam) o IgG de control. Se realizó PCR semicuantitativa con ADN polimerasa Taq de FastStart (Roche), utilizando cebadores previamente descritos para $V_{\lambda R}$ y $V_{\lambda U}$ (27); y los cebadores 5'-ATTGCGCATTGTTATCCACA-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-TAAGCCCTGCCAGTTCTCAT-3' (SEQ ID NO: 2) para la ovoalbúmina (Ova). Los productos de PCR se cuantificaron con el software Image-Quant (Amersham). El enriquecimiento se calculó como la relación del amplicón de interés al amplicón de Ova, normalizado a la relación de IgG de control, por ejemplo: Enriquecimiento $V_{\lambda R}$ = (anti-E2A [$V_{\lambda R}$ /Ova])/(IgG [$V_{\lambda R}$ /Ova]).

RT-PCR y transferencia Western

Para los ensayos de RT-PCR, la AID y la b-actina se amplificaron con cebadores como se describe (7); y transcritos de Ig λ con los cebadores 5'-GTCAGCAAACCCAGGAGAAAC-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-AATCCACAGTCACTGGGCTG-3' (SEQ ID NO: 4). Para la transferencia Western, se resolvieron lisados de células enteras (50 μ g) de DT40 PoliLacO- λ R RFP-LacI y DT40 PoliLacO- λ R RFPLacI Id1, y se detectó la proteína Id1 con anticuerpo anti-Id1 (JC-FL, Santa Cruz) usando FluorChem HD2 (Alpha Innotech).

Microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes

Para la imagen de PoliLacO, se transfectaron células de PoliLacO-IR DT40 con el constructo de expresión de GFP-LacI, p3'SSGFP-LacI (de Andrew Belmont, Universidad de Illinois, Urbana, Illinois), que codifica LacI diseñado para contener señales de localización nuclear SV40 y que carece de una secuencia necesaria para la formación del tetrámero (33); o su derivado, RFP-LacI, en el que GFP se sustituyó por RFP (DsRed-monómero, Clontech). Para la inmunotinción, se depositaron células ($\sim 3 \times 10^5$) sobre placas de vidrio utilizando Cytospin3 (800 rpm, 4 min., Shandon), se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 minutos y se tiñeron como se describió anteriormente (26). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-E2A (ab11176, 1:200; Abcam); Dominio anti-Pol II C-terminal fosforilado en Ser5 (ab5131, 1:500; Abcam). Alexa Fluor 488- o 594-conjugado anti-IgG (Molecular Probes) se utilizó como anticuerpos secundarios. Las imágenes fluorescentes se adquirieron utilizando el sistema de microscopía DeltaVision (Applied Precision) y se procesaron y analizaron con SoftWoRx (Applied Precision) e Imaris softwares (Bitplane). Las señales fluorescentes a veces eran parcial en vez de completamente superpuestas, lo que puede reflejar la considerable distancia (~ 17 kb) entre el PoliLacO-tag y la región V_{λ} ; Ambas configuraciones se puntuaron como colocalización. La fracción de colocalización se analizó con la prueba χ^2 de Pearson. Los radios nucleares se calcularon como el promedio de al menos dos mediciones independientes de diámetro, divididas por dos. La dependencia del ciclo celular del ciclo celular se determinó independientemente para cada línea celular y resultó ser relativamente invariable. Los valores estándar utilizados para correlacionar el radio nuclear con el ciclo celular fueron: G1, $r < 4 \mu$ m; G2, $r \geq 5.2 \mu$ m.

Resultados

E2A se asocia con el gen de Ig λ reordenado pero no sin reordenar

A pesar de la considerable evidencia de la importancia de E2A en la diversificación de genes de Ig, no se ha demostrado que este factor se asocie directamente con los genes Ig. Para probar la asociación de E2A con Ig λ , se utilizaron anticuerpos anti-E2A para inmunoprecipitar la cromatina de la línea de células DT40 B de pollo. Esta línea se derivó de un linfoma bursal y lleva a cabo la diversificación constitutiva de ambos genes Ig cadena pesada y liviana por la conversión de genes. Una búsqueda en el locus de la cadena liviana de pollo λ de 11 kb identificó más de 50 coincidencias con el consenso E2A, CANNTG: 17 en la región entre V_{λ} y $\psi V_{\lambda}1$, el más proximal de los pseudogenes corriente arriba; 2 en la región de unión a la matriz (MAR) en el intrón J-C; y 6 en el potenciador 3'. En las células DT40 B, el alelo funcional ha sufrido la recombinación VJ temprano en el desarrollo de células B, que elimina una región de 1.8 kb para unirse a los segmentos V y J, mientras que el alelo λ inactivo no está reorganizado

(Figura 4A), permitiendo a los dos alelos se puedan distinguir fácilmente por PCR. Tras la transferencia de la cromatina (ChIP), la recuperación de los alelos λ reordenados y no reordenados se ensayó en relación con un gen de control, la ovoalbúmina. Esto demostró que E2A fue 17.6 veces enriquecido en el alelo λ R reordenado, pero no enriquecido en el alelo λ U no reordenado (Figura 4B). Por lo tanto, E2A se asocia directamente con el alelo λ R reordenado.

E2A actúa en cis para regular la diversificación de Ig λ

Para indagar si E2A debe unirse en cis para promover la diversificación, aprovechamos un derivado de DT40, DT40 PolilacO- λ R, en el que se ha insertado operador de lactosa polimerizada en el ψ V λ . (Figura 5A), permitiendo que los factores expresados como fusiones con el represor de lactosa (LacI) se ataron al alelo λ R reordenado y se liberaron por cultivo con IPTG (27). La distribución del ciclo celular y las tasas clonales de conversión de genes Ig fueron comparables en DT40 PolilacO- λ R y de tipo salvaje DT40 (Figura 5B, C). Las células DT40 PolilacO- λ R se transfectoron establemente con un plásmido que expresaba la isoforma E47 de E2A fusionada a LacI (E47-LacI), o un plásmido control que expresaba proteína fluorescente verde fusionada a LacI (GFP-LacI). La distribución del ciclo celular fue comparable en los transfectantes GFP-LacI y E47-LacI, aunque los cultivos de esta última línea contenían algunas células sub-G1 (apoptóticas) (Figura 5D). Los niveles de transcritos Ig λ no se alteraron en los transfectantes E47-LacI (Figura 5E), confirmando los resultados publicados que muestran que E2A no regula la expresión génica Ig en células B de pollo (21, 22). Los niveles de transcripciones de AID fueron aproximadamente tres veces mayores en los transfectantes de E47-LacI (Figura 5E). Un aumento similar en la expresión de la AID en respuesta a la expresión ectópica de E47 ha sido observado por otros (22).

Para indagar si E2A regula la diversificación directamente, a través de la unión a Ig λ , cultivamos E47-LacI independientes (n=19) o GFP-LacI (n=13) transfectantes en presencia y ausencia de IPTG, y determinó las tasas de diversificación clonal utilizando el slgM ensayo de fluctuación de pérdidas (26, 27, 30). Este ensayo registra la inactivación de mutaciones independientemente de si se producen por conversión génica, mutación puntual, supresión o inserción, y por lo tanto cuantifica los eventos iniciadores independientemente del resultado de la mutagénesis. Este análisis mostró que la tasa clonal de diversificación era 4.5 veces mayor en los transfectantes de E47-LacI en relación con los controles GFP-LacI (P=0.019, prueba U de Mann-Whitney, Figura 5F). Por otra parte, el cultivo con IPTG, que libera E47-LacI de PolilacO, causó tasas de diversificación para volver casi a los niveles de fondo en DT40 PolilacO- λ R E47-LacI células, pero no tuvo efecto sobre GFP-LacI controles (Figura 5F). Así, E47-LacI promueve la diversificación actuando en cis.

E2A localiza a Ig λ R en la fase G1 del ciclo celular

En las células B humanas, la reticulación del receptor en la fase G1 del ciclo celular puede iniciar la hipermutación somática, produciendo mutaciones identificables dentro de 90 minutos (34). Por lo tanto, fue de interés para determinar la etapa de ciclo celular en la que E2A actúa en Ig λ . El gen λ R reordenado y diversificado se puede representar fácilmente como un punto brillante en células PolilacO- λ R de DT40 que expresan GFP-LacI (27). Sin embargo, cuando las células se tiñeron con Hoechst 33342 y se clasificaron por contenido de ADN para enriquecer las células en la etapa G1, S o G2/M, la fracción de células que mostraba una señal fluorescente clara del gen marcado disminuyó del 90-95% rutinariamente observado en las células no clasificadas a aproximadamente el 45%. Como tal una pérdida en la señal podría sesgar los resultados, por lo tanto, determinada etapa del ciclo celular por un enfoque diferente. El análisis de las células manchadas y clasificadas por Hoechst 33342 mostró que el tamaño nuclear era significativamente menor en la fase G1 que en las células de la fase G2/M (por ejemplo, la Figura 6A). Por lo tanto, preguntamos si el radio nuclear (r) podría utilizarse para establecer la etapa del ciclo celular, midiendo los radios nucleares de las células G1 (n=55) y las células G2 (n=55) de una población DT40 PolilacO- λ R exponencialmente creciente se había teñido con Hoechst 33342 y se clasificó basándose en el contenido de ADN. Los radios nucleares medios de las células G1 fueron $3.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$; y de células G2, $5.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (Figura 6B). La comparación de las relaciones de las células G1:S:G2 determinadas por el radio nuclear (3: 6: 1) y la tinción (2.7: 5.5:1.7) validaron adicionalmente este enfoque. Así, las células G1 se identificaron experimentalmente como $r < 4 \mu\text{m}$; y células G2, $r > 5.2 \mu\text{m}$.

Las colocalizaciones de λ R/E2A se identificaron fácilmente mediante análisis microscópico de desconvolución de células PolilacO- λ R GFP-LacI de DT40 teñidas con anticuerpos anti-E2A (por ejemplo, la Figura 7A). Las colocalización de λ R/E2A fueron evidentes en el 26% de las células asincrónicas (n=227). El análisis de la distribución del ciclo celular de colocalizaciones mostró que el 45% de colocalizaciones de λ R/E2A ocurrieron en fase G1, 38% en fase S y 17% en células en fase G2 (Figura 7B). Por lo tanto, hubo un exceso aparente de colocalizaciones de λ R/E2A en la fase G1 (45%) con respecto a la fracción (25%) de las células en fase G1 (P < 0.0001, prueba χ^2).

También se determinó la dependencia del ciclo celular de la transcripción λ R, identificando las fábricas de transcripción activa mediante tinción con anticuerpo a Ser5 fosforilado en el dominio C-terminal de la ARN polimerasa II (P*-Pol II), una modificación característica de las moléculas de Pol II alargadas (35). En las poblaciones de células asincrónicas de las células DT40 PolilacO- λ R RFP-LacI, se pudieron identificar numerosas fábricas de transcripción activa a lo largo del núcleo, y se observaron colocalizaciones de λ R/P*-Pol II en el 19% de las células (n=392); Figura 7C). Análisis de la distribución del ciclo celular de λ R/P*-Pol II colocalizaciones mostraron que el 21% de colocalizaciones se produjeron en la fase G1, 58% en la fase S; y 21% en células de fase G2 (Figura

7D). Esto es comparable con la distribución del ciclo celular. Por lo tanto, λ R se transcribe a lo largo del ciclo celular, pero λ R/E2A colocalizaciones predomina en la fase G1.

La expresión de Id1 inhibe la diversificación de genes Ig y colocalizaciones de λ R/E2A en la fase G1.

Para indagar si las colocalizaciones de λ R/E2A en fase G1 son críticas para la diversificación, determinamos el efecto de la expresión de Id en estas colocalizaciones. Id antagoniza E2A, y la expresión en células DT40 B de Id1 o Id3 se ha demostrado anteriormente para disminuir la diversificación de genes Ig (22). Hemos generado estable DT40 PolilacO- λ R RFP-LacI Id1 transfectantes, confirmó la expresión de Id1 por transferencia Western (Figura 8A), y mostró que la expresión de Id1 no alteró el perfil del ciclo celular (Figura 8B). Verificamos que la expresión de Id1 disminuyó la tasa clonal de diversificación de genes de Ig ($P < 0.001$, prueba de Mann Whitney U, Figura 8C); pero no afectó a los niveles de Ig λ o las transcripciones de AID (Figura 8D). Comparamos entonces colocalizaciones de λ R/E2A en el derivado que expresa Id1 y en la línea parental, mediante tinción con anticuerpos anti-E2A. Las colocalizaciones de λ R/E2A fueron evidentes en el 13% de las células DT40 PolilacO- λ R RFP-LacI Id1 asincrónicas (n=90), en comparación con el 26% de las células RFP-LacI de PolilacO- λ R de DT40 ($P = 0.0030$, prueba de χ^2).

Para determinar si la expresión de Id1 afectó colocalizaciones en una etapa específica del ciclo celular, las colocalizaciones de λ R/E2A en los transfectantes Id1 se cuantificaron con respecto al radio nuclear y al ciclo celular. Esto mostró que, en células DT40 PolilacO- λ R RFP-LacI Id1, el 10% de colocalizaciones ocurrieron en la fase G1; 58% en la fase S; y 32% en células de fase G2 (Figura 8E). Por lo tanto, la expresión de Id1 causó una disminución significativa en la fracción de colocalizaciones de λ R/E2A en la fase G1, del 45% en la línea parental al 10% en los transfectantes Id1 ($P < 0.0001$, prueba χ^2 ; Figura 8E) y el 90% de colocalizaciones de λ R/E2A en los transfectantes Id1 se produjeron después de la fase G1 del ciclo celular. Tomado junto con una diversificación disminuida evidente en los transfectantes Id1, esto demuestra que la fase G1 es la ventana crítica en la que E2A promueve la diversificación.

Las colocalizaciones de λ R/P*-Pol II se identificaron en 18% de las células DT40 PolilacO- λ R RFP-LacI Id1 teñidas con anticuerpos para las fábricas de transcripción activas (n=290), comparables a la línea parental (19%, $P=0.80$, χ^2 test; Figura 7D). El perfil del ciclo celular de las colocalizaciones de λ R/P*-Pol II fue también comparable en los transfectantes Id1 y en la línea parental (Figura 8F). La ausencia de efecto de la expresión de Id1 en λ R/P*-Pol II colocalizaciones es coherente con los niveles de transcripción de Ig λ no disminuidos en DT40 PolilacO- λ R RFP-LacI Id1 transfectantes (Figura 8D). Por lo tanto, la expresión de Id1 afecta a la distribución del ciclo celular de colocalizaciones de λ R con E2A, pero no con P*-Pol II.

Discusión

Estos resultados muestran que E2A debe actuar en cis para promover la diversificación de genes de Ig y que la fase G1 es la ventana crítica en la que E2A funciona en este proceso. Los experimentos han examinado λ genes etiquetados con PolilacO y imágenes por la unión a GFP-LacI o RFP-LacI. Esto proporciona un poderoso enfoque para estudiar la diversificación genética. El locus marcado es visible en >90% de las células fijas, lo que permite el análisis de colocalizaciones con factores que intervienen en la diversificación. La capacidad de fijar los reguladores potenciales y su liberación por cultivo con IPTG permite estudiar los efectos de un factor en el locus Ig λ independiente de sus otros objetivos. Esto es especialmente útil para un factor como E2A, que funciona en la parte superior de una gran y compleja jerarquía reguladora (36).

Los resultados establecen que E2A regula directamente la diversificación del gen Ig por asociación física con los loci Ig. La ChIP proporcionó evidencia clara de asociación de E2A con el alelo λ R reordenado en células B de DT40. El hecho de que E2A debe funcionar en cis se estableció mostrando que la aceleración en la diversificación resultante de la unión de E2A (fusión E47-LacI) con el alelo Ig λ en células PolilacO- λ R de DT40 no fue evidente en células cultivadas con IPTG, que libera LacI de LacO.

E2A es más conocido como un regulador transcripcional, pero la función E2A en la diversificación no refleja la activación transcripcional a Ig λ , ya que los niveles de transcritos Ig λ no se alteraron por la expresión ectópica de E47. Esto confirma los resultados de otros que han examinado los efectos de E2A en la diversificación en pollo y células B murinas (20, 22, 23). Además, colocalizaciones de λ R con E2A, que son más prominentes en la fase G1, distinta de la distribución del ciclo celular de λ R a fábricas de transcripción activa, que es comparable a la distribución del ciclo celular, lo que sugiere que λ R se transcribe a lo largo del ciclo celular. La independencia de la función de E2A en la diversificación y la transcripción es apoyada por los efectos contrastantes de la expresión Id1 en colocalizaciones de la λ R reordenada con E2A y fábricas de transcripción activa. La expresión de Id1 disminuyó la diversificación, y también disminuyó las colocalizaciones de λ R con E2A. Por el contrario, la expresión Id1 no afectó el número o la distribución del ciclo celular de localización de λ R a las fábricas de transcripción activa. Que E2A no esté obligado a reclutar λ R a las fábricas de transcripción es coherente con la ausencia de efecto de la expresión de Id1 en la transcripción de Ig λ .

E2A regula la expresión de la AID, y esto indirectamente estimula la diversificación del gen Ig. Se demostró que el gen AID era un objetivo de regulación transcripcional por E2A en células B murinas (19); y nosotros y otros (22)

hemos demostrado que la expresión ectópica de E2A aumenta los niveles de transcripción de AID en células B de pollo DT40. Esto puede contribuir o explicar la moderada aceleración en la diversificación evidente en las células cultivadas con IPTG DT40 PoliLacO- λ R E47-LacI. Aunque se ha informado que la ablación de E2A no disminuye los niveles de transcripción de AID en las células B de pollo (21), los factores redundantes con E2A podrían asegurar un nivel mínimo de expresión de AID en ausencia de E2A.

Los resultados identifican la fase G1 como la ventana crítica en la que E2A funciona en Ig λ . Se observó un exceso de colocalizaciones de λ R/E2A en la fase G1, en relación con otras etapas del ciclo celular; y mostró que la expresión de Id1 específicamente disminuye colocalizaciones en G1 fase, y disminuye la tasa de diversificación. Las proteínas Id heterodimerizan con proteínas E para inhibir ADN vinculante (14]. Que las colocalizaciones durante G1 fueron afectadas específicamente por la expresión Id1 puede ser indicativo de distintos modos de asociación E2A con Ig λ durante el ciclo celular. En las fases S y G2, E2A puede ser reclutado a través de interacciones con otras proteínas, en lugar de la unión directa al ADN.

Otras líneas de evidencia apoyan la opinión de que la diversificación se inicia en la fase G1. La hipermutación somática en la línea celular BL2 humana puede ser inducida por la estimulación *in vitro* que tiene lugar sólo durante la fase G1, y las mutaciones puntuales se vuelven evidentes a los 90 minutos de la estimulación, cuando las células están todavía en G1 (34). En las células B murinas activadas para la recombinación de conmutadores de clase, las colocalizaciones de IgH con NBS1 o γ -H2AX, participantes en la ruta de recombinación de conmutación, son prominentes en la fase G1 (37); y las rupturas de ADN en las regiones S se pueden detectar en la fase G1 (38). Las rupturas de ADN también se han identificado en etapas posteriores del ciclo celular en las líneas de células B humanas hipermutantes (39), pero estas demostraron ser independientes de AID (40).

E2A puede funcionar en la fase G1 para preparar un locus para eventos que ocurren más tarde en el ciclo celular, o incluso durante un ciclo celular subsiguiente. E2A ha sido implicado recientemente en el mantenimiento de la acetilación de la histona H4 (21), y es posible que E2A funcione para establecer un ambiente local de la cromatina favorable al ataque por AID o la diversificación efectiva en las células hijas.

Referencias

1. Maizels, N. 2005. Annu Rev Genet 39: 23-46.
2. Martomo, S. A., and P. J. Gearhart. 2006. Curr Opin Immunol 18: 243-248.
3. Di Noia, J. M., and M. S. Neuberger. 2007. Annu Rev Biochem 76: 1-22.
4. Teng, G., and F. N. Papavasiliou. 2007. Annu Rev Genet 41: 107-120.
5. Muramatsu, M., et al. 2000. Cell 102: 553-563.
6. Revy, P., et al. 2000. Cell 102: 565-575.
7. Arakawa, H., et al. 2002. Science 295: 1301-1306.
8. Harris, R. S., et al. 2002. Curr Biol 12: 435-438.
9. Bransteitter, R., et al. 2003. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 4102-4107.
10. Chaudhuri, J., et al. 2003. Nature 422: 726-730.
11. Ramiro, A. R., et al. 2003. Nat Immunol 4: 452-456.
12. Barnes, D. E., and T. Lindahl. 2004. Annu Rev Genet 38: 445-476.
13. Liu, M., et al. 2008. Nature 451: 841-845.
14. Murre, C. 2005. Nat Immunol 6: 1079-1086.
15. Hagman, J., and K. Lukin. 2006. Curr Opin Immunol 18: 127-134.
16. Murre, C. 2007. Adv Exp Med Biol 596: 1-7.
17. Nutt, S. L., and B. L. Kee. 2007. Immunity 26: 715-725.
18. Quong, M. W., et al. 1999. Embo J 18: 6307-6318.

19. Sayegh, C. E., et al. 2003. *Nat Immunol* 4: 586-593.
20. Schoetz, U., et al. 2006. *J Immunol* 177: 395-400.
- 5 21. Kitao, H., et al. 2008. *Int Immunol* 20: 277-284.
22. Conlon, T. M., and K. B. Meyer. 2006. *Eur J Immunol* 36: 139-148.
23. Michael, N., et al. 2003. *Immunity* 19: 235-242.
- 10 24. Kothapalli, N., et al. 2008. *J Immunol* 180: 2019-2023.
25. Lazorchak, A. S., et al. 2006. *Mol Cell Biol* 26: 810-821.
- 15 26. Yabuki, M., et al. 2005. *Nat Immunol* 6: 730-736.
27. Cummings, W. J., et al. 2007. *PLoS Biol* 5: e246.
28. Engel, I., and C. Murre. 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 996-1001.
- 20 29. Bounpheng, M. A., et al. 1999. *Faseb J* 13: 2257-2264.
30. Sale, J. E., et al. 2001. *Nature* 412: 921-926.
- 25 31. Larson, E. D., et al. 2005. *Curr Biol* 15: 470-474.
32. Larson, E. D., et al. 2005. *Mol Cell* 20: 367-375.
33. Belmont, A. S., and A. F. Straight. 1998. *Trends Cell Biol* 8: 121-124.
- 30 34. Faili, A., et al. 2002. *Nat Immunol* 3: 815-821.
35. Palancade, B., and O. Bensaude. 2003. *Eur J Biochem* 270: 3859-3870.
- 35 36. Schwartz, R., et al. 2006. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9976-9981.
37. Petersen, S., et al. 2001. *Nature* 414: 660-665.
38. Schrader, C. E., et al. 2007. *J Immunol* 179: 6064-6071.
- 40 39. Papavasiliou, F. N., and D. G. Schatz. 2000. *Nature* 408: 216-221.
40. Papavasiliou, F. N., and D. G. Schatz. 2002. *J Exp Med* 195:1193-1198.

Ejemplo 4: La estructura de la cromatina regula la conversión génica

Este ejemplo ilustra cómo la estructura de la cromatina contribuye al uso de secuencias homólogas como donantes para la reparación utilizando la línea de células B de pollo DT40 como modelo. En DT40, los genes de la inmunoglobulina se someten a la diversificación de secuencias reguladas mediante la conversión génica planificada por donantes de pseudogenes. Hemos encontrado que la matriz de pseudogenes V λ se caracteriza por modificaciones histonas asociadas con la cromatina activa. Hemos demostrado directamente la importancia de la estructura de la cromatina para la conversión génica, utilizando un sistema experimental regulable en el que la proteína heterocromatina, HP1, expresada como una fusión al represor Lac, está atada a los operadores de lactosa polimerizados integrados en la matriz donadora pseudo-V λ . El HP1 atado disminuyó la acetilación de las histonas dentro de la matriz pseudo-V λ , y alteró el resultado de la diversificación V λ , de modo que predominaban las mutaciones no planificadas en lugar de las mutaciones con plantilla. Así, la estructura de la cromatina regula la reparación dirigida por homología. Estos resultados sugieren que las modificaciones de las histonas pueden contribuir al mantenimiento de la estabilidad genómica evitando la recombinación entre secuencias repetitivas. Este ejemplo usa las siguientes abreviaturas: AcH3, histona H3 acetilada; AcH4, histona H4 acetilada; AID, deaminasa inducida por activación; DSB, ruptura de doble filamento; GFP, proteína fluorescente verde; Ig, inmunoglobulina; MRN, MRE11/RAD50/NBS1; NHEJ, no-homólogos de unión final; V, variable; UNG, Uracil DNA glicosilasa; AP, abásico; PoliLacO, operador de lactosa polimerizada; ChIP, transferencia de cromatina; Ova, ovoalbúmina; LOH, pérdida de heterocigosidad.

Materiales y métodos

Transferencia de cromatina (ChIP). La ChIP se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente [48, 89]. Para todos los experimentos se analizaron al menos dos preparaciones de cromatina de al menos dos líneas transfectadas de forma estable independiente. Las figuras presentan un experimento representativo en el cual los resultados del análisis de cuatro amplificaciones separadas se usaron para calcular una desviación estándar. Se llevaron a cabo cuatro amplificaciones separadas de diluciones en serie de ADN plantilla, para establecer que las intensidades de producto medidas estaban dentro del intervalo lineal. El enriquecimiento del amplicón experimental se normalizó al enriquecimiento de un amplicón de control interno del gen de la ovoalbúmina (Ova), amplificado en el mismo tubo por PCR dúplex; y el enriquecimiento en ChIP con anticuerpos específicos se normalizó a experimentos paralelos en los que se llevó a cabo la ChIP con controles de ADN de entrada total. La inclusión del amplicón de control interno de Ova nos permitió normalizar para la eficiencia IP, el trasvase de fondo y las diferencias en la carga de gel. Enriquecimiento = $[(\psi\text{V}\lambda/\text{Ova})_{\text{Ab}}]/[(\psi\text{V}\lambda/\text{Ova})_{\text{Entrada}}]$. Como control adicional, se comparó la relación de los amplicones experimentales y de control en el control de entrada total con una ChIP de control con IgG poliespecífica; en todos los casos, el enriquecimiento en la entrada y los controles de IgG eran esencialmente iguales. Los datos se presentan para experimentos representativos; las desviaciones estándar se calcularon a partir de cuatro amplificaciones separadas de diluciones en serie de ADN plantilla.

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-Ach3 (06-599), anti-Ach4 (06-866), y H3 (K4) dimetilado (07-030) de Upstate (Lake Placid, NY). Los cebadores de PCR para ChIP fueron:

V λ R: 5'-GCCGTCAGTATTGCCGTTTTCTCCCTC-3' y 5'-CGAGACGAGGTCAGCGACTCACCTAGGAC-3'; región entre $\psi\text{V}\lambda 1$ y V λ : 5'-CTGTGGCCTGTCTAGTCTTA-3' y 5'-GCAGGGAACCACAAGAACAT-3'; $\psi\text{V}\lambda 1$: 5'-GGGACTTGTGTACCAGGAT-3' y 5'-CGCAGTCACATGTGGAATATC-3'; $\psi\text{V}\lambda 5$: 5'-GAGCCCCATTTTCTCTCCTC-3' y 5'-GAGATGTGCAGCAACAAGGA-3'; $\psi\text{V}\lambda 13$: 5'-CCCTCTCCCTATGCAGGTTC-3' y 5'-CCCCTATCACCATACCAGGA-3'; $\psi\text{V}\lambda 18$: 5'-CCATTTTCTCCCTCTCTCC-3' y 5'-TCACCCTACAGCTTCAGTGC-3'; $\psi\text{V}\lambda 24$: 5'-CCATTTTCTCCCTCTCTCC-3' y 5'-CAGCCCATCACTCCCTCTTA-3'; $\psi\text{V}\lambda 25$: 5'-TCTGTTGGTTTCAGCACAGC-3' y 5'-GCAGTTCTGTGGGATGAGGT-3'; $\psi\text{V}\lambda$ flanco corriente arriba: 5'-GGCTCCTGTAGCTGATCCTG-3' y 5'-GTTCTTTGCTCTTCGGTTGC-3'; $\psi\text{V}\lambda 17$ en el alelo dirigido a PoliLacO: 5'-TAGATAGGGATAACAGGGTAATAGC-3' y 5'-AGGGCTGTACCTCAGTTTCAC-3'; OVA: 5'-ATTGCGCATTGTTATCCACA-3' y 5'-TAAGCCCTGCCAGTTCTCAT-3'; Pol ϵ : 5'-GGGCTGGCTCATCAACAT-3' y 5'-CTGGGTGGCCACATAGAAGT-3' (SEQ ID NOS: 5-28, respectivamente).

Constructos, transfección y cultivo celular. El plásmido de expresión de LacI-HP1 se creó sustituyendo LacI-HP1a de un constructo proporcionado por L. Wallrath (Universidad de Iowa, Iowa City) para AID en pAIDPuro (de H. Arakawa, Munich, Alemania), para situar LacI-HP1 corriente abajo del promotor β -actina de pollo. El plásmido de expresión GFP-LacI (p3'ss-EGFP-LacI) fue proporcionado por A. Belmont (Universidad de Illinois, Urbana). El cultivo celular y la transfección se llevaron a cabo como se describe previamente [47]. DT40 PoliLacO- λ_R se generó por orientación génica homóloga, utilizando un constructo que lleva aproximadamente 3.8 kb de operador de lactosa polimerizada (PoliLacO) flanqueada por brazos diseñados para dirigirse a la región entre $\psi\text{V}\lambda 17$ - $\psi\text{V}\lambda 20$, 17 kb corriente arriba de la V λ_R transcrita. En resumen, los integrantes homólogos fueron identificados por PCR, y el marcador seleccionable eliminado por expresión Cre. El linfoma de la bursa DT40 deriva de células B en las que solo se reordena un alelo Ig λ y en el que los dos cromosomas parentales se distinguen por un polimorfismo cerca de $\psi\text{V}\lambda 17$. Esto nos permitió determinar si el alelo reordenado o no arreglado había sido atacado por PCR. Los experimentos de control establecieron que la distribución del ciclo celular era comparable en las células DT40 PoliLacO- λ_R , DT40 PoliLacO- λ_R GFP-LacI y DT40 PoliLacO- λ_R LacI-HP1; y que el cultivo de células con IPTG hasta 500 μM durante 7 días no afectó la tasa de proliferación o las modificaciones de la cromatina en $\psi\text{V}\lambda 17_R$ en células de control DT40 PoliLacO- λ_R GFP-LacI. Los oligonucleótidos para el análisis de la secuencia V λ se han descrito [47].

Imágenes de fluorescencia. Para la obtención de imágenes de fluorescencia, las células (2×10^5) fueron sometidas a Cytospin sobre láminas de vidrio y atadas con paraformaldehído al 2% durante 20 minutos, permeabilizadas con 0.1% de NP-40 durante 15 minutos y teñidas como se describió anteriormente [90]. La tinción primaria fue con un anticuerpo monoclonal anti-LacI (dilución 1:500; Upstate); y el anticuerpo secundario fue anticuerpo IgG Alexa Fluor 594 (1: 2000, Molecular Probes, Eugene, OR). Para visualizar el núcleo, las células se tiñeron con DAPI (Sigma, Saint Louis, MO). Las imágenes fluorescentes se adquirieron utilizando el sistema de microscopía DeltaVision (Applied Precision) y se procesaron con software softWoRx (Applied Precision).

RT-PCR. Se recolectó ARN de células utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen) y se purificó con una columna PreAnalytiX (Qiagen). Los transcritos de V λ se amplificaron después de la dilución de la plantilla (1:1300); y la β -actina se amplificó a partir de una muestra no diluida. Los cebadores para la amplificación de V λ fueron 5'-GTCAGCAAACCCAGGAGAAAC-3' (SEQ ID NO: 29) y 5'-AATCCACAGTCACTGGGCTG-3' (SEQ ID NO: 30). Los cebadores para la amplificación de β -actina ya se han descrito [36].

Cuantificación de variantes de pérdida de sIgM y análisis de secuencias. El ensayo de variante de pérdida sIgM, que mide las variantes de pérdida de sIgM acumuladas resultantes de mutaciones con desplazamiento de marco o no sentido en regiones V mutadas, se usó para cuantificar la diversificación de regiones de Ig V [47, 50]. En resumen,

las células slgM^+ se aislaron mediante citometría de flujo seguido por la clonación de dilución limitativa, y se expandieron durante 4 semanas. Para cuantificar la fracción de células slgM^+ , se tiñeron aproximadamente 1×10^6 células con IgM-RPE anti-pollo (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) y se analizaron en un FACScan con el software CellQuest (BD Biosciences).

El PCR de célula individual y el análisis de secuencias se realizaron como se describe [47]. En resumen, se clasificaron las células slgM^+ , se dividieron alícuotas en pozos individuales, se amplificaron y se secuenciaron regiones $\text{V}\lambda$ y sus secuencias se compararon con los donantes $\psi\text{V}\lambda$ para determinar si las mutaciones fueron con plantilla o sin plantilla. El criterio para una mutación con plantilla fue que nueve bases consecutivas deben ser una coincidencia exacta en el donante y el receptor. Las secuencias fueron derivadas de dos líneas transfectadas independientemente. Sólo se incluyeron secuencias únicas para la clasificación de las mutaciones.

Resultados

Estructura de cromatina permisiva en las plantillas de donante $\text{V}\lambda$ y $\psi\text{V}\lambda$

En células B de DT40, el gen $\text{V}\lambda$ funcional en un alelo de $\text{Ig}\lambda$ se reordena y se expresa, y el otro no se reorganiza y no se expresa. Se caracterizó la estructura de la cromatina en los alelos reordenados ($\text{V}\lambda_{\text{R}}$) y no reordenados ($\text{V}\lambda_{\text{U}}$) y la matriz $\psi\text{V}\lambda$ por transferencia de cromatina (ChIP). La ChIP se llevó a cabo con anticuerpos específicos para la acetilación de lisina en el terminal N de las histonas H3 y H4. El ADN recuperado se amplificó en reacciones de PCR dúplex; recuperación normalizada a un amplicón del gen de la ovoalbúmina (Ova), que no se expresa en células B; y enriquecimiento normalizado a un control de entrada de ADN total (ver Materiales y Métodos para más detalles). La estructura genómica distinta de $\text{V}\lambda_{\text{R}}$ y $\text{V}\lambda_{\text{U}}$ permiten distinguirlos por PCR con cebadores específicos. La ChIP demostró un considerable enriquecimiento de las histonas acetiladas H3 y H4 (AcH3 y AcH4) en el gen $\text{V}\lambda_{\text{R}}$ reordenado. En un experimento típico, AcH3 se enriqueció más de 80 veces a $\text{V}\lambda_{\text{R}}$ y AcH4 más de 30 veces (Figura 9B). Por el contrario, en el alelo $\text{V}\lambda_{\text{U}}$ no reordenado, los niveles de AcH3 y AcH4 eran mucho más bajos que a $\text{V}\lambda_{\text{R}}$ (16 veces y 7 veces inferior, respectivamente); y sólo unos pocos se enriquecieron en relación con el ADN de entrada.

Se ensayó la estructura de cromatina dentro de la matriz $\psi\text{V}\lambda$ por amplificación con cebadores que interrogaron siete sitios, incluyendo una región entre $\psi\text{V}\lambda 1$ y el gen $\text{V}\lambda$, $\psi\text{V}\lambda 1$, $\psi\text{V}\lambda 5$, $\psi\text{V}\lambda 13$, $\psi\text{V}\lambda 18$, $\psi\text{V}\lambda 24$, $\psi\text{V}\lambda 25$ y la región flanqueante corriente arriba. (Debido a la escasez de polimorfismos, los arreglos $\psi\text{V}\lambda$ en los dos alelos $\text{Ig}\lambda$ en DT40 no se pueden distinguir fácilmente por PCR). Sorprendentemente, se observó enriquecimiento considerable de AcH3 y AcH4 a lo largo de la matriz $\psi\text{V}\lambda$ (Figura 9B). El enriquecimiento no fue proporcional a la distancia del gen $\text{V}\lambda_{\text{R}}$ transcrita, ya que los sitios distantes de $\text{V}\lambda_{\text{R}}$ no mostraron consistentemente menores niveles de enriquecimiento que los sitios proximales (Figura 9B). Por lo tanto, el enriquecimiento de histonas acetiladas dentro de la matriz $\psi\text{V}\lambda$ no representa simplemente una difusión graduada de la modificación de la cromatina desde el gen $\text{V}\lambda_{\text{R}}$ transcrito hasta los sitios corriente arriba. La estructura de cromatina no uniforme del locus sugiere la presencia de elementos cis que regulan la estructura de la cromatina en la matriz $\psi\text{V}\lambda$.

Fijación reversible de proteínas de fusión de LacI a la matriz $\psi\text{V}\lambda$ en DT40 PoliLacO- λ_{R}

La modificación local de la estructura de la cromatina puede conseguirse uniendo los reguladores a los sitios de unión al ADN como proteínas de fusión apropiadas. Esta estrategia se ha utilizado, por ejemplo, para demostrar que la proteína heterocromatina HP1a, expresada como una fusión con el represor de lactosa (LacI-HP1), promueve una estructura de cromatina cerrada y la inactivación de los genes informadores vecinos de una repetición LacO en *Drosophila* [61, 62]; y para demostrar que la fijación de la histona metiltransferasa G9a de vertebrados a un sitio de unión GAL4 dentro de un minigén V(D)J reportero afecta la recombinación mediada no homóloga de ese constructo [63]. La línea celular, DT40 PoliLacO- λ_{R} , que es un derivado de DT40 en el que se ha insertado el operador de lactosa polimerizado (PoliLacO) mediante un gen homólogo dirigido entre $\psi\text{V}\lambda 17$ - $\psi\text{V}\lambda 20$, 17 kb corriente arriba del transcrita $\text{V}\lambda_{\text{R}}$ (Figura 10A). El inserto PoliLacO es de 3.8 kb de longitud y consta de aproximadamente 100 copias de un operador de 20-méro [64]. Usando esta línea celular, es posible ensayar los efectos de los factores reguladores atados sobre la recombinación homóloga en un proceso fisiológico dentro de un locus endógeno, evitando la necesidad de un reportero transgénico. Los experimentos de control han demostrado que la etiqueta PoliLacO no afecta a la proliferación celular, el ciclo celular, o la diversificación de genes Ig .

En DT40 PoliLacO- λ_{R} GFP-LacI, que expresa de forma estable una proteína verde fluorescente mejorada fusionada a un represor de lactosa (GFP-LacI), el alelo λ_{R} marcado puede ser visualizado directamente por microscopía de fluorescencia y aparece como un punto distinto en cada célula (Figura 10B, izquierda). El fijación es reversible, ya que los puntos brillantes no son evidentes tras un cultivo durante la noche con IPTG 100 μM , lo que impide que LacI se una a LacO (Figura 10B, derecha).

El HP1 atado disminuye las modificaciones características de la cromatina activa a $\psi\text{V}\lambda$

Para manipular la estructura de la cromatina en la matriz $\psi\text{V}\lambda$, generamos transfectantes estables de DT40 PoliLacO- λ_{R} que expresan la proteína HP1 de *Drosophila melanogaster* fusionada a LacI (LacI-HP1). El HP1 es una

proteína heterocromatina no histona que funciona en el silenciamiento de genes heterocromáticos, la propagación de heterocromatina y desacetilación de histonas [58-60]. El HP1 atado ha demostrado promover una estructura cerrada de cromatina en los genes adyacentes [61, 62, 66-68]. La tinción de DT40 PolilacO- λ_R LacI-HP1 transfectantes con anticuerpos anti-LacI mostró que el LacI-HP1 colocalizado con regiones densas de DAPI correspondientes a la heterocromatina pericéntrica (Figura 11A), se comporta como un marcador funcional de heterocromatina [65].

Para indagarse si el LacI-HP1 atado alteró la estructura de la cromatina, se ensayaron modificaciones de la cromatina en $\psi\lambda 17$. Este es el único sitio en el arreglo $\psi\lambda$ en el que los alelos reordenados y no reordenados pueden distinguirse mediante el uso de cebadores de PCR específicos, debido a un polimorfismo de secuencia creado durante la construcción de DT40 PolilacO. Después de la ChIP, se amplificó el ADN con cebadores de PCR específicos para el alelo reordenado dirigido ($\psi\lambda 17_R$). El enriquecimiento de $\psi\lambda 17_R$ se comparó con el gen de la ovoalbúmina no expresada (Ova) como control interno; y normalizado a la relación de enriquecimiento de $\psi\lambda 17_R$: Ova en el ADN de entrada total (ver Material y Métodos). Ach3 y Ach4 se enriquecieron en controles $\psi\lambda 17_R$ en DT40 PolilacO- λ_R GFP-LacI 2.2 veces y 5.9 veces, respectivamente (Figura 11B, C). Estos niveles de enriquecimiento son comparables a los documentados en DT40 (Figura 9B). (Obsérvese que el análisis de la modificación en $\psi\lambda$ en la exploración de la línea DT40 parental incluye necesariamente ambos alelos, lo que puede subestimar las modificaciones de activación en el alelo reordenado. Al contrario, en el análisis de las modificaciones en $\psi\lambda 17_R$ sólo interroga el alelo activo.) Ach3 y Ach4 fueron no enriquecidos en $\psi\lambda 17_R$ en DT40 PolilacO- λ_R LacI-HP1 transfectantes (0.6 y 1.0 veces, respectivamente, Figura 11B, C), lo que es compatible con el silenciamiento mediado por HP1. El HP1 puede efectuar el silenciamiento mediante el reclutamiento de una histona metiltransferasa que modifica la lisina 9 de la histona H3 [66-68], pero también puede promover el silencio independiente de esta modificación [61]. La ChIP utilizando anticuerpos contra cualquiera de H3 di- y tri-metilada (K9) no reveló un claro enriquecimiento de la modificación de H3 K9-Me (datos no presentados). La metilación de la lisina 4 (diMeK4) de la histona H3 se asocia con la transcripción y generalmente presenta una distribución superpuesta con acetilación [69,70]. Los ensayos de diMeK4 (H3) en $\psi\lambda 17_R$ demostraron que esta modificación estaba enriquecida 18.9 veces en células DT40 PolilacO- λ_R GFP-LacI, pero a niveles de fondo en células LacI-HP1 de PolilacO- λ_R DT40 (Figura 11B, C).

El HP1 promueve el mantenimiento y la propagación de heterocromatina [66]. Para verificar que los cambios en la estructura de la cromatina promovida por HP1 atado no se propagaron a través del cromosoma, examinamos otro sitio cerca del locus de la cadena liviana λ en el cromosoma 15, el gen que codifica la subunidad catalítica de los Pol ϵ de ADN. Los Pol ϵ de ADN se expresan de manera omnipresente y esenciales para la replicación cromosómica en eucariotas [71], y son codificados por un mapeo de genes de aproximadamente 2.1 Mb de Ig λ . No se encontró diferencia en el enriquecimiento de Ach3 en la región promotora de polo en el DT40 PolilacO- λ_R LacI-HP1 transfectantes en relación a DT40 PolilacO- λ_R GFP-LacI controles (Pol ϵ /Ova enriquecimiento de 8.5 veces y 8.4 veces, respectivamente, Figura 3C). Del mismo modo, no hubo diferencias en Ach4 en el promotor Pol ϵ en los transfectantes DT40 PolilacO- λ_R LacI-HP1 en relación con los controles DT40 PolilacO- λ_R GFP-LacI (Pol ϵ /Ova enriquecimiento de 1.9 veces y 1.7 veces, respectivamente, Figura 11C). Por lo tanto, la fijación de LacI-HP1 a $\psi\lambda$ causó modificaciones locales en la estructura de la cromatina, disminuyendo las modificaciones Ach3, Ach4 y diMeK4 (H3) características de la cromatina abierta en $\psi\lambda 17_R$, y haciendo que la cromatina adopte un estado menos permisivo.

El HP1 atado no afecta a la expresión génica de λ

Hemos indagado cómo HT1 atado afectó los niveles de Ach3 y Ach4 en el λ_R expresado mediante la comparación de estas modificaciones en células DT40 PolilacO- λ_R LacI-HP1 y DT40 PolilacO- λ_R GFP-LacI transfectantes (Figura 12A). El HP1 atado disminuyó los niveles de Ach3 y Ach4 hasta aproximadamente el 40% y el 20% de los niveles de control, respectivamente. Para indagar si esta expresión de genes afectados, se ensayó tanto la expresión IgM (sIgM) de superficie niveles de transcripción de λ . Las células de tinción con IgM anti-pollo de ratón mostraron que la expresión de sIgM era comparable en líneas DT40 PolilacO- λ_R GFP-LacI y DT40 PolilacO- λ_R LacI-HP1, cultivadas en presencia o ausencia de IPTG (Figura 12B). Los niveles de transcripción de λ se ensayaron mediante RT-PCR cuantitativa de ARN recolectado a partir de células DT40 PolilacO- λ_R GFP-LacI y DT40 PolilacO- λ_R LacI-HP1 y normalizaron a β -actina como control (Figura 12C). No se observó diferencia significativa entre los niveles de transcripción de λ en las dos líneas celulares, lo que demuestra que la transcripción no se ve afectada por la vinculación de HP1 dentro de la matriz $\psi\lambda$. De este modo el LacI-HP1 atado no afectó a la expresión del gen Ig descendente, aunque disminuyó los niveles de Ach3 y Ach4 a λ_R . Los niveles muy altos de Ach3 y Ach4 característicos de λ (Figura 9B, Figura 12A), por lo tanto, no son esenciales para mantener altos niveles de expresión génica.

El HP1 atado altera la estructura de la cromatina local

Para evaluar la amplitud de efectos en la cromatina de LacI-HP1 fueron examinados los niveles de Ach3 y Ach4 a lo largo de la Ig λ de locus en la cadena liviana en los mismos amplicones examinados en la Figura 9, incluyendo uno en el flanco, seis en la matriz $\psi\lambda$, así como en el λ expresado. Los niveles de modificación se determinaron comparando las relaciones de $\psi\lambda 17_R$:Ova de las condiciones inmunoprecipitadas y de entrada, como en la Figura

11B. Las modificaciones de Ach3 en los sitios estudiados oscilaron entre el 24% y el 63% de los niveles en los mismos sitios en los controles (Figura 13A, barras oscuras); y el nivel medio de acetilación de H3 en todos los sitios fue de 38% del control de PoliLacO- λ_R GFP-LacI. El cultivo de transfectantes de DT40 PoliLacO- λ_R LacI-HP1 durante tres días con IPTG 250 μ M aumentó la acetilación de H3 en los ocho sitios estudiados (Figura 13A, comparación de barras oscuras y de luz). Los efectos del cultivo de IPTG fueron algo variables, pero en la mayoría de los sitios el cultivo de IPTG restauró los niveles de Ach3 hasta al menos el 45% del nivel en las células de control DT40 PoliLacO- λ_R GFP-LacI; con un promedio de más del 80%. Por lo tanto, las modificaciones de la cromatina en $\psi V\lambda 17_R$ en células DT40 PoliLacO- λ_R LacI-HP1 resultaron directamente del LacI-HP1 atado y fueron en gran medida reversibles.

La acetilación de H4 se estudió en los mismos ocho sitios (Figura 13B, barras oscuras). Se encontró que las modificaciones de Ach4 oscilaban entre 18% y 42% de los niveles de control; y el nivel medio fue de 29% de la línea celular de control. El cultivo con IPTG durante tres días incrementó la acetilación de H4 en los ocho sitios estudiados (Figura 13B, comparación de barras oscuras y de luz), restableciendo los niveles de acetilación de H4 hasta al menos 57% del nivel en el control de células DT40 PoliLacO- λ_R GFP-LacI; con un promedio de más del 80%. Además, IPTG puede revertir al menos parcialmente los efectos de LacI-HP1.

Estos resultados muestran que las modificaciones observadas de la cromatina en la matriz $\psi V\lambda$ se deben a la fijación de HP1. Por otra parte, el hecho de que estas modificaciones son reversibles muestra que un mecanismo activo invierte las modificaciones de las histonas impuestas por la fijación de los factores de modificación de la cromatina en $\psi V\lambda$.

El HP1 atado impide la mutagénesis por plantilla.

La capacidad para manipular la estructura de la cromatina en $\psi V\lambda$ sujetando LacI-HP1 (Figuras 11-13) nos permitió preguntar directamente si y cómo la estructura de la cromatina influye en la conversión del gen Ig. Se utilizó el ensayo de variante de pérdida de slgM para determinar si LacI-HP1 atado afectaba la velocidad clonal de diversificación de secuencias del gen $V\lambda_R$ reordenado. Este ensayo de fluctuación mide la fracción de las células variantes que ya no expresan slgM estructuralmente intacto, y por lo tanto la puntuación de los eventos de mutación resultante de la conversión de genes o mutagénesis puntual [47, 50]. Los derivados clonales independientes de DT40 PoliLacO- λ_R GFP-LacI y DT40 PoliLacO- λ_R LacI-HP1 se establecieron limitando la clonación por dilución de células slgM⁺ y la fracción de células slgM⁻ en cada población determinada por citometría de flujo de células cultivadas durante 4 semanas, y luego se tiñeron con anticuerpo anti-IgM. La mediana de la tasa de pérdida slgM fue de 0.5% para células DT40 PoliLacO- λ_R GFP-LacI y 2.8% para células DT40 PoliLacO- λ_R LacI-HP1 (Figura 14A). Esto corresponde a una aceleración de 5.6 veces de las tasas de diversificación clonal en los transfectantes LacI-HP1 en relación con los controles GFP-LacI.

La diversificación genética de Ig en las células B de pollo se produce predominantemente mediante la conversión génica (mutación por plantilla); pero si la conversión génica se ve afectada, por ejemplo, por la ausencia de factores esenciales, la reparación puede crear una fracción significativa de mutaciones sin plantilla [50-55]. Esto se acompaña típicamente de un aumento en la tasa de diversificación clonal, debido a que las plantillas $\psi V\lambda$ para la conversión génica son aproximadamente 80% idénticas al gen reordenado y una fracción significativa de lesiones de ADN reparadas por conversión génica no sufren ninguna alteración de la secuencia; en contraste, la reparación por una polimerasa mutagénica es más probable que altere la secuencia de ADN. Para determinar el grado de diversificación acelerada de HP1, clasificamos células slgM individuales de los transfectantes PoliLacO- λ_R GFP-LacI DT40 PoliLacO- λ_R LacI-HP1, regiones $V\lambda$ expresadas amplificadas por PCR de una sola célula y se secuenciaron estas regiones. Los cambios de secuencia fueron categorizados como con plantilla si se encontraban dentro de un tracto que contiene dos o más mutaciones y el tracto era una coincidencia exacta de al menos 9 pb de una secuencia donante $\psi V\lambda$; y como ambiguo si consistieron en sólo un cambio de base única, pero sí coincidiendo con al menos 9 pb de una secuencia donante $\psi V\lambda$. También se puntuaron los eventos sin plantilla, que consistían en mutaciones puntuales, eliminaciones e inserciones. En los transfectantes DT40 PoliLacO- λ_R GFP-LacI de control, se documentaron 54 eventos con plantilla y 2 eventos ambiguos entre 70 mutaciones únicas; por lo tanto la mayoría de los eventos (77%) fueron con plantilla, y una pequeña fracción de eventos (20%) fueron mutaciones puntuales (Figura 14B, izquierda, Figura 15). Sorprendentemente, en las células DT40 PoliLacO- λ_R LacI-HP1 predominaron las mutaciones puntuales (59%), acompañadas de eliminaciones (8%) e inserciones (14%); mientras que sólo se documentaron 1 evento claramente templado y 6 eventos ambiguos entre 36 mutaciones únicas (Figura 14B, derecha, Figura 15). Por lo tanto, sólo el 3% de las mutaciones fueron claramente con plantilla, e incluso incluyendo la clase ambigua de mutaciones potencialmente con plantilla, las plantillas podrían representar no más del 19% de las mutaciones. Las comparaciones estadísticas mostraron que la diferencia entre la fracción de mutaciones claramente con plantilla en las células de control DT40 PoliLacO- λ_R GFP-LacI y los transfectantes DT40 PoliLacO- λ_R LacI-HP1 (77% comparado con 3%) fue altamente significativa ($P=7.1 \times 10^{-7}$, prueba exacta de Fisher). La diferencia en la fracción de mutaciones ambiguas, potencialmente con plantilla en las células de control (3%) y transfectantes HP1 (17%) también es significativa ($P=0.05$, prueba exacta de Fisher). Esto sugiere que algunas mutaciones en esta categoría pueden surgir como resultado de las limitaciones en la longitud de un tracto de conversión de genes impuestas por la cromatina de donante no admisible. Por lo tanto, la fijación de HP1 aceleró las tasas clonales de mutagénesis al afectar la mutación con plantilla.

Discusión

La conversión génica en los loci de Ig de pollo utiliza una matriz de donantes ψV corriente arriba como plantillas para la reparación dirigida por homología de lesiones dirigidas a los genes V reordenados y transcritos. Este ejemplo muestra que en las células B de pollo que llevan a cabo la conversión del gen de la Ig activa, la cromatina dentro de la matriz donante $\psi V\lambda$ se caracteriza por el enriquecimiento de H3 y H4 acetiladas, modificaciones que se correlacionan con una estructura de cromatina abierta. Demostramos directamente la importancia de la estructura permisiva de la cromatina para la conversión del gen Ig, mostrando que el sujetar la proteína heterocromatina HP1 a la matriz donante $\psi V\lambda$ causó cambios locales en la estructura de la cromatina, disminuyendo las modificaciones AcH3, AcH4 y diMeK4 (H3) características de la cromatina abierta. Aunque estos cambios no fueron acompañados por la característica de modificación Me-K9 (H3) de la cromatina cerrada, hicieron que la región adoptara un estado menos permisivo para la conversión génica. El fijación de HP1 fue acompañado por un cambio dramático en el espectro de mutación de Ig V λ , de modo que las mutaciones con plantilla estaban en la minoría y las mutaciones puntuales predominaron. Es importante destacar que este efecto sobre la mutagénesis se correlacionó con un cambio en la estructura de la cromatina y no cambios en la expresión del locus. Por lo tanto, la estructura de la cromatina puede determinar si la conversión génica se produce en una lesión de ADN generada endógenamente.

El mecanismo de la conversión génica dentro de un paisaje complejo de la cromatina

La conversión génica en V λ resulta del cebado de una nueva síntesis de ADN en el extremo 3' de una ruptura utilizando una región $\psi V\lambda$ como plantilla. La conversión génica requiere sinapsis entre el ADN donante y el receptor, así como el acceso al donante por factores que llevan a cabo la reparación dirigida por homología. Los niveles elevados de acetilación H3 y H4 característicos de la matriz $\psi V\lambda$ en DT40 de tipo salvaje son evidencia de una estructura de cromatina relajada que incrementaría la accesibilidad de los genes $\psi V\lambda$ a factores de acción trans y también crearía una arquitectura tridimensional que es favorable para la sinapsis de la secuencia.

El HP1 atado dentro de la matriz de donantes de $\psi V\lambda$ dañó la conversión génica en el V λ_R reordenado, sin afectar la expresión génica de V λ . Los cambios cromatográficos causados por HP1 atado pueden perjudicar la conversión génica al impedir el acceso de los factores de reparación y la cadena invasora a la plantilla donante. El HP1 atado también puede contribuir a una arquitectura cromosómica mayor que afecta a la mecánica de las vías de reparación del ADN, como el bucle necesario para yuxtaponer las secuencias del donante y receptor. Las mutaciones puntuales que se acumulan en los transfectantes de LacI-HP1 son típicas de la reparación recombinada frustrada, y son características de las células que carecen de factores trans actores esenciales para la recombinación [49-55] o algunos o todos de la matriz de donantes ψV [56]. El HP1 regula la estructura de la cromatina y el silenciamiento de genes heterocromáticos de dos maneras, al asociarse con una histona metiltransferasa [66] y el reclutamiento de histona deacetilasas [60]. El HP1 atado causó modificaciones características de una estructura de cromatina no permisiva dentro de $\psi V\lambda$.

La acetilación de histona se ha documentado en genes de Ig de mamífero transcritos activamente sometidos a hipermutación somática y recombinación de conmutación de clase, pero aún no se ha resuelto si la hiperacetilación contribuye a la focalización de la diversificación [72-76]. Una conexión entre la acetilación de histonas y la conversión de genes fue sugerida por experimentos que muestran que el tratamiento de las células DT40 con el inhibidor de la histona desacetilasa, la tricotatina A, promueve la desacetilación de la histona en todo el genoma acompañado de un aumento de la conversión génica en V λ_R [77]. Sin embargo, la interpretación de estos resultados se complica por el hecho de que los efectos de la tricotatina A son genómicos y no específicos. La línea celular DT40 PoliLacO- λ_R permite la manipulación local de la estructura de la cromatina, evitando esa complicación. Además, hemos sido capaces de demostrar que los efectos de atar una proteína de fusión LacI-HP1 se invirtieron en gran medida en el cultivo con IPTG, por lo que un mecanismo activo debe determinar la modificación de la cromatina a $\psi V\lambda$.

Para estudios de recombinación homóloga, la línea de células DT40 PofyLacO- λ_R B tiene la ventaja adicional de que la conversión génica de Ig es un proceso fisiológico dentro de un locus endógeno, evitando la necesidad de un reportero transgénico.

Estructura de la cromatina, estabilidad del genoma, envejecimiento y terapia génica

La importancia de la estructura de la cromatina para el resultado de la recombinación homóloga tiene implicaciones para comprender los mecanismos que normalmente mantienen la estabilidad genómica. Hay un gran número de elementos repetitivos distribuidos en todo el genoma de los vertebrados, y la recombinación entre estos elementos puede conducir a la inestabilidad genómica [78]. En el genoma humano, hay aproximadamente un millón de elementos Alu, y la recombinación entre los elementos Alu puede causar duplicaciones que conducen a la tumorigénesis y a enfermedades genéticas [79, 80]. Las histonas que llevan modificaciones represivas se enriquecen en elementos repetitivos [81]. Estas modificaciones, indudablemente, mantienen la represión transcripcional; nuestros resultados sugieren que también pueden contribuir a la supresión de la recombinación.

La pérdida de heterozigosidad (LOH) se produce como resultado de la recombinación mitótica desigual entre homólogos en sitios alélicos. El mecanismo de LOH es de particular interés, ya que contribuye a la pérdida de la función supresora tumoral de del gen conduce a la tumorigénesis [82]. Recientes experimentos han demostrado un aumento dependiente de la edad en LOH en *S. cerevisiae* [83] y en los genes reportero en *Drosophila* células germinales [84]; y un aumento en la recombinación homóloga en células pancreáticas de ratón [85]. Los mecanismos propuestos para explicar LOH asociado a la edad incluyen elevadas tasas de daño en el ADN, cambios en la distribución del ciclo celular, y la inactivación de la homología independiente de las vías de reparación con el envejecimiento. Los resultados sugieren otra posibilidad, que la relajación de la estructura de la cromatina puede acompañar el envejecimiento y promover un genoma en todo el aumento de la recombinación homóloga en el envejecimiento de las células. Esta posibilidad es apoyada por el reciente análisis de *Drosophila* [86], así como por la evidencia reciente de que la mutación en la lámina A responsable del síndrome de Progeria de Hutchinson-Gilford conduce a una pérdida del genoma de metilación H3 [87].

El hallazgo de que la estructura de la cromatina regula la recombinación homóloga también tiene ramificaciones prácticas. Un considerable esfuerzo actual está dirigido hacia el desarrollo de estrategias que aprovechan la capacidad de una célula para la homología dependiente de reparación para promover la terapia génica, proporcionando un gen donante intacto para reemplazar a un gen diana deficiente [88]. Los resultados sugieren que la estructura permisiva en el donante será un parámetro de diseño importante en el desarrollo de genes donantes para aplicaciones terapéuticas.

Referencias

1. West SC (2003). Nat Rev Mol Cell Biol 4: 435-445.
2. Lee GS, et al. (2004). Cell 117: 171-184.
3. Essers J, Houtsmuller AB, Kanaar R (2006). Methods Enzymol 408: 463-485.
4. Wyman C, Kanaar R (2006). Annu Rev Genet 40: 363-383.
5. Weinstock DM, Richardson CA, Elliott B, Jasin M (2006). DNA Repair (Amst) 5: 1065-1074.
6. Sugawara N, Haber JE (2006). Methods Enzymol 408: 416-429.
7. Brugmans L, Kanaar R, Essers J (2007). Mutat Res 614: 95-108.
8. Garber PM, Vidanes GM, Toczyski DP (2005). Trends Biochem Sci 30: 63-66.
9. Rodrigue A, et al. (2006). Embo J 25: 222-231.
10. Haber JE (2000). Trends Genet 16: 259-264.
11. Rooney S, Chaudhuri J, Alt FW (2004). Immunol Rev 200: 115-131.
12. Caldecott KW (2003). DNA Repair (Amst) 2: 955-969.
13. Sung JS, Demple B (2006). Febs J 273: 1620-1629.
14. Rogakou EP, et al. (1998). J Biol Chem 273: 5858-5868.
15. Burma S, et al. (2001). J Biol Chem 276: 42462-42467.
16. Ward IM, Chen J (2001). J Biol Chem 276: 47759-47762.
17. Rogakou EP, et al. (1999). J Cell Biol 146: 905-916.
18. Unal E, et al. (2004). Mol Cell 16: 991-1002.
19. Paull TT, et al. (2000). Curr Biol 10: 886-895.
20. van Attikum H, et al. (2004). Cell 119: 777-788.
21. Morrison AJ, et al. (2004). Cell 119: 767-775.
22. Downs JA, et al. (2004). Mol Cell 16: 979-990.

23. Jazayeri A, McAtinsh AD, Jackson SP (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1644-1649.
24. Tamburini BA, Tyler JK (2005). *Mol Cell Biol* 25: 4903-4913.
- 5 25. Schildkraut E, Miller CA, Nickoloff JA (2006). *Mol Cell Biol* 26: 3098-3105.
26. Arakawa H, Buerstedde JM (2004). *Dev Dyn* 229: 458-464.
- 10 27. Maizels N (2005). *Annu Rev Genet* 39:23-46.
28. Thompson CB, Neiman PE (1987). *Cell* 48: 369-378.
29. Reynaud CA, et al. (1987). *Cell* 48: 379-388.
- 15 30. Reynaud CA, et al. (1989). *Cell* 59: 171-183.
31. Buerstedde JM, et al. (2002). *Nucleic Acids Res* 30: 230-231.
- 20 32. Yamazoe M, Sonoda E, Hochegger H, Takeda S (2004). *DNA Repair (Amst)* 3:1175-1185.
33. Sale JE (2004). *DNA Repair (Amst)* 3: 693-702.
34. Muramatsu M, et al. (2000). *Cell* 102: 553-563.
- 25 35. Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, et al. (2000). *Cell* 102: 565-575.
36. Arakawa H, Hauschild J, Buerstedde JM (2002). *Science* 295:1301-1306.
- 30 37. Harris RS, Sale JE, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS (2002). *Curr Biol* 12: 435-438.
38. Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS (2002). *Nature* 418: 99-103.
39. Bransteitter R, et al. (2003). *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4102-4107.
- 35 40. Chaudhuri J, Tian M, Khuong C, Chua K, Pinaud E, et al. (2003). *Nature* 422: 726-730.
41. Ramiro AR, Stavropoulos P, Jankovic M, Nussenzweig MC (2003). *Nat Immunol* 4: 452-456.
- 40 42. Di Noia J, Neuberger MS (2002). *Nature* 419: 43-48.
43. Rada C, et al. (2002). *Curr Biol* 12: 1748-1755.
44. Imai K, et al. (2003). *Nat Immunol* 4: 1023-1028.
- 45 45. Di Noia JM, Neuberger MS (2004). *Eur J Immunol* 34: 504-508.
46. Saribasak H, et al. (2006). *J Immunol* 176: 365-371.
- 50 47. Yabuki M, Fujii MM, Maizels N (2005). *Nat Immunol* 6: 730-736.
48. Larson ED, Cummings WJ, Bednarski DW, Maizels N (2005). *Mol Cell* 20: 367-375.
49. Takata M, et al. (2000). *Mol Cell Biol* 20: 6476-6482.
- 55 50. Sale JE, et al. (2001). *Nature* 412: 921-926.
51. Niedzwiedz W, et al. (2004). *Mol Cell* 15: 607-620.
- 60 52. Hatanaka A, et al. (2005). *Mol Cell Biol* 25: 1124-1134.
53. Yamamoto K, Hirano S, Ishiai M, Morishima K, et al. (2005). *Mol Cell Biol* 25: 34-43.
54. McIlwraith M, et al. (2005). *Mol Cell* 20: 783-792.
- 65 55. Kawamoto T, Araki K, Sonoda E, Yamashita YM, et al. (2005). *Mol Cell* 20: 793-799.

56. Arakawa H, Saribasak H, Buerstedde JM (2004). PLoS Biol 2: E179.
57. McCormack WT, Thompson CB (1990). Genes Dev 4: 548-558.
58. James TC, Eissenberg JC, Craig C, Dietrich V, et al. (1989). Eur J Cell Biol 50: 170-180.
59. Eissenberg JC, et al. (1990). Proc Natl Acad Sci U S A 87: 9923-9927.
60. Nielsen AL, et al. (1999). Embo J 18: 6385-6395.
61. Li Y, Danzer JR, Alvarez P, Belmont AS, Wallrath LL (2003). Development 130: 1817-1824.
62. Danzer JR, Wallrath LL (2004). Development 131: 3571-3580.
63. Osipovich O, Milley R, Meade A, Tachibana M, et al. (2004). Nat Immunol 5: 309-316.
64. Robinett CC, Straight A, Li G, Wilhelm C, et al. (1996). J Cell Biol 135: 1685-1700.
65. Verschure PJ, et al. (2005). Mol Cell Biol 25: 4552-4564.
66. Bannister AJ, et al. (2001). Nature 410: 120-124.
67. Jacobs SA, Taverna SD, Zhang Y, et al. (2001). Embo J 20: 5232-5241.
68. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, et al. (2001). Nature 410: 116-120.
69. Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD (1999). Proc Natl Acad Sci U S A 96: 14967-14972.
70. Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis CD, Felsenfeld G (2001). Science 293: 2453-2455.
71. Araki H, Ropp PA, Johnson AL, Johnston LH, et al. (1992). Embo J 11: 733-740.
72. Nambu Y, Sugai M, Gonda H, Lee CG, Katakai T, et al. (2003). Science 302: 2137-2140.
73. Woo CJ, Martin A, Scharff MD (2003). Immunity 19: 479-489.
74. Li Z, Luo Z, Scharff MD (2004). Proc Natl Acad Sci U S A 101: 15428-15433.
75. Odegard VH, Kim ST, Anderson SM, et al. (2005). Immunity 23: 101-110.
76. Wang L, Whang N, Wuerffel R, Kenter A (2006). J Exp Med 203: 215-226.
77. Seo H, Masuoka M, Murofushi H, et al. (2005). Nat Biotechnol 23: 731-735.
78. Stankiewicz P, Lupski JR (2002). Trends Genet 18: 74-82.
79. Batzer MA, Deininger PL (2002). Nat Rev Genet 3: 370-379.
80. Aplan PD (2006). Trends Genet 22: 46-55.
81. Martens JH, O'Sullivan RJ, et al. (2005). Embo J 24: 800-812.
82. Tycko B (2003). Ann N Y Acad Sci 983: 43-54.
83. McMurray MA, Gottschling DE (2003). Science 301: 1908-1911.
84. Preston CR, Flores C, Engels WR (2006). Curr Biol 16: 2009-2015.
85. Wiktor-Brown DM, Hendricks CA, et al. (2006). Proc Natl Acad Sci U S A 103: 11862-11867.
86. Peng JC, Karpen GH (2007). Nat Cell Biol 9: 25-35.
87. Shumaker DK, Dechat T, et al. (2006). Proc Natl Acad Sci U S A 103: 8703-8708.
88. Porteus MH, Connelly JP, Pruett SM (2006). PLoS Genet 2: e133.

89. Larson ED, Duquette ML, Cummings WJ, et al. (2005). *Curr Biol* 15: 470-474.

90. Liu Y, Maizels N (2000). *EMBO Reports* 1: 85-90.

5 Ejemplo 5: Conversión de genes acelerada por modificaciones distintas de la cromatina

Este ejemplo demuestra que la eficiencia de la reparación está determinada por la estructura de la cromatina del donante. El análisis aprovecha un sitio de regulación *cis* (operadores de lactosa polimerizados, PoliLacO) insertado justo corriente arriba del gen $\psi\lambda$ transcrito y diversificante en la línea de células DT40 B de pollo. Los datos muestran que el sujetar el activador VP16 o la histona chaperona, HIRA, se altera la estructura de la cromatina local y se acelera la conversión génica aproximadamente 10 veces. Si bien estos dos factores tienen resultados funcionales comparables, tienen efectos distintos sobre la estructura de la cromatina. El fijación de VP16 aumenta los niveles locales de histonas acetiladas H3 y H4; mientras que la fijación de HIRA aumenta la densidad de los nucleosomas. Por lo tanto, resultados funcionales comparables pueden lograrse mediante modificaciones de cromatina distintas.

15 Materiales y métodos

Transferencia de cromatina (ChIP). La ChIP se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Cummings et al., 2007). Para todos los experimentos se analizaron al menos dos preparaciones de cromatina de al menos dos líneas transfectadas de forma estable independientes. Las figuras presentan un experimento representativo en el cual los resultados del análisis de cuatro amplificaciones separadas se usaron para calcular una desviación estándar. Se llevaron a cabo cuatro amplificaciones separadas de diluciones en serie de ADN plantilla, para establecer que las intensidades de producto medidas estaban dentro del intervalo lineal. El enriquecimiento del amplicón experimental se normalizó al enriquecimiento de un amplicón de control interno del gen de la ovoalbúmina (Ova), amplificado en el mismo tubo por PCR dúplex; y el enriquecimiento en ChIP con anticuerpos específicos se normalizó a experimentos paralelos en los que se llevó a cabo ChIP con controles de ADN de entrada total. La inclusión del amplicón de control interno de Ova nos permitió normalizar para la eficiencia IP, el trasvase de fondo y las diferencias en la carga de gel. Enriquecimiento = $[(\psi\lambda/\text{Ova})_{\text{Ab}}]/[(\psi\lambda/\text{Ova})_{\text{Entrada}}]$. Como control adicional, se comparó la relación de los amplicones experimentales y de control en el control de entrada total con una ChIP de control con IgG poliespecífica; En todos los casos, el enriquecimiento en la entrada y los controles de IgG eran esencialmente iguales. Los datos se presentan para experimentos representativos; Las desviaciones estándar se calcularon a partir de cuatro amplificaciones separadas de diluciones en serie de ADN plantilla.

Los anticuerpos utilizados fueron: anti-H3 CT-pan, anti-AcH3 (06-599), anti-AcH4 (06-866) y dimetilado H3(K4) (07-030) de Upstate (Lake Placid, NY).

Los cebadores de PCR para ChIP fueron:

$\psi\lambda_R$: 5'-GCCGTCAGTATTGCCGTTTTCTCCCCTC-3' y 5'-CGAGACGAGGTCAGCGACTCACCTAGGAC-3'; región promotora entre $\psi\lambda 1$ y $\psi\lambda$: 5'-CTGTGGCCTGTCACTGCTTA-3' y 5'-GCAGGGAACCACAAGAACAT-3'; $\psi\lambda 1$: 5'-GGGACTTGTGTACCAGGAT-3' y 5'-CGCAGTCACATGTGGAATATC-3'; $\psi\lambda 5$: 5'-GAGCCCCATTTTCTCTCCTC-3' y 5'-GAGATGTGCAGCAACAAGGA-3'; $\psi\lambda 13$: 5'-CCCTCTCCCTATGCAGGTTTC-3' y 5'-CCCCTATCACCATACCAGGA-3'; $\psi\lambda 18$: 5'-CCATTTTCTCCCCTCTCTCC-3' y 5'-TCACCCTACAGCTTCAGTGC-3'; $\psi\lambda 24$: 5'-CCATTTTCTCCCCTCTCTCC-3' y 5'-CAGCCCATCACTCCCTCTTA-3'; $\psi\lambda 25$: 5'-TCTGTTGGTTTCAGCACAGC-3' y 5'-GCAGTTCTGTGGGATGAGGT-3'; $\psi\lambda$ flanco corriente arriba: 5'-GGCTCCTGTAGCTGATCCTG-3' y 5'-GTTCTTTGCTCTTCGGTTGC-3'; $\psi\lambda 17$ en el alelo dirigido a PoliLacO: 5'-TAGATAGGGATAACAGGGTAATAGC-3' y 5'-AGGGCTGTACCTCAGTTTCAC-3'; OVA: 5'-ATTGCGCATTGTTATCCACA-3' y 5'-TAAGCCCTGCCAGTTCTCAT-3'; Pol ϵ : 5'-GGGCTGGCTCATCAACAT-3' y 5'-CTGGGTGGCCACATAGAAGT-3' (SEQ ID NOS: 5-28, respectivamente).

Digestión con MNasa y transferencia Southern. Se prepararon núcleos y se realizaron digestiones con 0, 3, 7, 15, 30 y 60 unidades de MNasa tal como se describió (Prioleau et al., 1999). Después de la digestión con MNasa, el ADN se extrajo tres veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se precipitó con etanol. Se cargaron veinte microgramos de ADN en un gel, se resolvieron mediante electroforesis y se transfirieron para hibridación Southern. La sonda lacO se marcó por cebado aleatorio, utilizando como molde un fragmento de aproximadamente 500 pb de longitud que contenía repeticiones de polyLacO.

Imágenes de fluorescencia. Para la obtención de imágenes de fluorescencia, las células (2×10^5) fueron sometidas a Cytospin sobre láminas de vidrio y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 15 minutos. Para visualizar el núcleo, las células se tiñeron con DAPI (Sigma, Saint Louis, MO). Las imágenes fluorescentes se adquirieron utilizando el sistema de microscopía DeltaVision (Applied Precision) y se procesaron con software softWoRx (Applied Precision).

RT-PCR. Se recogió ARN de células utilizando Reactivo TRIzol (Invitrogen). Los transcritos de V λ y β -actina se amplificaron después de la dilución de la plantilla. Los cebadores para la amplificación de V λ fueron 5'-GTCAGCAAACCCAGGAGAAAC-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-AATCCACAGTCACTGGGCTG-3' (SEQ ID NO: 4). Se han descrito los cebadores para la amplificación de la β -actina (Arakawa et al., 2002).

Cuantificación de variantes de pérdida de slgM y análisis de secuencias. El ensayo de la variante de pérdida de slgM, que mide las variantes de pérdida de slgM acumuladas resultantes de mutaciones de desplazamiento de marco o mutaciones sin sentido en regiones V mutadas, se utilizó para cuantificar la diversificación de la región de Ig V (Sale et al., 2001; Yabuki et al., 2005; Cummings et al. 2007). En resumen, las células slgM⁺ se aislaron mediante citometría de flujo seguida por la clonación de dilución limitativa, y se expandieron durante 4 semanas. Para cuantificar la fracción de células slgM⁺, se tiñeron aproximadamente 1×10^6 células con IgM-RPE anti-pollo (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) y se analizaron en un FACScan con el software CellQuest (BD Biosciences).

La PCR de una sola célula y el análisis de secuencias se realizaron como se describe (Yabuki et al., 2005, Cummings et al., 2007). En resumen, se clasificaron las células slgM⁺, se dividieron alícuotas en pozos individuales, se amplificaron y se secuenciaron regiones V λ y sus secuencias se compararon con los donantes ψ V λ para determinar si las mutaciones fueron con plantilla o sin plantilla. El criterio para una mutación con plantilla fue que nueve bases consecutivas deben ser una coincidencia exacta en el donante y el receptor. Las secuencias eran derivadas de dos líneas transfectadas independientemente. Sólo se incluyeron secuencias únicas para la clasificación de las mutaciones.

Resultados

El VP16 atado acelera la conversión de genes

Si la estructura represora de la cromatina del donante perjudica la conversión génica, la activación de las modificaciones podría promover la conversión génica. Para probar esta posibilidad, aprovechamos la línea celular PoliLacO- λ DT40 construida por nuestro laboratorio. En esta línea celular, se ha insertado el operador de lactosa polimerizada (PoliLacO) en la matriz ψ V λ entre ψ V λ 17- ψ V λ 20, 17 kb corriente arriba del gen V λ expresado (Figura 16A, Ejemplo 4). Esto nos permite analizar los efectos de los factores reguladores atados expresados como fusiones con el represor de la lactosa. Los experimentos de control han demostrado que la etiqueta PoliLacO no afecta a la proliferación celular, al perfil del ciclo celular o a la diversificación del gen Ig.

La pérdida de acetilación de histonas dentro de los donadores de ψ V λ se correlaciona con la disminución de la conversión génica en V λ (Ejemplo 4). Por lo tanto, probamos el efecto de VP16, un potente transactivador derivado del virus herpes, que se ha asociado con la relajación de la cromatina y el reclutamiento de las histonas acetiltransferasas (Tumbar et al., 1999; Carpenter et al., 2005). Generamos DT40 PoliLacO- λ R transfectantes que expresan de forma estable GFP-LacI-VP16. La transferencia Western confirmó la expresión de la proteína (Figura 16B). El perfil del ciclo celular (Figura 16C) y los niveles de transcripción λ (Figura 16D) no se alteraron con respecto a los transfectantes DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI de control. Las imágenes fluorescentes de los transfectantes DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI-VP16 mostraron una sola mancha verde dentro del núcleo, evidencia de la expresión de GFP-LacI-VP16 y unión a PoliLacO (Figura 16E).

Se ensayó la acetilación de histonas en células PoliLacO- λ GFP-LacI-VP16 y control DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI. La matriz ψ V λ se ensayó por amplificación con cebadores específicos para siete sitios, incluyendo la región promotora entre ψ V λ 1 y el gen V λ (V λ pro), ψ V λ 1, ψ V λ 5, ψ V λ 13, ψ V λ 24, ψ V λ 25. (Debido a la ausencia de polimorfismos, los arreglos ψ V λ en los dos alelos Ig λ en DT40 no se puede distinguir fácilmente por PCR). Además, hemos ensayado modificaciones de cromatina en: (1) ψ V λ 17, que debido a una secuencia polimorfismo creado durante la construcción de DT40 PoliLacO- λ , es el único sitio en la ψ V λ matriz en la que los alelos reordenados y sin reordenar se pueden distinguir mediante el uso de específicos PCR, (2) el alelo reordenado de V λ (V λ R), (3) el alelo no reordenado de V λ (V λ U) y (4) el gen Pol ϵ , un control intracromosómico. La amplificación de los sitios ψ V λ se realizó en dúplex con el gen de la ovoalbúmina no expresada (Ova). Por lo tanto, Ova funciona como un control interno, y la relación de enriquecimiento de ψ V λ : Ova de inmunoprecipitaciones se normalizó a ψ V λ : relación Ova de ADN de entrada total (ver Material y Métodos). El VP16 atado aumentó tanto los niveles de Ach3 (Figura 17A) como los de Ach4 (Figura 17B) en los transfectantes DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI-VP16 en relación con las células DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI de control.

Se utilizó el ensayo de variante de pérdida de slgM para indagar si el la fijación de VP16 alteró la tasa clonal de diversificación de secuencia de V λ . Este ensayo de fluctuación mide la fracción de células variantes que ya no expresan slgM estructuralmente intacto y, de este modo, registra los eventos de mutación resultantes de la conversión génica, mutación puntual, inserción o eliminación (Sale et al., 2001; Yabuki et al., 2005). Mientras que la conversión génica es la vía predominante de la diversificación de genes de Ig en las células B de pollo, si la conversión génica se ve afectada (por ejemplo, por la ausencia de factores de recombinación esenciales (Sale et al., 2001; Niedzwiedz et al., 2004; Hatanaka et al., 2005; Kawamoto et al., 2005; McIlwraith et al., 2005; Yamamoto et al., 2005), otros resultados de la reparación, particularmente las mutaciones puntuales, predominan. Por lo que la

diversificación es mejor monitorizada por este ensayo de pérdida de función, en lugar de un ensamblaje slgM^+ a slgM^+ de ganancia de función, que registra sólo la conversión génica (Saribasak et al., 2006).

Los derivados clonales independientes de los transfectantes DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI y DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI-VP16 se establecieron limitando la clonación por dilución de células slgM^+ y después de 4 semanas de cultivo la fracción de células slgM^+ en cada población determinada por citometría de flujo de células teñidas con anticuerpo anti-IgM. La comparación de los porcentajes medianos de las células slgM^+ mostró que los transfectantes DT40 PoliLacO-GFP-LacI-VP16 exhibían un aumento de 8.4 veces en la diversificación con respecto a las células de control DT40 PoliLacO-GFP-LacI (Figura 17B). El análisis de secuencias de las regiones V λ amplificadas por PCR de célula única mostró que la mayor diversificación era mediante la conversión génica tanto en células de control como en células en las que VP16 estaba atada a Ig λ (Figura 22).

La histona H3.3 se enriquece con los genes donantes $\psi\text{V}\lambda$

No sólo las modificaciones de histonas, sino también los cambios localizados en la composición de histonas de los nucleosomas pueden contribuir a la regulación de la estructura de la cromatina. Una variante de histona asociada con la activación de la cromatina y depositada independientemente de la replicación es H3.3. La histona H3.3 es la principal variante de tipo H3 que contiene modificaciones postraducción asociadas a la activación (McKittrick et al., 2004; Henikoff, 2008), por lo que era interesante preguntar si H3.3 se enriqueció en la matriz $\psi\text{V}\lambda$. Para distinguir H3 de H3.3 por ChIP, se generó una derivada DT40 que expresa de forma estable FLAGtagged H3.3 (H3.3-FLAG).

La caracterización de la deposición de H3.3 por ChIP con un anticuerpo anti-FLAG demostró el enriquecimiento de la variante H3.3 en el gen V λ_R expresado. La estructura de la cromatina dentro de la matriz $\psi\text{V}\lambda$ se ensayó mediante la amplificación de los sitios corriente arriba del gen V λ reordenado y expresado que incluye $\psi\text{V}\lambda 1$, $\psi\text{V}\lambda 5$, $\psi\text{V}\lambda 13$, $\psi\text{V}\lambda 24$, $\psi\text{V}\lambda 25$, $\psi\text{V}\lambda 17R$, V λ_R (Figura 18A), así como el alelo reordenado, V λ_U ; y en otro gen en el mismo cromosoma que Ig λ , Pol ϵ . En un experimento típico, H3.3 se enriqueció más de 4 veces en relación con el ADN de entrada a V λ_R ; pero, sorprendentemente, hemos observado enriquecimiento considerable de H3.3 a lo largo de la matriz $\psi\text{V}\lambda$, con mayor enriquecimiento a $\psi\text{V}\lambda 5$ y V λ_{pro} (Figura 18B). El enriquecimiento de H3.3 dentro de la matriz $\psi\text{V}\lambda$ no representa simplemente una difusión graduada de la variante del gen V λ_R transcrita a los sitios corrientes arriba, ya que los sitios proximales no muestran consistentemente mayores niveles de enriquecimiento que los sitios distales. La estructura de cromatina no uniforme del locus sugiere la presencia de elementos cis, particularmente en la región $\psi\text{V}\lambda 5$, que puede regular la expresión y/o diversificación del locus.

HIRA atado provoca un aumento local en la deposición de histonas

HIRA es una chaperona de histona, y una de sus funciones es ensamblar nucleosomas que contienen la variante de histona, H3.3 (Ray-Gallet et al., 2002; Tagami et al., 2004). El enriquecimiento de H3.3 en la matriz $\psi\text{V}\lambda$ sugirió, por lo tanto, que la vinculación de HIRA podría acelerar la diversificación de genes Ig, análoga al efecto de VP16 atado. Para probar esto, se generaron transfectantes DT40 estables PoliLacO- λ HIRA-LacI, se verificaron niveles comparables de expresión de la proteína por transferencia Western (Figura 19A), y se demostró que la fijación no afectó el perfil del ciclo celular (Figura 19B) o los niveles de transcripción λ (Figura 19C). Los ensayos de ChIP de los niveles de Ach3 y Ach4 no mostraron diferencias entre las células en las que HIRA o GFP fue atado a Ig λ .

Para indagar si el HIRA atado aumentaba los niveles de H3.3, se generaron transfectantes DT40 PoliLacO- λ FLAG-H3.3 HIRA-LacI y luego se determinó el enriquecimiento de FLAG-H3.3 en $\psi\text{V}\lambda 17R$, donde un polimorfismo permite el análisis del Ig λ atado solamente. Estos experimentos mostraron un modesto (1.4 veces) enriquecimiento de FLAG-H3.3 en cada uno de dos HIRA-LacI transfectantes independientes (Figura 20A) en relación con una línea de control. Además, un enriquecimiento comparable fue evidente cuando los anticuerpos pan-H3 se utilizaron para ChIP (que detectan H3 y otras variantes, incluyendo H3.3). Por lo tanto, HIRA parecía causar un enriquecimiento neto de las histonas, incluyendo H3.3, y por lo tanto afectado la densidad de nucleosomas en $\psi\text{V}\lambda$.

HIRA atado promueve la conversión de genes Ig

Para indagar si la HIRA atada afecta la tasa clonal de diversificación de genes de Ig, establecimos derivados clonales independientes de transfectantes DT40 PoliLacO- λ HIRA-LacI limitando la clonación por dilución de células slgM^+ y después de 4 semanas de cultivo se determinó la fracción de slgM^+ células en cada población. La fracción de células slgM^+ era claramente mayor en los transfectantes de HIRA-LacI que en las células de control (por ejemplo, la Figura 20B). La comparación de los porcentajes medianos de células slgM^+ mostró que las células DT40 PoliLacO- λ HIRA-LacI exhibían un aumento de 11 veces en la diversificación con respecto a las células de control DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI (Figura 20C). Esto no sólo refleja la sobreexpresión de HIRA, ya que solo una modesta aceleración en la diversificación (1.7 veces) fue evidente en los transfectantes de DT40 expresando de forma estable HIRA (Figura 20C). El análisis de secuencias de las regiones V λ amplificadas por PCR de célula única mostró que la mayor diversificación era mediante la conversión génica en células de control y en células en las que HIRA estaba atada a Ig λ (Figura 23).

La fracción de las mutaciones con plantilla en el tracto corto se incrementa por VP16 o HIRA atadas

VP16 y la HIRA atadas aceleraron la tasa clonal de diversificación génica comparativamente (8.4 veces y 11 veces, respectivamente), y la conversión génica predominó en ambas. Para establecer si las diferencias sutiles podrían distinguir los espectros mutacionales, se compararon los eventos mutacionales independientes en los transfectantes DT40 PoliLacO- λ HIRA-LacI y DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI-VP16 con los transfectantes de control DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI. Los cambios de secuencia fueron categorizados como la conversión de genes si estaban dentro de un tracto que era una coincidencia exacta de por lo menos 9 pb de un donante $\psi\lambda$ secuencia, y contenía uno, dos o más cambios de base simples de la línea germinal de la secuencia. Los eventos que contenían una única diferencia de base y dos o más diferencias se contabilizaban por separado como conversión de genes de tracto "corto" y "largo", debido a que algunas mutaciones en la primera clase podían en principio surgir de mutaciones puntuales que corresponden coincidentemente con secuencias de donadores de $\lambda\lambda$. También se puntuaron los eventos sin plantilla, que consistían en mutaciones, eliminaciones e inserciones puntuales.

En los transfectantes de DT40 PoliLacO-GFP-LacI-VP16, el 74% de los eventos se planearon, pero una fracción significativa de eventos con plantilla (39%, o 29% de todos los eventos de mutación) (Tabla 1, Figura 22). También hubo fracciones significativas de inserciones (13% en comparación con 0%). Los eventos de conversión génica predominaron de manera similar (87%) entre los eventos analizados en las células PoliLacO- λ HIRA-LacI de DT40 (Tabla 1, Figura 23). La mayoría de los eventos de conversión génica fueron de tracto largo, pero una minoría significativa (24%, o 21% de todos los eventos de mutación) fue la conversión de genes de tracto corto. El resto de eventos fueron mutaciones (11%) e inserciones (2%) puntuales. Anteriormente se caracterizaron eventos mutagénicos en el control DT40 PoliLacO-GFP-LacI transfectantes, y se encontró que la mayoría de las mutaciones se debieron a eventos de conversión de genes de tracto largo (77%), mientras que una pequeña fracción (3%) eran bien eventos de conversión de tracto corto o mutaciones puntuales que coincidentemente corresponden con una secuencia donante (Ejemplo 4: resumido en la Tabla 1). Las mutaciones restantes (20%) no corresponden a ninguno de los donantes de pseudogenes y fueron, por lo tanto, mutaciones puntuales claras.

Tabla 1. Efecto de HP1 y VP16 atados en la conversión génica.

Resumen de secuencias de regiones λ que llevan mutaciones únicas de DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI (n=71; Ejemplo 4), DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI-VP16 (n=31) y DT40 PoliLacO- λ HIRA-LacI (N=137). Datos obtenidos a partir de al menos dos transfecciones independientes.

	GFP-LacI	GFP-LacI-VP16	HIRA-LacI
Conversión de genes			
Largo (2 o más nt)	77%	45%	66%
Corto (1 nt)	3%	29%	21%
Total	80%	74%	87%
Mutación puntual	20%	13%	11%
Inserción	0	13%	2%

Por lo tanto, la aceleración de la diversificación por VP16 e HIRA atados se debe a un aumento de los niveles de mutación con plantilla. En ambos casos, la mayoría de los tratos con plantilla contenían dos o más mutaciones; pero cerca de un tercio de los tratos contenía sólo una mutación. En contraste, esencialmente todos los eventos de conversión génica en las células de control GFP-LacI contenían al menos dos mutaciones. Esto sugiere que los cambios en la estructura de la cromatina donante pueden no solo acelerar la conversión de genes, sino también limitar la extensión de los tratos de conversión de genes; o que la conversión acelerada de genes puede titular factores que contribuyen a extender la longitud de los tratos de conversión.

HIRA atada aumenta la densidad de los nucleosomas

Los resultados anteriores muestran que VP16 e HIRA atadas tenían efectos comparables sobre el resultado de la diversificación de genes de Ig, aunque cada una tenía diferentes efectos locales: VP16 aumentó Ach3 y Ach4, mientras que HIRA aumentó H3.3 y la carga de histonas en general. Para establecer cómo la carga de estos diferentes factores podría afectar a la cromatina, se sondeó la estructura de la cromatina utilizando nucleasa micrococcica (MNasa). Se recolectaron los núcleos, se trataron con cantidades variadas de MNasa, se purificó ADN genómico, se resolvieron y se transfirieron, y después se probaron con ADN marcado homólogo a las repeticiones LacO. El patrón de digestión de MNasa de las células DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI y DT40 PoliLacO- λ GFP-LacI-VP16 aparecieron comparables por este ensayo (Figura 21). La digestión con altos niveles de MNasa produjo un

producto de límite claro. Esta es la región del ADN (aproximadamente 150 pb) que contacta con el nucleosoma, y por lo tanto se protege de la MNasa. El espaciamiento entre los nucleosomas individuales puede variar, causando una liviana variación en los tamaños de multímeros nucleosómicos producidos por digestión parcial, y produciendo bandas característicamente borrosas que migran más lentamente en el gel.

Por el contrario, la digestión con MNasa de la cromatina a partir de células DT40 PoliLacO HIRA-LacI reveló un patrón diferente: se observó escalamiento distintivo que no se encontró en el control (Figura 21, derecha). La serie claramente definida de productos de digestión se extendió a partir de los 1-meros producidos en la digestión límite hasta 8-meros y más allá; mientras que la escala se hizo borrosa en tamaños más grandes que 4-meros en el control y células que expresan VP16. Esto sugiere que atar la chaperona HIRA de histona aumentó la uniformidad del tamaño del enlazante. Esto ocurriría si la densidad de nucleosomas locales se incrementara, consistente con el papel conocido de HIRA como una chaperona de histona, así como con la evidencia de que el sujetar HIRA incrementó el enriquecimiento local de H3.3 y H3 (Figura 18C).

Discusión

Este ejemplo ha mostrado que la conversión génica puede ser acelerada por cambios en la estructura de la cromatina, y que existen al menos dos medios diferentes para este fin. La conversión de genes se aceleró en un orden de magnitud al atar ya sea el activador, VP16, o la histona chaperona, HIRA, en la matriz $\psi V\lambda$ en la línea de células DT40 B de pollo. El atar VP16 aumentó los niveles de AcH3 y AcH4; mientras que atar HIRA no afectó a las marcas de cromatina, pero aumentó la densidad de nucleosomas, en parte por la carga H3.3. El hecho de que diferentes cambios en el estado de la cromatina permitan de manera similar la recombinación homóloga muestra que la célula tiene rutas redundantes disponibles para regular los usos del ADN en la recombinación.

El efecto de atar VP16 e HIRA en la diversificación de genes de Ig es distinto del de atar la proteína de heterocromatina HP1. El atar HP1 causó un aumento de casi 3 veces en las mutaciones puntuales, acompañado de una disminución en las mutaciones con plantilla (Ejemplo 4). Estas diferencias muestran que la estructura de la cromatina donante puede ser activada o reprimida para la reparación del ADN dirigida por homología, con consecuencias sobre el resultado de la reparación.

En la actualidad, se cree que la reparación de homología dirigida alélica predomina en fase S y depende de cromátidas hermanas para plantillas. El potencial de alteraciones locales de la estructura de la cromatina para activar las regiones para la reparación dirigida por la homología sugiere que la regulación puede ser más compleja y requerir no sólo la presencia de un donante homólogo sino también la estructura de la cromatina que es propicia para la reparación.

La fijación de HIRA o VP16 aceleró las tasas de diversificación clonal promoviendo la mutación con plantilla. En ambos casos, se observó un aumento en la fracción de mutaciones con plantilla en las que sólo un único cambio de base plantilla fue evidente en el tracto de mutación. Aunque estas mutaciones de "tracto corto" comprendían solamente el 29% y el 21% de las mutaciones totales en los transfectantes VP16 y HIR1, respectivamente, esta categoría de mutaciones estaba esencialmente ausente (3%) en los transfectantes GFP-LacI.

Pueden surgir tramos de conversión de genes cortos si los factores necesarios para promover la conversión génica de largo tramo no son suficientemente abundantes para soportar el aumento del gen en células en las que VP16 o HIRA está unido a PoliLacO. Alternativamente, el aumento de las mutaciones en esta categoría podría reflejar los cambios en la estructura de la cromatina causada por atar estos factores, lo que podría afectar tanto la posición del nucleosoma como la longitud del enlazante.

La densidad de nucleosomas se incrementa al atar HIRA. Es probable que este aumento de densidad refleje la disminución de la longitud del enlazante. Si las regiones de enlazante son plantillas preferidas para la conversión de genes, el acortamiento de esas regiones en los transfectantes de HIRA puede contribuir a la disminución de la longitud del tracto de conversión génica. El acortamiento de la longitud del nucleosoma puede alternativamente, rehacer la fase de los nucleosomas de modo que, aunque la cromatina esté activa para la recombinación, las regiones no homólogas entre el ψV se vuelven menos accesibles.

El papel de HIRA en los pseudogenes es un nuevo ejemplo de cómo la carga de histonas afecta la reparación del ADN. El papel de HIRA en los pseudogenes no transcritos es particularmente interesante ya que muchos estudios han encontrado la transcripción requerida para la deposición de novo de H3.3 (Ahmad and Henikoff, 2002a, Ahmad and Henikoff, 2002b, Janicki et al, 2004, Wirbelauer et al, 2005). Los resultados sugieren ahora que la transcripción no es un requisito previo para la carga de H3.3.

Estos resultados aumentan nuestra comprensión de las limitaciones ejercidas por las restricciones de la cromatina sobre la recombinación. Además, proporcionan una visión de la necesaria cromatinización de moléculas utilizadas para la orientación génica y/o terapia génica.

Referencias

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4: 16477-16484.

5 Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002b). *Mol Cell* 9: 1191-1200.

Arakawa, H., et al.. (2002). *Science* 295: 1301-1306.

Brown, D.T. (2001). *Genome Biol* 2: REVIEWS0006.

10 Carpenter, A.E., et al. (2005).. *Mol Cell Biol* 25: 958-968.

Cummings, W.J., et al. (2007). See Example 4.

15 Hatanaka, A., et al. (2005).. *Mol Cell Biol* 25:1124-1134.

Henikoff, S. (2008).. *Nat Rev Genet* 9: 15-26.

Janicki, S.M., et al. (2004).. *Cell* 116: 683-698.

20 Kawamoto, T., et al. (2005).. *Mol Cell* 20: 793-799.

Kidd, J.M., et al. (2008).. *Nature* 453: 56-64.

25 Lupski, J.R. (2007). *Nat Genet* 39: S43-47.

McIlwraith, M.J., et al. (2005).. *Mol Cell* 20: 783-792.

McKittrick, E., et al. (2004).. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1525-1530.

30 Neely, K.E., et al. (2002).. *Mol Cell Biol* 22: 1615-1625.

Niedzwiedz, W., et al. (2004).. *Mol Cell* 15: 607-620.

35 Prioleau, M.N., et al. (1999).. *Embo J* 18: 4035-4048.

Ray-Gallet, D., et al. (2002).. *Mol Cell* 9: 1091-1100.

Rodrigue, A., et al. (2006).. *Embo J* 25: 222-231.

40 Sale, J.E., et al. (2001).. *Nature* 412: 921-926.

Saribasak, H., et al. (2006).. *J Immunol* 176: 365-371.

45 Seo, H., et al. (2005).. *Nat Biotechnol* 23: 731-735.

Tagami, H., (2004).. *Cell* 116: 51-61.

Tumbar, T., et al. (1999).. *J Cell Biol* 145: 1341-1354.

50 West, S.C. (2003).. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 435-445.

Wirbelauer, C., et al. (2005).. *Genes Dev* 19: 1761-1766.

55 Yabuki, M., et al. (2005).. *Nat Immunol* 6: 730-736.

Yamamoto, K., et al. (2005).. *Mol Cell Biol* 25: 34-43.

Ejemplo 6: Generación de anticuerpos de diagnóstico para mesotelina y HE4

60 Este ejemplo ilustra cómo se puede usar la invención para desarrollar anticuerpos contra los biomarcadores de cáncer de ovario bien confirmados con mesotelina y HE4. Los anticuerpos identificados serán valiosos reactivos de diagnóstico nuevos, añadiendo redundancia útil a ensayos clínicos. Este ejemplo valida además la utilidad de DT40 PolilacO como una plataforma para la selección de anticuerpos de diagnóstico que reconocen otros biomarcadores.

65

DT40 PolilacO como vehículo para el desarrollo de anticuerpos: identificación de nuevos anticuerpos contra dos biomarcadores ováricos de cáncer, mesotelina (Scholler et al., 1999; Frierson et al., 2003) y HE4 (Hellstrom et al., 2003).

La mesotelina es un marcador de diferenciación epitelial altamente expresado en células cancerosas de muchos orígenes, incluyendo el cáncer de ovario (Robinson et al., 2003). HE4 (alias WFDC2) es un miembro de la familia de la proteína del suero (WAP), cuyos miembros están secretados en altos niveles y asociados con cáncer, aunque la función no se entiende (Bouchard et al., 2006). Hemos obtenido mesotelina recombinante y HE4. Estas proteínas se expresan en levaduras como fusiones de biotina, lo que facilita la unión a perlas o placas con estreptavidina acoplada para selección o ensayos ELISA (Scholler et al., 2006). También hemos obtenido anticuerpos de cadena única (scFv) contra mesotelina y HE4 (Scholler et al., 2008), que proporcionan un estándar para la comparación inicial de afinidades de anticuerpos recientemente identificados.

Para identificar anticuerpos de alta afinidad para la mesotelina y HE4, se realiza la hipermutación iterativa y la selección clonal para el reconocimiento de cada antígeno recombinante. Los clones se expanden bajo condiciones que aceleran la hipermutación; son seleccionados para clones que se unen a mesotelina o HE4 con alta afinidad por clasificación de células activadas magnéticas; y la afinidad de anticuerpo de sobrenadantes se ensaya mediante un ensayo ELISA. Las poblaciones que producen anticuerpos de alta afinidad se seleccionan adicionalmente para aumentar la afinidad y la especificidad (Figura 3).

La selección puede iniciarse en tres poblaciones de 10^8 células cada una (correspondientes a 100 ml de cultivo). Cada población puede ser derivada de una sola célula aislada por dilución limitante, y luego cultivada bajo condiciones que aceleran la hipermutación. Para minimizar el enriquecimiento de células "pegajosas", que unen a perlas por sí mismas, antes del enriquecimiento para una especificidad deseada, cada población se limpia primero con perlas unidas a biotina. El enriquecimiento para una especificidad deseada se consigue convenientemente por clasificación de células activadas magnéticas (MACS). Utilizando MACS, es posible enriquecer muy rápidamente a partir de tamaños de muestra muy grandes (10^8 células), logrando consistentemente un enriquecimiento de 100 veces de poblaciones que comprenden $<0.1\%$ de la muestra inicial (Volna et al., 2007). La población seleccionada se amplía y se vuelve a seleccionar utilizando el mismo protocolo.

Basándose en los resultados de otros (por ejemplo, Cumbers et al., 2002), se prevé que las células que producen anticuerpos específicos para cada "antígeno" se recuperarán en 2-3 ciclos de hipermutación iterativa y selección (2-3 semanas), y probablemente más temprano. Se puede probar la afinidad de anticuerpos de las agrupaciones de células mediante el ensayo ELISA; y cuando la afinidad está en el intervalo de 1-10 nM, se realiza la clonación por dilución limitante y se identifican los clones que identifican el anticuerpo de alta afinidad. La limitación de la clonación por dilución se lleva a cabo en medio que contiene IPTG, que libera el represor del operador para desacelerar la hipermutación. El anticuerpo producido a partir de estas poblaciones clonales se caracterizará adicionalmente, como se describe a continuación.

Se pueden utilizar tres criterios para establecer que este enfoque ha tenido éxito:

1. Afinidad y especificidad. La eficacia del desarrollo de anticuerpos se valida demostrando que la afinidad de anticuerpos aumenta en el curso de la selección. Las afinidades de anticuerpos se miden por primera vez mediante ensayos ELISA de diluciones de sobrenadante de células cultivadas durante 48 horas, en presencia de IPTG, para minimizar la hipermutación adicional, en medio despojado de IgM, para minimizar el fondo en el ELISA. Para asegurar que los anticuerpos reconocen el antígeno y no el andamio recombinante en el que se muestra, la reactividad se prueba con biotina y estreptavidina. Una comparación concomitante de los anticuerpos anti-mesotelina y anti-HE4 contra ambos antígenos recombinantes sirve como una prueba de reactividad cruzada. Las afinidades se comparan con el control de los anticuerpos scFv dirigidos a la mesotelina o HE4. Después del establecimiento de poblaciones clonales de alta afinidad, se determinará la Kd cuantitativamente por resonancia de plasmón de superficie por Biacore.

2. Segmentación de la mutagénesis. El mecanismo celular que hipermuta los genes del anticuerpo en el curso de la selección clonal concentra las mutaciones en las CDR, los subdominios de las regiones V que contactan con el antígeno. Se predice que los clones de alta afinidad aislados por hipermutación acelerada y selección concentrarán de manera similar las mutaciones en las CDR. Para probar esto, se puede usar PCR de célula única para amplificar las regiones VH y VL de células B individuales después de la selección de afinidad, secuenciar las regiones VH y VL y comparar estas secuencias con las de la población no seleccionada.

3. Mantenimiento de la especificidad y afinidad por cultivo con IPTG. El poder de esta plataforma para la producción de anticuerpos depende en parte de la capacidad de limitar la hipermutación cuando se ha generado un clon de alta afinidad. Para probar esto, se pueden cultivar poblaciones clonales en presencia y ausencia de IPTG, y comparar las afinidades medias de cultivos expandidos por citometría de flujo de células unidas a mesotelina marcada con fluorescencia o HE4. Se predice que las afinidades permanecen constantes en cultivos que contienen IPTG, pero aumentan o disminuyen en cultivos que carecen de IPTG. De este modo, la distribución de la señal de fluorescencia será más amplia en los cultivos que contienen IPTG.

Referencias

Bergan, L., et al. (2007). Cancer Lett 255, 263-274.

5 Bouchard, D., et al. (2006). Lancet Oncol 7, 167-174.

Cumbers, S.J., et al. (2002). Nat Biotechnol 20, 1129-1134.

Frierson, H.F., Jr., et al. (2003). Hum Pathol 34, 605-609.

10 Hellstrom, I., et al. (2003). Cancer Res 63, 3695-3700.

Hung, C.F., et al. (2008). Immunol Rev 222, 43-69.

15 Liu, X.Y., et al. (2008). Immunol Rev 222, 9-27.

Robinson, B.W., et al. (2003). Lancet 362, 1612-1616.

Sale, J.E. (2004). DNA Repair (Amst) 3, 693-702.

20 Scholler, N., et al. (1999). Proc Natl Acad Sci U S A 96, 11531-11536.

Scholler, N., et al. (2006). J Immunol Methods 317, 132-143.

25 Scholler, N., et al. (2008). Clin Cancer Res 14, 2647-2655.

Seo, H., et al. (2005). Nat Biotechnol 23, 731-735.

Volna, P., et al. (2007). Nucleic Acids Res 35, 2748-2758.

30 A partir de lo anterior, se apreciará que, aunque se han descrito realizaciones específicas de la invención para fines ilustrativos, pueden realizarse diversas modificaciones sin desviarse del alcance de la invención. Por consiguiente, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones adjuntas.

35 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Washington

40 <120> Mutagénesis inducibles de genes diana

<130> UW.31-WO-U1

<150> US 60/932,672

45 <151> 2007-05-31

<160> 31

50 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador sintético

60 <400> 1
attgcgcatt gttatccaca 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 2
 5 taagccctgc cagttctcat 20

 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 15 <400> 3
 gtcagcaaac ccaggagaaa c 21

 <210> 4
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 25
 <400> 4
 aatccacagt cactgggctg 20

 <210> 5
 30 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Cebador sintético

 <400> 5
 gccgtcactg attgccgttt tctcccctc 29

 40 <210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 6
 50 cgagacgagg tcagcgactc acctaggac 29

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 7
 60 ctgtggcctg tcagtgtta 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 8
 5 gcaggaacc acaagaacat 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 15 <400> 9
 gggactgtg tcaccaggat 20

 <210> 10
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 25
 <400> 10
 cgcagtcaca tgtggaatat c 21

 <210> 11
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Cebador sintético

 <400> 11
 gagccccatt ttctctctc 20

 40 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 12
 50 gagatgtgca gcaacaagga 20

 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 13
 60 ccctctccct atgcagggtc 20

 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 14
 5 cccctatcac cataccagga 20

 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 15 <400> 15
 ccattttctc ccctctctcc 20

 <210> 16
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 25
 <400> 16
 tcaccctaca gcttcagtgc 20

 <210> 17
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Cebador sintético

 <400> 17
 ccattttctc ccctctctcc 20

 40 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 18
 50 cagcccatca ctcctctta 20

 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 19
 60 tctgttggtt tcagcacagc 20

 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 20
 5 gcagttctgt gggatgaggt 20

 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 15 <400> 21
 ggctcctgta gctgatcctg 20

 <210> 22
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 25
 <400> 22
 gttctttgct ctcggttgc 20

 <210> 23
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Cebador sintético

 <400> 23
 tagataggga taacaggga atagc 25

 40 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 24
 50 agggctgtac ctgagttca c 21

 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 25
 60 attgcgcatt gttatccaca 20

 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 26
 5 taagccctgc cagttctcat 20

 <210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético

 15 <400> 27
 gggctggctc atcaacat 18

 <210> 28
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 25
 <400> 28
 ctgggtggcc acatagaagt 20

 <210> 29
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Cebador sintético

 <400> 29
 gtcagcaaac ccaggagaaa c 21

 40 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 30
 50 aatccacagt cactgggctg 20

 <210> 31
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Pollo
 55
 <400> 31

ES 2 628 973 T3

```

- - - - -
tctccctctc caggttcctt ggtgcaggca gcgctgactc agccggcctc ggtgtcagca    60
aacctgggag gaaccgtcaa gatcacctgc tccgggggtg gcagctatgc tggaagttac    120
tattatggct ggtaccagca gaagtctcct ggcagtgcc  ctgtcactgt gatctatgac    180
aacgacaaga gaccctcgga catcccttca cgattctccg gttccctatc cggctccaca    240
aacacattaa ccatcactgg ggtccgagcc gatgacgagg ctgtctatct ctgtgggagt    300
gcagacaaca gtggtgctgc atttggggcc gggacaaccc tgaccgtcct aggtgagtcg    360
ctgacctcgt ctcggtct                                     378

```

5

REIVINDICACIONES

1. Una célula B modificada para inducir reversiblemente la diversificación de un gen diana, comprendiendo la célula B:
 - (a) un elemento regulador cis unido operativamente a un gen diana, en el que el gen diana comprende un promotor y una región codificadora; y
 - (b) un constructo de fusión que codifica un factor de fijación fusionado a un factor de diversificación, en el que el factor de fijación se une específicamente al elemento regulador cis de (a) y el factor de diversificación induce reversiblemente la diversificación de la región codificadora.
2. La célula B de la reivindicación 1, que es una célula B de pollo o una célula B humana DT40.
3. La célula B de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el elemento regulador cis es un operador de lactosa polimerizado (LacO) y el factor de fijación es un represor de lactosa (LacI) o el elemento regulador cis es un operador de tetraciclina (TetO) y el factor de fijación es el represor de la tetraciclina (TetR).
4. La célula B de la reivindicación 3, en la que el factor de diversificación es un regulador transcripcional, una proteína asociada a la heterocromatina, una chaperona de histonas, un remodelador de cromatina, un componente del complejo de poros nucleares, un regulador génico o una combinación de los mismos.
5. La célula B de las reivindicaciones 3 o 4, en la que el factor de diversificación es un factor de reparación del ADN, un factor de replicación del ADN, una resolvasa, una helicasa, un regulador del ciclo celular, un factor de ubiquitilación, un factor de sumoilación o una combinación de los mismos.
6. La célula B de la reivindicación 4, en la que el regulador transcripcional es VP16 o E47 (codificado por E2A), la proteína asociada a heterocromatina es HP1, la chaperona de histona es HIRA y/o el gen diana es un gen Ig humano, por ejemplo, un gen IgL o un gen IgH y/o el gen diana comprende una región codificadora heteróloga y regiones que codifican un dominio transmembrana y una cola citoplásmica suficiente para efectuar la visualización del producto génico diana sobre la superficie de las células B.
7. Un método para producir un repertorio de polipéptidos que tienen secuencias variantes de un polipéptido de interés, comprendiendo el método:
 - (a) cultivar la célula B de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6 en condiciones que permiten la expresión del factor de diversificación, en el que el gen diana de la célula B contiene la región codificadora del polipéptido de interés, permitiendo de este modo diversificar la región codificadora; y
 - (b) mantener el cultivo en condiciones que permitan la proliferación de la célula B hasta que se obtenga una pluralidad de células B y el repertorio deseado.
8. Un método para producir células B que producen un polipéptido de interés, comprendiendo el método:
 - (a) cultivar una célula B de una cualquiera de las reivindicaciones 3-6 en condiciones que permiten la expresión del factor de diversificación permitiendo de este modo la diversificación de la región codificadora del polipéptido de interés, en donde el gen diana de la célula B contiene la región codificadora del polipéptido de interés, y en el que la célula B expresa el polipéptido de interés en la superficie de la célula B;
 - (b) seleccionar células del cultivo que se unen a un ligando que se une específicamente al polipéptido de interés expresado en la superficie de las células B; y
 - (c) repetir las etapas (a) y (b) hasta seleccionar células que tienen una afinidad deseada para el ligando que se une específicamente al polipéptido de interés.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, en el que el polipéptido de interés es una Ig.
10. El método de la reivindicación 7 u 8, que comprende además 1) añadir una molécula reguladora al cultivo, en donde la molécula reguladora modula la unión del factor de fijación al elemento regulador cis, modulando de este modo la diversificación de la región codificadora, 2) retirar una molécula reguladora del cultivo, en donde la molécula reguladora modula la unión del factor de fijación al elemento regulador cis, modulando así la diversificación de la región codificadora y/o 3) modular la expresión de un gen regulador en la célula B, donde el gen regulador regula la diversificación, modulando así la diversificación de la región que codifica el polipéptido de interés.

11. Un kit que comprende:

(a) una célula B modificada para inducir reversiblemente la diversificación de un gen diana, comprendiendo la célula B un elemento regulador cis ligado operativamente a un gen diana, en el que el gen diana comprende un promotor y una región codificadora; y

(b) uno o más recipientes; y

(c) uno o más constructos de fusión almacenados en un contenedor de (b), en el que cada constructo de fusión es expresable en la célula B y codifica un factor de fijación fusionado a un factor de diversificación, en el que el factor de fijación se une específicamente al elemento regulador cis de (a) y el factor de diversificación induce reversiblemente la diversificación de la región codificadora.

12. El kit de la reivindicación 11, en el que el elemento regulador cis es un operador de lactosa polimerizado (LacO) y el factor de fijación es un represor de lactosa (LacI) o el elemento regulador cis es un operador de tetraciclina (TetO) y el factor de fijación es el represor de la tetraciclina (TetR).

13. El kit de las reivindicaciones 11 o 12, en el que el factor de diversificación es un regulador transcripcional, una proteína asociada a la heterocromatina, una chaperona de histonas, un remodelador de cromatina, un componente del complejo de poros nucleares, un regulador génico o una combinación de los mismos.

14. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que el factor de diversificación es un factor de reparación del ADN, un factor de replicación del ADN, una resolvasa, una helicasa, un regulador del ciclo celular, un factor de ubiquitilación, un factor de sumoilación o una combinación de los mismos.

15. El kit de la reivindicación 13, en el que el regulador transcripcional es VP16 o E47 (codificado por E2A), la proteína asociada a heterocromatina es HP1, la chaperona de histona es HIRA y/o el gen diana es un gen Ig humano, y/o el gen diana comprende una región codificadora heteróloga y regiones que codifican un dominio transmembrana y una cola citoplasmática suficiente para efectuar la visualización del producto génico diana sobre la superficie de la célula B.

16. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que la célula B es una célula B de pollo o una célula B humana DT40.

17. El kit de la reivindicación 15 o 16, en el que el gen Ig humano es un gen IgL o un gen IgH.

18. El método de la reivindicación 9, en el que el polipéptido de interés es IgL o IgL o ambos.

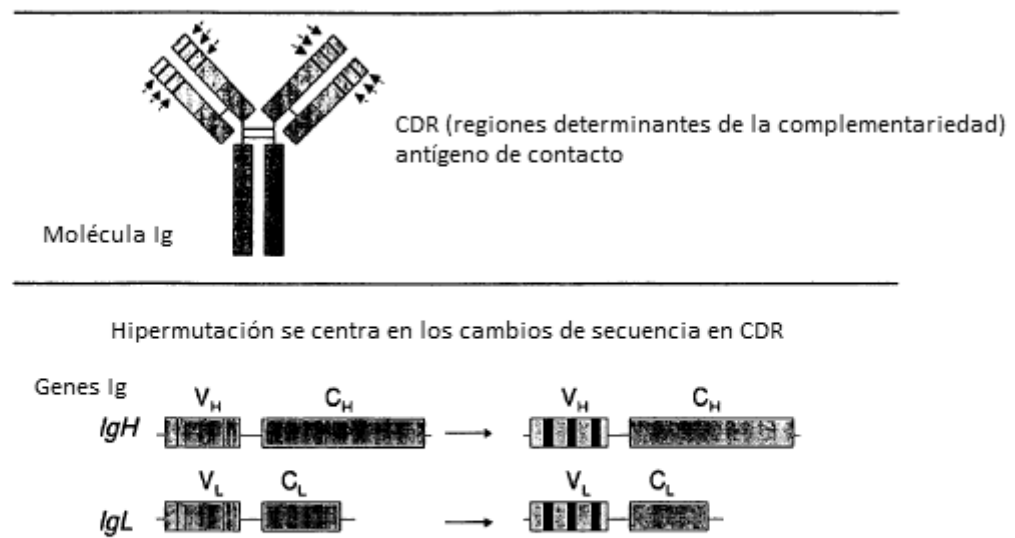


Figura 1

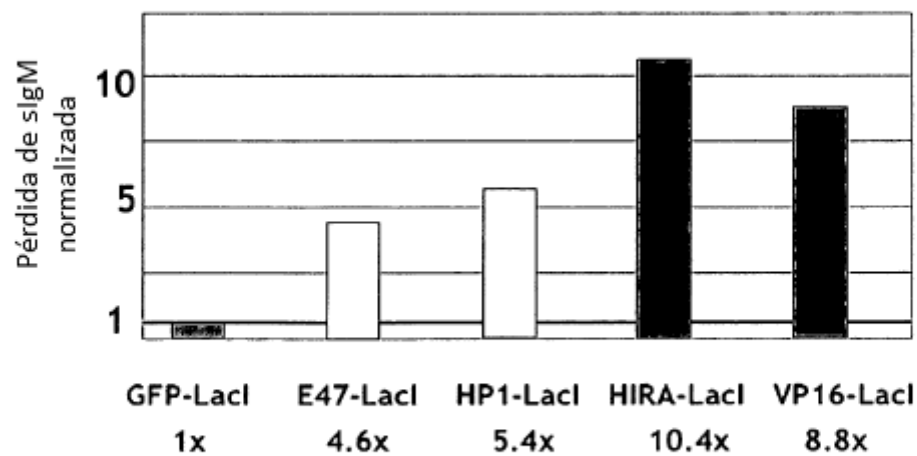


Figura 2

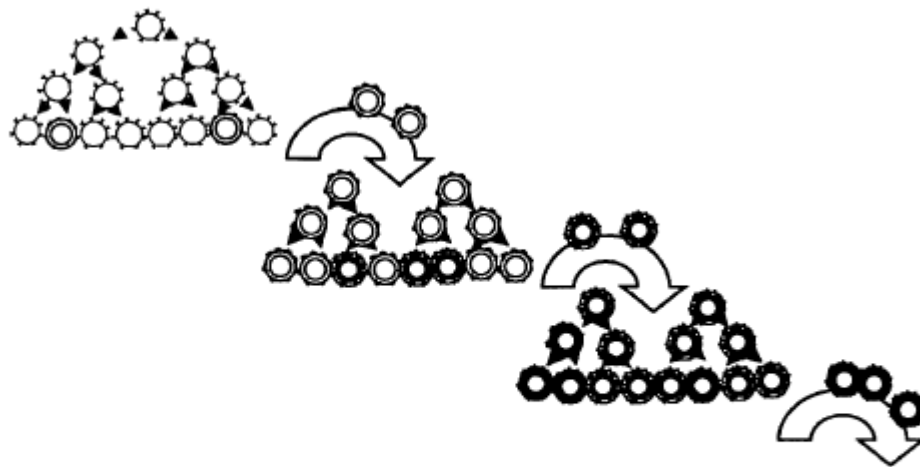


Figura 3

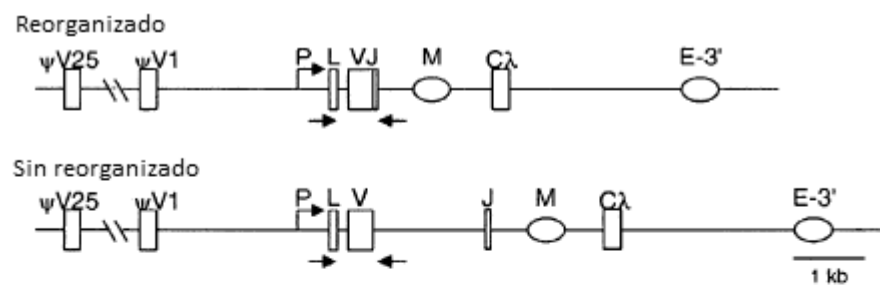


Figura 4A

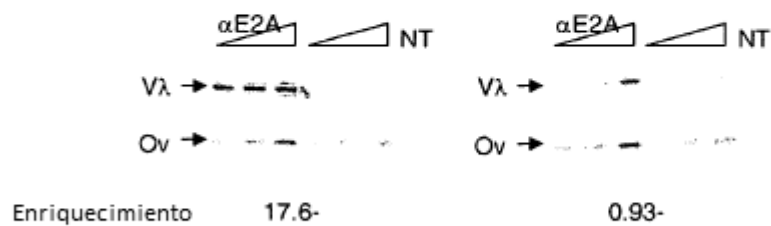


Figura 4B

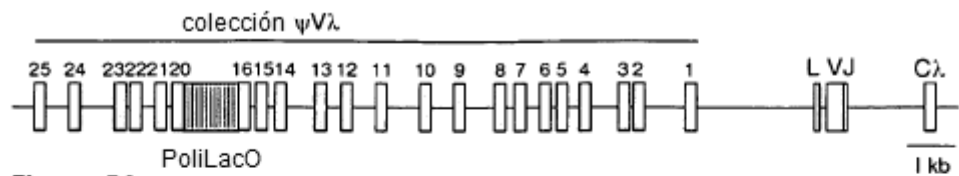


Figura 5A

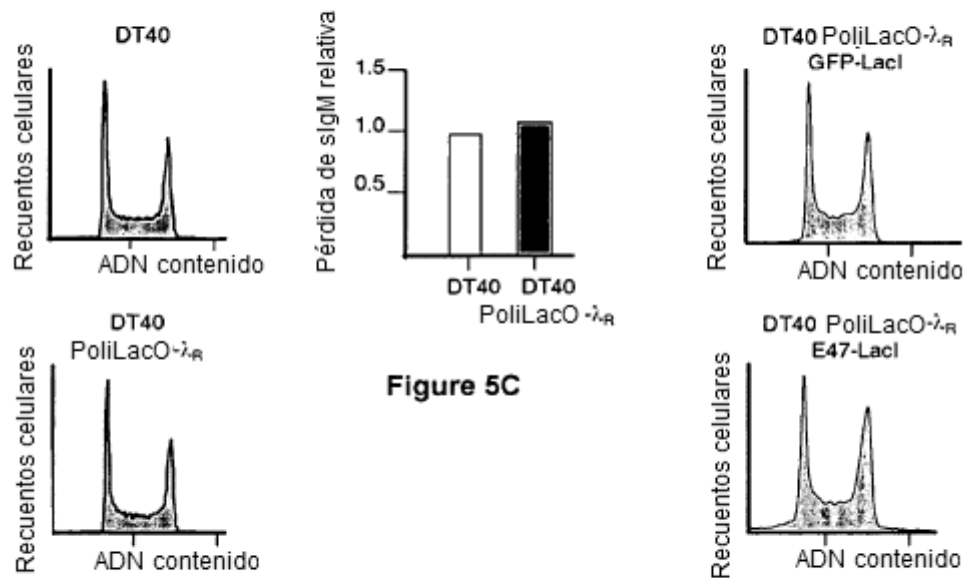


Figure 5C

Figura 5B

Figura 5D

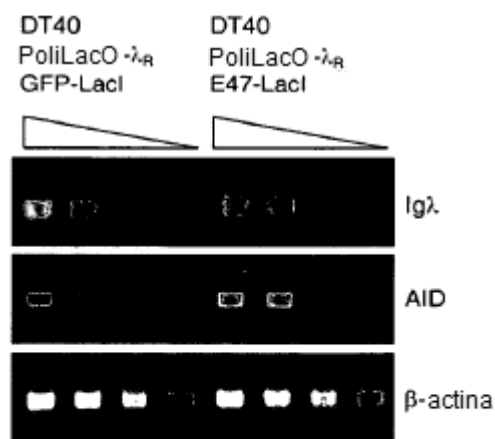


Figura 5E

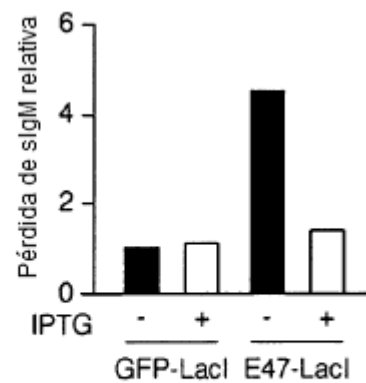


Figura 5F

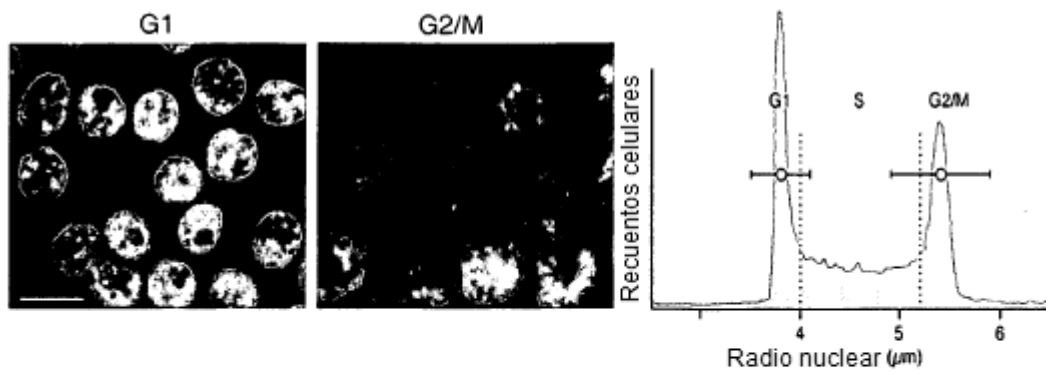


Figura 6A

Figura 6B

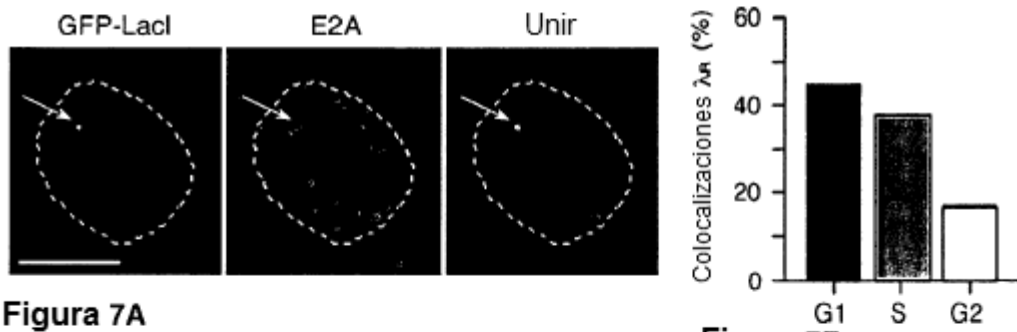


Figura 7A

Figura 7B

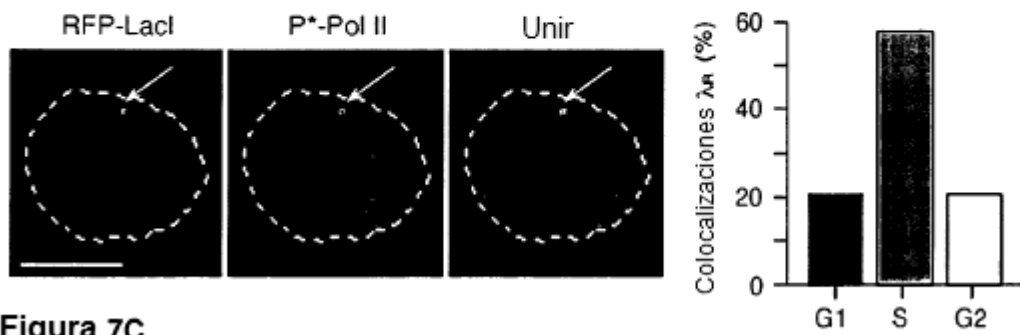


Figura 7C

Figura 7D

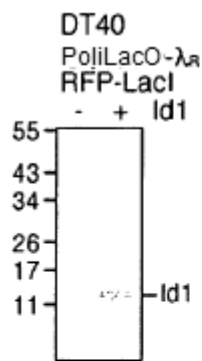


Figura 8A

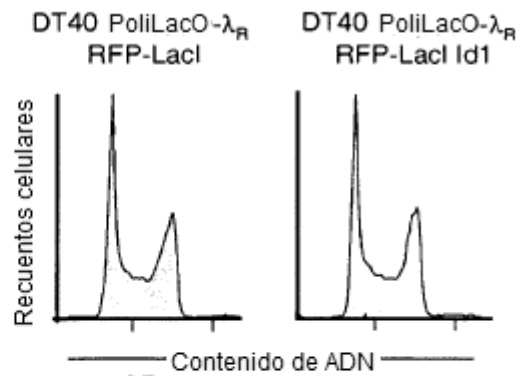


Figura 8D

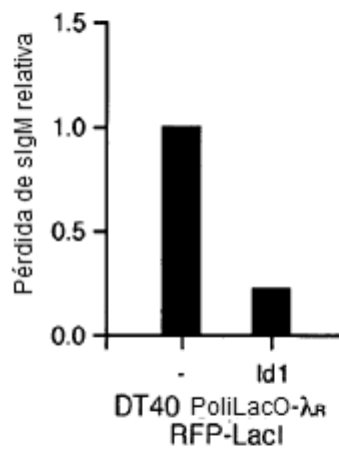


Figura 8C

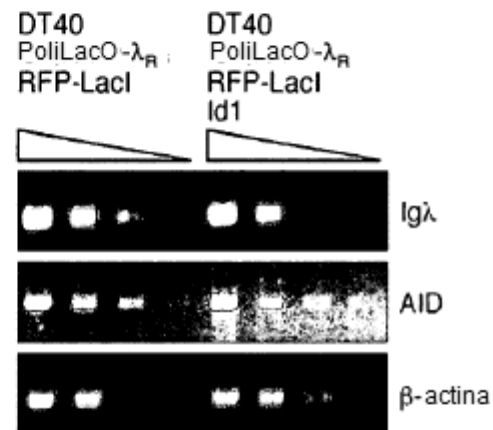


Figura 8D

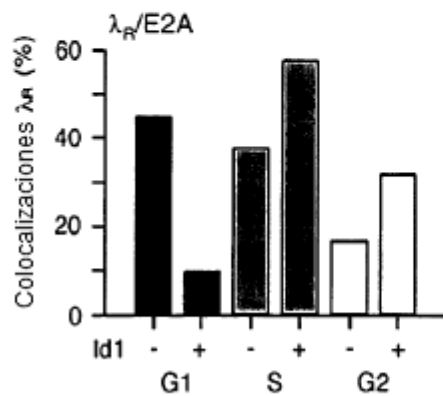


Figura 8E

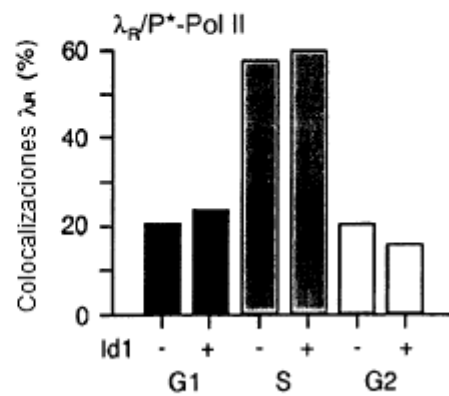


Figura 8F

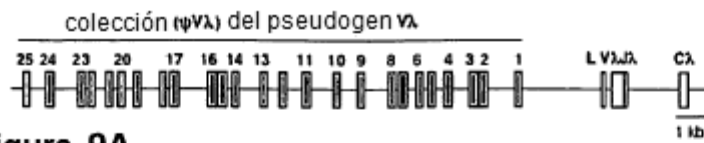


Figura 9A

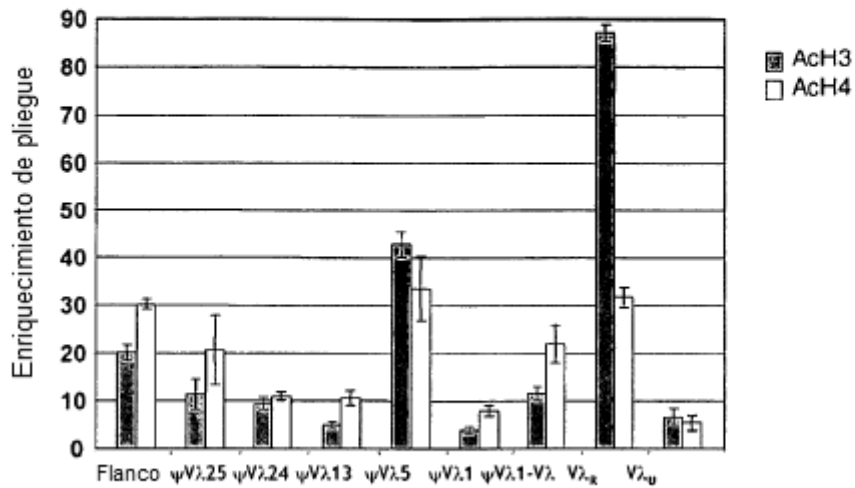


Figura 9B

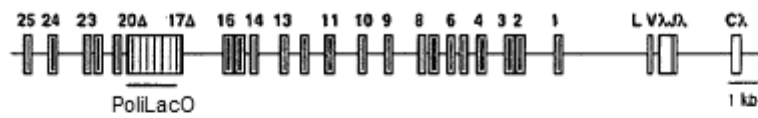


Figura 10A

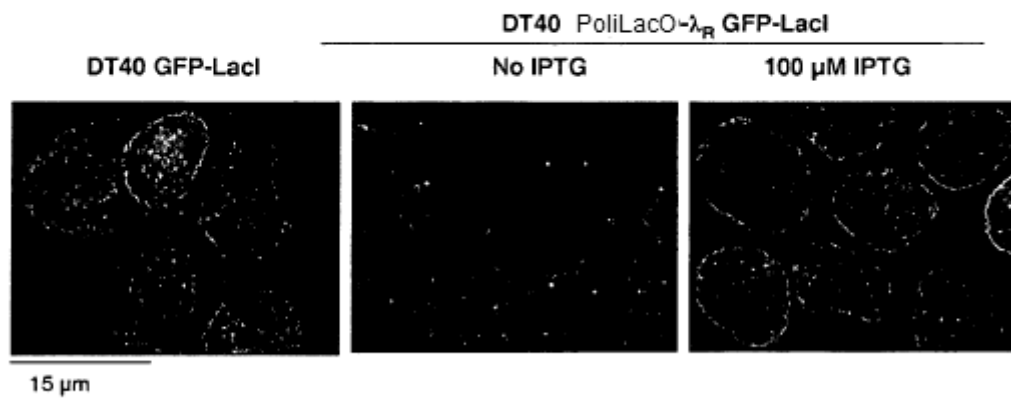


Figura 10B

Figura 9A

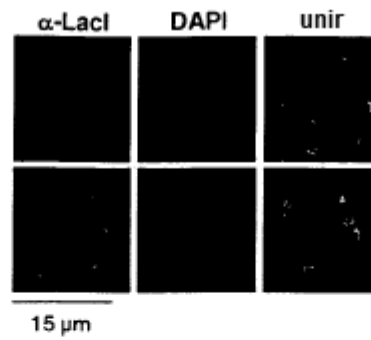


Figura 11B

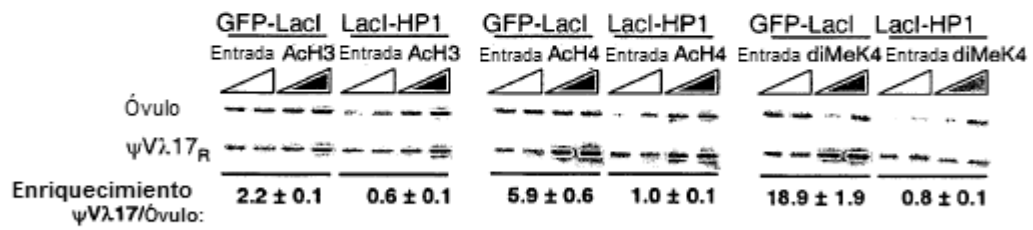


Figura 11C

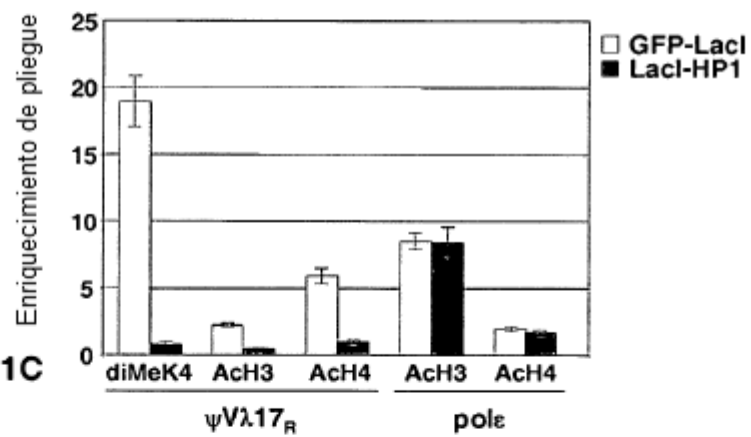
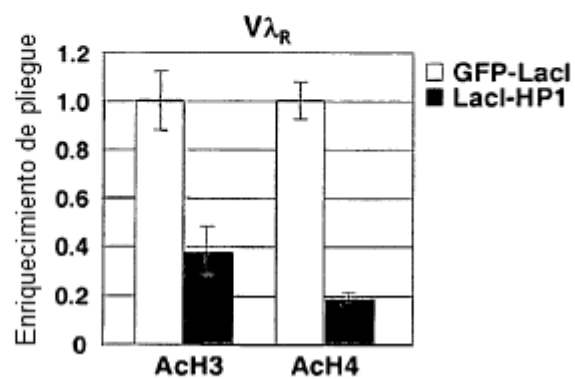


Figura 12A



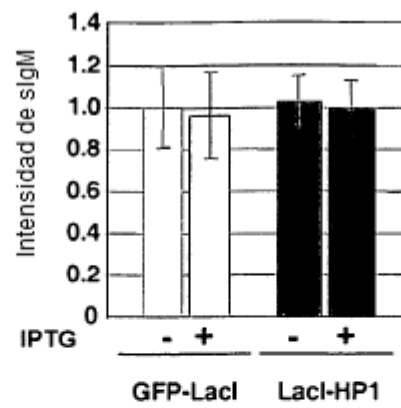


Figura 12B

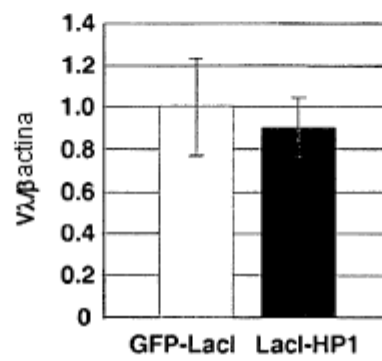


Figura 12C

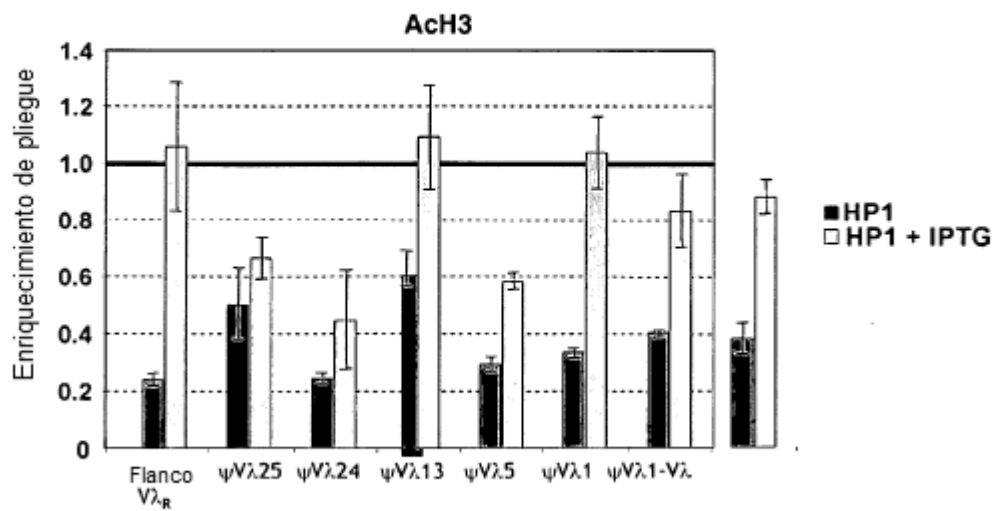


Figura 13A

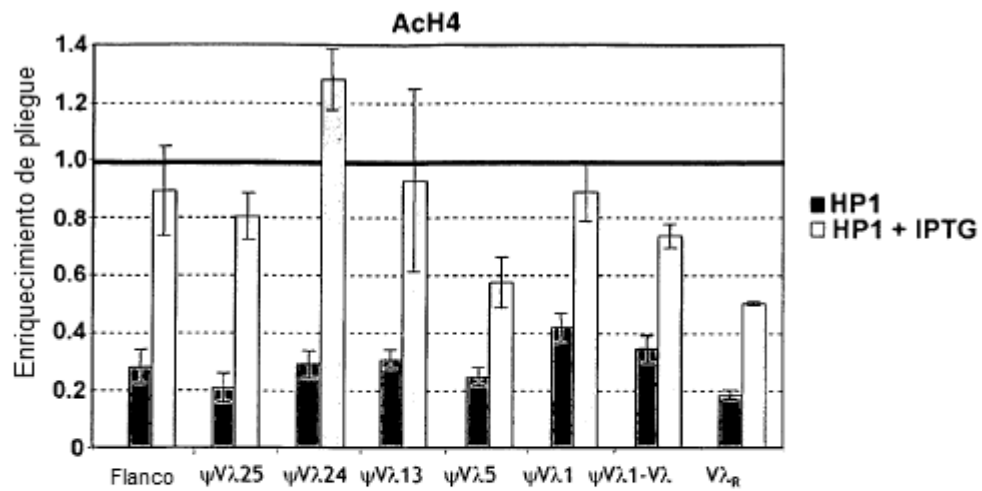


Figura 13B

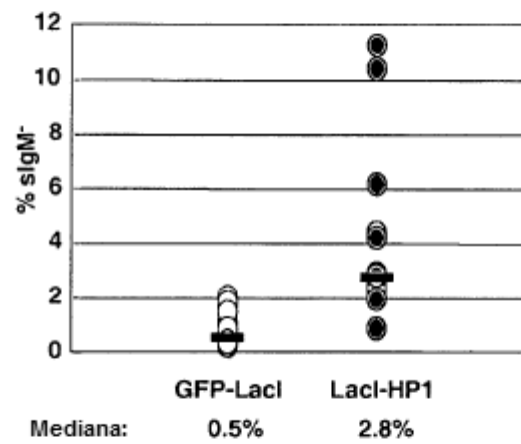


Figura 14A

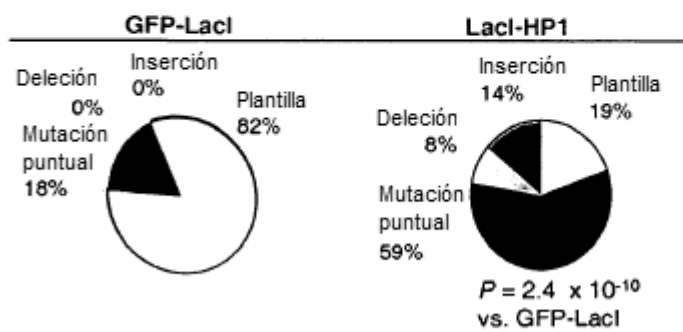


Figura 14B

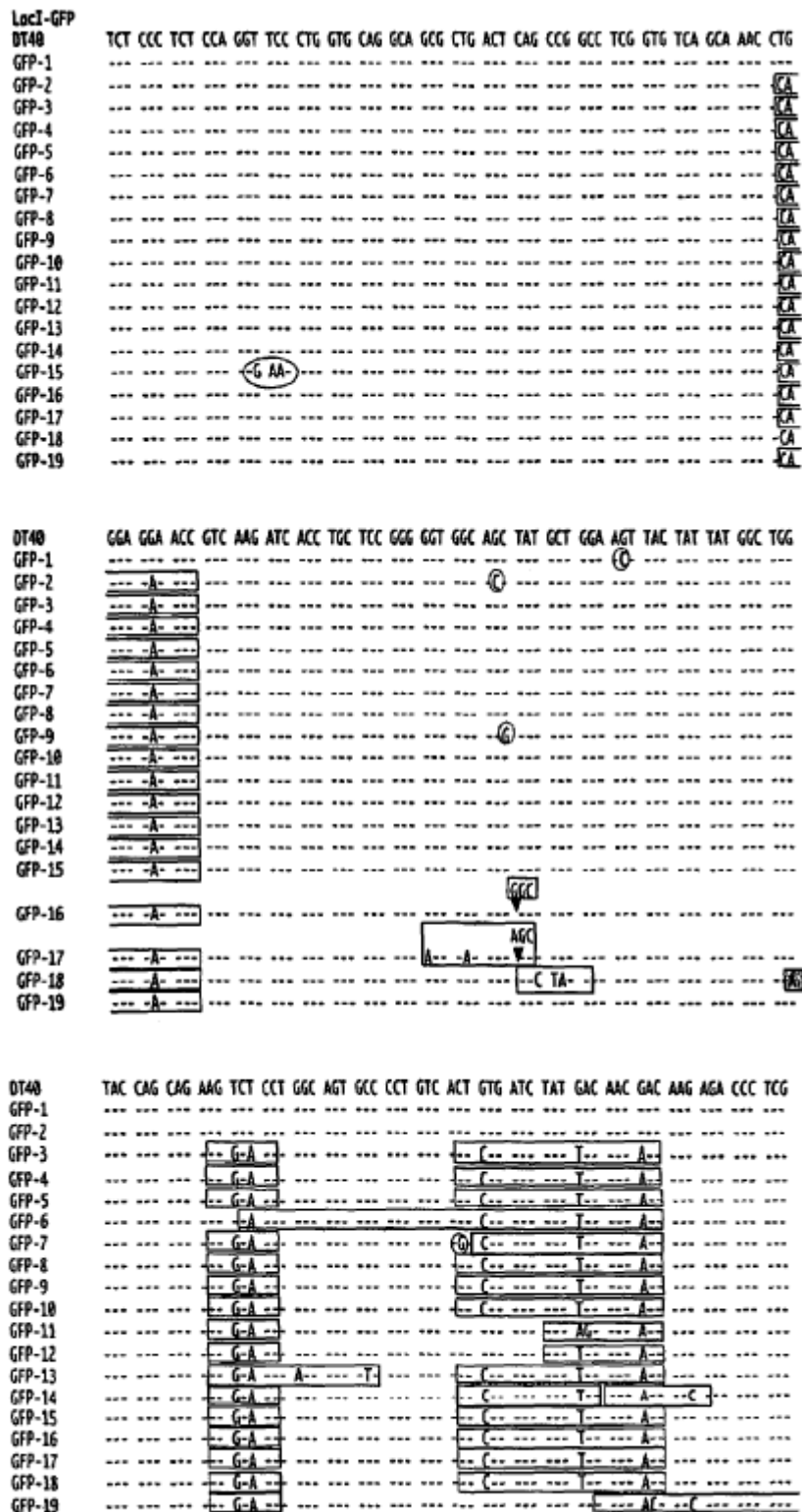


FIGURA 15 (CONTINUA)

DT40	GAC ATC CCT TCA CGA TTC TCC GGT TCC CTA TCC GGC TCC ACA AAC ACA TTA ACC ATC ACT GGG GTC
GFP-1	---
GFP-2	---
GFP-3	---
GFP-4	---
GFP-5	---
GFP-6	---
GFP-7	---
GFP-8	---
GFP-9	---
GFP-10	---
GFP-11	---
GFP-12	---
GFP-13	---
GFP-14	---
GFP-15	---
GFP-16	---
GFP-17	---
GFP-18	---
GFP-19	---

DT40	CGA GCC GAT GAC GAG GCT GTC TAT TTC TGT GGG AGT GCA GAC AAC AGT GGT GCT GCA TTT GGG GCC
GFP-1	---
GFP-2	---
GFP-3	---
GFP-4	---
GFP-5	---
GFP-6	---
GFP-7	---
GFP-8	---
GFP-9	---
GFP-10	---
GFP-11	---
GFP-12	---
GFP-13	---
GFP-14	---
GFP-15	---
GFP-16	---
GFP-17	---
GFP-18	---
GFP-19	---

DT40	GGG ACA ACC CTG ACC GTC CTA GGT GAG TCG CTG ACC TCG TCT CGG TCT
GFP-1	---
GFP-2	---
GFP-3	---
GFP-4	---
GFP-5	---
GFP-6	---
GFP-7	---
GFP-8	---
GFP-9	---
GFP-10	---
GFP-11	---
GFP-12	---
GFP-13	---
GFP-14	---
GFP-15	---
GFP-16	---
GFP-17	---
GFP-18	---
GFP-19	---

FIGURA 15 (CONTINUACIÓN)

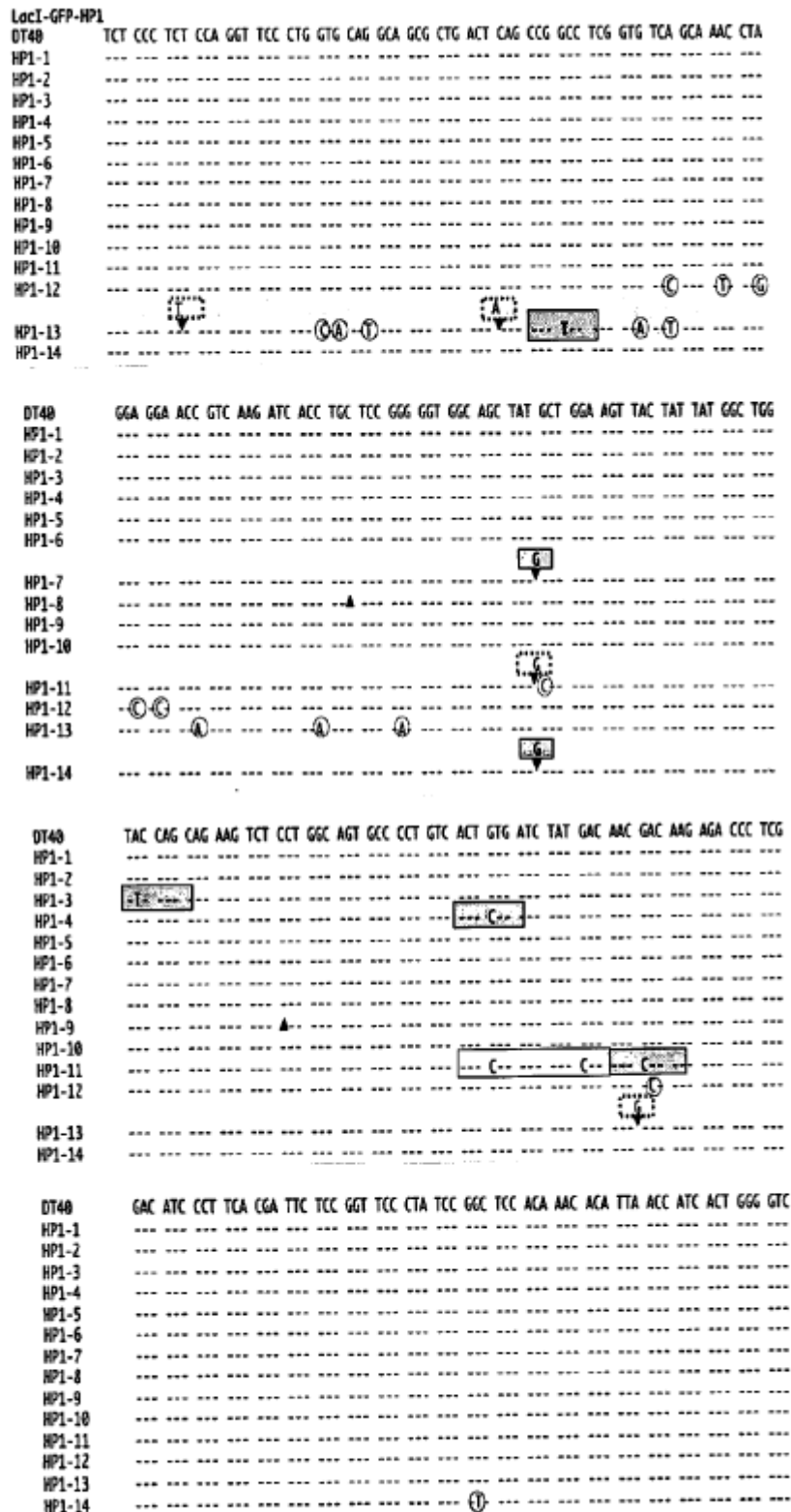
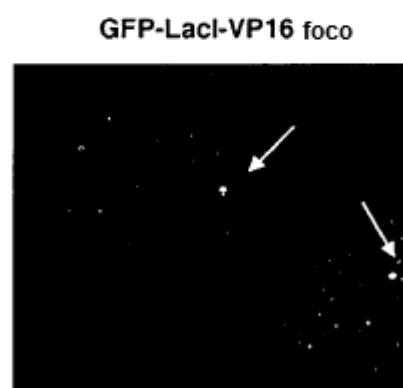
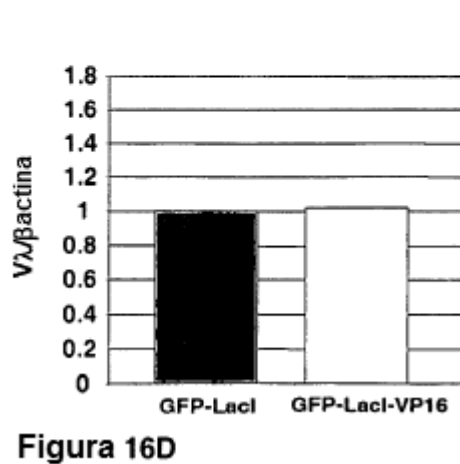
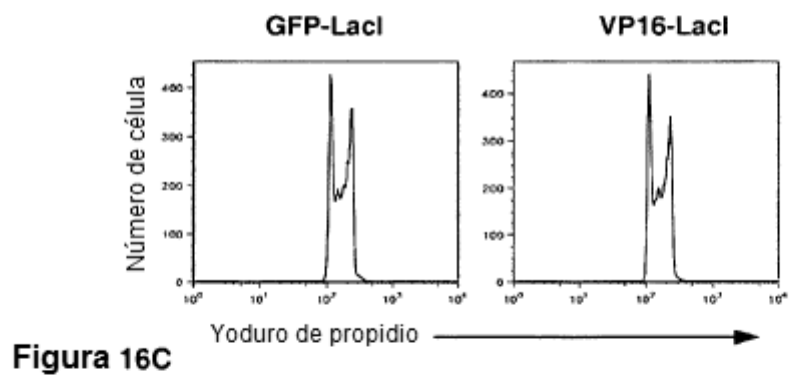
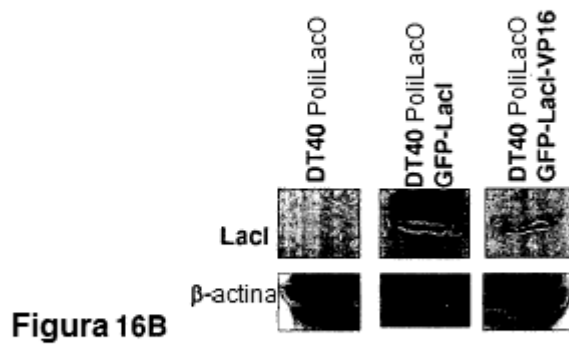
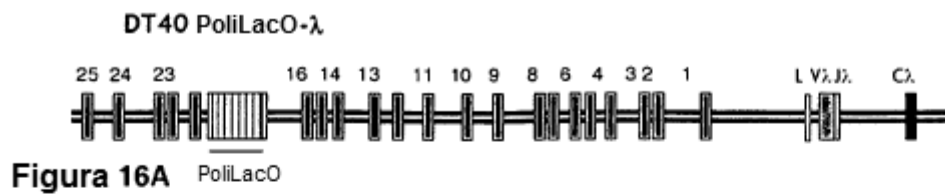


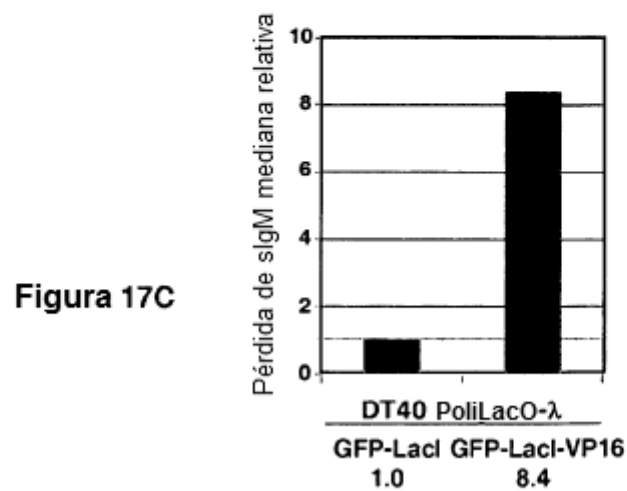
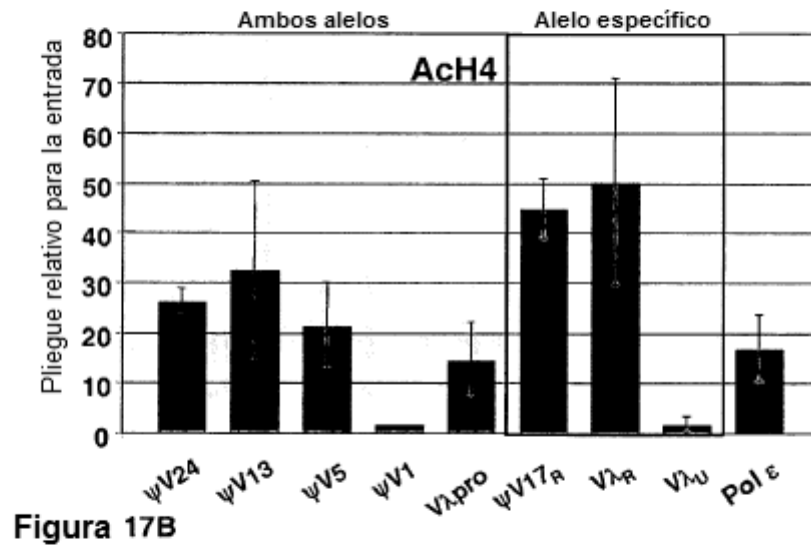
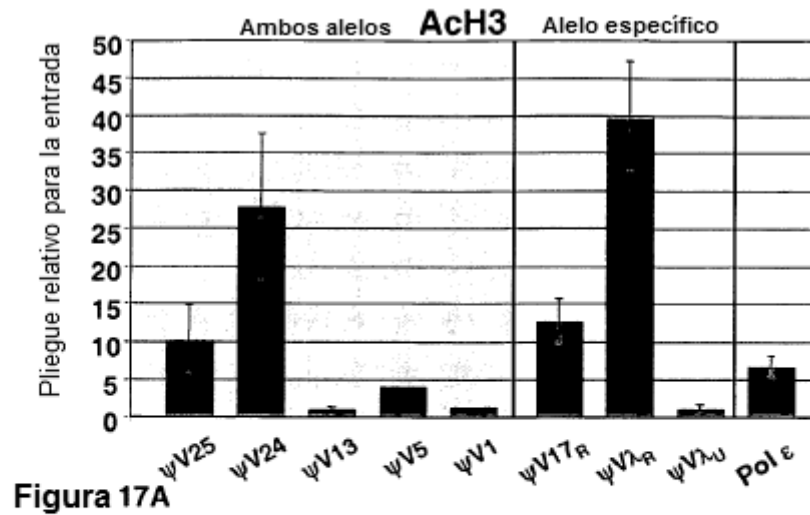
FIGURA 15 (CONTINÚA)

DT40	CGA GCC GAT GAC GAG GCT GTC TAT TTC TGT GGG AGT GCA GAC AAC AGT GGT GCT GCA TTT GGG GCC
HP1-1	---
HP1-2	---
HP1-3	---
HP1-4	---
HP1-5	---
HP1-6	---
HP1-7	---
HP1-8	---
HP1-9	---
HP1-10	---
HP1-11	---
HP1-12	---
HP1-13	---
HP1-14	---

DT40	GGG ACA ACC CTG ACC GTC CTA GGT GAG TCG CTG ACC TCG TCT CGG TCT
HP1-1	---
HP1-2	---
HP1-3	---
HP1-4	---
HP1-5	---
HP1-6	---
HP1-7	---
HP1-8	---
HP1-9	---
HP1-10	---
HP1-11	---
HP1-12	---
HP1-13	---
HP1-14	---

FIGURA 15 (CONTINUACIÓN)





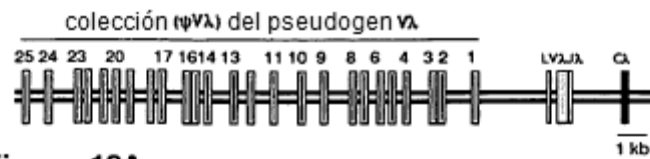


Figura 18A

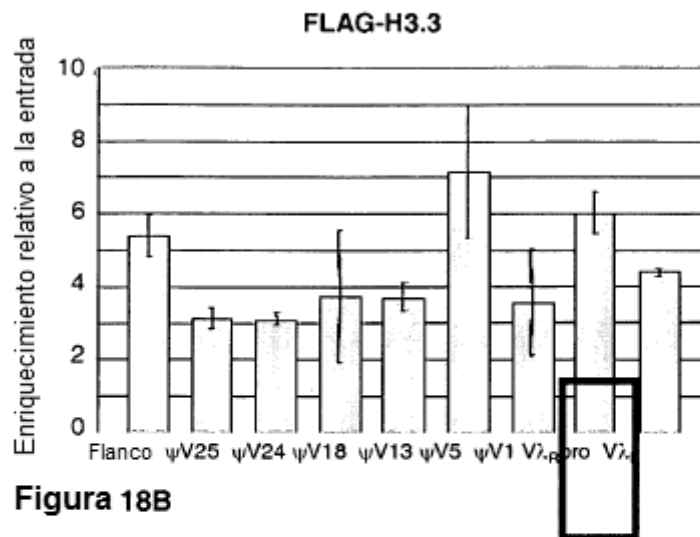


Figura 18B

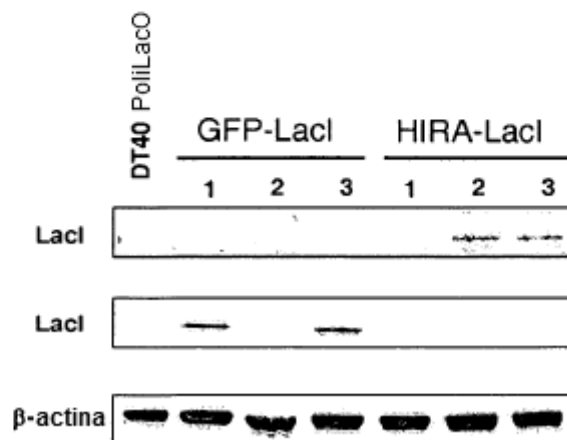


Figura 19A

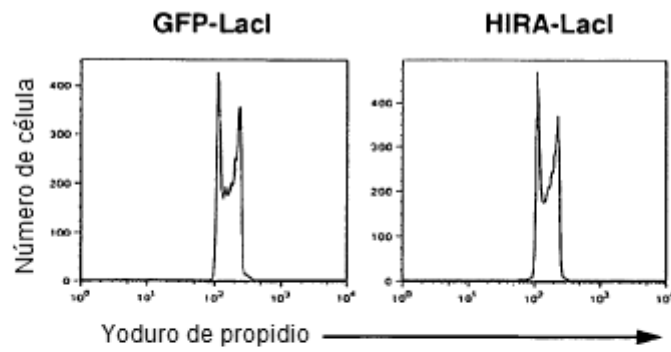


Figura 19B

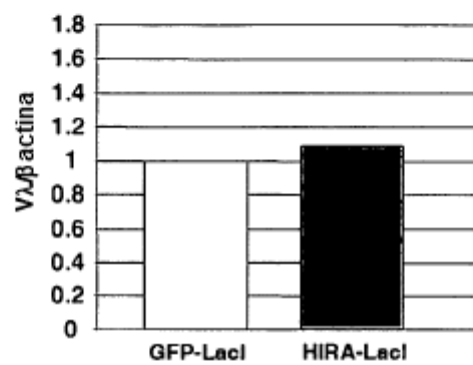


Figura 19C

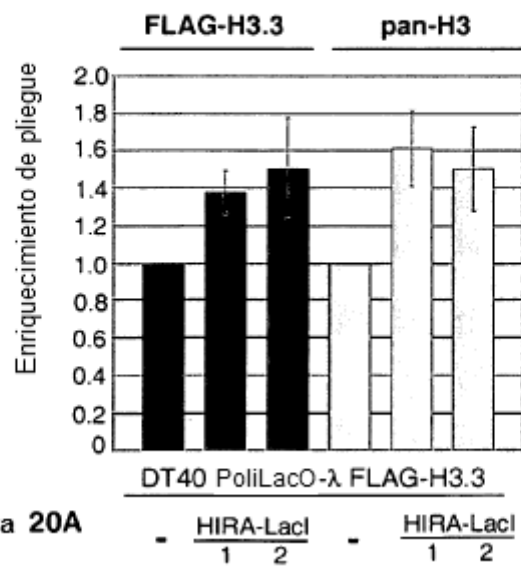


Figura 20A

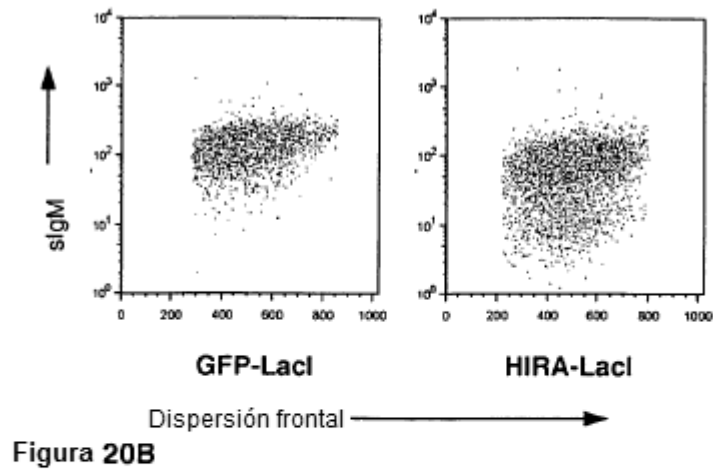


Figura 20B

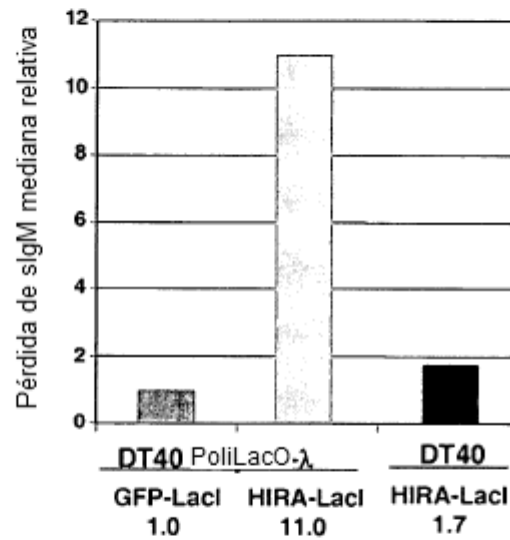


Figura 20C

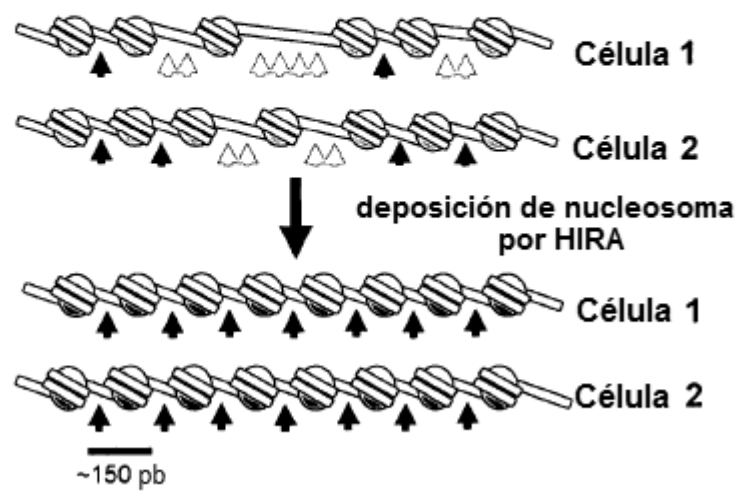


Figura 21B

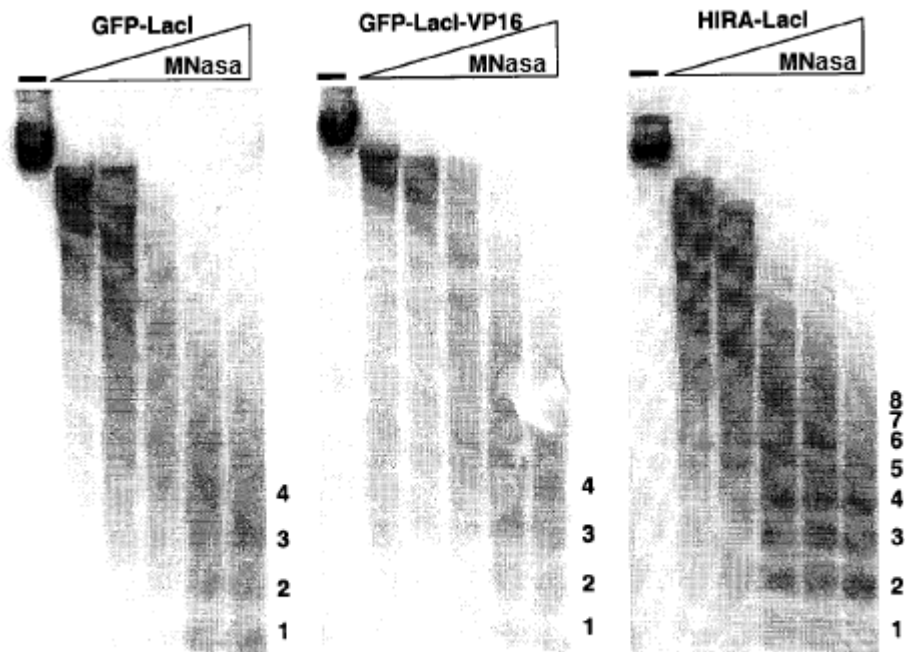
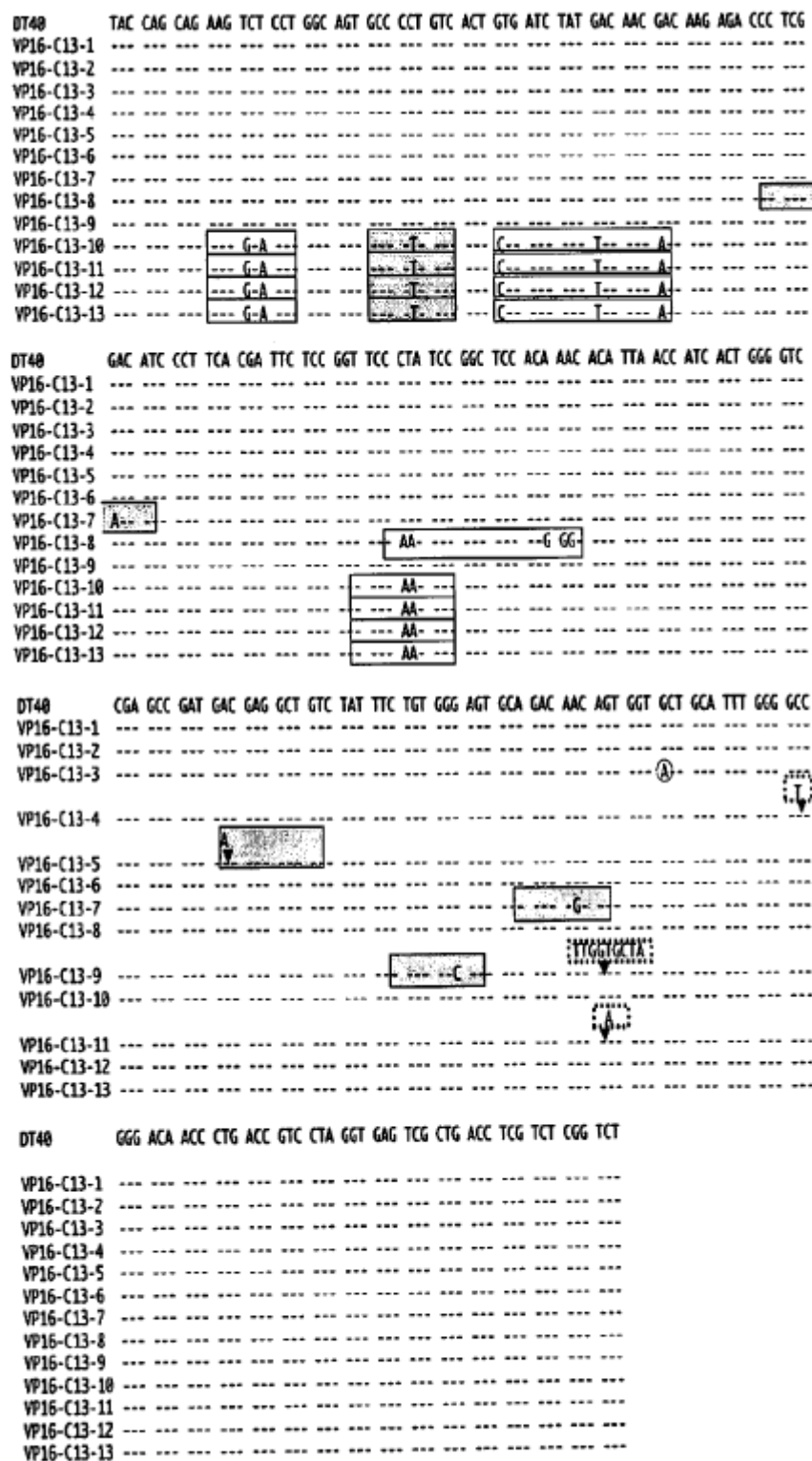
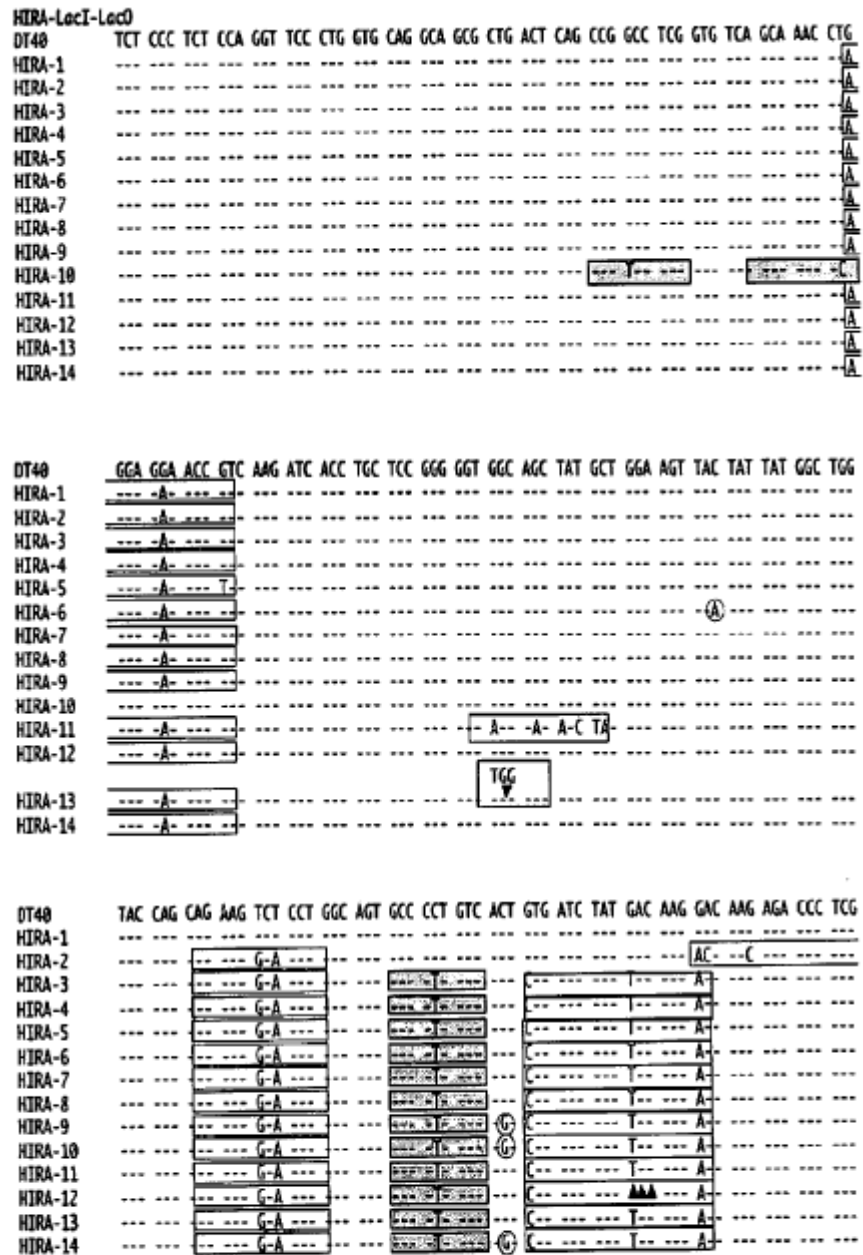


Figura 21A

VP16-LacI	
DT40	TCT CCC TCT CCA GGT TCC CTG GTG CAG GCA GCG CTG ACT CAG CCG GCC TCG GTG TCA GCA AAC CCA
VP16-C13-1	---
VP16-C13-2	---
VP16-C13-3	---
VP16-C13-4	---
VP16-C13-5	---
VP16-C13-6	---
VP16-C13-7	---
VP16-C13-8	---
VP16-C13-9	---
VP16-C13-10	---
VP16-C13-11	---
VP16-C13-12	---
VP16-C13-13	---
DT40	GGA GAA ACC GTC AAG ATC ACC TGC TCC GGG GGT GGC AGC TAT GCT GGA AGT TAC TAT TAT GGC TGG
VP16-C13-1	---
VP16-C13-2	---
VP16-C13-3	---
VP16-C13-4	---
VP16-C13-5	---
VP16-C13-6	---
VP16-C13-7	---
VP16-C13-8	---
VP16-C13-9	---
VP16-C13-10	---
VP16-C13-11	---
VP16-C13-12	---
VP16-C13-13	---

FIGURA 22





DT40	GAC ATC CCT TCA CGA TTC TCC GGT TCC CTA TCC GGC TCC ACA AAC ACA TTA ACC ATC ACT GGG GTC
HIRA-1	-----AA-----GGG-----
HIRA-2	A-----
HIRA-3	-----
HIRA-4	-----
HIRA-5	-----
HIRA-6	-----
HIRA-7	-----
HIRA-8	-----
HIRA-9	-----
HIRA-10	-----
HIRA-11	-----
HIRA-12	-----
HIRA-13	-----
HIRA-14	-----

DT40	CGA GCC GAT GAC GAG GCT GTC TAT TTC TGT GGG AGT GCA GAC AAC AGT GGT GCT GCA TTT GGG GCC
HIRA-1	-----
HIRA-2	-----
HIRA-3	-----T-----
HIRA-4	-----
HIRA-5	-----
HIRA-6	-----
HIRA-7	-----C-----
HIRA-8	-----
HIRA-9	-----
HIRA-10	-----
HIRA-11	-----
HIRA-12	-----
HIRA-13	-----C-----CAGGGAG-----A-----
HIRA-14	-----AACCATCACTGGGGTCCGAGCCGATGACGAGGCTGTCTATT-----

DT40	GGG ACA ACC CTG ACC GTC CTA GGT GAG TCG CTG ACC TCG TCT CGG TCT
HIRA-1	-----
HIRA-2	-----
HIRA-3	-----
HIRA-4	-----
HIRA-5	-----
HIRA-6	-----
HIRA-7	-----
HIRA-8	-----
HIRA-9	-----
HIRA-10	-----
HIRA-11	-----
HIRA-12	-----
HIRA-13	-----
HIRA-14	-----

FIGURA 23 (CONTINUACIÓN)