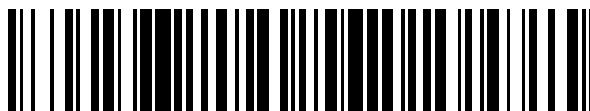


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 209**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2001 PCT/US2001/15376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2001 WO01088192**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2001 E 01935403 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 1430123**

54 Título: **Procedimiento para generar organismos hipermutables**

30 Prioridad:

17.05.2000 US 204769 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2018

73 Titular/es:

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY (14.3%)
111 Market Place, Suite 906
Baltimore, MD 21202, US;
MORPHOTEK, INC. (14.3%);
NICOLAIDES, NICHOLAS C. (14.3%);
SASS, PHILIP M. (14.3%);
GRASSO, LUIGI (14.3%);
VOGELSTEIN, BERT (14.3%) y
KINZLER, KENNETH (14.3%)

72 Inventor/es:

NICOLAIDES, NICHOLAS C.;
SASS, PHILIP M.;
GRASSO, LUIGI;
VOGELSTEIN, BERT y
KINZLER, KENNETH W.

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 659 209 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

Procedimiento para generar organismos hipermutables

5 **SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al área de genes de reparación de errores de apareamiento. En particular, se refiere al sector de la mutagénesis.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

En los últimos cuatro años, se ha determinado la causa genética del síndrome del cáncer colorrectal hereditario no poliposo (HNPCC), también conocido como síndrome de Lynch II, para la mayoría de las familias afectadas por la enfermedad (13). La base molecular del HNPCC implica inestabilidad genética resultante de la reparación defectuosa de errores de apareamiento (MMR). Se han identificado muchos genes en roedores y seres humanos que codifican proteínas que parecen participar en el proceso de la MMR, incluidos los homólogos de mutS GTBP, hMSH2 y hMSH3 y los homólogos de mutL hMLH1, hPMS1 y hPMS2 (2, 7, 11, 17, 20, 21, 22, 24). Se han identificado mutaciones en la línea germinal en cuatro de estos genes (hMSH2, hMLH1, hPMS1 y hPMS2) en las familias con HNPCC (2, 11, 13, 17, 24). Aunque el defecto mutador que surge de la deficiencia de MMR puede afectar cualquier secuencia de ADN, las secuencias microsatélites son particularmente sensibles a las anomalías de MMR (14). La inestabilidad de los microsatélites es, por lo tanto, un indicador útil de MMR defectuosa. Además de su aparición en prácticamente todos los tumores que surgen en pacientes con HNPCC, la inestabilidad de microsatélites se encuentra en una pequeña fracción de tumores esporádicos con propiedades moleculares y fenotípicas distintivas (27).

El HNPCC se hereda de forma autosómica dominante, de modo que las células normales de los miembros de la familia afectados contienen un alelo mutante del gen de MMR relevante (heredado de un progenitor afectado) y un alelo de tipo salvaje (heredado del progenitor no afectado).

Sin embargo, durante las primeras etapas del desarrollo tumoral, el alelo de tipo salvaje se inactiva a través de una mutación somática, dejando a la célula sin gen de MMR funcional y dando como resultado un defecto profundo en la actividad de la MMR. Debido a que se requiere una mutación somática además de una mutación en la línea germinal para generar una MMR defectuosa en las células tumorales, este mecanismo generalmente se conoce como uno que involucra dos acontecimientos, análogo a la inactivación bialélica de genes supresores tumorales que inician otros cánceres hereditarios (11, 13, 25). De acuerdo con este mecanismo de dos acontecimientos, las células no neoplásicas de pacientes con HNPCC generalmente retienen niveles casi normales de actividad de MMR debido a la presencia del alelo de tipo salvaje.

Se ha encontrado que una amplia gama de organismos con MMR defectuosa tienen mutaciones genéticas generalizadas en todo su genoma. En todos los casos, estos organismos tienen mutaciones en la línea germinal dentro de ambas copias de un gen de MMR en particular. Recientemente, el trabajo realizado por Nicolaides y otros ha demostrado que se puede lograr una disminución en la MMR dentro de las células de organismos de orden superior mediante la introducción de un alelo negativo dominante de un gen de MMR. Estos datos sugieren que la utilización de dicho enfoque puede generar organismos genéticamente alterados para producir nuevos rasgos de producción. Existe una necesidad en la técnica de procedimientos adicionales con los cuales generar diversidad genética.

El documento CA 2240609 y Nicolaides y otros, Mol. Cell. Biol, 1998; 18(3): 1635-41, dan a conocer ambos procedimientos para generar mutaciones, pero no están relacionados con la restauración de la estabilidad disminuyendo o suprimiendo la expresión de un polinucleótido que codifica hPMS2-134.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Los objetivos de la presente invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Figura 1A y 1B. Diagramas de vectores de expresión *PMS2* (figura 1A) e indicadores pCAR (figura 1B).

Figura 2A -2C. Células SH cotransfectadas con los indicadores pCAR y los vectores de expresión *PMS2* después de 17 días de selección del fármaco. (Figura 2A) Transferencias de tipo Western de lisados de células SH no transfectadas (calle 1) o células SH transfectadas con *PMS2NOT* (calle 2) o *PMS2WT* (calle 3). La flecha indica la proteína de 110 kD esperada para hPMS2. (Figura 2B) Transferencias de tipo Western de lisados de células SH no transfectadas (calle 1) o células SH transfectadas con *PMS2NOT* (calle 2) o *PMS2134* (calle 3). La flecha indica la proteína de 14 kD esperada para hPMS-134. Tanto A como B se sondaron con un anticuerpo generado contra el extremo N de hPMS2. Los polipéptidos superiores en A y los polipéptidos inferiores en B representan proteínas de

hámster con reactividad cruzada. (Figura 2C) Actividad de β -galactosidasa en lisados derivados de células SH cotransfectadas con *PMS2NOT* (calle 1), *PMS2WT* (calle 2) o *PMS2134* (calle 3) más el plásmido indicador. Las actividades relativas de β -galactosidasa se definen como la relación de la actividad de β -galactosidasa en células transfectadas con pCAROF en comparación con la de células transfectadas con pCARIF; esta normalización controló la eficacia de la transfección y controló la actividad de la β -galactosidasa en las células que expresaban los diversos genes efectores *PMS2*.

Figuras 3A y 3B. Actividad β -galactosidasa *in situ* de clones combinados de células SH transducidas establemente con los vectores de expresión *PMS2WT* (figura 3A), o *PMS2134* (figura 3B), a continuación retransfectadas con el indicador pCAROF. Después de 17 días de selección del fármaco, las colonias se combinaron, se cultivaron y se tiñeron para determinar la actividad de β -galactosidasa. Un cultivo agrupado de células SH transducidas con *PMS2134* que expresan β -galactosidasa desde pCAROF es visible en la figura 3B. Cada uno de los campos ilustrados es representativo del encontrado en experimentos por triplicado.

Figura 4. Generación de vectores de expresión de mamífero inducibles que contienen alelos del gen de reparación de errores de apareamiento negativo dominante. El ADNc de *PMS134* con o sin un epítipo de V5 en el extremo C se clonó en el vector de expresión de mamífero pIND regulado por el esteroide ecdisona. El ADNc de *PMS134* se clonó en el único sitio BamHI del vector en la orientación de sentido al promotor mínimo de choque térmico. Los vectores resultantes se denominan pINDPMS134V5 o pINDPMS134, respectivamente. El vector pIND contiene ese gen de resistencia a neomicina como marcador seleccionable.

Figura 5. Generación de secuencias génicas alteradas tras la inducción de *PMS134*. Las células que contenían el vector vacío pIND o pINDPMS134 se transfectaron con el plásmido pCAR-OF que contiene el plásmido indicador de β -galactosidasa con una repetición de poliCA en el extremo N del gen β -gal, que interrumpe el marco de lectura abierto para producir un desplazamiento de marco. El plásmido también contiene el gen de resistencia a higromicina para seleccionar las líneas estables. Las células que eran resistentes a G418/higromicina se expandieron y crecieron durante 10 días con o sin ecdisona 1 μ M. El día 14, las células se tiñeron *in situ* para detectar focos que produjeran β -gal funcional. Tal como se muestra, se observó un número significativo (25/campo) de focos positivos para β -gal en células cultivadas en presencia del esteroide inductor, mientras que poco se observó en los cultivos cultivados sin la molécula inductora.

Figura 6. Restablecimiento de células genéticamente estables después de la selección. Para determinar si los clones eran genéticamente estables después de la eliminación del inductor químico (y el apagado posterior del alelo de MMR negativo dominante), se aislaron clones de pINDPMS134/pCAR-OF y se ensayó la actividad de β -gal funcional. Los clones con expresión de β -gal se sembraron en placas de 96 pocillos a una dilución limitante que produjo aproximadamente 45 pocillos con clones por placa. Los clones se cultivaron de nuevo 14 generaciones (1 generación/día) con o sin ecdisona y se tiñeron para determinar la actividad β -gal *in situ*. Tal como se muestra, se observó un número significativo de clones positivos para β -gal en células cultivadas en ausencia del esteroide inductor (42/45 pocillos fueron positivos para β -gal), mientras que un mayor número de clones perdieron actividad de β -gal bajo exposición constante al inductor (18/45 pocillos fueron positivos para β -gal). Estos datos demuestran la capacidad de restaurar la estabilidad genética en clones que han sido genéticamente alterados *in vivo* a través del bloqueo de la MMR.

Figura 7. Diagrama del gen de la purina fosforilasa genéticamente alterado (PNP) con un tramo poli A fuera del marco insertado en el extremo N (denominado poliPNP). Este gen codifica para un gen PNP no funcional. Cuando el tramo poliA se altera aleatoriamente mediante una MMR defectuosa, el tramo se desplaza y permite la producción de un gen PNP funcional. El PNP puede convertir el profármaco no tóxico 9-(β -D-2-desoxieritropentofuranosil)-6-metilpurina (denominado MPD) en el análogo de 6-metilpurina tóxico (denominado (MP)). La construcción tiene un marcador de hemaglutinina (HA) en el extremo C para el análisis de transferencia de tipo Western.

Figura 8A y 8B. Ensayo de toxicidad de células con MMR defectuosa o células competentes que expresan poliPNP con o sin exposición a MPD. (Figura 8A) El gráfico muestra que en las células defectuosas para MMR que expresan el gen de poliPNP, las células se destruyen en presencia del profármaco MPD en contraste con las células competentes para MMR. (Figura 8B) Transferencia de tipo Western que muestra la producción de un polipéptido marcado con poliPNP-HA en las células defectuosas para MMR en contraste con las células competentes para MMR.

Figura 9. Ensayo de toxicidad de una línea celular defectuosa o competente para MMR que expresa poliPNP con o sin exposición a MPD. El gráfico muestra que en células HCT116 defectuosas para MMR (genéticamente deficientes para MLH1), la introducción de un gen de MLH1 funcional restaura la estabilidad genética de la célula, tal como lo indica el hecho de que el gen de poliPNP no se convierte a una forma activa, tal como se ve en las células HCT116 transfectadas con un ADNc de MLH1 truncado (no funcional) (pC9MLHstop). Estos datos demuestran que la deficiencia de MMR se puede complementar con un gen de MMR funcional (HCT116/pC9MLH1), por lo que se mantiene la integridad genómica de un gen o locus que se ha alterado.

Figuras 10A y 10B. Transferencia de tipo Western de células transfectadas con una construcción de expresión de MLH1 y el gen poliPNP. (Figura 10A) Los lisados celulares de las células transfectadas con el vector de expresión MLHstop (calle 1) o el vector MLH1 (calle 2) se lisaron y sondearon para determinar la expresión de la proteína MLH1 en células HCT116. Tal como se muestra en la figura 10A, las células transfectadas con la construcción de expresión de longitud completa MLH1 produjeron un polipéptido del peso molecular esperado (flecha). (Figura 10B) Lisados celulares de células HCT116 transfectadas con el vector de expresión MLHstop (calle 1) o el vector MLH1 (calle 2) más el gen poliPNP se lisaron y sondearon para determinar poliPNP utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA que puede detectar el marcador HA en el extremo C de la proteína PNP. Tal como se muestra en la figura 10B, las células transfectadas con la construcción de expresión MLHstop produjeron un polipéptido del peso molecular esperado (flecha) en contraste con las células transfectadas con el ADNc funcional de MLH1, que restauró la estabilidad genómica de la célula, manteniendo así la estructura genómica de el gen poliPNP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los presentes inventores han descubierto un procedimiento para desarrollar células hipermutables aprovechando las células con reparación defectuosa de errores de apareamiento para crear genes alterados, ARN, polipéptidos y células u organismos completos con nuevos fenotipos. Los alelos dominantes negativos de tales genes, cuando se introducen en células o animales transgénicos, aumentan la tasa de mutaciones espontáneas al reducir la efectividad de la reparación del ADN y, por lo tanto, hacen que las células o animales sean hipermutables. Por consiguiente, se pueden utilizar células o animales hipermutables para desarrollar nuevas mutaciones en uno o más genes para producir nuevos rasgos de salida de una célula u organismo huésped. Los presentes inventores mostrarán que la utilización de agentes químicos que causan daños en el ADN puede mejorar la tasa de hipermutabilidad en células que expresan alelos del gen de reparación del error de apareamiento negativo dominante. Los presentes inventores también muestran que la selección de genes alterados y la restauración de la estabilidad genética de una célula u organismo huésped mediante la restauración de la MMR pueden conducir a productos biológicos estables que consisten en genes, ARN o polipéptidos alterados.

Los complejos de proteínas en células que van desde bacterias hasta células de mamíferos llevan a cabo el proceso de reparación de errores de apareamiento, también llamado corrección de errores de apareamiento. Un gen de reparación de errores de apareamiento es un gen que codifica una de las proteínas de dicho complejo de reparación de errores de apareamiento. Aunque sin desear quedar limitado por ninguna teoría en particular del mecanismo de acción, se cree que un complejo de reparación de errores de apareamiento detecta distorsiones de la hélice de ADN que resultan del apareamiento no complementario de bases nucleotídicas. La base no complementaria en la cadena de ADN más reciente se escinde y la base escindida se reemplaza con la base apropiada que es complementaria de la cadena de ADN anterior. De esta forma, las células eliminan muchas mutaciones que se producen como resultado de errores en la replicación del ADN.

Los alelos dominantes negativos causan un fenotipo defectuoso de reparación de errores de apareamiento incluso en presencia de un alelo de tipo salvaje en la misma célula. Un ejemplo de un alelo negativo dominante de un gen de reparación de errores de apareamiento es el gen humano *hPMS2-134*, que lleva una mutación de truncamiento en el codón 134. La mutación hace que el producto de este gen termine anormalmente en la posición del aminoácido 134, dando como resultado un polipéptido más corto que contiene los 133 aminoácidos N-terminales. Tal mutación causa un aumento en la tasa de mutaciones que se acumulan en las células después de la replicación del ADN. La expresión de un alelo negativo dominante de un gen de reparación de errores de apareamiento da como resultado un deterioro de la actividad de reparación de errores de apareamiento, incluso en presencia del alelo de tipo salvaje. Cualquier alelo que produzca tal efecto se puede utilizar en la presente invención.

Los alelos dominantes negativos de un gen de reparación de errores de apareamiento se pueden obtener de las células de seres humanos, animales, levaduras, bacterias u otros organismos. Las células de cribado para la actividad de reparación de errores de apareamiento defectuoso pueden identificar tales alelos. Las células de animales o seres humanos con cáncer se pueden analizar para detectar una reparación defectuosa de errores de apareamiento. Las células de pacientes con cáncer de colon pueden ser particularmente útiles. El ADN genómico, el ADNc o el ARNm de cualquier célula que codifica una proteína de reparación de errores de apareamiento se pueden analizar para detectar variaciones de la secuencia de tipo salvaje. Los alelos dominantes negativos de un gen de reparación de errores de apareamiento también pueden crearse artificialmente, por ejemplo, produciendo variantes del alelo *hPMS2-134* u otros genes de reparación de errores de apareamiento. Se pueden utilizar diversas técnicas de mutagénesis dirigida al sitio. La idoneidad de dichos alelos, ya sean naturales o artificiales, para su utilización en la generación de células o animales hipermutables puede evaluarse probando la actividad de reparación de errores de apareamiento causada por el alelo en presencia de uno o más alelos de tipo salvaje, para determinar si es un alelo negativo dominante.

Una célula, un organismo o un animal en el que se ha introducido un alelo negativo dominante de un gen de reparación de errores de apareamiento se volverá hipermutable. Esto significa que la tasa de mutación espontánea de tales células o animales es elevada en comparación con células o animales sin dichos alelos. El grado de elevación de la tasa de mutación espontánea puede ser, como mínimo, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1.000 veces más de que la de la célula o animal normal.

De acuerdo con un aspecto, se introduce un polinucleótido que codifica una forma negativa dominante de una proteína de reparación de errores de apareamiento en cualquier célula eucariótica o un animal transgénico. El gen puede ser cualquier alelo negativo dominante que codifica una proteína, que es parte de un complejo de reparación de errores de apareamiento, por ejemplo, *PMS2*, *PMS1*, *MLH1*, *GTBP*, *MSH3* o *MSH2*. El alelo negativo dominante puede ser de origen natural o producirse en el laboratorio. El polinucleótido puede estar en forma de ADN genómico, ADNc, ARN o un polinucleótido sintetizado químicamente. El polinucleótido puede clonarse en un vector de expresión que contiene un segmento promotor constitutivamente activo (tal como, CMV, SV40, EF-1 o secuencias LTR pero sin limitación a los mismos) o en secuencias promotoras inducibles, tales como los vectores inducibles con tetraciclina o ecdisona/glucocorticoide, en los que se puede regular la expresión del gen de reparación de errores de apareamiento negativo dominante. El polinucleótido se puede introducir en la célula mediante transfección.

La transfección es cualquier proceso mediante el cual se introduce un polinucleótido en una célula. El proceso de transfección se puede llevar a cabo en un animal vivo, por ejemplo, utilizando un vector para terapia génica, o puede llevarse a cabo *in vitro*, por ejemplo, utilizando una suspensión de una o más células aisladas en cultivo. La célula puede ser cualquier tipo de célula eucariótica, incluidas, por ejemplo, células aisladas de seres humanos u otros primates, mamíferos u otros vertebrados, invertebrados y organismos unicelulares, tales como protozoos o levaduras.

En general, la transfección se llevará a cabo utilizando una suspensión de células, o una sola célula, pero también se pueden aplicar otros procedimientos siempre que una fracción suficiente de las células o tejidos tratados incorporen el polinucleótido para permitir el crecimiento y utilización de células transfectadas. El producto proteico del polinucleótido puede expresarse de forma transitoria o estable en la célula. Las técnicas para la transfección son bien conocidas. Las técnicas disponibles para introducir polinucleótidos incluyen, pero sin limitación a las mismas, electroporación, transducción, fusión celular, la utilización de cloruro de calcio y el empaquetamiento del polinucleótido junto con lípidos para la fusión con las células de interés. Una vez que una célula ha sido transfectada con el gen de reparación de errores de apareamiento, la célula puede crecer y reproducirse en cultivo. Si la transfección es estable, de modo que el gen se expresa en un nivel constante para muchas generaciones de células, se obtiene una línea celular.

Una célula aislada es una célula obtenida de un tejido de ser humano o animal separando mecánicamente las células individuales y transfiriéndolas a un medio de cultivo celular adecuado, con o sin pretratamiento del tejido con enzimas, por ejemplo, colagenasa o tripsina. Tales células aisladas se cultivan típicamente en ausencia de otros tipos de células. Las células seleccionadas para la introducción de un alelo negativo dominante de un gen de reparación de errores de apareamiento se pueden derivar de un organismo eucariótico en forma de un cultivo celular primario o una línea celular inmortalizada, o pueden derivarse de suspensiones de organismos unicelulares.

Un polinucleótido que codifica una forma negativa dominante de una proteína de reparación de errores de apareamiento se puede introducir en el genoma de un animal produciendo un animal transgénico. El animal puede ser cualquier especie para la cual haya técnicas adecuadas disponibles para producir animales transgénicos. Por ejemplo, los animales transgénicos pueden prepararse con ganado doméstico., por ejemplo, vacas, cerdos, ovejas, cabras, caballos, etc.; de animales utilizados para la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, vacas, cerdos o cabras que expresan una proteína recombinante en su leche; o animales experimentales para investigación o pruebas de productos, por ejemplo, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, conejos, etc.

Se puede utilizar cualquier procedimiento para hacer animales transgénicos conocidos en la técnica. De acuerdo con un proceso de producción de un animal transgénico, el polinucleótido se inyecta en un huevo fertilizado del animal y el huevo inyectado se coloca en una hembra pseudopreñada. El huevo se desarrolla en un animal maduro en el que se incorpora y expresa el polinucleótido. El huevo fertilizado se produce *in vitro* a partir del huevo y el esperma de animales donantes de la misma especie que la hembra pseudopreñada, a la que se prepara mediante tratamientos hormonales para recibir el óvulo fertilizado y quedar preñada. Un procedimiento alternativo para producir animales transgénicos implica introducir el polinucleótido en células embrionarias mediante inyección o transfección y reintroducir las células embrionarias en el embrión en desarrollo. Sin embargo, con este procedimiento, si el polinucleótido no se incorpora en las células de la línea germinal, el gen no se transmitirá a la progenie. Por lo tanto, un animal transgénico producido por este procedimiento debe evaluarse para determinar si el gen se incorpora a las células germinales del animal. Una vez que se producen los animales transgénicos, pueden crecer hasta la edad reproductora, cuando se pueden aparear para producir y mantener una colonia de animales transgénicos.

Una vez que se ha producido una línea celular transfectada o una colonia de animales transgénicos, puede utilizarse para generar nuevas mutaciones en uno o más genes de interés. Un gen de interés puede ser cualquier gen que posea de forma natural la línea celular o el animal transgénico o que se introduzca en la línea celular o animal transgénico. Una ventaja de la utilización de tales células o animales para inducir mutaciones es que la célula o animal puede tener un amplio espectro de alteraciones genéticas que pueden producir productos biológicos comercialmente beneficiosos. Los animales hipermutables pueden luego criarse y seleccionarse para nuevos rasgos deseados de producción (tales como producción de leche, resistencia a plagas, etc.). Una vez que se identifica un rasgo nuevo, el alelo negativo dominante puede eliminarse anulando directamente el alelo mediante tecnologías

utilizadas por los expertos en la materia o criando parejas que carezcan del alelo dominante negativo para seleccionar la descendencia con un rasgo deseado y un genoma estable. Otra alternativa es utilizar un sistema de expresión CRE-LOX, mediante el cual el alelo negativo dominante se corta y empalma a partir del genoma animal una vez que se ha establecido un nuevo rasgo de salida.

Otro aspecto es la utilización de células que carecen de MMR (debido a un gen o genes de MMR endógenos mutados o mediante la introducción de un gen de MMR negativo dominante) y mutágenos químicos que causan una tasa mejorada de mutaciones en el genoma de un huésped. Se sabe que la falta de actividad de MMR hace que las células sean más resistentes a los efectos tóxicos de los agentes que dañan el ADN. La presente invención enseña la utilización de hacer células competentes para MMR; la reparación defectuosa de errores de apareamiento a través de la expresión de un alelo del gen de MMR negativo dominante y, a continuación, potenciar la hipermutabilidad genómica con la utilización de un mutágeno de ADN. La presente solicitud también instruye sobre la utilización del empleo de células que son naturalmente deficientes en MMR y la exposición de mutágenos químicos para aumentar la tasa de alteraciones genómicas para generar células con nuevas estructuras genéticas y/o nuevos fenotipos. Los mutágenos químicos se pueden clasificar por propiedades químicas, por ejemplo, agentes alquilantes, agentes de reticulación, etc. Los siguientes mutágenos químicos son útiles, como lo son otros no enumerados en el presente documento, de acuerdo con la presente invención. N-etil-N-nitrosourea (ENU), N-metil-N-nitrosourea (MNU), clorhidrato de procarbazona, clorambucilo, ciclofosfamida, metanosulfonato de metilo (MMS), metanosulfonato de etilo (EMS), sulfato de dietilo, monómero de acrilamida, trietilenmelamina (TEM), melfalán, mostaza nitrogenada, vincristina, dimetilnitrosamina, N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), 7,12 dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), óxido de etileno, hexametilfosforamida, bisulfán. En un aspecto preferente, se utiliza una técnica de mutagénesis que confiere una tasa de mutación en el intervalo de 1 mutación de cada 100 genes; 1 mutación por cada 1.000 genes. La utilización de tal combinación (deficiencia de MMR y mutágenos químicos permitirá la generación de una amplia variedad de alteraciones genómicas (tal como, pero sin limitación a las mismas, expansiones o eliminaciones de segmentos de ADN dentro del contexto de la región codificadora de un gen, las regiones intrónicas de un gen, o las regiones proximales y/o distales 5' o 3', mutaciones puntuales, secuencias repetitivas alteradas) que son inducidas preferentemente por cada agente particular.

Las mutaciones se pueden detectar analizando las alteraciones en el genotipo de las células o animales, por ejemplo, examinando la secuencia de ADN genómico, ADNc, ARN mensajero o aminoácidos asociados con el gen de interés. Las mutaciones también se pueden detectar mediante el cribado del fenotipo del gen. Un fenotipo alterado puede detectarse identificando alteraciones en la movilidad electroforética, propiedades espectroscópicas u otras características físicas o estructurales de una proteína codificada por un gen mutante. También se puede detectar la función alterada de la proteína *in situ*, en forma aislada, o en sistemas modelo. Se puede detectar la alteración de cualquier propiedad de la célula o animal asociada con la función del gen de interés, tal como, pero sin limitación a las mismas, la medición de la secreción de proteína, la resistencia química, la resistencia a patógenos, etc.

Otra aplicación es la utilización de vectores inducibles que controlan la expresión de un gen de MMR dominante negativo y que funciona normalmente. La presente solicitud enseña la utilidad de utilizar dicha estrategia para restablecer la estabilidad del ADN una vez que una célula u organismo huésped muestra un nuevo rasgo de salida, gen alterado, ARN o polipéptido generado mediante selección de rasgos con o sin la combinación de mutágenos químicos para establecer una versión genéticamente estable de esta célula u organismo. En el caso de células con MMR defectuosa como resultado de la expresión ectópica de un alelo del gen de MMR negativo dominante, la actividad de la MMR disminuye o se elimina completamente mediante la eliminación de la molécula del inductor del cultivo celular o del entorno del organismo. Además, la expresión de un gen de MMR negativo dominante puede suprimirse eliminando el alelo del gen de MMR utilizando procedimientos que son estándar para los expertos en la técnica de la tecnología de inactivación del ADN en células germinales o somáticas (Waldman, T., y otros Cancer Res 55: 5187- 5190, 1995).

Otro aspecto más nos enseña la utilización de la restauración de la actividad de MMR en una línea celular defectuosa MMR, tal como HCT116, DLD-1, etc., por lo que la célula se trata con mutágenos químicos, seleccionados para un nuevo rasgo de salida como resistencia a patógenos, resistencia química, etc. La célula se transfecta con una copia de un gen de MMR de tipo salvaje que complementa el defecto MMR endógeno y restaura la estabilidad del ADN de una célula o un organismo que presenta un nuevo rasgo de salida, una secuencia de gen alterado, una expresión de ARN alterada y/o una expresión de proteína alterada.

La divulgación anterior generalmente describe la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos que se dan a conocer en el presente documento con fines ilustrativos solamente, y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1: Utilización de la proteína de reparación de errores de apareamiento negativo dominante para causar hipermutabilidad en células competentes para la reparación de errores de apareamiento.

Se encontró un defecto profundo en la MMR en las células normales de dos pacientes de HNPCC. Que este defecto estaba operativo *in vivo* se demostró por la amplia presencia de inestabilidad de microsatélites en las células no

neoplásicas de tales pacientes. Uno de los dos pacientes tenía una mutación de truncamiento en la línea germinal del gen *hPMS2* en el codón 134 (la mutación *hPMS2134*), mientras que el otro paciente tenía una pequeña delección en la línea germinal dentro del gen *hMLH1* (26). Por lo tanto, estos datos contradijeron el modelo de dos acontecimientos que generalmente se cree que explica las características bioquímicas y biológicas de los pacientes con HNPCC. La base de esta deficiencia de MMR en las células normales de estos pacientes no estaba clara y se ofrecieron varias posibles explicaciones. Por ejemplo, fue posible que el segundo alelo del gen de MMR relevante fuera inactivado en la línea germinal de estos pacientes a través de un mecanismo desconocido, o que mutaciones desconocidas de otros genes implicados en el proceso de MMR estuvieran presentes colaborando con la mutación conocida en la línea germinal. Está claro a partir de experimentos de inactivación en ratones que la deficiencia de MMR es compatible con el crecimiento y el desarrollo normales, lo que respalda estas posibilidades (1,3,6). Como alternativa, era posible que los alelos mutantes ejercieran un efecto negativo dominante, dando como resultado una deficiencia de MMR incluso en presencia del alelo de tipo salvaje del gen de MMR correspondiente y todos los demás genes implicados en el proceso de MMR. Para distinguir entre estas posibilidades, los presentes inventores expresaron el polipéptido truncado codificado por la mutación *hPMS2134* en una línea celular competente para MMR y analizó su efecto sobre la actividad de MMR de la célula. Los resultados mostraron que este mutante podría, de hecho, ejercer un efecto negativo dominante, lo que da como resultado manifestaciones bioquímicas y genéticas de la deficiencia de MMR.

La línea celular de hámster sirio competente para MMR TKts (en lo sucesivo denominada células SH) se cotransfectó con varios plásmidos de expresión *hPMS2* más construcciones indicadoras para evaluar la actividad de MMR. Los plásmidos de expresión *hPMS2* contenían el producto genético de *hPMS2* normal o el gen *hPMS2* truncado identificado en el paciente descrito anteriormente (*PMS2WT* y *PMS2134*, respectivamente, figura 1A). Un vector "vacío" desprovisto de secuencias de *hPMS2* (*PMS2NOT*, figura 1A) sirvieron como un control adicional. La construcción indicadora pCAROF (fuera de marco) contenía un gen de resistencia a la higromicina más un gen de β -galactosidasa que contenía un tramo de poliCA del tramo exterior de 29 pb en el extremo 5' de su región de codificación. La construcción indicadora pCARIF (dentro del marco) era idéntica, excepto que el tramo de poliCA era de 27 pb y, por lo tanto, no alteraba el marco de lectura de la β -galactosidasa (figura 1B). El indicador pCAROF no generaría actividad de β -galactosidasa a menos que una mutación que restableciera el marco (es decir, inserción o delección) surgiera después de la transfección.

Se utilizaron diferentes esquemas de transfección para evaluar los efectos de la mutación *PMS2134* en células SH. En el primer esquema, los vectores de expresión más los indicadores se cotransfectaron juntos. Se generaron grupos que contenían más de 100 clones y clones individuales después de la selección con higromicina durante 17 días y se cosecharon para ensayos de transferencia de tipo Western y β -galactosidasa. Las células SH transducidas con los polipéptidos sintetizados *PMS2WT* y *PMS2134* del tamaño esperado, tal como se evaluó con anticuerpos anti*hPMS2* en las transferencias de tipo Western (figura 2A y 2B). Tal como se esperaba, prácticamente no se observó actividad de β -galactosidasa en las células SH transfectadas con el indicador pCAROF más *PMS2NOT* (figura 2C). Sin embargo, las células SH transfectadas con *PMS2134* expresaron considerable actividad de β -galactosidasa, significativamente más que las transfectadas con *PMS2WT* (figura 2C). Estos resultados sugirieron que el polipéptido truncado codificado por la construcción *PMS2134* perturba la maquinaria de MMR endógena, dando como resultado delecciones o inserciones que restauran el marco de lectura. La naturaleza exacta de estas presuntas delecciones o inserciones no pudo evaluarse, ya que se transdujeron múltiples copias de las construcciones indicadoras en las condiciones de los presentes inventores y la secuencia de β -galactosidasa de tipo salvaje era muy superior a las de los mutantes esperados, lo que impidió su demostración por secuenciación directa.

En el segundo esquema, las células SH se cotransfectaron con cada uno de los vectores de expresión *PMS2* más el plásmido de resistencia a la higromicina pLHL4. Los cultivos resistentes a la higromicina que contienen más de 100 clones se agruparon y expandieron. Estos cultivos se cotransfectaron después con los indicadores pCARIF o pCAROF más un plásmido separado que permite la selección de genética. Dos semanas más tarde, las células agrupadas, cada una con más de 100 colonias resistentes tanto a la higromicina como a la genética, se tiñeron con Xgal para evaluar la actividad de la β -galactosidasa. Tal como se muestra en la figura 3, los cultivos transfectados con *PMS2134* (panel B) contenían muchas células azules, mientras que prácticamente ninguna célula era azul en los cultivos transfectados con *PMS2WT* (paneles A). En cada caso, la eficacia de la transfección se controló mediante transfecciones paralelas utilizando pCARIF, que también sirvió como control de la actividad de β -galactosidasa de células que expresan los diversos genes efectores de *PMS2*, lo que dio como resultado niveles de expresión de β -galactosidasa similares en todos los casos (no mostrado). Aumentos en la actividad de la β -galactosidasa después de transfección de *PMS2134* en comparación con la transfección de *PMS2WT* también se observaron cuando se aplicó un protocolo experimental similar a la línea celular 293 de células de riñón embrionario humano competentes para MMR. Estas células se cotransfectaron con pCAROF más los diversos plásmidos efectores *PMS2* y se seleccionaron durante 17 días en higromicina. El día 17, las colonias se tiñeron con Xgal para evaluar la actividad de β -galactosidasa y se puntuaron para células que expresan β -galactosidasa. Tal como se muestra en la tabla 1, solo las células que expresaban el polipéptido *PMS2134* expresaban una actividad de β -galactosidasa detectable. Estos datos demuestran un efecto negativo dominante similar de la proteína *hPMS2134* en sistemas de roedores y de seres humanos y validan la utilidad del sistema de roedores en estos estudios.

Tabla 1. Expresión de β -galactosidasa de 293 clones transfectados con la construcción indicadora pCAROF más plásmidos efectores PMS2. Se cotransfectaron 293 células con el plásmido indicador pCAROF β -galactosidasa más los plásmidos efectores *PMS2NOT*, *WT*, o *-134*. Las células transfectadas se seleccionaron en higromicina durante 17 días y se tiñeron con xgal para la actividad de β -galactosidasa (células de color azul). Los resultados siguientes representan la media $\pm$ desviación estándar de los experimentos por triplicado.

Muestra	Colonias azules	Colonias blancas
<i>PMS2NOT</i>	0 $\pm$ 0	17 $\pm$ 2,7
<i>PMS2WT</i>	0 $\pm$ 0	18 $\pm$ 4,0
<i>PMS2134</i>	15 $\pm$ 2,1	6 $\pm$ 2,1

Plásmidos. El ADNc de *hPMS2134* de tipo salvaje de longitud completa se obtuvo a partir de una biblioteca de ADNc humano de HeLa, tal como se describe (18). Un ADNc de *hPMS2* que contenía un codón de terminación en el aminoácido 134 se obtuvo mediante RTPCR del paciente en el que se descubrió la mutación (9). Los fragmentos de ADNc se clonaron en el sitio BamHI en el vector pSG5, que contiene un promotor de SV40 seguido de una señal de poliadenilación de SV40 (8). Los vectores indicadores de pCAR descritos en la figura 1 se construyeron, tal como se describe en las referencias 21 y 25.

Líneas celulares y transfección. Se obtuvieron fibroblastos de hámster sirio Tkts13 y células humanas HEK293 de la ATCC y se cultivaron tal como se describe (15). Se crearon líneas celulares transfectadas de forma estable que expresan *hPMS2* mediante cotransfección de los vectores de expresión *PMS2* y el plásmido pLHL4 que codifica el gen de resistencia a la higromicina en una relación de 3:1 (pCAR:pLHL4) y seleccionados con higromicina. Se generaron líneas celulares transfectadas de forma estable que contenían indicadores pCAR mediante cotransfección de vectores pCAR junto con el plásmido pNTK que codifica el plásmido de resistencia a neomicina o con pLHL4. Todas las transfecciones se realizaron con fosfato de calcio tal como se ha descrito previamente (15).

Ensayo de β -galactosidasa. Diecisiete días después de la transfección con pCAR, los ensayos de β -galactosidasa se realizaron utilizando 20 g de proteína en 2mercaptoetanol 45 mM, MgCl_2 1 mM, NaPO_4 0,1 M y 0,6 mg/ml de rojo clorofenol β -D-galactopiranosido (CPRG, Boehringer Mannheim). Las reacciones se incubaron durante 1 hora, se terminaron mediante la adición de Na_2CO_3 0,5M y se analizaron mediante espectrofotometría a 576 nm (16). Para la tinción de β -galactosidasa *in situ*, las células se fijaron en glutaraldehído al 1% en PBS y se incubaron en NaCl 0,15 M, MgCl_2 1 mM, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 3,3 mM, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 3,3 mM, 0,2% de XGal durante 2 horas a 37°C.

Transferencia de tipo Western.

Se realizaron transferencias de tipo Western para PMS2 tal como se describe en el ejemplo 5 utilizando un PMS2 antihumano policlonal generado contra los codones 1-20 del polipéptido humano de longitud completa.

EJEMPLO 2: Los alelos genéticos de reparación de errores de apareamiento negativos dominantes causan un defecto en la actividad de MMR

La explicación más probable para las diferencias en la actividad de la β -galactosidasa entre las células transfectadas con *PMS2WT* y *PMS2134* fueron que la proteína PMS2134 alteraba la actividad de la MMR, lo que dio como resultado una mayor frecuencia de mutación dentro del indicador pCAROF y el restablecimiento del ORF. Para probar directamente la hipótesis de que la MMR estaba alterada, los presentes inventores utilizaron un ensayo bioquímico para MMR con clones individuales de células que contenían vectores vacíos *PMS2-WT*, *PMS2-134* o *PMS2-NOT* tal como se describe en el ejemplo 1. Se prepararon extractos nucleares a partir de los clones y se incubaron con sustratos heterodúplex que contenían una delección/inserción de /CA\ o un error de apareamiento G/T en las condiciones descritas previamente. Los heterodúplex /CA\ y G/T se utilizaron para probar la reparación desde las direcciones 3' y 5', respectivamente. Hubo una diferencia importante entre los clones que expresan *PMS2-134* y los otros clones en estos ensayos (tabla 2A). Mientras que todos los clones repararon sustratos desde la dirección 3' (heterodúplex /CA\), las células que expresan el polipéptido PMS2134 tenían muy poca actividad de reparación 5'. Un defecto direccional similar en la reparación de errores de apareamiento fue evidente con clones combinados resultantes de la transfección con *PMS2134* o cuando el heterodúplex contenía un bucle de 24 pares de bases, ejemplos de los cuales se muestran en la tabla 2B. Se observó una pequeña disminución en la actividad de MMR en los ensayos de reparación 3'/CA\ *PMS2-WT*, quizá como resultado de la interferencia en los ensayos bioquímicos por sobreexpresión de la proteína PMS2. No se produjo ninguna actividad significativa por *PMS2-WT* en los ensayos de β -galactosidasa *in situ* (figura 3; tabla 1), un resultado más probable que refleje el estado *in vivo*.

Tabla 2. Actividad de reparación de errores de apareamiento de extractos nucleares de clones SH (A) o cultivos combinados (B). Los extractos se analizaron para determinar la actividad de MMR con 24 fmol de heterodúplex.

*Estos datos representan resultados similares derivados de más de cinco experimentos independientes.

A. Clones SH*

		<u>Substrato reparado (fmol/15 min)</u>	
		3'/CA\5'G/T	
<u>Línea celular</u>			
PMS2-NOT			
	clon A	10,2	3,5
	clon B	12,7	2,9
	clon C	13,5	5,5
PMS2-WT			
	clon A	2,8	2,2
	clon B	5,7	4,8
	clon C	4,7	2,9
PMS2-134			
	clon A	2,5	0,0
	clon B	2,4	0,0
	clon C	5,0	0,5

B. Cultivos agrupados

		<u>Substrato reparado (fmol/15 min)</u>		
	3'G/T	5'G/T	3'/CTG\	5'/CTG\
<u>Línea celular</u>				
PMS2-NOT	2,07 +/- 0,09	2,37 +/- 0,37	3,45 +/- 1,35	2,77 +/-1,37
PMS2-WT	1,65 +/- 0,94	1,86 +/- 0,57	1,13 +/- 0,23	1,23 +/- 0,65
PMS2-134	0.14+/-0.2	0.0 +/- 0.0	1.31 +/- 0.66	0.0+/-0.0

Ensayos bioquímicos para la reparación de errores de apareamiento. La actividad de MMR en extractos nucleares se realizó tal como se describe, utilizando 24 fmol de sustrato (12, 25). Los ensayos de complementación se realizaron añadiendo ~ 100 ng de componentes MutL α o MutS α purificados a 100 μ g de extracto nuclear, ajustando la concentración final de KCl a 100 mM (4, 10, 30). Los sustratos utilizados en estos experimentos contienen una rotura de cadena de 181 nucleótidos 5' o 125 nucleótidos 3' con respecto al error de apareamiento. Los valores representan experimentos realizados, como mínimo, por duplicado.

Ejemplo 3: Utilización de células defectuosas en MMR y mutágenos químicos para mejorar las mutaciones en loci genéticos.

Para aumentar la tasa de mutaciones genéticas y producir células con genes alterados, expresión de ARN o polipéptidos, la utilización de la deficiencia de MMR y mutágenos químicos es una herramienta poderosa para generar dicha diversidad. Las ventajas de utilizar células con MMR defectuosas son que la disminución de esta actividad hace que las células sean más resistentes a los efectos tóxicos de tales compuestos, pero permite el aumento de las alteraciones genéticas y fenotípicas de un organismo o célula huésped. Los siguientes experimentos se realizan para demostrar la utilidad de la presente invención. Las células que son genéticamente defectuosas para MMR, tales como pero sin limitación a las mismas, HCT116, DLD-1, etc. o células tales como las descritas en los ejemplos 1 y 2 que se convierten en defectuosas en MMR por la expresión ectópica de un alelo negativo dominante están cubiertas por la presente invención. Brevemente, las células competentes y deficientes en MMR se incuban con un rango (1nM a 1mM) de mutágenos químicos durante 1 hora a 24 horas a 37°C al 5% de CO₂ en medio de crecimiento. Después de que se completa la incubación, los mutágenos químicos se lavan del medio y las células se cultivan en presencia de hipoxantina, aminopterina y timina para marcar las células mutantes HPRT tal como se describió previamente (Walker, VE y otros Mutat Res. 17:371-388, 1999.) y conocido por los expertos en la materia. Las células se colocan en placas a 1X10⁵ ml de células en placas de cultivo de tejidos de 10 cm y se cultivaron durante 14 días a 37°C al 5% de CO₂ en medio de crecimiento. Después de 14 días, los números de colonias resistentes a HAT se determinan contando al microscopio. Un experimento típico demostrará que se forma un

número significativamente mayor de colonias resistentes a HAT (debido a gen HPRT alterado) en células defectuosas en MMR tratadas químicamente que en células control, demostrando la capacidad de aumentar las mutaciones dentro de un gen endógeno de la célula/organismo huésped. La utilización de células defectuosas en MMR más exposición a radiación química o ionizante también se puede utilizar para mejorar la mutación genética *en vivo* dentro de genes diana introducidos por transfección y selección de líneas celulares estables o transitorias. Con el fin de demostrar la capacidad de la deficiencia de MMR más mutágenos químicos para mejorar la mutación genética dentro de un gen diana transducido, los presentes inventores emplearon la utilización de las células descritas anteriormente, por lo que el vector pCAROF (véase el ejemplo 1) se transfectó en células HCT116. Las células se seleccionaron para los clones positivos de pCAR-OF mediante resistencia a higromicina. Se hicieron crecer células resistentes a higromicina hasta la confluencia y se expusieron 100.000 células a compuesto alquilante de etil-metanosulfonato (EMS) 10 μ M durante 8 horas y se devolvieron al medio de crecimiento. Después se cultivaron las células durante la noche y luego se sembraron a una densidad de 1.000 células de placa en placas de 10 cm por triplicado. Las células se cultivaron durante 10 días y se calificaron para la actividad de β -gal utilizando los procedimientos descritos en el ejemplo 1. Los resultados mostraron que las células cultivadas en ausencia del compuesto tenían un número de focos positivos para β -gal de 92 $\pm$ 10 por placa. Por el contrario, las células expuestas a EMS dieron como resultado un aumento significativo en el número de células positivas para β -gal (205 $\pm$ 18). Estos datos demuestran la utilización de células defectuosas en MMR más mutágenos químicos para generar mutaciones genéticas en genes diana *en vivo*. Este procedimiento es útil para generar diversidad genética en genes diana con fines comerciales.

EJEMPLO 4: Estabilidad restaurada del ADN de una célula deficiente con reparación defectuosa de errores de apareamiento que expresan un alelo génico de MMR negativo dominante mediante vector inducible.

La capacidad de inducir hipermutabilidad del ADN mediante la expresión ectópica de un alelo del gen de MMR negativo dominante tiene muchas aplicaciones comerciales importantes para generar células eucariotas con subtipos genéticamente diversos. Los siguientes experimentos demuestran la capacidad de marcar permanentemente un cambio genético en el genoma de una célula defectuosa de MMR tal como se describe en los ejemplos 1 y 2 mediante la restauración de su competencia MMR. Primero, el alelo negativo dominante de PMS2-134 se clonó en los sistemas vectoriales inducibles eucariotas pcDNA4/TO (vector inducible por tetraciclina) (Invitrogen), denominado pcDNA4/TO/PMS134S, el vector inducible por glucocorticoides pIND/V5-His (Invitrogen), denominado pIND/PMS134S. Las células Tk-ts13 o HEK293 se cotransfectaron con cada vector más el pCAR-OF (contiene un gen de resistencia a la higromicina como marcador seleccionable) tal como se describe a continuación. Se utilizó un vector vacío como control para cada combinación. Las células transfectadas se seleccionaron durante 10-14 días para células resistentes a zeocina/higromicina (Z/H) o neomicina/higromicina (N/H). Los clones se recogieron y expandieron como clones o grupos individuales. Las células se expandieron y se colocaron en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos a 1×10^5 células/ml en medio de crecimiento (DMEM más el 10% de suero bovino fetal) con o sin productos químicos inductores (1 μ g/ml de tetraciclina para pcDNA4/TO/PMS134S y 1 μ M de ecdisona para pIND/PMS134S). Los cultivos celulares se recogieron y se analizaron para la expresión de la proteína inducida por PMS2-134 a través de Western (tal como se describe en el ejemplo 5) después de 24 horas de cultivo a 37°C en el 5% de CO₂. El análisis Western de extractos de células pIND/PMS134S reveló la producción de una proteína de ~17 kd cuando se cultivó en presencia de ecdisona, mientras que los cultivados sin ecdisona no tenían niveles detectables. Los clones que tienen expresión de PMS2-134 inducible se expandieron y crecieron en presencia de ecdisona o tetraciclina durante 24 horas. Las células se recogieron durante 72 horas para identificar la cinética de pérdida de la expresión de PMS2-134 mediante transferencia Western en ausencia de inductor. Estos datos demostraron niveles indetectables de proteína durante 72 horas.

Para demostrar la capacidad de inducir inestabilidad genética utilizando un sistema de vector inducible, las células que contenían pIND/PMS134S o pIND/V5-His se cultivaron durante 14 días con o sin ecdisona y se tiñeron para medir la actividad de β -gal *in situ* tal como se describe (documento MCB). Tal como se muestra en la figura 5, un número significativo de focos celulares se tiñeron de azul positivo en células pIND/PMS134S cultivadas en presencia de ecdisona (25 células/campo tal como se observó en la evaluación microscópica invertida) en contraste con controles de vector vacío que no tenían focos azules observables. Por el contrario, ni las células pIND/PMS134S ni las células pIND/V5-His crecieron en ausencia del inductor teñido positivo. Estos datos demuestran la capacidad de utilizar genes de MMR negativos dominantes bajo el control de vectores inducibles para generar inestabilidad genómica y diversidad genética en genes para producir funciones bioquímicas alteradas y/o nuevos fenotipos.

Para demostrar que la supresión de la expresión de PMS2-134 puede restablecer el dominio de MMR en estas células, se realizó el siguiente experimento. Las células se mantuvieron en medio inductor más Z/H o N/H durante 14 días. Un subconjunto de cada clon o grupo se sembró en placas de halcón de 24 pocillos a 5×10^4 células/ml. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C en el 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se tiñeron *en vivo* para la expresión de β -galactosidasa tal como se describió previamente (Nicolaidis y otros Mol. Cell Biol. 18:1635-1641, 1998). Las células que se vuelven azules lo han hecho debido a una disminución en su actividad MMR endógena debido a los efectos negativos dominantes de PMS2-134 en la maquinaria de MMR. Estas células se subclonaron por dilución limitante en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de molécula inductora. La estabilidad genética restaurada se demostró en los clones que expresaban PMS2-134 cuando se encontró un menor número de revertientes (células no azules) en los clones donde se eliminó el agente inductor (42 de 45 pocillos en contraste con

las placas donde los clones estaban en constante exposición al inductor (18 de 45 pocillos)). Estos datos demuestran la capacidad de regular la estabilidad genómica y la evolución genética utilizando la expresión del gen de MMR regulado.

La utilización de mutágenos químicos tal como se describe en el ejemplo 3 en combinación con la estrategia del gen de MMR inducible descrito anteriormente también se enseña en la solicitud como un procedimiento para generar organismos huésped genéticamente diversos con nuevos fenotipos y/o producción estable de expresión génica alterada. Para demostrar este efecto, las células que contienen expresión negativa dominante inducible se exponen a moléculas inductoras y posteriormente se exponen a mutágenos químicos o radiación ionizante. A continuación, las células se expanden en presencia de una molécula inductora y los cultivos se seleccionan para células con nuevos fenotipos y/o estructura génica alterada según se determina por análisis de secuencia o actividad bioquímica. Las células con gen alterado o fenotipo se eliminan de la molécula inductora y se restablecen la estabilidad genética y el fenotipo.

Transfecciones

Generación de células HEK293 estables que contienen el receptor de ecdisona con el vector inducible pIND/PMS 134S o pcDNA/TO/PMS 134S. Las células HEK293-ecdisonaR se transfectaron con el vector vacío pIND o pcDNA/TO o el vector pIND/PMS 134S o pcDNA/TO/PMS 134S utilizando Lipofectamine 2000 (Gibco/BRL). Las células se seleccionaron para la resistencia seleccionable del marcador y los clones y grupos se expandieron. A continuación, las líneas estables se expusieron a ecdisona 1 μ M durante 48 horas y los extractos se aislaron y analizaron mediante transferencia Western para identificar clones con expresión de PMS134 inducida utilizando antisuero dirigido al extremo N del polipéptido PMS134 tal como se describe a continuación.

Plásmidos

El PMS2-134 se clonó como un fragmento BamHI del vector pSG5PMS134 (descrito en el ejemplo 1) en los siguientes vectores de expresión inducibles. El vector inducible por tetraciclina (pcDNA4/TO/PMS134S) contiene el marcador seleccionable de zeocina bajo el control del promotor EM-7 y las secuencias poliA de SV40. La estructura del plásmido se confirmó por análisis de restricción de endonucleasa y secuenciación. El vector inducible por glucocorticoides (pIND/PMS134S) contiene el marcador seleccionable de neomicina bajo el control del promotor temprano de SV40 y las secuencias poliA. Una figura esquemática del vector se presenta en la figura 4.

Transfecciones

Los vectores de expresión inducibles se cotransfectaron en células Tk-ts13 y células HEK293 siguiendo los procedimientos descritos anteriormente solos o en combinación con el vector pCAR-OF tal como se describe en el ejemplo 1. Las células se seleccionaron para zeocina/higromicina (pcDNA4/TO/PMS134S) o clones resistentes a neomicina/higromicina (pIND/PMS134S) tal como se describe (ref. 15, Grasso y otros J. Biol. Chem. 273:24016-24024, 1998). Los clones resistentes se recogen y/o se agrupan y se expanden para el análisis de proteínas.

Ejemplo 5: Restauración de MMR y restauración de una estabilidad genética mediante la expresión de un gen complementario de MMR, el gen y el establecimiento de una estructura genómica fija.

La utilización de células con reparación de MMR defectuosa debido a defectos de genes endógenos tales como, pero sin limitación, las líneas celulares HCT116, DLD-1 y HEC-1-A (ref. 12, 25 y Kondo, y otros J Biochem 125:818-825, 1999) puede ser útil para alterar la estructura genética de genes para producir moléculas variantes comercialmente viables, tales como nuevos agentes antimicrobianos, factores de crecimiento bioactivo u hormonas, estructuras de anticuerpos alteradas, etc. La utilidad y el valor de dicha célula es que una vez alterada se ha producido la estructura del gen, la integridad de esta alteración génica se puede conservar en el genoma de la célula haciendo que la célula sea genéticamente estable mediante la introducción de un gen funcional complementario de MMR. Este ejemplo demuestra que la introducción de un gen de purina nucleótido fosforilasa (PNP) bacteriano alterado genéticamente, donde se inserta un tramo poli-A fuera del marco en el extremo N-terminal del gen (denominado poliPNP), puede ser genéticamente alterado en una célula deficiente en MMR y también genéticamente estable cuando una célula con MMR defectuosa se convierte en MMR competente por la expresión directa de un gen de MMR complementario. El gen poliPNP codifica para un gen PNP no funcional. Cuando el tramo poli-A se altera aleatoriamente mediante alteraciones genéticas debidas a la MMR defectuosa, el tramo se altera aleatoriamente, lo que permite la producción de un gen y polipéptido PNP funcional. El PNP convierte el profármaco no tóxico 9-(β -D-2-desoxi-eritro-pento-furanosil)-6-metil-purina (denominado MPD) en el sustrato del análogo de 6-metilpurina tóxico (denominado MP) (Sorscher, EJ, y otros Gene Therapy 1:233-238, 1994). El gen de poliPNP se modificó por ingeniería genética para que contuviera una etiqueta de epítipo de hemaglutinina en el extremo C para facilitar la detección del polipéptido codificado mediante análisis de transferencia Western utilizando un anticuerpo anti-HA. El gen de poliPNP se clonó en el vector de expresión pCEP4, que tiene un gen de resistencia a la higromicina (Hyg) para la selección. El diagrama esquemático que muestra este gen se da en la figura 7. También se hizo un gen homólogo llamado PNP en el que un tramo poliA en el marco se clona en el extremo N del gen como un control positivo para la actividad de PNP. Brevemente, la línea celular HCT116 defectuosa en MMR y la línea celular

HEK293 competente en MMR se transfectaron con el poliPNP, el vector de expresión PNP, o un vector pCEP4 vacío. A continuación, se seleccionaron las células para la resistencia a Hyg y se aislaron los clones. Las células expandidas se cultivaron en presencia de cantidades crecientes de MPD (0, 1, 10, 50, 100, 300 μ M) durante 10 días. A continuación del período de tratamiento, las células se contaron mediante hemocitómetro y exclusión con azul tripán. Tal como se muestra en la figura 8A, se observó una disminución del 20% y del 30% en el número de células cuando se cultivaron células HCT116/poliPNP en presencia de 100 μ M o 300 μ M de MPD, respectivamente. Por el contrario, no se observó una disminución en el crecimiento celular con las células competentes de MMR HEK293/poliPNP incluso a la concentración más alta (300 μ M) de MPD utilizada. Para ambas líneas celulares, la expresión de PNP dio como resultado una supresión del crecimiento del 100% cuando las células crecieron en presencia de 50-300 μ M de MPD, lo que demuestra los efectos tóxicos del MP convertido en ambas líneas celulares. La transferencia de tipo Western confirmó que un polipéptido que contenía el epítipo de HA se producía realmente en las células HCT116/poliPNP, demostrando así que la estructura del gen de poliPNP estaba alterada para producir una enzima PNP funcional y de longitud completa (figura 8B).

La restauración de la estabilidad genética y la subsiguiente impresión de un locus o loci genéticos alterados es una invención importante de la presente solicitud para producir productos biológicos viables, mediante la cual biomoléculas alteradas, células u organismos completos con características de producción alteradas deseadas se vuelven genéticamente estables para la utilización a largo plazo. Para generar líneas celulares defectuosas en MMR estables que han sido o no han sido expuestas a mutágenos químicos y seleccionadas para cambios genéticos deseados, la introducción de un gen complementario de MMR que puede sustituir al locus del gen de MMR endógeno mutado se enseña en la presente solicitud. Esto se demuestra mediante el ejemplo que utiliza células HCT116, que son genéticamente deficientes para el homólogo MutL humano MLH1 (12, 24, 25). En este ejemplo, se utiliza un vector de expresión de mamífero que codifica el polipéptido MLH1 funcional (pC9MLH1) o un vector de expresión que codifica para un ADNc de MLH1 con un codón de parada prematuro (pC9MLHstop). Estos vectores de expresión contienen un gen de resistencia a neomicina (neo) que permite la selección de células que contienen este vector. Para demostrar la capacidad de complementar la actividad de MMR en una célula que de otro modo sería defectuosa en MMR y para imprimir permanentemente la estructura o estructuras alteradas de un locus génico, las construcciones poliPNP y pC9MLH se cotransfectaron en células HCT116. Las células se seleccionaron durante 10 días en neo e Hyg y los clones resistentes se aislaron y expandieron. A continuación, se cultivaron las células en presencia de MPD y se contaron para el crecimiento después de 10 días. Tal como se demuestra en la figura 9, las células transfectadas con el ADNc de tipo salvaje de MLH1 expresaron MLH1 según lo determinado por Western, en contraste con las células transfectadas con MLHstop. Además, cuando las células se cultivaron en presencia de 300 μ M de MPD, las células que expresan MLH1 mostraron una disminución del 2% en el crecimiento celular total en comparación con las células cultivadas en medio solo, mientras que las células transfectadas con el MLHstop o vector vacío y poliPNP tenían una reducción del 35% en el crecimiento celular en comparación con las células cultivadas en medio solo. Estos datos demuestran que complementando el defecto de MMR con un gen o ADNc de MMR de tipo salvaje expresado ectópicamente puede establecer la estabilidad genómica de una línea celular defectuosa en MMR y establecer líneas estables a largo plazo que se han seleccionado para producir nuevos rasgos de salida y/o genómica modificada o estructuras polipeptídicas, tales como PNP biológicamente activo o inactivo.

Plásmidos.

El ADNc de *hMLH1* de tipo salvaje de longitud completa se obtuvo de una biblioteca de ADNc de Hela humana tal como se describe (18). Un ADNc de MLH1 que contiene un codón de terminación se obtuvo a través de RTPCR del paciente en el que se descubrió la mutación (24). Los fragmentos de ADNc se clonaron en el sitio XhoI del vector pCEP9 (Invitrogen), que contiene el promotor de CMV seguido de una señal de poliadenilación de SV40 (8) y un gen que codifica la resistencia a la neomicina. El vector pC9MLH1 produce la función completa de la proteína MLH1, mientras que la parada de pC9MLH1 produce el polipéptido MLH1 truncado no funcional. Los vectores de poliPNP y PNP se describen en la figura 4. El poliPNP contiene un tramo de poliA de 21 bases fuera del marco insertado después del codón 2 del gen de PNP bacteriano que da como resultado un polipéptido truncado (Sorscher, EJ, y otros Gene Therapy 1:233-238, 1994) El poliPNP contiene un tramo poliA de 20 bases en marco insertado después del codón 2 del gen PNP bacteriano que da como resultado una proteína PNP funcionalmente activa de longitud completa. Tanto el gen de poliPNP como el de PNP tienen un epítipo de hemaglutinina (HA) fusionado en el marco en el extremo C seguido de un codón de terminación. El gen poliPNP y PNP se construyó mediante reacción en cadena de la polimerasa utilizando un cebador sentido: 5'-ccaagcttagaccaccatggc[aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaatcgc](#)taccacacacattaatgc-3', en el que el tramo poliA está subrayado, mientras que el cebador para PNP contiene 1 A menos en el tramo poliA. El cebador antisentido para ambas construcciones es 5'-ataagaatgcggccgctatctcttagctagcgtaatctggaacatcgtaagcgtaatct ggaacatcgctactctttatcgccagcag-3'. Se utilizó ADN bacteriano DH5 α como molde para la amplificación. El gen PNP modificado se produjo por amplificación utilizando 95°C durante 30 segundos, 54°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto durante 25 ciclos en tampones, tal como se describió previamente (19). Los insertos genómicos amplificados se clonaron en vectores de cola T (clonación TA, Invitrogen) y los clones recombinantes se secuenciaron para identificar vectores con secuencias de nucleótidos correctas. Los fragmentos de PNP se subclonaron luego en los sitios KpnI-XhoI del vector pCEP4 (Invitrogen) utilizando sitios del sitio de clonación múltiple ("polylinker") del vector de clonación TA. Los vectores de expresión de PNP recombinante se secuenciaron para asegurar la autenticidad de la secuencia utilizando secuencias de cebador

internas.

Líneas celulares y transfección.

Las células humanas HCT116 y HEK293 se obtuvieron de ATCC y se cultivaron según lo sugerido por el proveedor en RPMI más el 10% de suero bovino fetal. Las células se transfectaron con vectores de expresión de PNP y/o MLH1 utilizando liposomas siguiendo el protocolo del fabricante (Gibco/BRL). Se generaron líneas celulares transfectadas de manera estable que expresan vector vacío, PNP o poliPNP mediante transfección seguida de selección con higromicina. Para los experimentos de complementación, las células HCT116 se transfectaron con PNP/MLH1, PNP/MLH1 stop, poliPNP/MLH1 o poliPNP/MLH1stop en una relación 1:1 utilizando 5 µg de cada plásmido y las células se seleccionaron para resistencia a higromicina y neomicina. Después de 10 días, se observaron colonias resistentes a los medicamentos y se seleccionaron para su análisis.

Ensayo de destrucción de MPD

Para el ensayo de destrucción de MPD, las células se sembraron a 2×10^4 de células/ml y se sembraron alícuotas de 1 ml en placas de cultivo tisular costar de 24 pocillos. Para ensayos de destrucción, las células se sembraron en 0, 1, 10, 50, 100 y 300 µM de MPD por triplicado. Las células se cultivaron durante 10 días, se digirieron con tripsina y se contaron en un hemocitómetro utilizando exclusión con azul tripán. Los datos se presentan como una media $\pm$ SD para cada estudio.

Transferencia de tipo Western

Después de contar números de células iguales de cada 0 µM de células tratadas con MPD se lisó directamente en tampón de muestra (Tris 60 mM, pH 6,8, SDS al 2%, glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol 0,1 M, azul de bromofenol al 0,001%) y se hirvió durante 5 minutos. Los lisados de proteínas se separaron por electroforesis en geles de tris-glicina al 18% (Novex). Los geles se electrotransfirieron a Immobilon-P (Millipore) en Tris 48 mM, glicina 40 mM, SDS al 0,0375%, metanol al 20% y se bloquearon a temperatura ambiente durante 1 hora en solución salina tamponada con Tris más Tween-20 al 0,05% y leche condensada al 5%. Los filtros se sondearon con anticuerpos monoclonales (αMLH14) generados contra MLH1 o hemaglutinina humana (HA) (Boehringer Mannheim) y un anticuerpo secundario de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante, utilizando quimioluminiscencia para detección (Pierce). Se utilizó IgG de ratón como control para todos los experimentos para evaluar las interacciones de anticuerpos no específicos del anticuerpo primario y asegurar que el antisuero utilizado detectara las proteínas esperadas.

Referencias

1. Baker S.M., Bronner, C.E., Zhang, L., Plug, A.W., Robatez, M., Warren, G., Elliott, E.A., Yu, J., Ashley, T., Arnheim, N., Bradley, N., Flavell, R.A. y Liskay, R.M. 1995. Male defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 82:309-319.
2. Bronner, C.E., Baker, S.M., Morrison, P.T., Warren, G., Smith, L.G., Lescoe, M.K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., Tannergard, P., Bollag, R.J., Godwin, A., R., Ward, D.C., Nordenskjold, M., Fishel, R., Kolodner, R., y Liskay, R.M. 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 368:258-261.
3. de Wind N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., y Riele, H.T. 1995. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* 82:321-33.
4. Drummond, J.T., Li, G.M., Longley, M.J., y Modrich, P. 1995. Isolation of an hMSH2p160 heterodimer that restores mismatch repair to tumor cells. *Science* 268:1909-1912.
5. Drummond, J.T., Anthoney, A., Brown, R., y Modrich, P. 1996. Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutLD and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J.Biol.Chem.* 271:9645-9648.
6. Edelmann, W., Cohen, P.E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., Umar, A., Kunkel, T., Cattoretti, G., Chagnatti, R., Pollard, J.W., Kolodner, R.D., y Kucherlapati, R. 1996. Meiotic pachytene arrest in MLH1deficient mice. *Cell* 85:1125-1134.
7. Fishel, R., Lescoe, M., Rao, M.R.S., Copeland, N. J., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M., y Kolodner, R. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 7:1027-1038.
8. Green, S., Issemann, I., y Sheer, E. 1988. A versatile in vivo eucaryotic expression vector for protein engineering. *Nuc. Acid Res.* 16:369.

9. Hamilton, S.R., Liu, B., Parsons, R., E., Papadopoulos, N., Jen, J., Powell" S.M., Krush, A.J., Berk, T., Cohen, Z., tetu, B., Kinzler, K.W. y Vogelstein, B. 1995. The molecular basis of Turcot's syndrome. N. Eng. J. Med. 332:839-847.
- 5 10. Holmes, J., Clark, S., y Modrich, P. Strand specific mismatch correction in nuclear extracts of human and Drosophila melanogaster cell lines. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5837- 5841.
- 10 11. Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., NystromLahti, M., Guan, X.Y., Zhang, J., Meltzer, P.S., Yu, J.W., Kao, F.T., Chen, D.J., Cerosaletti, K.M., Fournier, R.E.K., Todd, S., Lewis, T., Leach R.J., Naylor, S.L., Weissenbach, J ., Mecklin, J.P., Jarvinen, J.A., Petersen, G.M., Hamilton, S.R., Green, J., Jass, J., Watson, P., Lynch, H.T., Trent, J.M., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., y Vogelstein, B. 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell 75:1215-1225.
- 15 12. Li, G.M., y Modrich, P. 1995. Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human mutL homologs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1950-1954.
- 20 13. Liu, y otros 1996. Nat. Med.. 2:169-174
14. Modrich, P. 1994. Science 266:1959-1960
15. Nicolaides, N.C. y otros, 1991. Mol. Cell. Biol. 11:6166-6176
- 25 16. Nicolaides, N.C. y otros, 1992. J. Biol. Chem. 267:19665-19672
17. Nicolaides N. C., y otros, 1994. Nature 371:75-80
- 30 18. Nicolaides N. C., y otros, 1995. Genomics 29:329-334
19. Nicolaides N. C., y otros, 1995. Genomics 30:195-206.
20. Nicolaides N. C., y otros, 1995. Genomics 31:395-397.
- 35 21. Palombo y otros, 1994. Nature 36:417.
22. Palombo y otros, 1995. Science 268:1912-1914.
- 40 23. Pang y otros, 1997. Mol. Cell. Biol. 17:4465-4473.
24. Papadopoulos, N. y otros, 1994. Science 263:1625-1629.
25. Parsons, R. y otros 1993. Cell 75:1227-1236.
- 45 26. Parsons, R. y otros 1995. Science 268:738-740.
27. Perucho, M. 1996. Biol. Chem. 377:675-684.
28. Prolla, T.A. y otros 1994. Science 264:1091-1093.
- 50 29. Strand, M. y otros, 1993. Nature 365:274-276.
30. Su y otros 1988. J. Biol. Chem. 263: 6829-6835.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para generar una célula genéticamente estable *in vitro* que comprende una mutación en un gen de interés, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

cultivar una célula de mamífero hipermutable que comprende el gen de interés y un polinucleótido que codifica una proteína hPMS2 de reparación de errores de apareamiento del péptido truncado que consiste en los 133 aminoácidos N-terminales de HPMS2 (hPMS2-134);

probar la célula para determinar si el gen de interés alberga una mutación y detectar la mutación; y restaurar la actividad de reparación de errores de apareamiento a la célula disminuyendo o suprimiendo la expresión del polinucleótido que codifica hPMS2-134, generando de ese modo una célula genéticamente estable que comprende una mutación en un gen de interés.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa de prueba comprende analizar una secuencia de nucleótidos del gen de interés, analizar el ARNm transcrito del gen de interés, analizar una proteína codificada por el gen de interés o analizar el fenotipo de la célula.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la célula de mamífero se prepara mediante el proceso de introducción de un polinucleótido que codifica hPMS2-134 en una célula de mamífero.

4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que se introduce un gen indicador interrumpido con un tramo de polimononucleótido que provoca un desplazamiento del marco de lectura en la célula de mamífero para permitir el control de la hipermutabilidad.

5. Procedimiento para generar una mutación en un gen de interés *in vitro*, que comprende las etapas de:

contactar *in vitro*, como mínimo, una célula de mamífero con un mutágeno, en el que dicha, como mínimo, una célula de mamífero comprende (a) un gen de interés y (b) un polinucleótido que codifica una proteína de reparación de errores de apareamiento del péptido truncado hPMS2 que comprende los 133 aminoácidos N-terminales de HPMS2 (hPMS2-134), en el que dicho polinucleótido que codifica hPMS2-134 está bajo el control de un promotor inducible; analizar la, como mínimo, una célula de mamífero para determinar si el gen de interés alberga una mutación y detectar la mutación; y disminuir la expresión del polinucleótido que codifica hPMS2-134 en la célula o las células seleccionadas mediante el cultivo en condiciones no inductoras.

6. Procedimiento, según la reivindicación 5, que comprende además la introducción de un polinucleótido que codifica hPMS2 en la una o más células seleccionadas para complementar hPMS2-134, mediante lo cual se restablece la estabilidad genética.

7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el polinucleótido que codifica hPMS2 es constitutivamente activo en la una o más células seleccionadas.

8. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el polinucleótido que codifica hPMS2 está regulado de manera inducible.

9. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el polinucleótido que codifica hPMS2 se introduce en la una o más células seleccionadas por fusión célula - célula con una célula competente en la reparación de errores de apareamiento.

10. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que el ensayo comprende analizar una secuencia de nucleótidos del gen de interés, analizar el ARNm transcrito del gen de interés, analizar una secuencia de aminoácidos codificada por el gen de interés, o analizar el fenotipo asociado con el gen de interés.

11. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la mutación da como resultado un fenotipo detectable.

FIG. 1

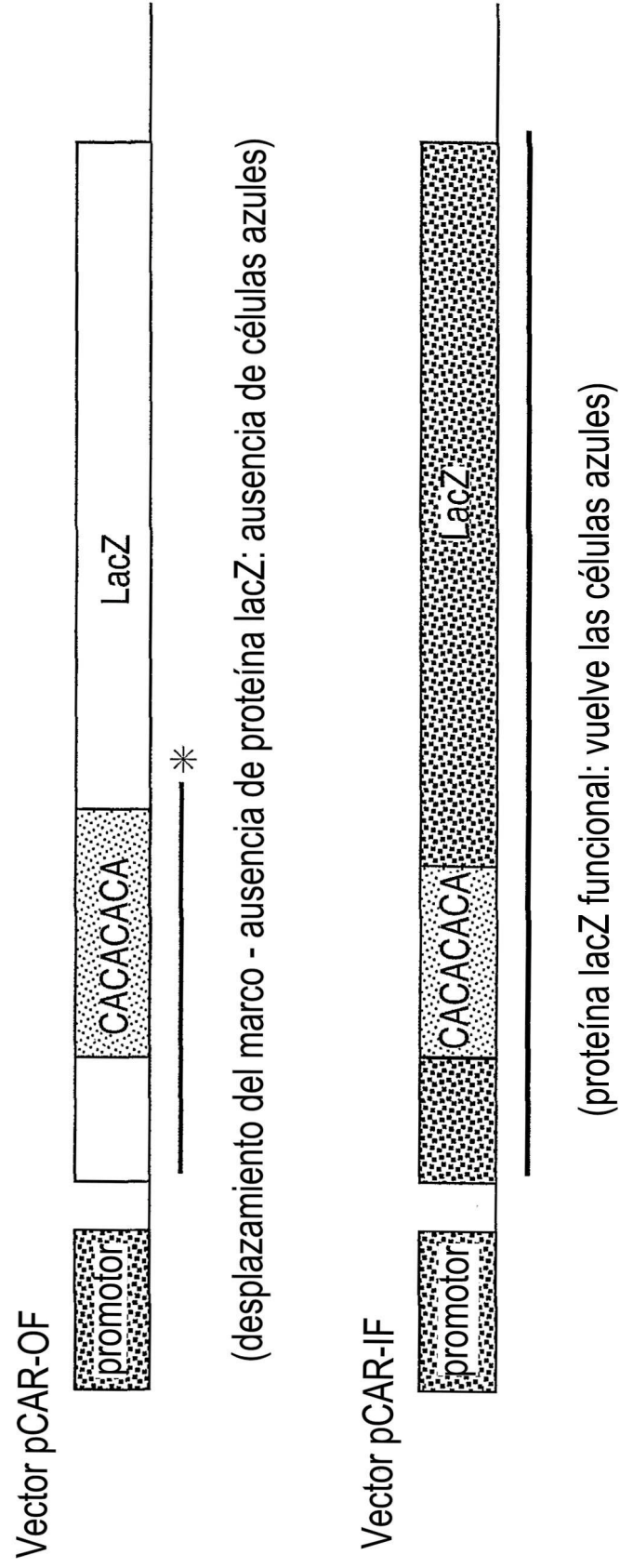


FIG. 2A

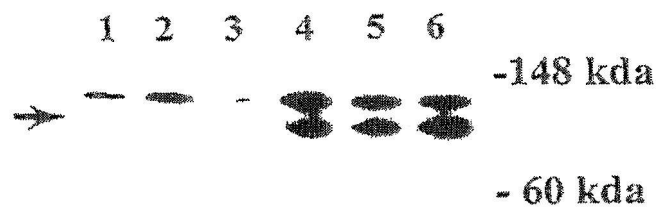


FIG. 2B

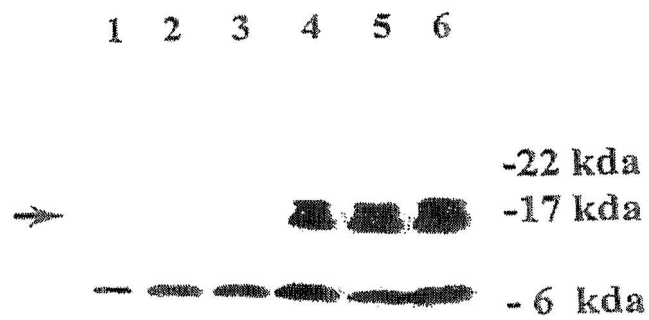


FIG. 2C

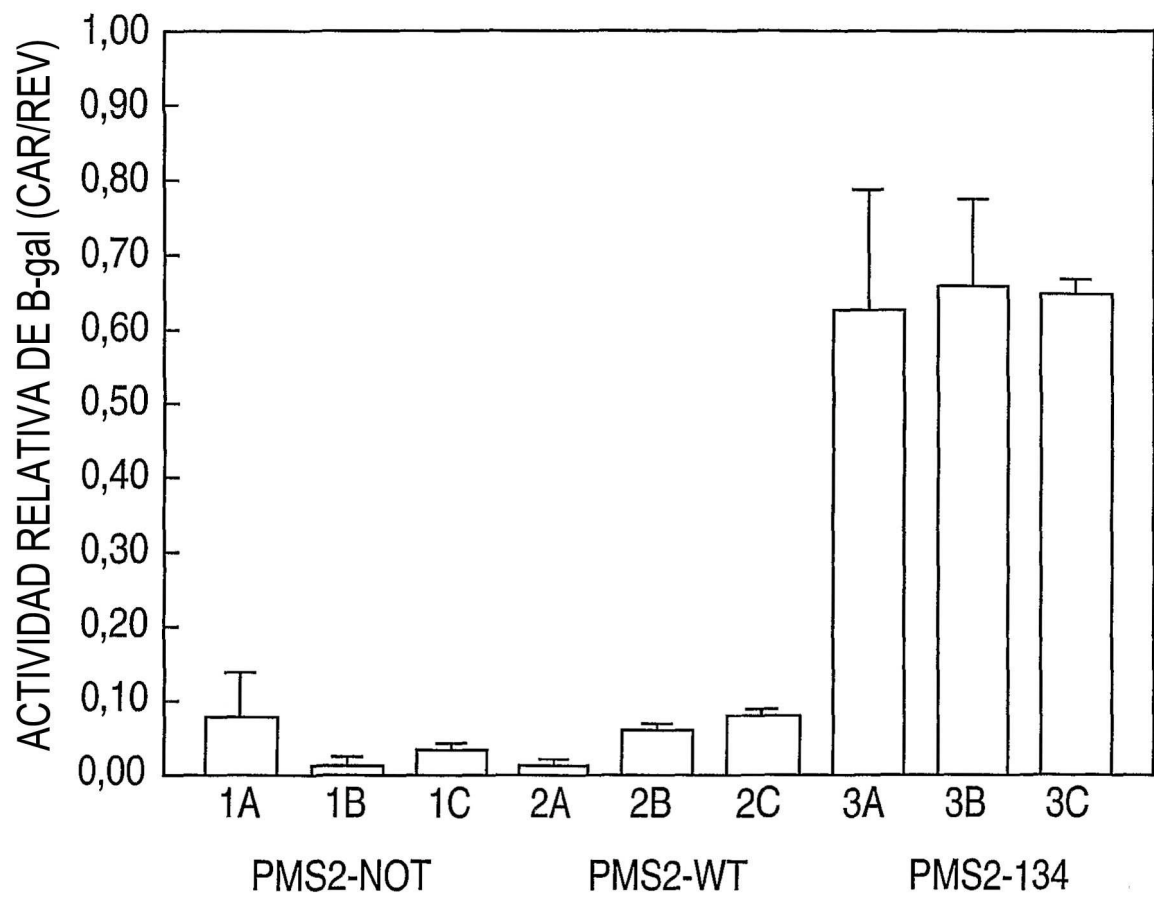


FIG. 3B

PMS2-134

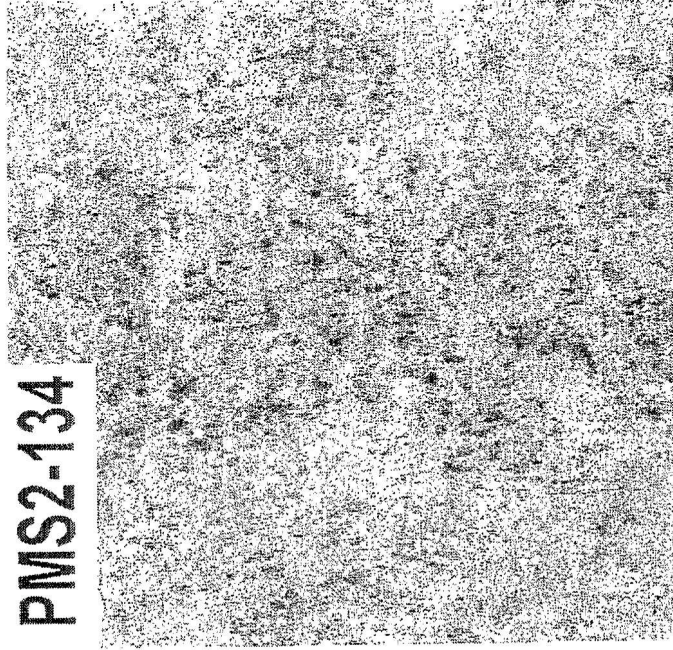


FIG. 3A

PMS2-WT

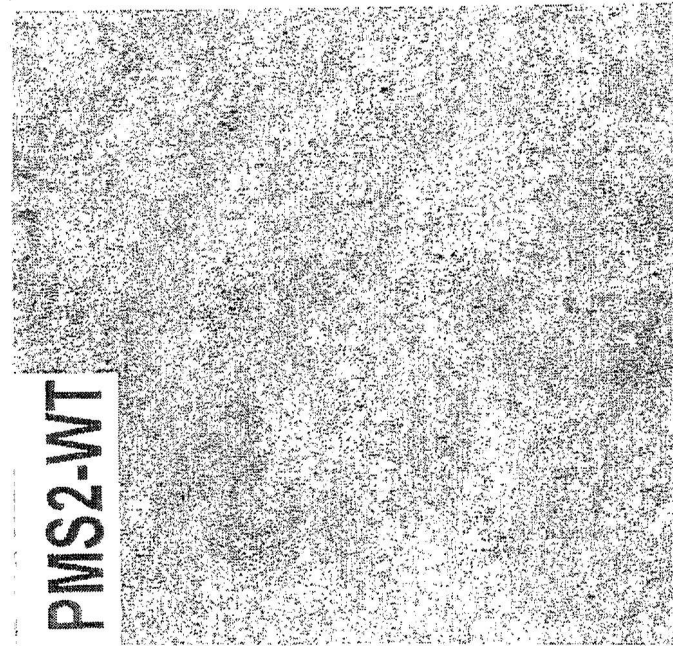
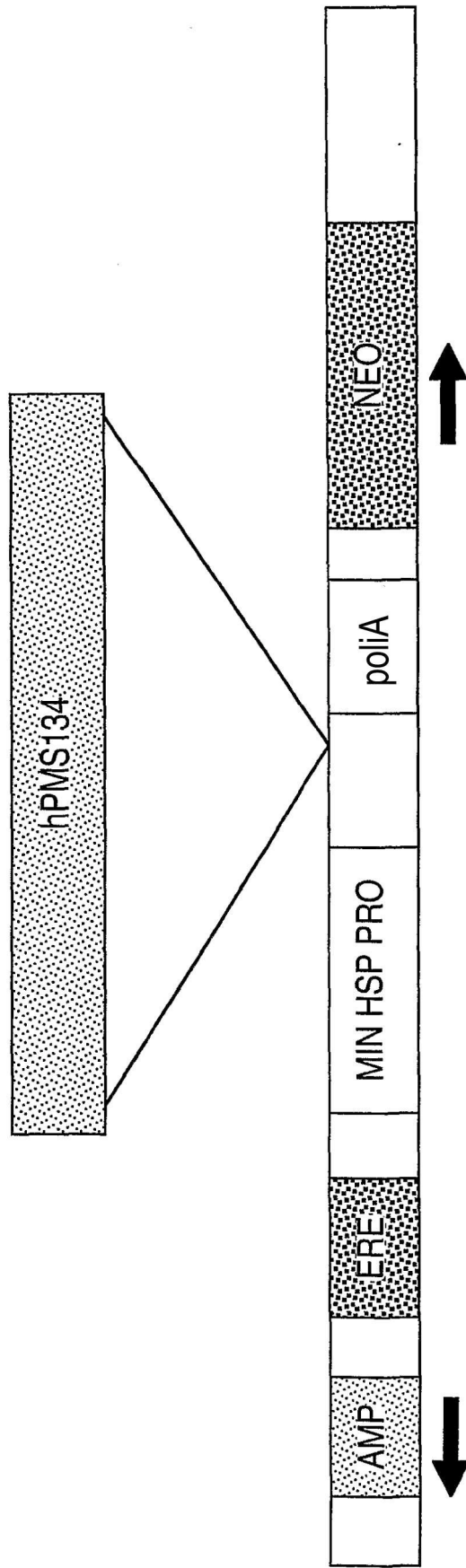


FIG. 4

AMP = gen de resistencia a ampicilina

ERE = elementos de respuesta a ecdisona

MIN HSP PRO = promotor mínimo del choque térmico

hPMS134 = alelo de MMR negativo dominante

poliA = señal de poliadenilación de BGH

NEO = gen de neomicina fosfotransferasa

FIG. 5

Alteración de los genes indicadores de β -galactosidasa tras la inducción de la expresión génica de MMR negativo dominante

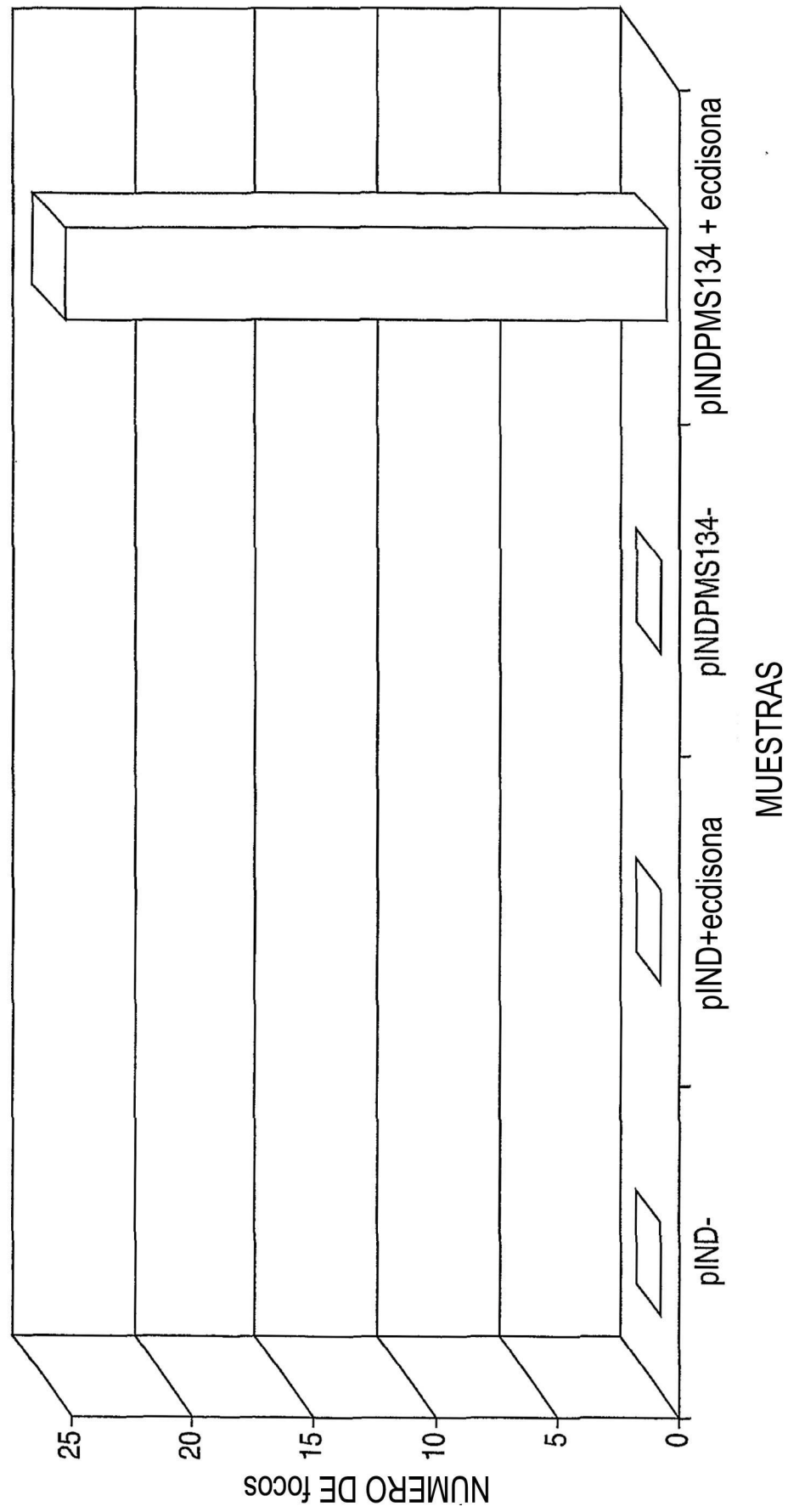


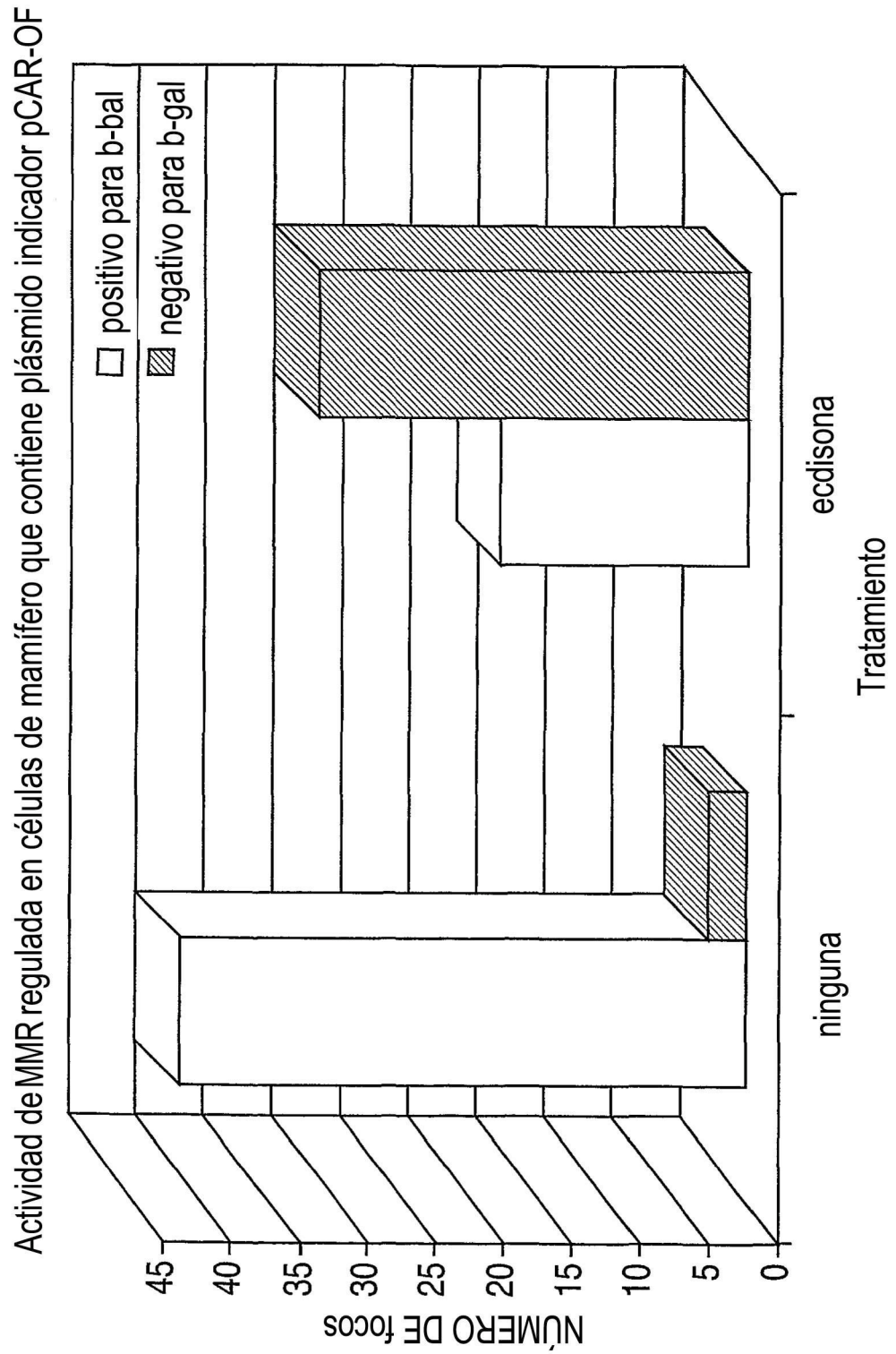
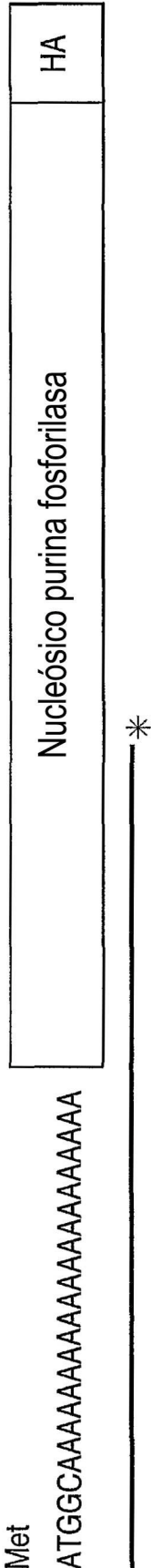
FIG. 6

FIG. 7

poliPNP: el tramo de poliA fuera de marco codifica un polipéptido truncado



PNP: el tramo de poliA dentro del marco codifica un polipéptido de longitud completa

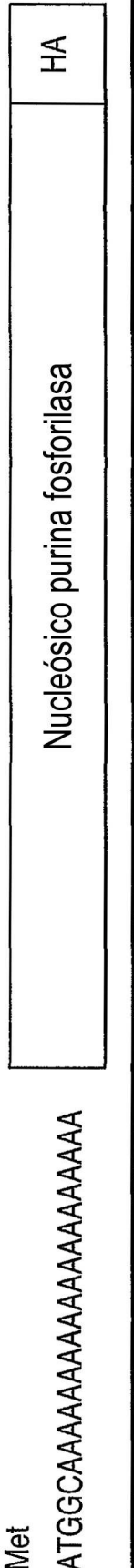


FIG.8A

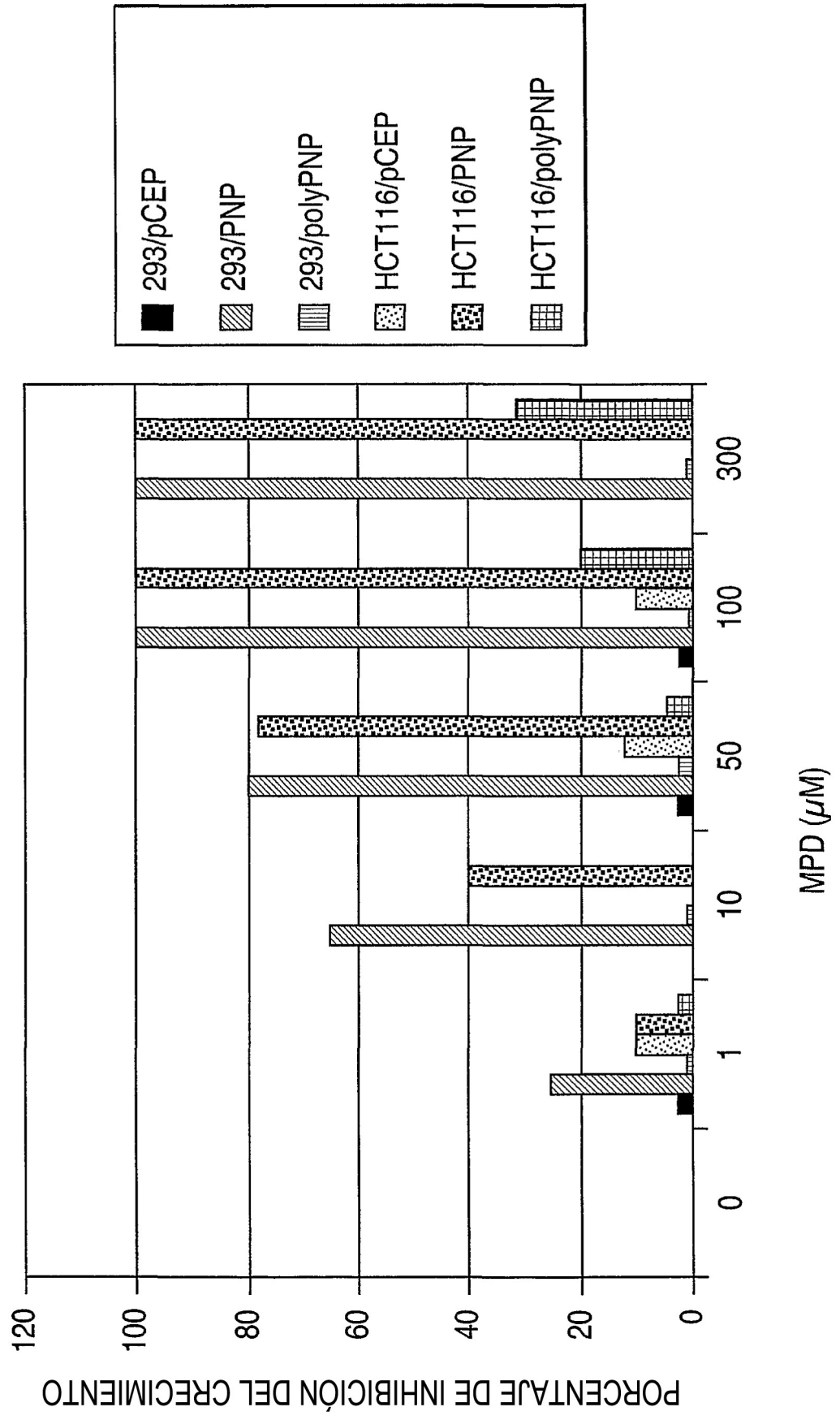


FIG. 8B

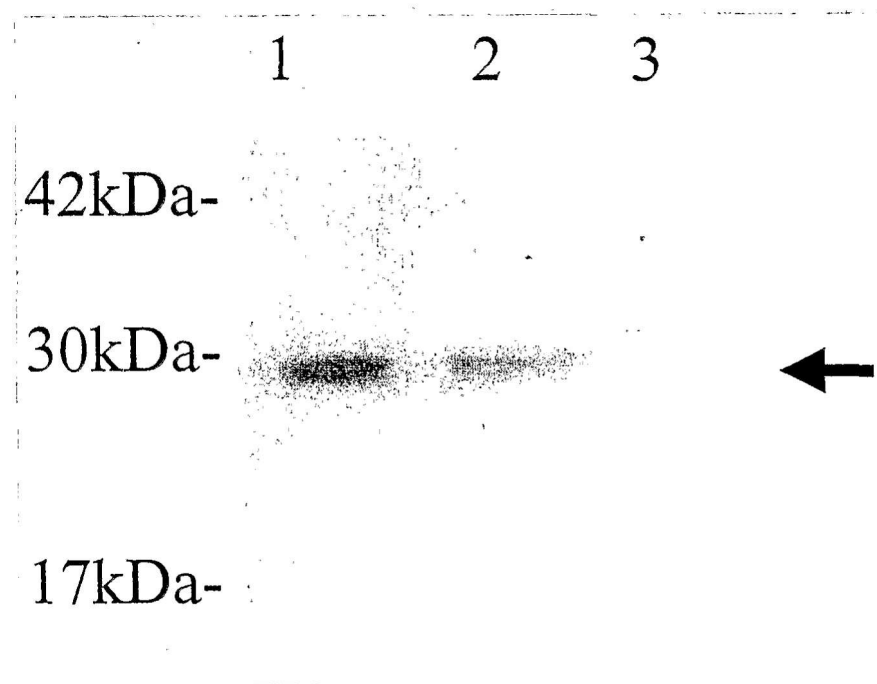


FIG. 9

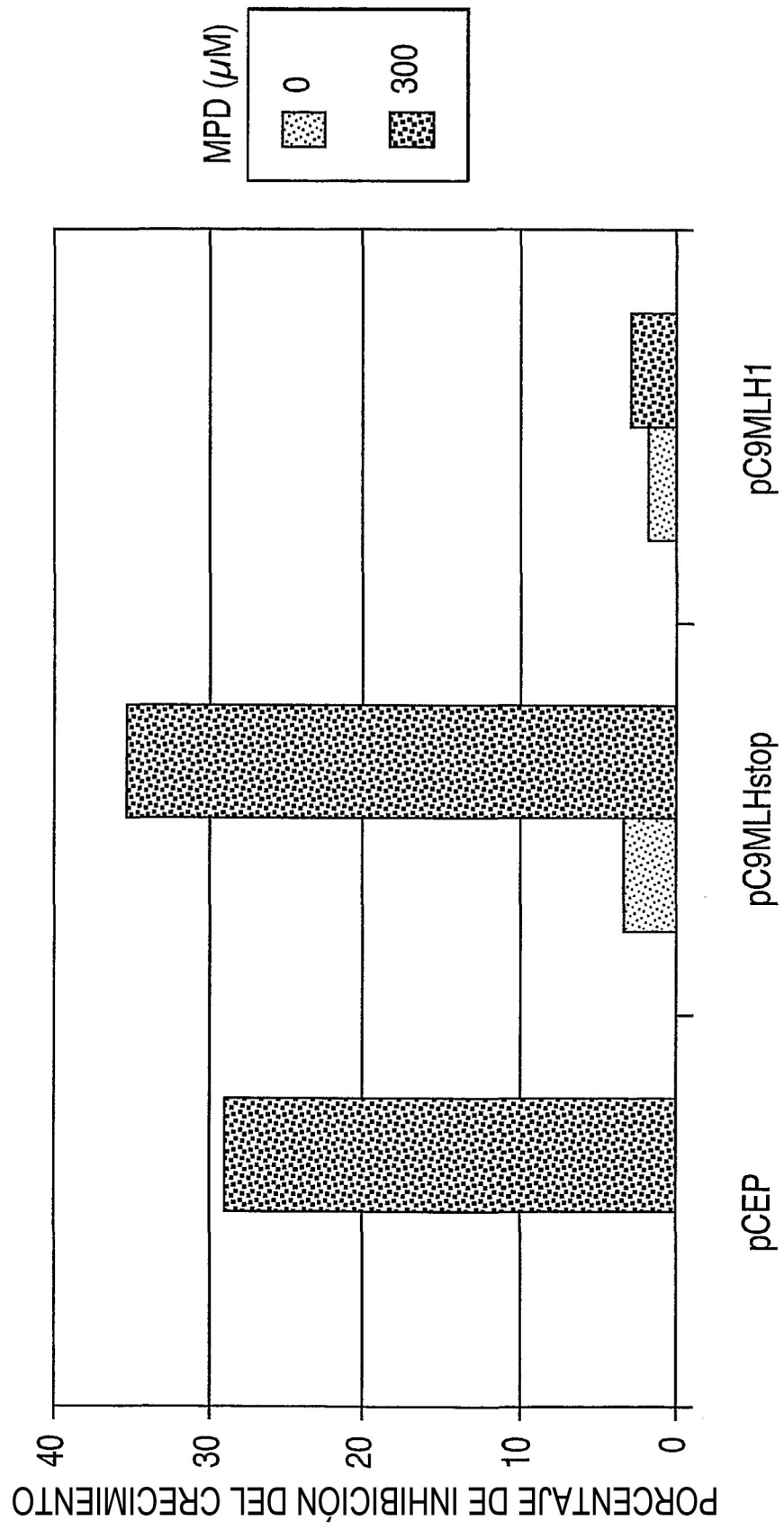


FIG. 10B

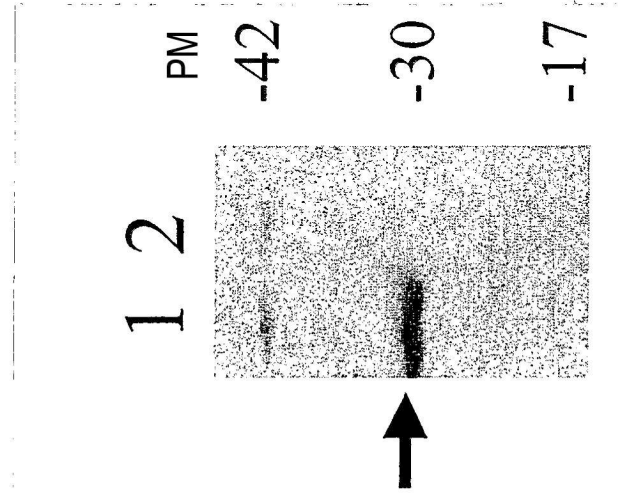


FIG. 10A

