

MECANISMOS MOLECULARES DE DIVERSIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS*

Martha Rendón-Anaya y Alejandro Alagón

RESUMEN

El sistema inmune es capaz de reconocer una enorme cantidad de antígenos de manera específica por medio de receptores codificados por un número muy limitado de exones funcionales de línea germinal. Es por ello que los linfocitos B cuentan con cuatro mecanismos de diversificación somática de anticuerpos, que producen modificaciones a nivel de secuencia en los genes de inmunoglobulinas para optimizar la especificidad de los receptores de antígenos. Dichos mecanismos involucran una serie de elementos génicos y de complejos enzimáticos, que en su mayoría, participan en vías de reparación de lesiones de ADN. Por este motivo, estudiar las bases moleculares de la diversificación de anticuerpos, además de tener un fuerte impacto desde un punto de vista inmunológico, aporta al entendimiento de procesos que garantizan la integridad génica.

PALABRAS CLAVE: Inmunoglobulina, diversificación, recombinación, hipermutación somática, conversión génica.

ABSTRACT

The immune system is capable of specifically recognizing an immense variety of antigens, due to the presence of receptors which are encoded by a very limited number of functional germline exons. Therefore, the B lymphocytes use four mechanisms of somatic antibody diversification that modify the sequence of the immunoglobulin genes, in order to optimize the specificity of the antigen receptors. These mechanisms involve different genomic and enzymatic factors, which broadly belong to DNA repair pathways. Thus, studying the molecular basis of the antibody diversification has been a very important source of immunological knowledge, and has improved our understanding regarding the pathways which maintain genomic integrity.

KEY WORDS: Immunoglobulin, diversification, recombination, somatic hypermutation, gene conversion.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es capaz de reconocer una enorme cantidad de antígenos de manera específica por

medio de receptores codificados por un número muy limitado de exones funcionales de línea germinal. Por este motivo, los linfocitos cuentan con

mecanismos de diversificación de anticuerpos que producen modificaciones a nivel de secuencia en los genes de inmunoglobulinas en res-

Abreviaturas: ADNcs, ADN de cadena sencilla; AID, activation induced deaminase (deaminasa inducida por activación); APE1/2, apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/2 (endonucleasa apurínica/apirimidínica 1/2); APOBEC, apolipoprotein B mRNA editing enzyme (apolipoproteína B, enzima editora de ARNm); APOBEC1, apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide 1 (apolipoproteína B, enzima editora de ARNm, polipéptido catalítico 1); ATM, ataxia-telangiectasia mutated (ataxia-telangiectasia mutada); BER, base excision repair (reparación por escisión de bases); CDRs, complementarity determining regions (regiones determinantes de complementariedad); CG, conversión génica; DNA-PK, DNA-dependent protein kinase (proteína cinasa dependiente de ADN); DNA-PKcs, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente de ADN); HMG1/2, high mobility group protein 1/2 (proteínas del grupo de alta movilidad 1/2); HMS, hipermutación somática; HP1, heterochromatin protein 1 (proteína de heterocromatina 1); Igs, inmunoglobulinas; MLH1, MutL protein homologue 1 (proteína homóloga de MutL 1); MMR, mismatch repair (reparación de apareamientos incorrectos); MRN, complejo Mre11/Rad50/Nbs1; MSH2/6, MutS protein homologue 2/6 (proteínas homólogas de MutS 2/6); NHEJ, non-homologous end joining (unión de extremos no homólogos); PKA, protein kinase A (proteína cinasa A); RAG1/2, recombination activating genes 1/2 (genes activadores de recombinación 1/2); RCC, recombinación para cambio de clase; RH, recombinación homóloga; RPA, replication protein A (proteína de replicación A); RSS, recombination signal sequences (secuencias señalizadoras de recombinación); TDT, terminal deoxynucleotidyl transferase (deoxinucleotidil transferasa terminal); UNG, uracil nucleoside glycosylase (glicosilasa de uracilo-ADN); XRCC4, X-ray cross-complementation protein 4 (proteína de reparación de lesiones de ADN).

*Recibido: 28 de enero de 2008 Aceptado: 10 junio de 2008 (artículo publicado extemporáneamente)
Instituto de Biotecnología, UNAM. Avenida Universidad 2001, CP 62210, Cuernavaca, Morelos, México. Autor responsable Martha Rendón-Anaya Correo E: mrendon@ibt.unam.mx

puesta a la presencia de antígenos en el organismo. Las inmunoglobulinas (Igs) están formadas por dos cadenas pesadas y dos ligeras, codificadas en *loci* diferentes. Las cadenas pesadas cuentan con una región constante, la cual determina la forma en la que el antígeno es removido del organismo, y una región variable que junto con la región variable de las cadenas ligeras, forma un dominio de reconocimiento de antígenos. Durante el desarrollo temprano de las células B, las regiones variables de los receptores se ensamblan por un proceso de recombinación entre segmentos de línea germinal, el cual corresponde a la diversificación primaria de las Igs. Después de la maduración de las células B, las regiones variables son blanco de una serie de mecanismos de diversificación secundaria, que optimizan la especificidad de los receptores. Estos mecanismos son la hipermutación somática (HMS), la cual introduce cambios puntuales en los segmentos variables rearrreglados; la conversión génica (CG), que produce cambios por medio del intercambio no recíproco de secuencias variables; y la recombinación de cambio de clase (RCC) que reemplaza las regiones constantes, promoviendo cambios de isotipos de Igs. A pesar de ser procesos diferentes, la HMS, la CG y la RCC requieren un primer intermediario común, que resulta de una vía compartida por los tres mecanismos. Esta vía inicia con una lesión en los segmentos V(D)J provocada por la desaminasa AID, daño que al ser reconocido por diferentes proteínas en determinados puntos del ciclo celular, dará paso a alguno de los mecanismos de diversificación secundaria.

A continuación describiremos los mecanismos de diversificación primaria y secundaria, así como las principales características de AID y sus implicaciones en la HMS, CG y RCC.

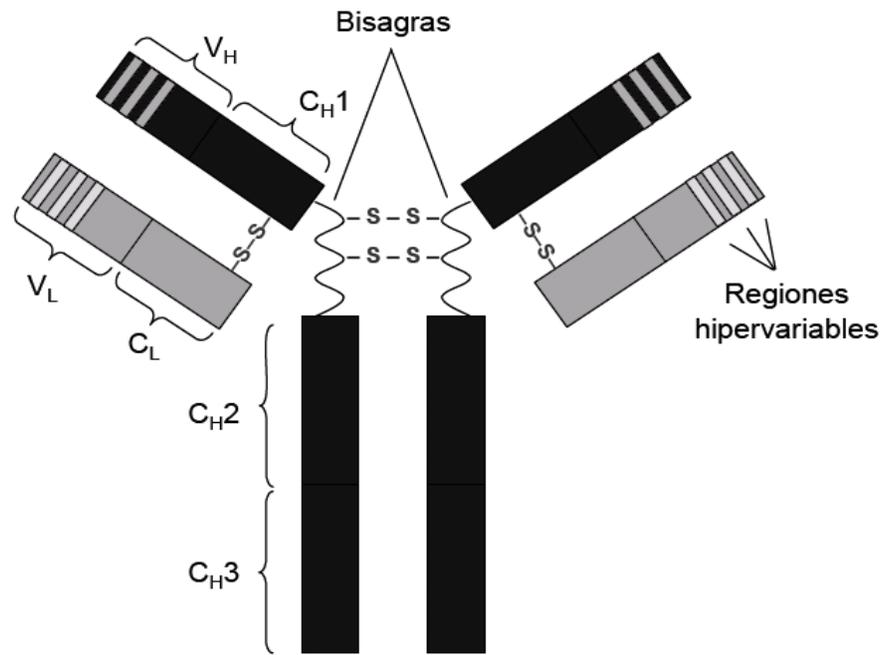


Figura 1. Estructura básica de las inmunoglobulinas: las cadenas pesadas (en negro) y las ligeras (en gris) están divididas en dominios (C_{H1} , 2 y 3, V_H , C_L y V_L respectivamente) y se mantienen unidas por puentes disulfuro

CÉLULAS B Y ANTICUERPOS

Los anticuerpos, que en conjunto se conocen como inmunoglobulinas (Igs), son producidos exclusivamente por las células B, y constituyen aproximadamente el 20% del contenido proteico en plasma. Cada célula B produce una sola especie de Ig con un sitio de reconocimiento de antígeno único. Las Igs producidas por células B naïve, se insertan en la membrana plasmática, donde funcionan como receptores de antígeno. Al ser activadas por algún antígeno que puedan reconocer, y con ayuda de las células T, las células B (tanto naïve como las de memoria) proliferan y se diferencian en células efectoras productoras de anticuerpos. Estos son solubles, y mantienen el mismo dominio receptor de antígenos usado por los receptores de membrana iniciales (1).

La estructura de Ig más sencilla consiste en una molécula en forma de Y con dos sitios idénticos de unión de antígenos en los extremos de cada brazo, por lo que se conocen como

anticuerpos bivalentes. La estructura básica consiste en cuatro cadenas polipeptídicas unidas por enlaces covalentes (puentes disulfuro) y por interacciones no covalentes. Dos de ellas son cadenas ligeras (L) y las dos restantes son cadenas pesadas (H) de mayor longitud, que contienen una pequeña región flexible que funciona como bisagra para variar la distancia entre los brazos de las Igs en presencia de antígenos (Fig. 1). Ambas cadenas tienen una región variable (V) en el extremo N-terminal y una constante (C) en el C-terminal, ésta última más larga que la región V en el caso de las cadenas H, y de igual longitud a la V en las cadenas L. Las cadenas L y H están formadas por segmentos repetidos de ~110 amino ácidos, que se pliegan con ayuda de un puente disulfuro, para formar los dominios C_H , V_H , C_L y V_L (Fig. 1). Estos dominios tienen una estructura tridimensional muy similar, que consiste en un sándwich de láminas β unidas por el puente disulfuro. Sin embargo, los

dominios V_H y V_L difieren de los C_H y C_L pues presentan bucles hipervariables entre las láminas β que se conocen como regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Las CDRs en conjunto dan origen al sitio de reconocimiento de antígenos, mientras que el esqueleto del dominio está conformado principalmente por las láminas β , por lo que se denominan regiones marco (1).

Las células de mamíferos pueden producir cinco clases (isotipos) de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada uno con una cadena pesada diferente α , δ , ϵ , γ , μ , respectivamente. Adicionalmente, existen subclases de IgA e IgG, codificadas por cadenas α y γ diferentes. Cada isotipo determina la forma en la que el antígeno es removido del organismo. El IgM es el primer isotipo producido por las células B nuevas; el IgG es el isotipo más abundante en suero y tiene la capacidad de unirse a receptores en células fagocíticas; el IgA se encuentra principalmente en secreciones como lágrimas y saliva; el IgE se une a basófilos y células cebadas para liberar histamina e iniciar una reacción alérgica. Por otro lado, los dos tipos de cadenas ligeras más comunes son λ y κ , sin embargo, la proporción de Igs con cadenas L de tipo λ y de tipo κ , varía entre organismos (1).

Los genes de Igs se distinguen por estar divididos en segmentos génicos, incluso los *loci* de las cadenas H y L pueden estar distribuidos en diferentes cromosomas. Las regiones C son codificadas por un solo segmento de ADN, mientras que las regiones V se ensamblan a partir de por lo menos dos segmentos génicos (Fig. 2a): cada región V de las cadenas L requiere la unión de un segmento variable (V) largo, y otro más pequeño de unión (J), mientras que las regiones V de las cadenas H se forman a través de la unión de un segmento V, un segmento J y un tercer segmento de diversidad

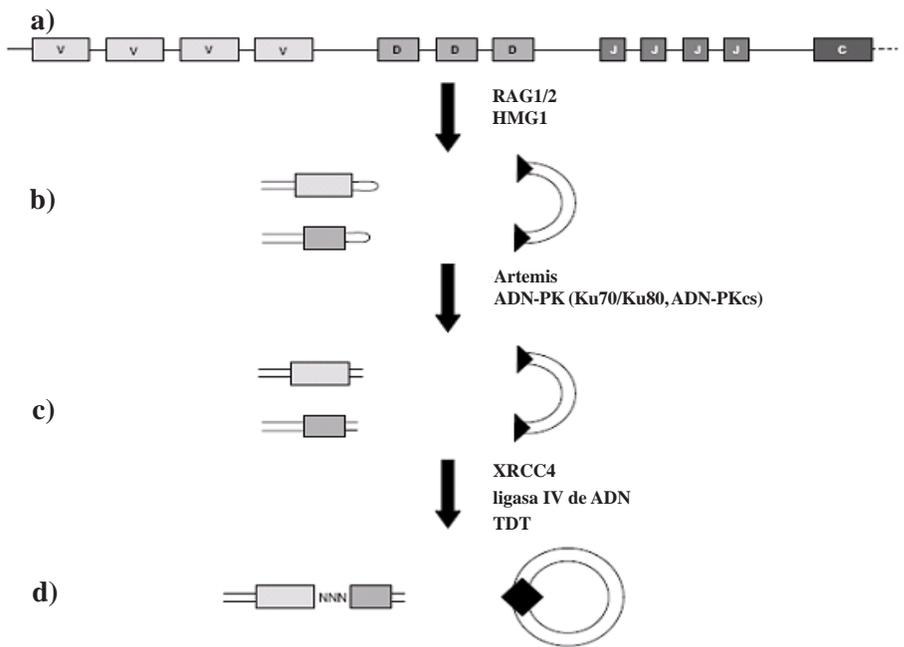


Figura 2. Recombinación V(D)J. a) Organización de los segmentos génicos de línea germinal. b) Formación de extremos con estructura de horquilla sellada en los segmentos codificantes. El ADN que separa los segmentos involucrados en la recombinación se escinde del cromosoma, manteniendo las secuencias de señalización fosforiladas en los extremos (triángulos negros). c) Apertura de los extremos en horquilla de los segmentos codificantes. d) Unión de los segmentos codificantes y de los extremos de señalización.

(D). El número de segmentos V, D y J funcionales y de pseudogenes de línea germinal varía considerablemente de un organismo a otro. Por ejemplo, el pollo (*Gallus gallus*) tiene entre 80 y 100 pseudogenes (ψ) en el extremo 5' de la región variable de la cadena H mientras que el *locus* λ está conformado por un solo segmento J λ , un V λ funcional y 25 ψ V. Por otra parte, algunos mamíferos como el humano, cuentan con más de 100 segmentos V de cadena pesada, por lo menos 20 segmentos D y 6 J. Como veremos más adelante, estas diferencias pueden sesgar la diversificación de Igs hacia alguna vía en particular.

RECOMBINACIÓN V(D)J

Como vimos en la sección anterior, los genes que codifican los receptores de antígenos de las células B y T están separados en diferentes segmentos génicos. En particular, las regiones variables de los receptores de

antígenos se ensamblan durante el desarrollo temprano de los linfocitos por medio de la unión de un segmento variable (V), un segmento de unión (J) y un segmento de diversidad (D) de línea germinal. Este proceso se lleva a cabo gracias a la recombinación denominada V(D)J, y corresponde al primer paso para la diversificación de anticuerpos por dos razones fundamentales. En primer lugar, en función del número de segmentos génicos V, D y J, se puede generar una gran cantidad de combinaciones V(D)J que dan diferentes grados de especificidad a los receptores. En segundo lugar, existen imprecisiones durante la unión de los segmentos génicos, inherentes al proceso de recombinación.

La recombinación V(D)J es un proceso sitio específico iniciado por las proteínas RAG1 y RAG2 específicas de los linfocitos, las cuales reconocen y cortan en doble cadena las secuencias señalizadoras de recombinación

(RSSs) (Fig. 2). Las RSSs flanquean los segmentos génicos involucrados en la recombinación, y están compuestas por un heptámero palindrómico conservado y un nonámero rico en AT, separados por secuencias espaciadoras de 12 ó 23 pb. Se ha observado que esta primera etapa se lleva a cabo en dos pasos: primero, RAG1 ayudada por una proteína de unión y plegamiento de ADN llamada HMG1/2, reconoce las secuencias espaciadoras y se ancla al nonámero; posteriormente, en presencia de RAG2, la interacción ADN-proteína se estabiliza principalmente sobre el heptámero, cerca del punto de corte. Una vez ancladas en las RSSs, RAG1 y RAG2, cortan entre el heptámero y la secuencia codificante, dejando por un lado los extremos codificantes con una estructura de horquilla sellada en el cromosoma y, por otro lado, los extremos de señalización fosforilados (Fig. 2b), los cuales se escinden del cromosoma. Los cuatro extremos se mantienen asociados con las proteínas RAG en un complejo sináptico post-corte. Posteriormente, el daño provocado al ADN es reparado por la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ). De esta forma, el corte en doble cadena es reconocido por el complejo DNA-PK (proteína cinasa dependiente de ADN), el cual está formado por el heterodímero Ku70/ Ku80 (que se une a los extremos del ADN), y la subunidad catalítica (DNA-PKcs) que pertenece a la familia de cinasas de tipo PI3K y requiere de la asociación del complejo Ku70/ Ku80 al ADN para ser activada. DNA-PKcs se une y fosforila a la proteína Artemis, estimulando así su actividad de endonucleasa para abrir la estructura de horquilla en los extremos codificantes (Fig. 2c). Finalmente, el complejo formado por la proteína XRCC4 (proteína de reparación de lesiones de ADN) y la ligasa IV de ADN, cataliza la unión de los segmen-

tos codificantes y de los extremos de señalización (Fig. 2d). En la última etapa de la recombinación V(D)J, la proteína TDT (deoxinucleotidil transferasa terminal) aumenta la diversidad en la zona de unión de los segmentos, pues agrega nucleótidos en ausencia de secuencias molde a los extremos codificantes (2).

Existen diferentes mecanismos que regulan la recombinación V(D)J. En primer lugar, la recombinación ocurre únicamente entre dos genes flanqueados por RSSs que contienen espaciadores de 12 y 23 pb, respectivamente, lo cual se conoce como la regla 12/23. Esta regla garantiza el ensamblado adecuado de las regiones variables, y es regulada por las proteínas RAG y en buena medida por acción del complejo Ku70/Ku80 y DNA-PKcs, los cuales inhiben asociaciones de tipo 12/12 ó 23/23. Un segundo mecanismo de regulación de la recombinación V(D)J es la transcripción. Se ha observado una correlación entre ambos procesos, por lo que elementos que actúan en *cis*, como promotores, intensificadores (denominados *enhancers*), silenciadores, entre otros, parecen ser importantes para la recombinación V(D)J. Por ejemplo, los *enhancers* facilitan la transcripción al inducir un estado abierto de la cromatina asociado con acetilación de histonas, desmetilación de islas CpG, reclutamiento de coactivadores transcripcionales y reposicionamiento de nucleosomas en el promotor. Todos estos eventos, además de inducir la transcripción, determinan la accesibilidad de los segmentos recombinantes para las proteínas RAG. Finalmente, hay factores epigenéticos involucrados en la especificidad de la recombinación, los cuales también regulan el acceso de las proteínas RAG a los *loci* V, D y J. Se ha visto que modificaciones de la cromatina como la acetilación y la metilación están correlacionadas con la recombinación V(D)J. Un estudio

reciente sugiere que el dominio PHD (homeodominio de plantas) de RAG2 se une de manera específica a la histona H3 cuando ésta se encuentra metilada en la arginina 2, y di/trimetilada en la lisina 4 (3), lo cual indica que algunas modificaciones de la cromatina facilitan el anclaje de las proteínas RAG a las RSS y, por tanto, favorecen la recombinación V(D)J.

Recientemente, se ha estudiado un mecanismo de NHEJ alternativo, que parece competir en algunos casos con el NHEJ clásico durante la recombinación V(D)J. Este mecanismo alternativo une secuencias que presentan micro-homología y además produce deleciones largas. Ambas características permiten diseñar sustratos de recombinación que miden la habilidad de células deficientes en uno o varios factores del NHEJ clásico para reparar cortes en doble cadena por el mecanismo alternativo de NHEJ. De esta forma, se observó que células deficientes en RAG1, RAG2, XCCR4 ó DNA-PKcs rescatan de manera limitada la recombinación V(D)J por medio del NHEJ alternativo (4). El NHEJ alternativo es sin duda un mecanismo que deberá ser estudiado a detalle, para entender las implicaciones fisiológicas reales durante la diversificación primaria de Ig.

PAPEL DE AID EN EL PROCESO DE DIVERSIFICACIÓN DE Igs

Cuando la desaminasa inducida por activación (AID) fue identificada, se clasificó con base en un estudio de homología como miembro de la familia de desaminasas de citosinas de ARN, APOBEC (apolipoprotein B, enzima editora de ARNm). AID se expresa únicamente en células B durante la diversificación de Igs; tiene una longitud de 198 residuos, y tiene cuatro dominios: un dominio de localización nuclear en el extremo N-terminal, un dominio de dimerización que comprende del residuo 47 al 54, un dominio

catalítico del residuo 56 al 94 y un dominio de exportación en el extremo C-terminal.

La AID tiene homología con APOBEC1 (enzima editora de apolipoproteína B, polipéptido catalítico 1) y por ello, pudiera pensarse que actúa sobre ARNm. Sin embargo, en *Escherichia coli* se ha demostrado que reconoce algunos motivos de ADN y realiza la desaminación C→U en ADN de cadena sencilla (ADNcs). En efecto, al transformar células de *E. coli* con un plásmido que contenía AID, se observó la aparición de mutaciones puntuales, cuya frecuencia variaba en función del gen estudiado. Estas mutaciones correspondían en su mayoría a transiciones de tipo C→T (y G→A), lo cual es congruente con la capacidad de AID para deaminar C→U, y no presentaban una distribución aleatoria, es decir, la distribución era dependiente del contexto de la secuencia (5). Estudios posteriores confirmaron que AID desamina de manera preferencial citosinas en motivos WRC (W = A/T, R = purina) en el ADN, los cuales se denominan *hotspots* y se concentran en las CDRs.

Dado que la desaminación C→U implica un daño al ADN, existen diversos mecanismos celulares que intentan reparar la lesión provocada por AID. Uno de ellos es la reparación por escisión de bases (BER), en el cual, la glicosilasa de uracilo-ADN (UNG) remueve el uracilo creando un sitio abásico (Fig. 3) que es reconocido por la endonucleasa APE1 (endonucleasa apurínica/apirimidínica 1). De esta forma, se crea un hueco de un nucleótido en el sitio abásico, donde la polimerasa β reinserta un residuo dC, reestableciendo la integridad de la secuencia afectada. La participación de la vía de reparación BER ante el daño por AID fue confirmada en *E. coli*, pues se observó que si bien la deficiencia de UNG y la expresión ectópica de AID son por sí mismas

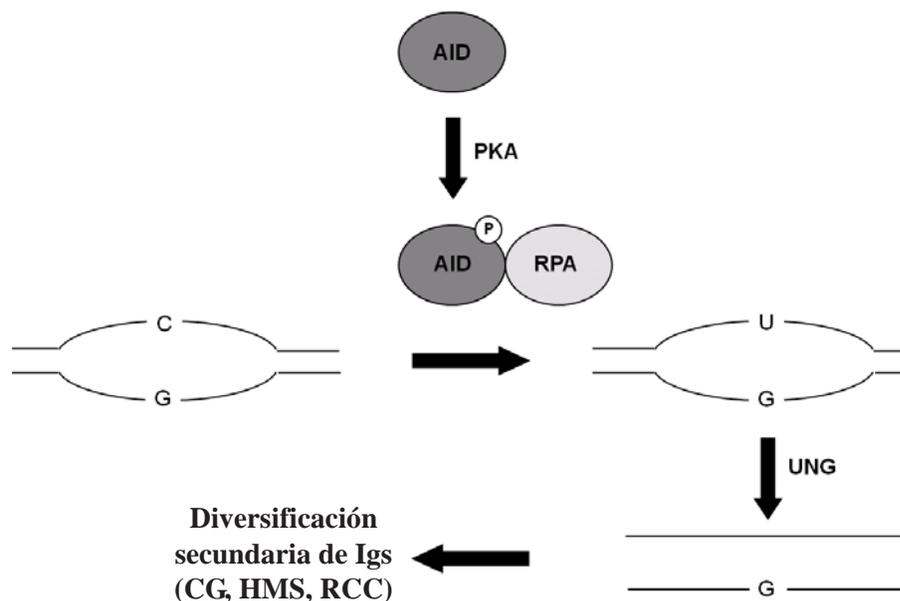


Figura 3. Inicio de la diversificación secundaria de inmunoglobulinas, mediado por la actividad de la AID. Al ser fosforilada por PKA, la AID interactúa con la RPA para desaminar ADN de cadena sencilla. Esta lesión es reconocida por la UNG, la cual elimina el uracilo y da origen a un intermediario común para la HMS, la CG y la RCC.

capaces de aumentar la tasa de mutación, la expresión AID en un contexto de deficiencia de UNG aumenta de manera sinérgica la frecuencia de las mutaciones inducidas por AID (5).

Se han usado diferentes enfoques para estudiar la actividad de la AID durante la diversificación de Igs. Por ejemplo, ensayos bioquímicos han mostrado que la proteína de unión a ADNcs, se asocia con AID en células B e incrementa la actividad enzimática de la desaminasa. Esta asociación ocurre cuando por acción de la cinasa PKA (proteína cinasa A), AID sufre fosforilaciones en el extremo N-terminal. Se ha observado que tanto en pollo como en ratón, la fosforilación de la serina 38 (S38) es requerida para que la HMS y la CG se lleven a cabo de manera eficiente. Al mutar este residuo, la actividad de desaminasa en ADNcs se mantiene en niveles bajos, puesto que se impide la interacción AID-RPA. Adicionalmente, estudios de microscopía de fuerza atómica mostraron que AID se une al

ADNcs y muestra actividad enzimática cuando se encuentra como monómero. Estos resultados implican que AID no fosforilada es activa como monómero *in vitro*, lo cual confirma que la fosforilación no es una modificación post-traduccional activadora, sino reguladora de AID. Por otro lado, se ha sugerido que la transcripción y el estado de la cromatina facilitan la actividad de AID, puesto que al paso de la ARN polimerasa, el ADNcs queda expuesto y se convierte así en un blanco de fácil acceso para la AID. Algunos estudios han mostrado que tanto la cadena de ADN transcrita como la no transcrita son desaminadas por AID, independientemente de la distribución de *hotspots*, por lo que se puede pensar que el enrollamiento negativo del ADN al paso de la ARN pol, hace al ADN accesible para la AID.

La actividad de AID es fundamental para la diversificación de las Igs puesto que la introducción de uracilos y la eliminación de éstos por la UNG, forma un intermediario (6) que al ser reconocido por alguna de las vías de

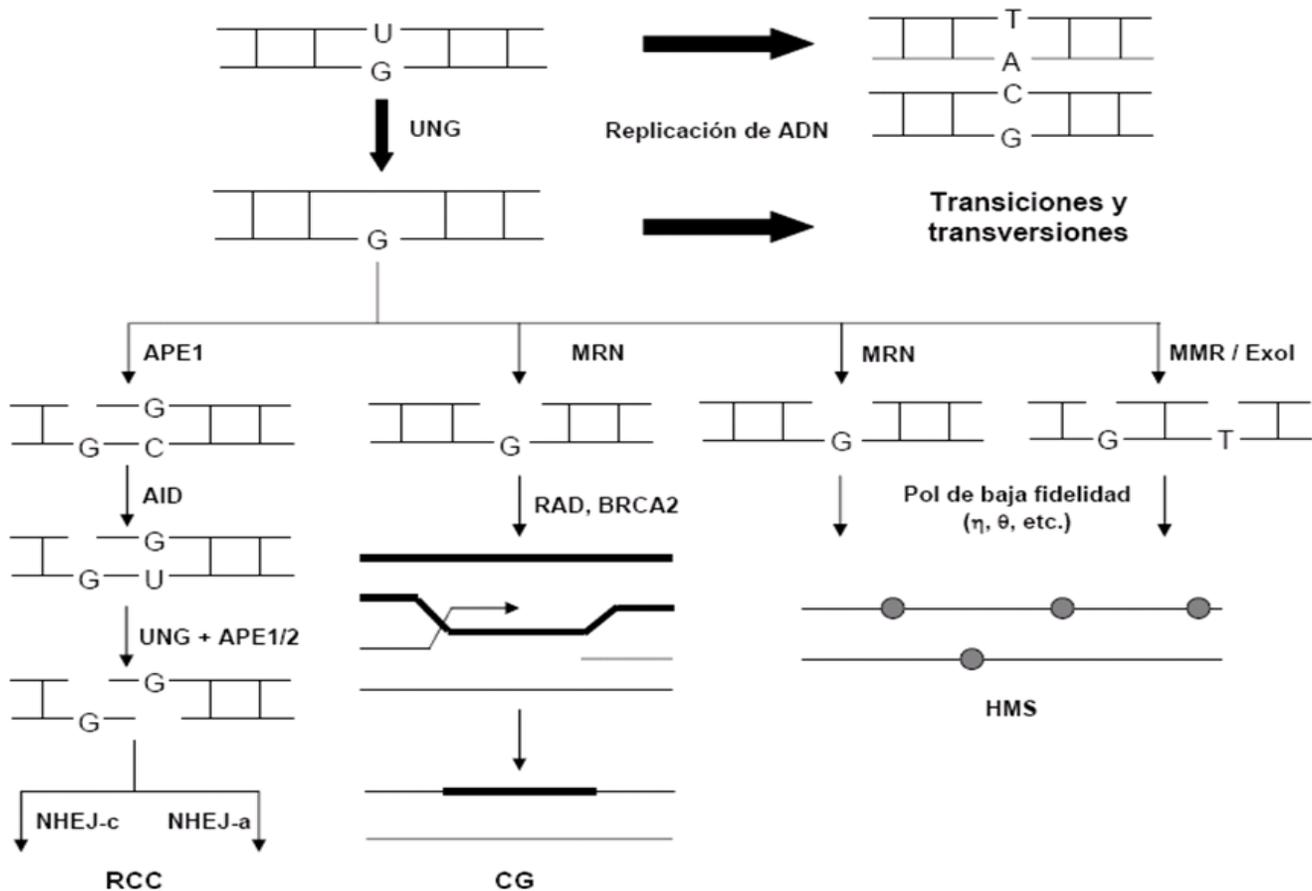


Figura 4. Diversificación secundaria de inmunoglobulinas. La replicación de ADN genera transiciones si ocurre antes de la escisión del uracilo introducido por AID, y transiciones y transversiones si ocurre posterior a la acción de la UNG. De manera alternativa, se pueden generar huecos en los sitios abásicos por la vía MMR o por acción del complejo MRN/Exo1, los cuales son blancos para la CG si se involucran proteínas de RH, o para la HMS si se involucran polimerasas de baja fidelidad. Si por otra parte APE1/2 cortan el sitio abásico, el corte en cadena sencilla puede ser blanco para la RCC.

reparación de ADN de la célula, desencadena alguno de los tres mecanismos de diversificación de Igs (HMS, RCC ó CG; Fig. 3). En primer lugar, cuando la replicación del ADN ocurre antes de que el uracilo pueda ser escindido, se fijará una transición de tipo C/G → T/A, iniciando así el proceso de HMS. En segundo lugar, si la UNG crea un sitio abásico antes de la replicación del ADN, es posible que ocurran tanto transiciones (cambio de bases tipo purina → purina o pirimidina → pirimidina) como transversiones (cambio de bases de tipo purina → pirimidina y *viceversa*), lo cual podría verse sesgado hacia algún tipo de cambio si se usan polimerasas de baja fidelidad con preferencias para introducir

determinados residuos. Esta vía corresponde de igual forma al proceso de HMS. De manera alternativa, MutS α (heterodímero conformado por MSH2 y MSH6) puede reconocer nucleótidos mal apareados de tipo U/G, ante lo cual recluta a MutL α (MLH1/PMS2), que a su vez recluta a la exonucleasa ExoI para generar un hueco que puede ser reparado por un proceso de alta fidelidad. Si por otra parte, APE1 corta el sitio abásico, y esta lesión no es rápidamente reparada por BER, entonces el corte en cadena sencilla puede ser blanco para la CG, RCC ó HMS si se involucra una polimerasa de baja fidelidad, como pol η ó pol θ (Fig. 4).

Otros estudios han revelado una polaridad funcional de AID durante

la diversificación de Igs. Shinkura y colaboradores (7) observaron que mutaciones que afectan el extremo C-terminal de la proteína, afectan la recombinación que da origen al cambio de isotipo, dejando intacta la capacidad para llevar a cabo la HMS. Por otra parte, mutaciones en el extremo N-terminal disminuyen la HMS y no afectan la RCC. Estas observaciones permiten sugerir que los dominios C y N-terminal de la AID interactúan con factores propios de cada mecanismo de diversificación de forma sitio específica.

HIPERMUTACIÓN SOMÁTICA (DIVERSIFICACIÓN SIN MOLDE)

La hipermutación somática (HMS) es

un proceso de diversificación de las regiones variables de los receptores de antígenos que introduce cambios puntuales en los segmentos V(D)J rearreglados, por lo que se conoce como diversificación sin molde. La HMS introduce mutaciones puntuales con una tasa de 10^{-3} /pb/generación, es decir, muchos órdenes de magnitud por encima de la tasa de mutación espontánea. Ocurre en una zona restringida, que comprende aproximadamente 150 pb curso abajo del promotor del *locus* IgV y se extiende entre 1 y 2 kb, disminuyendo a medida que aumenta la distancia al promotor (8).

El primer paso de la HMS, como se discutió en la sección anterior, ocurre cuando previo a la replicación de ADN se da una desaminación provocada por AID. De esta forma se fijan transiciones de tipo C/G→T/A, sobre todo, en las regiones con un alto número de *hotspots*. Sin embargo, hay otras vías que participan en la HMS y que, además, dan origen a cambios puntuales en los pares A/T.

En primer lugar, se ha observado que el complejo Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) facilita la HMS (Fig. 4). El MRN es un complejo que reconoce cortes de ADN, inicia cascadas de señalización durante los puntos de control del ciclo celular frente a cortes de ADN y regula cambios en la estructura de la cromatina en regiones próximas al corte de ADN. La Mre11 es una exonucleasa que se une directamente al ADN, la Rad50 es una proteína involucrada en el mantenimiento estructural de los cromosomas, mientras que la Nbs1 es la subunidad reguladora que determina la localización nuclear del complejo MRN. Se ha visto que la sobreexpresión de la subunidad Nbs1 en células B humanas acelera la hipermutación y que el complejo Mre11/Rad50 corta los sitios abásicos en el *locus* V(D)J para formar ADNcs. Con base en estas observaciones, se puede concluir que el complejo MRN

promueve el corte y la reparación de las lesiones iniciadas por AID por mecanismos que involucran polimerasas de baja fidelidad (8, 9).

Hasta el momento se han identificado aproximadamente 10 polimerasas de baja fidelidad, y son las polimerasas η y θ las que presentan mayor actividad durante la HMS. Por un lado, ratones deficientes en pol η muestran una reducción de 80% de mutaciones en sitios A/T, mientras que la ausencia de pol θ reduce en un 20% las mutaciones tanto en sitios A/T como C/G. Incluso se ha propuesto una interacción directa entre ambas polimerasas durante la HMS, lo cual promueve la aparición de cambios en los sitios A/T.

Por otra parte, se ha visto que el complejo MutS α (heterodímero MSH2/MSH6), el cual pertenece a la vía de reparación MMR (reparación equivocada), reconoce apareamientos incorrectos de tipo U/G y da origen a la formación de huecos, posiblemente por interacción directa con la exonucleasa 1 (Exo1). Una vez que se produce el corte en cadena sencilla, las polimerasas de baja fidelidad antes descritas pueden repararlo, dando lugar a nuevos cambios puntuales, los cuales se extienden a los sitios A/T (Fig. 4). Se ha observado que en ausencia de MSH2 ó MSH6 el número de mutaciones en los pares A/T disminuye. Aunado a esto, se sabe que el heterodímero MSH2/MSH6 interactúa y estimula la actividad de la polimerasa η , la cual induce cambios sobre todo en sitios A/T. Rev1 también se ha visto involucrada en la síntesis de ADN en el sitio abásico: Rev1 es una deoxicitidil transferasa, y tiene preferencia para insertar residuos de oxicitidina en la cadena recién sintetizada, lo cual resulta en transversiones de tipo C→G y G→C (8, 9).

Algunos autores han sugerido una correlación entre la transcripción de los *loci* de las regiones variables con

la tasa de hipermutación. Sin embargo, estudios recientes con elementos que actúan en *cis* para incrementar la tasa de transcripción han revelado que ésta es necesaria pero no suficiente para la HMS. Por ejemplo, Yang y colaboradores (10) analizaron la región promotora y el *enhancer* en el extremo 3' del *locus* IgL en células DT40. De dicho estudio derivaron observaciones interesantes. En primer lugar, al reemplazar el promotor endógeno del *locus* IgL por un promotor inactivo del bacteriófago T7, se eliminó por completo la CG y la HMS. En segundo lugar, al usar un promotor activo que mostraba una tasa de transcripción ~1.5 veces más alta que la del promotor endógeno, se observa muy poca CG y HMS. Por otro lado, al probar el promotor de β -actina, el cual incrementa la transcripción del gen hasta 3 veces en comparación con el promotor endógeno, la frecuencia de la CG y de la HMS alcanza el mismo nivel observado por el promotor endógeno. Esto quiere decir que la tasa de transcripción no está necesariamente relacionada de manera directa con la CG o con la HMS. Es posible incluso pensar que el promotor endógeno tiene elementos que lo hacen más eficiente para reclutar los complejos necesarios para ambos mecanismos de diversificación. Finalmente, se observó que al eliminar el *enhancer* en el extremo 3' del *locus* IgL, la CG y la HMS se vieron pobremente comprometidas, lo cual indica que el *enhancer* no es indispensable para la diversificación.

CONVERSIÓN GÉNICA (DIVERSIFICACIÓN CON MOLDE)

Por definición, la conversión génica (CG) se refiere a un proceso de intercambio no recíproco de ADN entre un *locus* receptor y un *locus* donador. La CG está involucrada en procesos de reparación de daños al ADN como cortes en doble cadena, por lo

que en el contexto de la diversificación de Igs se puede considerar un mecanismo de diversificación con molde. Muchos organismos recurren a este mecanismo como herramienta para la generación de variabilidad en las regiones V(D)J de los receptores de antígenos. El pollo (*Gallus gallus*) es quizás el mejor modelo que ha permitido el estudio de la CG durante la diversificación de Igs (11). En el pollo existe una gran cantidad de pseudogenes (ψ V) en el extremo 5' de las regiones V tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras, los cuales han perdido señales de recombinación, *enhancers*, promotores, y han sido truncados en los extremos 5' y/o 3'. Por ejemplo, el *locus* λ está conformado por un solo segmento J λ , un V λ funcional y 25 ψ V. Dado que estos pseudogenes presentan altos porcentajes de identidad con el segmento V funcional, son potenciales donadores de secuencia durante el proceso de CG. Un estudio realizado por Arakawa y colaboradores (6) confirma esta teoría, pues al eliminar ψ V donadores del *locus* rearreglado de la cadena ligera de células DT40, se elimina la diversificación por conversión génica, mientras que la mutación dependiente de AID aumenta. Es decir, se observó que la mayor parte de los cambios a nivel de secuencia, corresponden a cambios puntuales, que se localizan preferentemente en *hotspots* reconocidos por AID. Esto quiere decir que cuando AID introduce lesiones en el segmento V(D)J rearreglado, la reparación es efectuada, en caso de haber secuencias donadoras, por CG. Sin embargo, en ausencia de dichas secuencias, la HMS se ve incrementada. Esta observación apoya el modelo de un intermediario común para ambos procesos.

La CG es mediada por el proceso de recombinación homóloga (RH), el cual es un mecanismo de reparación de ADN que involucra un gran número

de proteínas (Rad52, BRCA1 y BRCA2, FA, MRN, helicasas, polimerasas, topoisomerasas y endonucleasas), algunas de ellas críticas para la CG (Fig. 4). En particular, BRCA2, la cual facilita la localización nuclear de Rad51 y el pegado de ésta al ADNcs, y las proteínas del grupo Rad52, un grupo altamente conservado en organismos eucariotes, han sido involucradas en la CG durante la diversificación de Igs. Este grupo incluye a Rad51, una recombinasa de la familia RecA, sus parálogos (Rad51B/C/D, XRCC2/3), Rad52, Rad54 y el complejo MRN (Mre11/Rad50/Nbs1). En efecto, al mutar XRCC2, XRCC3 o Rad51B en células DT40, se observa una fuerte reducción en el número de eventos de CG, mientras que la frecuencia de cambios puntuales en la región V, principalmente en sitios C/G en *hotspots* reconocidos por AID aumenta considerablemente. Es decir, al impedir la CG se induce la HMS. Por su parte, al reconocer daños en el ADN, el complejo MRN es capaz de reclutar proteínas como la cinasa ATM (ataxia-telangiectasia mutada), iniciando así una cascada de señalización que reúne los componentes de la RH, y puede generar, a través de Mre11, extremos libres para iniciar la CG (12). Sin embargo, el uso de las proteínas del grupo Rad52 en el contexto de la diversificación de Igs parece variar de un organismo a otro: mientras que en el pollo, Rad54 (proteína accesoria de Rad51 durante la RH) es necesaria para la CG, en células B de ratón parece haber independencia entre los eventos de CG y la presencia de Rad54.

La conversión génica puede iniciarse por dos tipos de lesiones en el ADN: cortes en cadena sencilla o en doble cadena. En general, cuando se da un corte en doble cadena, la RH o el NHEJ son los encargados de reparar dicha lesión, siendo el NHEJ el mecanismo preferencial en células de

mamíferos. Dado que hay estudios que sugieren que en ausencia de UNG la CG disminuye fuertemente y la HMS se ve favorecida, se ha pensado que cortes en cadena sencilla pueden dar origen al inicio de la CG. Dicha propuesta se ha analizado midiendo la frecuencia de la CG en células DT40 deficientes en los factores para el NHEJ, es decir, en células deficientes en PKcs y Ku70. En este contexto, se observó que la CG se ve incrementada entre 5 y 10 veces en ausencia de NHEJ, lo cual indica que el corte en doble cadena inicia la CG en el *locus* de Ig. Con base en estos resultados, y dado que el NHEJ funciona durante todo el ciclo celular, es posible pensar que la CG y el NHEJ compiten por la reparación de los cortes en cadena doble durante todo el ciclo celular. La RH por otra parte se usa preferentemente durante la fase S tardía y la G2, por lo que la RH y NHEJ pueden competir únicamente durante estas etapas.

Para que pueda ocurrir la CG, no sólo es necesario tener secuencias homólogas donadoras y receptoras, si no que se debe cumplir una serie de requisitos para que la maquinaria a cargo de la CG pueda acceder a dichas secuencias. Un ejemplo de ellos es el estado de la cromatina en los ψ V. Estudios por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) han mostrado que los ψ V λ donadores en células DT40 contienen histonas acetiladas (AcH3 y AcH4), lo cual es señal de un estado relajado de la cromatina. Para evaluar si estas condiciones favorecen la CG se usó HP1 (proteína de heterocromatina 1), una proteína de heterocromatina que promueve el silenciamiento de diferentes genes al inducir cambios en el estado de la cromatina (como desacetilación de histonas y propagación de la heterocromatina). Al disminuir el grado de acetilación de las histonas de los ψ V λ por acción de HP1, se observó que la frecuencia de mutaciones acumuladas por CG dis-

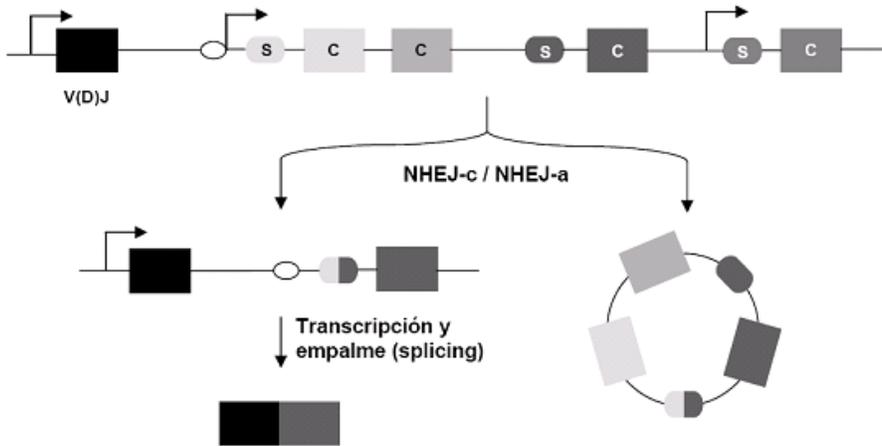


Figura 5. Recombinación para cambio de clase (RCC). Las flechas indican el inicio de la transcripción de las regiones S involucradas en la recombinación. Los mecanismos NHEJ clásico y/o alternativo unen las regiones S transcritas, y permiten la escisión de los segmentos C restantes. Posteriormente, la transcripción y el empalme ("splicing") permiten la unión del segmento V(D)J reorganizando al segmento C que se encuentra curso abajo. El óvalo blanco representa elementos en cis, como promotores o enhancers, que favorecen la transcripción.

minuyó de 77 a 3%, mientras que los cambios acumulados por HMS aumentaron de 20 a 58%. Esto indica que la estructura de la cromatina de las secuencias donadoras es un factor determinante en la CG (13). Incluso se ha observado que al tratar células DT40 con tricostatina A, un inhibidor de desacetilasas, aumenta la frecuencia de los eventos de conversión génica, acelerando así la diversificación de anticuerpos. Cabe mencionar que al igual que la HMS, la CG ha sido asociada con una tasa de transcripción elevada. Sin embargo, como se discutió en la sección anterior, la transcripción no es suficiente para que ocurra la CG (10).

RECOMBINACIÓN PARA CAMBIO DE CLASE (RCC)

Inicialmente, las células B expresan IgM, sin embargo, en respuesta al estímulo por algún antígeno y con ayuda de las células T, las células B expresan otros isotipos de Igs. El cambio de isotipo ocurre por medio de un mecanismo denominado recombinación para cambio de clase (RCC), el cual permite el reemplazo de la región constante de los anticuerpos por otro

exón curso abajo en el *locus* IGHC, para modificar la forma en la que el antígeno es removido del organismo, sin afectar la especificidad de la Ig. La RCC es un proceso sitio específico, pues se lleva a cabo en regiones intrónicas, conocidas como regiones S (switch). Las regiones S son secuencias de entre 1 y 10 kb de longitud, y se localizan a una distancia de entre 1 y 5 kb curso arriba de los genes CH (Fig. 5). Contienen patrones degenerados en tandem, ricos en G en la cadena no transcrita, así como blancos de desaminación distribuidos de manera heterogénea que son reconocidos por AID. Dado que son regiones intrónicas, las uniones heterogéneas entre ellas no afectan las secuencias codificantes. Se sabe que la transcripción de las regiones S es fundamental para dar inicio a la RCC, pues permite la formación de bucles, conocidos como *G-loops*, que consisten en híbridos ADN-ARN en la cadena molde. Los *G-loops* prolongan la desnaturalización del ADN y exponen los blancos de desaminación, favoreciendo el acceso de AID a la cadena de ADN rica en C (2).

El cambio de isotipo, al igual que

la recombinación V(D)J, depende del proceso NHEJ, por lo que un corte de ADN en doble cadena es indispensable para la RCC (Fig. 4, 5). Como se discutió en las secciones anteriores, posterior a la desaminación C→U en las regiones S, la UNG genera un sitio abásico en esta posición. Un estudio reciente reveló que células deficientes en APE2 y haploinsuficientes en APE1 muestran niveles muy bajos de RCC, por lo que se puede concluir que ambas proteínas APE son responsables del corte en doble cadena en el sitio abásico en las regiones S.

Las regiones S que participan en la RCC pueden estar separadas por distancias de hasta 150 kb, por lo que se requieren factores que faciliten la sinapsis S-S. Por ejemplo, las proteínas de reparación de ADN γ -H2AX, 53BP1 se han involucrado en la sinapsis S-S, pues mutaciones en estas proteínas reducen la RCC, mientras que rearrreglos dentro de las regiones S se mantienen. La ATM y la subunidad Nbs1 del complejo MRN también parecen participar en la sinapsis. Por otro lado, la organización de las regiones promotoras y algunos *enhancers* favorecen la sinapsis S-S ya que se ha observado que, durante la activación de células B de ratón, se forma un complejo conocido como sinaptonémico, entre los *enhancers* E μ y 3'E α y la región promotora, que facilita la RCC. Alteraciones en los *enhancers*, impiden la formación del complejo sinaptonémico y disminuyen fuertemente la RCC (14).

Si bien es cierto que en ausencia de proteínas involucradas en el proceso de NHEJ, como Ku70 y Ku80, la RCC disminuye fuertemente, hay evidencias que sugieren la existencia de mecanismos alternativos para la RCC. Se ha observado que en ausencia de la subunidad catalítica del complejo DNA-PK (DNA-PKcs) puede ocurrir RCC y, recientemente, se ha propuesto un mecanismo alternativo

de NHEJ, que parece competir con el NHEJ clásico durante la RCC. El NHEJ alternativo, como se discutió previamente, es capaz de unir cortes en doble cadena que presentan micro-homología en el contexto fisiológico de la RCC. Esta vía alterna difiere del NHEJ clásico puesto que opera en ausencia de XRCC4 y de Lig4 (es probable que use otra ligasa, como la Lig3) y no parece generar niveles detectables de uniones de RCC; sin embargo, aunque no es el mecanismo más eficiente para la reparación de cortes en doble cadena, sí parece ser un mecanismo robusto durante la RCC (15). Es posible pensar que el NHEJ clásico y la vía alterna compitan para la reparación de cortes en doble cadena en las regiones S durante la RCC, sobre todo en aquellos casos donde los cortes muestran micro-homologías de mayor longitud.

Adicionalmente, se ha visto que la polimerasa β de ADN reemplaza dC desaminados por AID y promueve la reparación correcta del corte en cadena sencilla previniendo, así, la RCC. Es posible pensar que la pol β disminuye su expresión durante la diversificación de Igs, o simplemente que las múltiples lesiones iniciadas por AID sobrepasan la capacidad de la polimerasa para ser reparadas. Por ello, se han estudiado los niveles de

expresión de pol β durante la RCC (16). Se observó que los niveles nucleares de la polimerasa aumentan frente a la activación de células B durante la RCC. Cuando células deficientes en pol β son activadas, hay un aumento de la RCC, pues se presenta un mayor número de cortes en doble cadena y de mutaciones en comparación con los controles. Se ha llegado a pensar que la pol β intenta reparar las lesiones en las regiones S, y es sobrepasada por el número de desaminaciones.

CONCLUSIÓN

Los estudios hechos en los últimos años en relación a la diversificación de Igs, han permitido identificar una serie de factores, tanto génicos como proteicos, necesarios para cada uno de los procesos aquí descritos. Incluso se han propuesto modelos que evidencian un grado de conocimiento considerable con respecto a la generación de variabilidad de anticuerpos. Desafortunadamente, la información que tenemos hasta el momento no deja claro el por qué los mecanismos de reparación, que en general son muy eficientes para garantizar la integridad del ADN, son la principal fuente de variaciones durante la diversificación de Igs en células B. Por otro lado, aún no contamos con estudios contundentes

que expliquen la especificidad de los mecanismos de diversificación para reconocer los *loci* de Igs y, en particular, las regiones V(D)J rearrregladas. Recientemente, se han involucrado elementos adicionales a las vías de reparación en el proceso de diversificación, como promotores y *enhancers* de los *loci* de Igs, y se han observado mecanismos alternativos que pueden competir con las vías de reparación clásicas implicadas en el desarrollo de los receptores de las células B. Lo anterior indica que es posible que existan procesos alternos aún no identificados que pueden, de igual forma, influenciar las modificaciones de los genes de Igs durante la respuesta inmune.

Las investigaciones futuras deberán ayudarnos a entender más a fondo los mecanismos de diversificación de Igs, lo cual redundará en aportaciones al entendimiento de procesos como la reparación de ADN y el mantenimiento de la integridad genómica, de enfermedades autoinmunes, y hasta oncogénesis. Cabe mencionar que la diversificación de Igs ha resultado ser un excelente modelo para el estudio de procesos de recombinación y conversión génica, y que sin duda alguna permitirá resolver preguntas clave en relación a estos mecanismos.

REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular Biology of the Cell. Garland Science, New York, NY, USA, p 1375-1384.
2. Maizels N (2005) Immunoglobulin gene diversification. *Annu Rev Genet* 39: 23-46.
3. Ramón-Maiques S, Kuo AJ, Carney D, Matthews AGW, Oettinger MA, Gozani O, Yang W (2007) The plant homeodomain finger of RAG2 recognizes histone H3 methylated at both lysine-4 and arginine-2. *PNAS* 104: 18993-18998.
4. Corneo B, Wendland RL, Deriano L, Cui X, Klein IA, Wong SY, Arnal S, Holub AJ, Weller GR, Pancake BA, Shah S, Brandt VL, Meek K, Roth DB (2007) Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature* 449: 483-487.
5. Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS (2002) AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418: 99-103.
6. Arakawa H, Saribasak H, Buerstedde JM (2004) Activation-induced cytidine deaminase initiates immunoglobulin gene conversion and hypermutation by a common intermediate. *PLoS Biol* 2: 967-974.

7. Shinkura R, Ito S, Begur NA, Nagaoka H, Muramatsu M, Kinoshita K, Sakakibara Y, Hijikata H, Honjo T (2004) Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat Immunol* 5: 707-712.
8. Teng G, Papavasiliou FN (2007) Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* 41:107-120.
9. Di Noia JM, Neuberger MS (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76: 1-22.
10. Yang SY, Fugmann SD, Schatz DG (2006) Control of gene conversion and somatic hypermutation by immunoglobulin promoter and enhancer sequences. *J Exp Med* 203: 2919-2928.
11. Sale JE (2004) Immunoglobulin diversification in DT40: a model for vertebrate DNA damage tolerance. *DNA Repair* 3: 693-702.
12. Tang ES, Martin A (2007) Immunoglobulin gene conversion: synthesizing antibody diversification and DNA repair. *DNA Repair* 6: 1557-1571.
13. Cummings WJ, Munehisa Yabuki M, Ellen C, Ordinario EC, David W, Bednarski DW, Simon Quay S, Nancy Maizels N (2007) Chromatin structure regulates gene conversion. *PLoS Biol* 5: 2145-2155.
14. Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T, Alt FW, Cogne M, Pinaud E, Kenter AL (2007) S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 27: 711-722.
15. Yan CT, Boboila C, Souza EK, Franco S, Hickernell TR, M, Gumaste S, Geyer M, Zarrin AA, Manis JP, Rajewsky K, Alt FW (2007) IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449: 478-483.
16. Wu X, Stavnezer J (2007) DNA polymerase beta is able to repair breaks in switch regions and plays an inhibitory role during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 204: 1677-1689.