



11281
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

10

“ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS
EN LA GENERACIÓN DE
ANTICUERPOS PROTECTORES”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

-INMUNOLOGÍA-

P R E S E N T A

M. en C. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

TUTOR: Dr. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE

MÉXICO, D.F.

2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS: "ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA GÉNERACIÓN DE ANTICUERPOS PROTECTORES".

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS -INMUNOLOGÍA-

PRESENTA:

M. en C. CONSTANTINO III ROBERTO LÓPEZ MACÍAS

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del CMN. s. XXI. IMSS bajo la tutoría del Dr. Vianney Ortiz Navarrete y la Co-tutoría del Dr. Armando Isibasi Araujo. Y en el Instituto de Inmunología Experimental de la Universidad de Zurich y del Politécnico Federal de Zurich (ETH) bajo la supervisión del Dr. Hans Hengartner y del Dr. Rolf Zinkernagel.

JURADO PARA EXAMEN DE GRADO COMO DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, (plan 582) DEL M. en C. CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACIAS.

PRESIDENTE:	DR. EDMUNDO LAMOYI VELAZQUEZ
SECRETARIO:	DR. RAUL MANCILLA JIMENEZ
PRIMER VOCAL:	DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE
SEGUNDO VOCAL:	DRA. IVONNE ROSENSTEIN AZOULAY
TERCER VOCAL:	DR. HANS HENGARTNER
SUPLENTE:	DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO
SUPLENTE.	DR. JOSE MORENO RODRIGUEZ

COMITE TUTORAL:

DR. VIANNEY ORTIZ NAVARRETE
DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA
DR. LEOPOLDO SANTOS ARGUMEDO

SUPERVISORES EXTERNOS:

DR. HANS HENGARTNER
DR. ROLF ZINKERNAGEL

DEDICATORIA.

A mis padres:

Ma. Yolanda Macías Y González y Constantino López Hernández

a mi hermano y a su esposa:

Ricardo U. López Macías y Nadia Urbano de la Rúa.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Armando Isibasi, de manera muy especial, por ser mi maestro y mentor, por su constante apoyo, orientación y estímulos que han sido fundamentales para mi desarrollo profesional y personal.

Al Dr. Hans Hengartner y al Dr. Rolf Zinkernagel por su confianza, apoyo y guía constantes desde mi estancia en su laboratorio hasta la fecha.

Al Dr. Vianney Ortiz por su compromiso y apoyo académicos.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Fernando Esquivel y el Dr. Leopoldo Santos, por sus valiosos consejos, comentarios y ayuda durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. César González Bonilla por sus recomendaciones y apoyo constantes.

A los miembros del jurado del examen de grado, Dra. Ivonne Rosenstein, Dr. José Moreno, Dr. Edmundo Lamoyi y al Dr. Raúl Mancilla por sus valiosos comentarios a este manuscrito.

En especial a Ma. Thérèse Pouchin, Ma. Elena y Alejandra Isibasi, por su amistad, cariño, ayuda y paciencia durante todos estos años. Gracias por considerarme parte de su familia.

A Marlies, Corinne y Daniela Hengartner por su cálido recibimiento y hospitalidad durante mi estancia en Zürich.

A mis amigos: Alana Althage, Nathalie Bodri, Weldy Bonilla, Andrea Fernández de Castro, Awen Gallimore, Fernando González, Patricia Haw, Carlos Haw, Nathalie Jeanguenat, Paul Klennerman, Guy Kollwelter, Thomas Kramps, Alain Lamarre, Aura Lorenzo, Francisco Lorenzo, Kevin Maloy, Adriana Martínez, Kathy McCoy, Annette Oxenius, Sophie Sierro y Livia Stovolone, por compartir conmigo sus vidas, sus experiencias personales y académicas y por apoyarme siempre. Gracias por su cariño, solidaridad y tolerancia.

A Elisabeth Schniderlin por su disposición, entrega y ayuda efectiva; a los Bundesstipendatinnen y Bundesstipendiaten del ETH.

A mis compañeros de trabajo: Peter Aihele, Laura Bonifaz, Roswitta Gampp, Elisabeth Hoerhager, Edith Horvath, Ulrich Kalinke, Urs Karrer, Burkhard Ludewig, Andrew MacPherson, Natalia Martín, Karin Riem, Peter Seiler, Therese Uhr, por sus enseñanzas ayuda y colaboración tanto en el laboratorio como fuera de él.

A la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social, por su apoyo económico durante mis años de Becario de investigación, por su apoyo para realizar mi estancia de investigación en Suiza y por brindarme la oportunidad de regresar a México con un puesto de trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por su apoyo económico durante mis estudios y en los proyectos de investigación en los que he participado.

A la Fundación UNAM por su apoyo para iniciar mi estancia en Suiza.

Al gobierno Suizo por el bundestipendium para realizar mi estancia en su país.

Al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por su mantener su apoyo durante mis estudios en México y en Suiza.

Al Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Postgrado (PADEP). Facultad de Medicina UNAM. Por el apoyo económico recibido para realizar estas investigaciones. Clave 012326. 1996.

A la Heuberg Stiftung por su apoyo económico para realizar estas investigaciones.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
I. INTRODUCCIÓN	14
II. ANTECEDENTES	18
1. Respuesta inmune humoral	19
2. Estructura y función de los anticuerpos	20
3. Mecanismos de generación de diversidad	21
3.1 Exclusión alélica e Isotípica	24
3.2 Diferenciación de células B	24
3.3 Generación de la diversidad del repertorio	25
4. Rearreglos secundarios de inmunoglobulinas	28
4.1 Secuencias de recombinación (RS) en el ratón y elementos de eliminación de κ (kde) humanos	29
4.2 La edición del receptor como un mecanismo de tolerancia inmunológica	30
4.3 Edición de receptor en ratones a los que se les ha insertado el transgene de Ig en el locus específico de Ig	33
4.4 La contribución de la edición de receptor en la diversificación del repertorio	36

4.5 La edición del receptor en linfocitos B maduros es denominada revisión de receptor	37
4.6 Posibles funciones de la revisión del receptor	42
4.7 Implicaciones y problemas del concepto de selección de receptor a través de los rearreglos secundarios de Ig	43
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
IV. HIPÓTESIS	46
V. OBJETIVOS	47
VI. MODELOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS	48
1. Ratones deficientes de la cadena L κ ($C\kappa^{-/-}$)	48
2. Ratones "Quasimonoclonales" (QM)	49
3. El Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV)	50
4. El virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCMV)	51
5. El virus de la Poliomiелitis humana (PV)	52
6. Las porinas de <i>Salmonella typhi</i>	53
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Ratones y Virus	55
2. Inmunizaciones	56
3. Ensayos de Neutralización para el VSV y PV	56
4. Ensayo de Neutralización para el LCMV	57
5. Detección de Anticuerpos por medio de ELISA	58
6. Expresión de fracciones variables de anticuerpos (Fv) en fagos filamentosos	58

7. Cepas bacterianas	61
8. Cultivo de bacterias	61
9. Obtención de las porinas	61
10. Electroforesis en geles de poliacrilamida	62
11. Cuantificación de proteínas	63
VIII. RESULTADOS	64
1. La cadena ligera λ puede sustituir funcionalmente a la cadena κ para la formación de anticuerpos protectores	64
2. Los rearrreglos secundarios e hipermutación somática de los genes de las inmunoglobulinas como mecanismos de generación de diversidad de anticuerpos e inmunidad protectora	67
2.1 Producción de anticuerpos neutralizantes contra VSV en ratones QM	67
2.2 Análisis de las regiones V_H de los anticuerpos anti-VSV provenientes de los ratones QM	72
2.3 Inducción de anticuerpos específicos contra LCMV y PV en ratones QM	76
2.4 Inmunización de ratones QM con porinas de <i>S. typhi</i>	79
IX. DISCUSIÓN	81
X. CONCLUSIONES	89
XI. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	90
XII. BIBLIOGRAFÍA	91
XIII. ANEXO DE PUBLICACIONES	115

LISTA DE ABREVIATURAS

Bac VSV-G	Glicoproteína del VSV expresada en células de insecto a través del sistema de Baculovirus
C	Región constante de las cadenas de inmunoglobulinas
C κ ^{-/-}	Ratones deficientes de la cadena L κ
CD	Molécula de diferenciación de grupo
CDRs	Regiones determinantes de complementariedad.
DMEM	Medio Dulbecco modificado por Eagle
DNA	Acido desoxirribonucléico
EDTA	Acido etilen-diamino-tetra acético
FR	Regiones estructurales de los genes de las inmunoglobulinas
GFP	Proteína verde fluorescente
H	Cadenas pesadas de las inmunoglobulinas
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	intravenoso
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
Ig	Inmunoglobulinas
IL-	Interleucina-
kde	Elementos de eliminación de humanos
L	Cadenas ligeras de las inmunoglobulinas
LCMV	Virus de linfocoriomeningitis del ratón
LPS	Lipopolisacárido
MEM	Medio modificado de Eagle
MHC I	Moléculas de histocompatibilidad clase I
MHC II	Moléculas de histocompatibilidad clase II
mini	Contenido mínimo de unidades del virus de la polio
neo ^r	Resistencia a neomicina

NP	(4-hydroxi-3-nitro-fenil)acetilo
PFU	Unidades formadoras de placa
PVR	Receptor específico del poliovirus
QM	Ratones "Quasimonoclonales"
RAG	Gen de activación de la recombinasa V(D)J
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
RNP	Nucleocápside del LCMV
RS	Secuencias de recombinación
RSS	Señales específicas de recombinación
s.c.	Subcutáneo
scFv	Anticuerpos de cadena simple
SPF	Condiciones libres de patógenos específicos
TCR	Receptor de linfocito T .
TdT	Enzima desoxinucleotidil transferasa
TI-1	Antígenos timo-independientes tipo I
TI-2	Antígenos timo-independiente tipo II
U.V	Luz ultravioleta
V	Región variable de las inmunoglobulinas .
Vacc-VSV-G	Glicoproteína del VSV expresada en el virus vaccinia como antígeno recombinante
VHF	Fiebres hemorrágicas virales
VP1-4	Proteínas ordenadas regularmente del PV
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
VSV-G	Glicoproteína G del VSV
VSV-IND	VSV serotipo Indiana
VSV-NJ	VSV serotipo New Jersey

RESUMEN

El presente trabajo es un estudio sobre la contribución de la cadena λ , los rearrreglos secundarios de inmunoglobulinas (Ig) y la hipermutación somática, en la generación de anticuerpos protectores. Como modelos experimentales fueron utilizados ratones deficientes de la cadena κ y ratones "Quasimonoclonales" (QM). Estos ratones fueron infectados con los virus de la estomatitis vesicular (VSV), linfocoriomeningitis linfocítica (LCMV), o bien, fueron inmunizados con diferentes antígenos virales y con porinas de *S. typhi*.

Los ratones deficientes de la cadena κ ($c\kappa^{-/-}$) tienen un repertorio teórico reducido unas 100 veces, mientras que su repertorio disponible se encuentra completamente modificado si lo comparamos con los ratones de la cepa original, en los cuales, la proporción κ/λ es de 95:5. El repertorio útil en los ratones $c\kappa^{-/-}$ mostró ser funcional y suficiente para enfrentar las infecciones y los retos antigénicos a los que se les sometió. De esta forma se demostró que tanto los anticuerpos con cadena κ como λ son capaces de mediar protección en estos modelos experimentales.

Se ha propuesto que los rearrreglos secundarios de Ig participan en la generación de diversidad de los anticuerpos. Sin embargo, su contribución en la generación de anticuerpos protectores no ha sido investigada. Con el fin de estudiar esta posibilidad, se infectaron e inmunizaron ratones QM. Estos ratones tienen un repertorio de anticuerpos oligoclonal debido a que se reemplazaron los elementos endógenos J_H por los genes rearrreglados $V_H(D)J_H$ 17.2.25 con especificidad anti-(4-hidroxi-3-nitro-fenil)acetilo (NP). Además, estos ratones son deficientes de la cadena κ dando como resultado que estos ratones tengan un repertorio teóricamente mono-específico.

A pesar de esto, los ratones QM fueron capaces de generar anticuerpos protectores contra los virus con los que se les infectó, no obstante, la cinética de aparición de los anticuerpos fue más lenta en estos animales comparada con los controles. Se aislaron anticuerpos de cadena simple (scFv) de los ratones QM infectados con VSV, al secuenciarlos, se pudo determinar que los mecanismos de rearrreglos secundarios y la hipermutación somática fueron utilizados para generar un repertorio de anticuerpos funcional y capaz de mediar protección.

En conjunto, el presente trabajo muestra que la cadena λ , los rearrreglos secundarios de Ig y la hipermutación somática, son capaces de contribuir en la generación de anticuerpos protectores. Y además, muestra la enorme capacidad de la respuesta inmune humoral para generar diversidad en condiciones donde el repertorio de anticuerpos se encuentra moderada o altamente reducido.

ABSTRACT

The present work addresses the contribution of the λ chain, immunoglobulin secondary rearrangements and somatic hypermutation in the generation of an antibody response against viral infections and other pathogen derived antigens. Mice deficient on the κ chain expression and "Quasimonoclonal" (QM) mice were used as experimental models. Mice were infected with vesicular stomatitis virus (VSV), lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) or poliovirus (PV). In addition mice were immunized with different viral antigens and porins from *S. typhi*.

κ chain deficient mice possess a reduced potential antibody repertoire within a factor of 100, while their available repertoire is completely changed due to the use of the λ chain only. In normal mouse strain, the κ/λ ratio is 95:5. After infections and immunizations mice were able to produce a protective antibody response. These results showed that antibodies using λ chain are able to mediate a protective antibody response equivalent to the one produced by antibodies using κ chain.

Variable (V) region gene replacement has been implicated in B cell repertoire diversification but the contribution of this mechanism to protective antibody responses is still unknown. To investigate the role of V gene replacements in the generation of antigen-specific and protective antibodies, we analyzed antiviral and antigen immunoglobulin responses of QM mice. The B cells of QM mice are genetically committed to exclusively express the anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl (NP) specificity. However, about 20% of the peripheral B cells of QM mice undergo secondary rearrangements and thereby potentially acquire new specificities. QM mice infected or immunized were able to produce an efficient antibody response. In general, kinetics of the antiviral immunoglobulin responses were delayed in QM mice, however, titers similar to control animals were eventually produced which were sufficient to protect against VSV-induced lethal disease. VSV neutralizing single-chain Fv (scFv) fragments isolated from phage display libraries constructed from QM mice showed V_H gene replacements and extensive hypermutation. Thus, our data demonstrate that secondary rearrangements and hypermutation can generate sufficient B cell diversity in QM mice to mount protective antiviral antibody responses, suggesting that these mechanisms might also contribute to the diversification of the B cell repertoire of normal mice.

The results reported here show the capacity of λ L chain, secondary rearrangements and somatic hypermutation in the generation of a protective antibody response. In addition, is shown the enormous diversification capacity of the humoral immune response to generate protective antibodies in a situation of a moderate or severely reduced antibody repertoire.

I. INTRODUCCIÓN

La protección o inmunidad contra las infecciones es un fenómeno en donde participan tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa; en el caso de la inmunidad adaptativa, la protección se caracteriza por la estimulación de linfocitos B para la producción de anticuerpos y de linfocitos T para la producción de interleucinas, perforinas etc., que en conjunto son capaces de reconocer y actuar en contra de los microorganismos invasores del y/o de sus productos. El efecto final inducido por la activación y acción del sistema inmune es el control de los patógenos y de sus efectos nocivos.

Para llevar a cabo estas funciones, el sistema inmune adaptativo cuenta con dos tipos de receptores para el reconocimiento de los antígenos, estos receptores son a su vez muy diversos. En el caso de los linfocitos B el receptor para el reconocimiento del antígeno es la inmunoglobulina de superficie (Igs), mientras que para el linfocito T es el receptor de linfocito T (TCR). El repertorio de estos receptores es tan amplio que permite al sistema inmune de los vertebrados reconocer a un número enorme de antígenos incluyendo a los provenientes de los patógenos invasores. Esta enorme diversidad de inmunoglobulinas (Ig) y de TCRs, a diferencia de los receptores de la respuesta inmune innata, es producto principalmente de los rearreglos del ácido desoxirribonucleico (DNA) de las células. Estos rearreglos recombinan los segmentos V(D)J para finalmente producir las regiones variables de las Ig y del TCR. No obstante, en el caso de los anticuerpos se han descrito otros procesos que participan en la generación de la enorme diversidad, estos son: el uso aleatorio de diferentes combinaciones de segmentos V(D)J, la imprecisión en la unión de los genes V(D)J que da como resultado la suma o pérdida de nucleótidos en los sitios de unión, la adición de nucleótidos (denominados segmentos N) mediada por la actividad de la enzima desoxinucleotidil transferasa (TdT), el apareamiento de las diferentes cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de las

apareamiento de las diferentes cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de las inmunoglobulinas y la hipermutación somática. En el ratón, el repertorio denominado potencial o teórico que se genera a través de estos mecanismos es de $10^{10} - 10^{11}$ diferentes especificidades, sin embargo, sólo una parte de este repertorio (10^7) se encuentra en forma de anticuerpos funcionales, a esta fracción se le denomina repertorio disponible. Aunque es lógico pensar que cualquiera de estas especificidades pudieran ser utilizadas en una respuesta inmune, el hecho es que muy pocas de ellas lo son; a esta fracción de anticuerpos que participa en la respuesta contra los antígenos se le denomina repertorio útil.

La complejidad del proceso de reconocimiento del antígeno y la heterogeneidad de los receptores para el antígeno son enormes, por este motivo el repertorio de inmunoglobulinas debe ser estrictamente regulado para así evitar la autorreactividad patológica y promover una respuesta inmune eficiente contra los patógenos. De esta forma, se cuenta con procesos de control o mecanismos para la generación de tolerancia inmunológica entre los que se ha descrito la eliminación clonal de células autorreactivas, la anergia, la ignorancia inmunológica, la tolerancia mediada por linfocitos T reguladores y recientemente los rearreglos secundarios de Ig en los linfocitos B.

Los rearreglos secundarios de Ig son denominados "Edición de Receptor" cuando ocurren en células B inmaduras; el proceso es controlado por señales a través del receptor de Ig en células B de médula ósea inmaduras en donde el reconocimiento de un autoantígeno estimula la recombinación de los genes VJ, dando como resultado un nuevo receptor no autorreactivo. En los órganos linfoides secundarios se ha observado un fenómeno similar al que se le ha denominado "Revisión de Receptor", en este caso la recombinasa V(D)J (RAG) vuelve a manifestar actividad en los centros germinales aunque se ha reportado también que la actividad de la

enzima nunca se pierde en su totalidad. En este caso el cambio de receptor participa en la respuesta inmune contra antígenos extraños y no sólo para la eliminación de receptores autorreactivos. Además se ha descrito que los estímulos derivados de los linfocitos T activan la recombinasa en las células B, mientras que el entrecruzamiento de la Ig de superficie suprime la actividad de esta enzima. En conjunto, estas investigaciones muestran que el sistema inmune aprovecha el control sobre la recombinación V(D)J para modificar los receptores antigénicos de tal forma que la especificidad contra antígenos propios se reduzca mientras que para los antígenos extraños mejore.

Son muchas las preguntas que quedan pendientes por abordar, por ejemplo: ¿cómo se forma el repertorio útil?, ¿Cuáles son los mecanismos que participan en la formación de éste?, ¿El repertorio útil es una representación aleatoria del repertorio disponible o se forma de acuerdo a reglas del desarrollo que no han sido descritas?. Si los anticuerpos del repertorio útil provienen del repertorio disponible entonces ¿Existen características especiales para los anticuerpos involucrados en proteger contra una infección? ¿Hay diferencias entre los anticuerpos protectores y los anticuerpos contra moléculas no relacionadas a enfermedades? y ¿Por qué existen anticuerpos capaces de reconocer antígenos de los patógenos, sin embargo, no son capaces de proteger contra la infección?. ¿Cuánto del repertorio es necesario para proteger contra una infección?, ¿Cuál es la contribución de la cadena λ a la inmunidad, si la mayoría de los anticuerpos del humano y del ratón utilizan la cadena κ ?. Finalmente, con toda esta diversidad ¿Cómo se evita la autoreactividad patológica a pesar de que normalmente es posible encontrar autoanticuerpos circulantes?, ¿Cuál es la contribución de los arreglos secundarios de Ig en la generación de anticuerpos protectores?.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la participación de la cadena λ , de los rearrreglos secundarios de Ig y la hipermutación somática en la generación de anticuerpos protectores.

II. ANTECEDENTES

La contribución de la inmunidad adquirida contra enfermedades infecciosas ha sido observada y reportado desde la antigüedad. En el año 430 A. C. Tucídides, en sus relatos sobre la peste de Atenas durante la guerra del Peloponeso, describe que los sobrevivientes de la plaga no eran atacados nuevamente por la enfermedad y si lo eran no era de forma mortal (1.1). Al final del siglo dieciocho, Jenner observó que la infección causada por el virus de la viruela de las vacas era capaz de inducir un estado de protección contra la viruela. De esta manera se desarrolló el concepto de vacunación; actualmente este procedimiento es utilizado contra una amplia variedad de patógenos y ha tenido un gran impacto positivo en la reducción de la morbilidad y la mortalidad tanto en humanos como animales (1). El éxito de dichas vacunas se debe primordialmente a que son capaces de inducir una respuesta inmune protectora; sin embargo, existen muchas vacunas experimentales que no han sido efectivas en la inducción de protección contra la enfermedad a pesar de inducir una buena respuesta de anticuerpos y/o linfocitos T. De esta forma, se ha hecho evidente que existe una respuesta de anticuerpos y linfocitos T capaz de producir inmunidad, es decir protección, y una respuesta de anticuerpos y de linfocitos T no protectora. No se conocen con precisión los mecanismos y características de la respuesta protectora. A su vez, las diferencias entre inmunidad y respuesta no protectora no han sido bien estudiadas. El estudio de estas características y mecanismos es de gran relevancia para entender el proceso de inmunidad y por lo tanto de gran utilidad para el desarrollo de vacunas.

Para diseñar nuevas y mejores vacunas contra los microorganismos patógenos es necesario conocer tanto los mecanismos de patogenicidad y virulencia del microorganismo como los mecanismos celulares y

moleculares que utiliza el hospedero para defenderse de los patógenos. Es importante identificar también, que antígenos de los microorganismos son capaces de inducir protección al ser administrados, así como estudiar sus características moleculares. A su vez, es de suma relevancia analizar la respuesta inmune protectora que se induce y los mecanismos que participan en la generación de ésta.

El reconocimiento primario del patógeno se lleva a cabo mediante receptores específicos contra moléculas del microorganismo. En el caso de la respuesta inmune innata, dichos receptores son codificados por la línea germinal mientras que para los linfocitos B y T estos receptores son producto de recombinación somática de genes y a su vez sufren modificaciones posteriores a dichas recombinaciones, por lo tanto son capaces de modificarse en el transcurso de una respuesta inmune (2).

1. Respuesta inmune humoral.

Una de las características más sorprendentes de la respuesta inmune humoral es el enorme repertorio de anticuerpos que es capaz de producir; en 1936 Landsteiner reporta sus estudios sobre la respuesta serológica en donde describe que el sistema inmune puede producir anticuerpos contra casi cualquier antígeno externo mientras se mantiene tolerante a lo propio (3). Veintitrés años después, Burnett y Talmage crearon un modelo de trabajo por medio del cual explicaron estas observaciones. A partir de este modelo de trabajo se desarrolló la teoría de la selección clonal (4,5). En esta teoría Burnett propone que cada linfocito produce un solo tipo de anticuerpo y que las clonas de linfocitos son seleccionadas y expandidas por el contacto entre los anticuerpos de la superficie celular y el antígeno, de esta forma los linfocitos B producirán anticuerpos con la misma especificidad que la de receptor de superficie. Los linfocitos por lo tanto, presentan un

receptor único para el antígeno en su superficie celular. Esta hipótesis de “una célula un receptor”, fue confirmada posteriormente por Nossal y Lederberg, quienes nombraron a este fenómeno como “exclusión alélica” (6,7).

En la actualidad se sabe que las Igs de superficie regulan también la fase de desarrollo T-independiente de los linfocitos B y que, además de la selección celular, el sistema inmune forma su repertorio por medio de una selección de receptores.

2. Estructura y función de los anticuerpos.

Las inmunoglobulinas (Igs) consisten de cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas idénticas (H) y dos ligeras idénticas (L) unidas por puentes disulfuro (8,9). Cada cadena H o L esta formada por una porción constante (C) y por una porción variable (V). Las regiones V son las responsables de unir al antígeno, éstas forman el sitio de unión al antígeno denominado paratopo, mientras que las regiones constantes son las encargada de mediar las funciones efectoras como la unión a receptores Fc a través de la región C de la cadena pesada.

La secuencia de aminoácidos de la región V es más variable en tres regiones a las que se les ha denominado regiones determinantes de complementariedad (CDRs), o regiones hipervariables. Estas son las regiones que mantienen contacto directo con el antígeno. Las CDRs se encuentran flanqueadas por cuatro regiones denominadas “estructurales” (FR) que son altamente conservadas (10,11).

Las Ig se han dividido en clases o isotipos (IgM, D, G, E y A) con base en la secuencia de aminoácidos de las cadenas H y en la reactividad de sus regiones constantes con sueros anti-Ig. Estos isotipos corresponden respectivamente a las letras griegas μ , δ , γ , ϵ y α . Por otro lado, las regiones

constantes de las cadenas ligeras se agrupan en dos isotipos denominados κ y λ . Las regiones constantes de la cadena pesada, de la cadena κ así como de la λ son codificadas por diferentes familias de genes, los que a su vez se localizan en diferentes cromosomas (12).

Los anticuerpos desempeñan una gran cantidad de funciones biológicas como son:

- a) Neutralización de microorganismos o de toxinas y su concentración en órganos linfoides secundarios para su procesamiento y depuración.
- b) Opcionización de los microorganismos.
- c) Lisis de los microorganismos a través de la fijación del complemento.
- d) Con el complemento también participan en la fagocitosis de microorganismos.
- e) Inmunidad de mucosas a través de la secreción de IgA en estos tejidos.
- f) Inmunidad en neonatos a través de la transferencia de IgA materna por medio de la leche.
- g) Citotoxicidad celular (eosinófilos y macrófagos) mediada por anticuerpos.
- h) Hipersensibilidad inmediata mediada por la desgranulación de mastocitos.
- i) Inmunidad pasiva del feto y respuesta inmune en neonatos (13).

3. Mecanismos de generación de la diversidad.

Desde hace muchos años se ha reconocido que una característica impresionante de la respuesta inmune humoral es la especificidad con la que interactúa con el antígeno y la gran diversidad de anticuerpos que es capaz de producir. Determinar la extensión de la diversidad de los anticuerpos y los mecanismos que participan en la generación de ésta ha sido motivo de estudio durante mucho tiempo.

Los estudios de Landsteiner (14,15) y de Jerne (16) entre otros, mostraron que cada individuo posee un número extraordinario de anticuerpos con diferentes especificidades. Las teorías para entender la diversidad de los anticuerpos tenían que explicar cómo las regiones constantes de la cadena H y L se escapan de la diversificación. Los modelos propuestos incluyeron: la teoría de la diversidad de la línea germinal, según la cual la evolución produjo una gran cantidad de genes para anticuerpos y la teoría de la diversificación somática, que sostiene que un número pequeño de genes en línea germinal son capaces de diversificarse durante la ontogenia a través de un proceso de mutación somática activo (17).

Utilizando los avances en genética y las secuencias de proteínas, Dreyer y Brennett (18) propusieron que un solo gen de línea germinal codifica para la región constante de la Ig, mientras que la región variable es codificada por diferentes genes V. Ellos propusieron que durante el desarrollo de las células B, uno de los múltiples genes V podría asociarse físicamente con la secuencia que codifica para la región C para de esta forma completar la secuencia V-C, que a su vez podría ser expresada por la célula. Esta hipótesis revolucionaria predijo el mecanismo de recombinación de DNA, que resulta en células del sistema inmune capaces de ser diferentes a otras células que expresan receptores de línea germinal a nivel genómico. La hipótesis de Dreyer y Brennett fue posteriormente comprobada por Hozumi y Tonegawa (19,20). Ellos demostraron con la que los genes que codifican para las regiones V y C de la cadena λ están separados en el DNA embrional y que son rearrreglados para ensamblarse en células B maduras (19-28,123). Las regiones variables de la cadena pesada se ensamblan como producto del rearrreglo de múltiples genes de línea germinal variables (V_H), de diversidad (D) y de unión (J_H), mientras que la cadena ligera es producto del rearrreglo de los genes V_L y J_L (20,29,30).

Los genes variables del *locus* de todos los receptores para el antígeno, incluyendo los de la cadena IgH y los dos IgL (κ y λ), así como los del TCR, son ensamblados por medio de una recombinasa V(D)J común durante estadios tempranos de maduración de las células B y de células T (29, 30 31). Las enzimas necesarias para desarrollar dicha recombinación que además es tejido específica están codificadas en los genes *rag-1* y *rag-2* (31,32). Los rearrreglos V(D)J involucran el reconocimiento de señales específicas de recombinación (RSS) que se encuentran en cada extremo de los genes de línea germinal, en la inserción de cortes de DNA de doble cadena en los sitios de unión de las RSS y en la unión de los segmentos codificantes y RSS (33). Los rearrreglos pueden ocurrir ya sea por mecanismos de eliminación o de inversión. Las señales de recombinación que flanquean a los genes V, D y J están constituidas por tres partes: un heptámero conservado, un espaciador de 12 o de 23 pares de bases y un nonámero conservado (29). La recombinación ocurre usualmente entre un segmento flanqueado por una señal de recombinación con un espaciador de 12 pares de bases con otra con un espaciador de 23 pares de bases. La recombinación entre dos genes flanqueados por RSS con orientaciones opuestas, localizados en el cromosoma entre dos segmentos de recombinación, resulta en la eliminación de las secuencias involucradas. Sin embargo, la recombinación entre segmentos flanqueados por RSS con la misma orientación dan como resultado la inversión de los genes involucrados.

En algunos *loci* endógenos, los genes V y las RSS se encuentran configurados de tal forma que tanto las uniones por eliminación como por inversión pueden ocurrir. En el caso de la cadena κ tanto del ratón como del humano, los segmentos V_{κ} se encuentran en ambas direcciones transcripcionales y por lo tanto se pueden rearrreglar por eliminación o por

inversión (34,35). En el caso del *locus* λ , los genes V se encuentran en una sola orientación por lo que sólo se rearreglan por medio de eliminación (36).

3.1 Exclusión alélica e Isotípica:

En la teoría de Burnet cada célula productora de Ig expresa una sola especificidad, sin embargo, cada célula linfocito B tiene dos *loci* para la cadena pesada y cuatro *loci* para la ligera. Si cada célula expresara la información contenida en sus cromosomas, entonces ¿Cómo es posible que las células expresen anticuerpos con sólo una especificidad?. A través de los estudios con antisueros se pudo distinguir que las proteínas de la cadena pesada y ligera encontradas en el 99% de linfocitos B individuales, corresponden a un sólo alelo tanto de la cadena pesada como de la ligera (29,37,38). A este fenómeno se le denominó exclusión alélica (37,38). No obstante este fenómeno y aún en las condiciones más estrictas de exclusión alélica, el linfocito B es capaz de expresar ambas cadenas ligeras κ y λ y de esta manera expresar dos diferentes receptores. La existencia de sub-*loci* funcionales de λ hace posible que un linfocito exprese múltiples receptores. A pesar de esto, las células B expresan receptores con una solo isotipo de cadena ligera, a éste fenómeno se le ha denominado "exclusión isotípica de cadenas ligeras" (37-39).

3.2 Diferenciación de células B:

Las células B provienen de células pluripotenciales que se diferencian en el hígado fetal y en la médula ósea adulta, estas células pasan por estadios de desarrollo altamente regulados en donde rearreglan y expresan los genes de las Ig (29,30,40). Las células Pro-B sufren de rearreglos D a J_H y de V_H a DJ_H . Las células Pre-B completan exitosamente los rearreglos V_H

a DJ_H y expresan la cadena μ . Los linfocitos B inmaduros a su vez han completado el rearrreglo de las cadenas ligeras y de esta manera son capaces de expresar IgM en su superficie, mientras que los linfocitos B maduros son capaces de expresar simultáneamente IgM e IgD por medio de un empalme o "splicing" alternativo de los transcritos de las cadenas pesadas.

Estas células migran al bazo, ganglios linfáticos y placas de Peyer en donde son capaces de seguir procesos de activación y diferenciación a través de la unión con el antígeno específico. Los precursores de las células B en sus diferentes estadios de desarrollo pueden estudiarse a través de marcadores de superficie que son detectados por medio de citometría de flujo (41).

En ratones, todo el linaje de células B expresa los marcadores CD45R/B220. Por medio de citometría Hardy y cols (41) identificaron precursores de células B como slg⁻ que son B220⁺/CD43⁻. La población de células B220⁺/CD43⁻/slg⁻ incluyen células pro-B en las que ocurren rearrreglos D a J_H y V a DJ_H (42). Después de un rearrreglo productivo y del rearrreglo de las cadenas ligeras la célula B inmadura se convierte en B220⁺/CD43⁻/slg⁺.

3.3 Generación de la diversidad del repertorio:

En los humanos como en los ratones, el repertorio primario de Ig se genera antes de la exposición al antígeno, a través de los procesos de unión de los genes V(D)J. La diversidad es enorme y es el resultado del uso de 100 o más genes V_H y V_K de línea germinal diferentes los cuales codifican para las primeras tres regiones FR así como para el CDR1 y 2 (11). El uso de combinaciones aleatorias de segmentos V, (D), y J para ensamblar el CDR3 del gene V introduce una diversidad enorme. La imprecisión de las uniones V(D)J da como resultado la adición o pérdida de

nucleótidos al sitio de unión V(D)J lo cual añade mayor diversidad. La adición de nucleótidos denominados segmentos N es mediada por la enzima TdT, la cual está activa durante los rearrreglos de la cadena pesada pero no de la cadena ligera (43-46). Las cadenas ligeras se asocian con las pesadas adicionando otro nivel de diversidad.

Durante la expansión clonal, producto de la unión con el antígeno, la hipermutación somática da como resultado una serie de cambios individuales de nucleótidos a lo largo de todo el gene V réarreglado, incluyendo el CDR1, 2 y 3 (47). El proceso de hipermutación somática modifica molecularmente al anticuerpo proporcionando cambios en su afinidad por el antígeno. Las células que presentan mayor afinidad por el antígeno en cuestión, son seleccionadas y expandidas durante este proceso (48).

El mecanismo de unión V(D)J es impreciso, por lo que se pueden obtener uniones que no mantengan el marco de lectura. El codón de iniciación del gene V predice que uno de tres uniones será productiva, la fidelidad del proceso de unión puede ser afectada por pequeñas regiones de homología entre los extremos de los segmentos réarreglados, lo que pudiera representar el uso preferencial de marcos de lectura productivos y no productivos en las reacciones de unión entre segmentos específicos (49).

Existen muchas evidencias experimentales que han confirmado que una de tres uniones son productivas durante los rearrreglos con la región constante de la cadena pesada (50). Para el caso del *locus* κ se determinó por medio de la secuenciación de las uniones, que un gran número de células poseen uniones no productivas (51,52). Además, la presencia de pseudogenes en el *locus* κ de ratones y de humanos ha permitido estimar que sólo una de cinco uniones es capaz de codificar una proteína (53). Sin embargo, la frecuencia de las uniones secuenciales de $V_{\kappa}J_{\kappa}$ en cada

cromosoma κ (54) significa que la proporción de uniones productivas en el cromosoma κ es mucho mayor a 0.3. La frecuencia medida de uniones productivas por cada cromosoma κ ha sido estimada en 0.6, lo cual sugiere que los rearrreglos secuenciales del *locus* κ son la regla más que la excepción (55). La secuenciación de las uniones λ ha sugerido así mismo, que la mitad de las uniones λ en linfocitos B periféricos son productivas (56,57), posiblemente debido a uniones dirigidas por homología.

Siguiendo el ejemplo de Jerne (16) muchos investigadores en el campo de la formación del repertorio encuentran que es muy útil distinguir entre tres conceptos sobre el repertorio: El repertorio teórico o potencial, el repertorio disponible y el repertorio útil (199). El repertorio teórico o potencial se obtiene multiplicando el número de genes individuales de los segmentos que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de las moléculas de anticuerpo, considerando las reglas de recombinación conocidas y asumiendo algunas contribuciones estocásticas y las limitaciones de las uniones de combinación. Los cálculos dan lugar a un repertorio potencial o teórico en el ratón de 10^9 - 10^{11} . De todo este repertorio potencial se ha visto que sólo es expresado una pequeña parte como anticuerpos funcionales, a este repertorio se le denomina repertorio disponible. El número de linfocitos B con receptores de Ig diferentes en su superficie en el ratón adulto se ha calculado es de 10^7 . Sin embargo, los receptores que conforman a este repertorio disponible son el resultado de la expresión de sólo unas pocas familias de genes (que varía en las diferentes cepas de ratones), por lo que gran parte del repertorio potencial no es expresado en el repertorio disponible. A pesar de que se asume que cualquiera de estas especificidades pudieran ser utilizadas durante una respuesta inmune, es reconocido también que muy pocas son realmente

usadas para este motivo, a este repertorio se le denomina repertorio útil (199).

4. Rearreglos secundarios de Inmunoglobulinas.

La organización de los genes de las Ig muestra características que parecieran estar adaptadas para promover rearrreglos secundarios en el caso de los *loci* de la cadena L, mientras que para la cadena H, los evitarían. Los rearrreglos secundarios son rearrreglos génicos de los alelos que ya han ensamblado los genes de la región V. Este tipo de rearrreglos puede reemplazar rearrreglos primarios que quedan fuera de marco de lectura y de esta forma salvarían al receptor. A su vez, pueden funcionar modificando un receptor funcional o bien inactivando todo un *locus*. El *locus* κ está particularmente adaptado para llevar a cabo rearrreglos secundarios. Este *locus* no posee segmentos D, por lo que después de una unión primaria $V_{\kappa}J_{\kappa}$ en un alelo, es posible llevar a cabo rearrreglos secundarios entre los segmentos V_{κ} 5' o los segmentos J_{κ} 3' en un solo paso.

En el ratón, durante los rearrreglos primarios son favorecidos los rearrreglos de $J_{\kappa 1}$ y $J_{\kappa 2}$ (58), por lo que los rearrreglos primarios que usan estos segmentos dejan disponibles en el extremo 3' segmentos J_{κ} para rearrreglos secundarios (59). La observación de cortes de DNA de doble cadena en las RSSs es consistente con la noción de que los rearrreglos ocurren progresivamente en los segmentos J_{κ} de 5' a 3' (60). Además, el *locus* κ se rearregla frecuentemente por medio de inversión, reteniendo de esta manera el repertorio completo de V_{κ} para subsecuentes rearrreglos. En cambio, los rearrreglos por eliminación originan la formación de episomas provocando que se pierda esta información del cromosoma. El *locus* κ del humano o del ratón es capaz de sufrir dos o más recombinaciones V-J en

un mismo alelo (61-67). El DNA escindido producto de la recombinación V/J contiene frecuentemente uniones VJ previamente generadas, sugiriendo que rearrreglos secundarios en κ son comunes en células no transformadas (68,69).

4.1 Secuencias de recombinación (RS) en el ratón y elementos de eliminación de κ (kde) humanos:

Los elementos de recombinación (RS) inactivan el *locus* κ por recombinación-eliminación (70,125). Los RS se encuentran ~25 kb 3' del exón C κ (71) y los kde, se encuentran en una posición similar en el locus humano (72). Ambos RS y kde contienen secuencias RSS con un espaciador de 23 pares de bases (bp) que puede recombinar a través de un proceso recombinasa V(D)J dependiente, ya sea con V κ s no rearrreglados o con sitios RSS no canónicos en el intrón J κ -C κ (69,73). Los rearrreglos RS/kde ocurren en aproximadamente el 75% de los linfocitos B del ratón que expresan cadena λ (74,75) y en una proporción mayor en linfocitos B humanos (75,76). Los rearrreglos RS ocurren en aproximadamente 12% de las células de ratón κ (77). Ya que las RS/kde no codifican una proteína, estas uniones no son funcionales (73,78), por lo que se piensa que estas secuencias sirven sólo para inactivar los genes κ , lo cual sucede frecuentemente después de una recombinación funcional (75). Ya que los rearrreglos de RS ocurren simultáneamente con los rearrreglos de λ , esto pudiera servir para dejar libre el camino para la expresión de λ (78,79). De esta forma, pareciera que la estructura del locus κ favorece reacciones de reemplazo para la edición de receptor.

4.2 La edición del receptor como un mecanismo de tolerancia inmunológica:

El uso de ratones transgénicos que expresan una cadena H y L ya rearrreglada y con una especificidad previamente definida (80) ha estimulado el análisis de la tolerancia de células B y T (81). Los ratones transgénicos cuyos receptores para el antígeno son específicos para: moléculas de histocompatibilidad clase I (MHC I), DNA, eritrocitos y lisozima de gallina (en ratones que la expresan como antígeno propio) entre otros, han permitido definir algunos de los mecanismos de control de la autorreactividad. En los modelos transgénicos de autoanticuerpos, las células B en desarrollo que expresan el receptor autoreactivo desaparecen del sistema linfóide periférico cuando encuentran al antígeno de manera multivalente, aunque es posible encontrar una población de estas células con niveles bajos de expresión del autorreceptor en la médula ósea (82,83,84). Dos líneas experimentales sugirieron que la edición de receptor (la inducción de rearrreglos secundarios por contacto con el autoantígeno) podría ser el mecanismo de tolerancia en los ratones arriba mencionados.

Tiegs *et al* (85) encontraron que en el ratón transgénico 3-83, en cuyas células B expresan anticuerpos específicos contra las moléculas MHC clase I, aloantígenos H-2K^k y H-2K^b, la mayoría de los linfocitos B expresan el anticuerpo transgénico. No obstante, cuando el autoantígeno fue introducido al sistema por medio de la cruce de estos ratones con los del fondo genético H-2K^k o H-2K^b, el número de linfocitos B en el bazo y en los ganglios linfáticos de estos ratones se encontró disminuido y estas células no expresaron el receptor autorreactivo.

Las células B remanentes conservaron la cadena H transgénica mientras que la cadena ligera fue reemplazada, en la mayoría de los casos se substituyó por una cadena λ endógena. En las células B Ig⁺ de médula

ósea de los ratones transgénicos se encontraron altos niveles de expresión de RNA mensajero de RAG que se relacionó con los rearrreglos en el *locus* endógeno de la cadena L. Con base en estos hallazgos, se propuso que la unión del autoantígeno con el receptor correspondiente en el linfocito B inmaduro es capaz de reinducir o de prolongar los rearrreglos de la cadena L, modificando así la especificidad de estas células y dando una señal de supervivencia en vez de una señal de muerte. A su vez se propuso que este mecanismo ocurre en ciertas poblaciones de linfocitos B inmaduros, ya que en los ratones 3-83 que expresan el autoantígeno en la periferia, bajo el control de un transgene específico para el hígado, hubo una eliminación exhaustiva de los linfocitos B sin que se apreciara edición de receptor.

Otras evidencias a favor de la edición de receptor fueron obtenidas en ratones transgénicos que expresan anticuerpos H+L (3H9) con especificidad contra DNA de doble cadena (DNAdc) (86,124). Se estudiaron linfocitos B de bazo e hibridomas generados a partir de estos ratones. Ningún hibridoma presentó la especificidad contra DNAdc lo cual indica que se activó un proceso de tolerancia. Sin embargo, los linfocitos B del bazo se encontraron en números normales, principalmente en ratones adultos. Estos linfocitos B expresan la cadena pesada transgénica 3H9, mientras que la cadena transgénica L fue substituida. Los hibridomas expresaron la cadena L endógena del ratón, lo cual eliminó la especificidad contra DNAdc y en un caso este fenómeno fue reversible cuando la cadena κ se perdió, lo cual sugiere que el transgene H con la cadena L endógena eliminan la expresión de la cadena L transgénica. Además de la exclusión alélica observada, se observó que estos híbridos usan en exceso los segmentos V_{κ} 12/13 asociados con J_{κ} s. En ratones control, transgénicos sólo para la cadena L 3H9, sólo 6/25 híbridos no expresaron la cadena L endógena, los restantes que sí la expresaron mostraron la distribución típica en el uso de regiones V_{κ} y J.

Estudios posteriores en ratones 3H9 que expresan sólo la cadena H transgénica mostraron que las células de bazo de estos animales expresaban receptores que perdieron la reactividad contra el DNAdc, a pesar de que esta cadena H unida con varias cadenas L es capaz de unir DNAdc. Por medio del análisis de hibridomas obtenidos a partir de células de bazo de estos animales, se pudo determinar que los linfocitos B de estos ratones utilizaron un repertorio muy limitado de genes V_{κ} . La mayoría de los hibridomas obtenidos de estos animales utilizaron $V_{\kappa}12/13$ que a su vez rearreglaron con ciertas J_{κ} en especial con $J_{\kappa}5$. También se encontró que en estas células se realizaron varios rearreglos en el mismo cromosoma lo cual sugirió que esta es la razón por la cual se favoreció el uso de ciertos segmentos J_{κ} . Esto permite suponer que varias uniones VJ producidas por los rearreglos secundarios se encontraban en marco de lectura y que fueron funcionales. Sin embargo, esto no se demostró experimentalmente (66,87-89). En otro estudio, realizado en ratones que expresan diferentes combinaciones de cadenas H con V_H11 anti-DNA, se encontraron resultados similares a los arriba reportados (66). En estos animales no existe cadena ligera transgénica por lo que se piensa que el desarrollo de los linfocitos B es normal y ya que la apoptosis de las células autorreactivas no explica el uso favorecido de ciertos segmentos J_{κ} . Estos resultados sugieren que las células autorreactivas fueron rescatadas por medio de la recombinación de Ig- κ .

4.3 Edición de receptor en ratones a los que se les ha insertado el transgene de Ig en el locus específico de Ig:

En los ratones transgénicos hasta ahora mencionados, el transgene ha sido incorporado al genoma del ratón de manera aleatoria, es decir, no se conoce la posición del transgene. Sin embargo, en la actualidad existe la posibilidad de insertar el transgene en una posición definida; a este proceso se le ha denominado “gene targeting” o inserción transgénica dirigida. Los ratones con inserción de un transgene de autoanticuerpo en el *locus* de Ig se crearon para simular lo más posible una situación natural y para probar el reemplazo de V_H *in vivo*. En teoría, la inserción dirigida de un transgene en su locus natural debería favorecer la edición de receptor ya que los rearrreglos secundarios en el alelo blanco pueden modificar o eliminar la expresión del autoanticuerpo. En los ratones transgénicos convencionales, la supresión de la expresión del transgene es muy ineficiente ya que los transgenes pueden estar insertados en cromosomas que no son potencialmente accesibles a la maquinaria de los rearrreglos. Además en los ratones con inserciones transgénicas dirigidas de la cadena H, conservan las regiones D en el extremo 5', las cuales normalmente son eliminadas durante la recombinación VDJ. Estas regiones D son capaces de rearrreglar con los segmentos J remanentes en el transgene o con los heptámeros embebidos en la región V_H blanco. En los primeros estudios realizados en este tipo de ratones, no se identificó a un heptámero embebido en la secuencia V_H insertada. Sin embargo, en estudios posteriores se detectó la presencia de rearrreglos destructivos causados por la unión de segmentos D en regiones similares al heptámero dentro del transgene (90). En otro estudio, se encontró una alta frecuencia de edición por medio de las regiones D, pero además se encontró reemplazo de V_H a VDJ, lo cual rescató la función de la cadena H (91). Esto ya se había predicho en

trabajos previos realizados en líneas celulares (92,93). Estos datos, junto con las observaciones hechas en otros ratones con inserciones dirigidas, han verificado que los eventos de reemplazo en el *locus* Ig-H son frecuentes en estos animales, e indican que los rearrreglos son capaces de modificar la especificidad *in vivo* (94-97). Sin embargo, se sigue debatiendo acerca de la frecuencia, especificidad e inducción de tolerancia inducidas por el reemplazo de V_H (98).

Los análisis *in vitro* mostraron que el heptámero embebido en el transgene es extremadamente ineficiente como blanco de recombinación V(D)J comparado con las RSS convencionales (99). La recombinación V_H a VDJ incluye casi siempre la adición de segmentos N derivados de la actividad de la enzima TdT, lo cual indica que la mayoría de los reemplazos se llevan a cabo en el estadio pro-B, previo al rearrreglo de la cadena L (91,94,95). Esto sugeriría que la señal tolerogénica no deriva del contacto con la Ig de superficie en el caso del reemplazo V_H -VDJ. Para estudiar este fenómeno, se utilizaron ratones con inserciones dirigidas de un transgene para la cadena H y L. Chen y col. (100) coexpresaron los genes 3H9H/ $V_{\kappa 4}$ con especificidad contra DNA de cadena sencilla (DNAcs). En estos ratones, la edición de receptor ocurrió en los genes de la cadena L. Además, se reportó que tanto los transgénicos convencionales como los de inserción dirigida 3H9H/ $V_{\kappa 8}$ mostraron un uso exagerado de $V_{\kappa 12/13}$ junto con el uso preferente de ciertos J_{κ} . Estos resultados sugieren que la tolerancia inducida por la edición de receptor se concentró en la cadena L y que este proceso puede ser inducido por moléculas tolerogénicas fuertes o débiles, en este caso, representadas respectivamente por DNAdc y DNAcs (100).

En otro estudio se utilizaron ratones 3-83 cuya especificidad de la cadena $\kappa + H$ o bien sólo de la cadena H es dirigida contra MHC H-2K^k y H-2K^b. Estos ratones fueron generados por medio de inserciones dirigidas de

los transgenes. Como control para el estudio se utilizaron 3-83κ cruzados con un ratón transgénico H de especificidad irrelevante (101). En estos ratones, la edición de receptor se llevó a cabo principalmente en la cadena L, y fue más activa en las células autoreactivas que en las que expresaban un receptor inocuo. En los ratones con el transgene H+L inocuo, la población de linfocitos preB pequeños (fracción D de Hardy (41)) se encontraba ausente, debido a una progresión acelerada en el desarrollo. Sin embargo, en los ratones con receptores autorreactivos que sufrieron de edición de receptor, este compartimiento celular se encontró bastante desarrollado, lo cual sugiere que la edición de receptor causó un retroceso de Ig⁺ a Ig⁻ en el desarrollo de estas células. Esto se debe quizás a la frecuencia tan alta de rearrreglos secundarios no funcionales asociados con la inactivación del gene autorreactivo. En conjunto, estos estudios muestran que la edición de receptor es un mecanismo que permite rescatar eficientemente células autorreactivas, ya que en la periferia, el número de linfocitos B se mantuvo relativamente normal (196,197).

La edición de receptor ocurre primordialmente en linfocitos B inmaduros y se centra principalmente en la cadena L, aunque se ha descrito que también se puede presentar en la cadena pesada (102). Las evidencias experimentales que han dado indicios de esto es la ineficiente exclusión alélica observada ya sea para la cadena L en unos modelos o bien en otros para la cadena H. Las células B inmaduras de médula ósea son sensibles a la inducción de tolerancia por edición de receptor. Sin embargo, conforme van madurando, van perdiendo dicha sensibilidad y se van haciendo más sensibles a la apoptosis. Estas células pueden ser diferenciadas por marcadores de superficie (103) y por su habilidad posterior de migrar al bazo (104). Se ha podido realizar un análisis más detallado de las células B susceptibles a la edición de receptor gracias a que estas células pueden ser expandidas selectivamente a partir de la médula ósea, utilizando IL-7 y

siguiendo su desarrollo después de retirar dicha Interleucina (105,106). En estos cultivos, el retiro de IL-7 es necesario para la expresión de la recombinasa, posiblemente debido a que los eventos del ciclo celular en células que proliferan suprimen la expresión de la recombinasa. La proteína RAG-2 se degrada selectivamente en células que han entrado al ciclo celular (107). Durante el retiro de la IL-7, mientras las células expresan cantidades crecientes de Ig, la habilidad para responder a los retos antigénicos por medio de la edición disminuye, mientras que la sensibilidad a la apoptosis se incrementa concomitantemente. Después de esto, en algún momento de la maduración, las células B fijan su receptor con el fin de participar en una respuesta inmune. Esta inhabilidad de llevar a cabo la edición de receptor en respuesta a un antígeno sólo tiene sentido en el contexto del modelo general de selección clonal.

4.4 La contribución de la edición de receptor en la diversificación del repertorio:

Además de ser un mecanismo de tolerancia inmunológica, la edición de receptor pudiera tener otras ventajas biológicas. La recombinación V(D)J es un fenómeno que está lejos de ser aleatorio, ya que existen diferencias dentro de las señales de recombinación de los diferentes grupos de segmentos variables y de unión, en las regiones promotoras y en la proximidad de ciertos elementos de regulación en *cis* que en conjunto afectan la eficiencia de la recombinación. Como resultado de esto, el incremento en la representación de ciertos genes es común y quizás inevitable. De esta forma, los rearrreglos secundarios y otros rearrreglos pudieran participar de manera importante en promover un grado mayor de aleatoriedad en el uso de los genes V y J que el generado por una sola recombinación (108).

4.5 La edición del receptor en linfocitos B maduros es denominada *revisión de receptor*:

La habilidad de promover la diversificación de los receptores en los linfocitos B no se encuentra limitada a las células inmaduras; también ha sido descrita en linfocitos B maduros en los centros germinales (109-113). Los primeros indicios de que este fenómeno era posible provinieron de células B maduras que, en la reacción de los centros germinales o en cultivos en condiciones especiales, fueron capaces de expresar RNAm de RAG. El análisis histológico de los bazo y nódulos linfáticos de los ratones inmunizados indicaron que el tipo de célula que expresaba RAG *in vivo* era el centrocito (109,110,114). El centrocito es una célula que no se divide pero que ha proliferado recientemente en el centro germinal, que además es seleccionada y mantiene una interacción muy cercana con la red de células dendríticas foliculares (115). El cultivo de linfocitos B de bazo con agonistas de CD40 y con IL-4, probablemente imitando la interacción con los linfocitos T e induciendo el switch de Ig, fue capaz de inducir la expresión de los genes RAG en estas células (112,114,115). A su vez, el tratamiento de linfocitos B de bazo con LPS e IL-4 produjo el mismo efecto (109,114).

Estudios ulteriores sugirieron que la IL-7 puede sustituir a la IL-4 y que es *in vivo*, probablemente una citocina muy importante para la expresión de RAG en los centrocitos, ya que anticuerpos anti- IL-7R aunque permitieron la formación de los centros germinales evitaron la expresión de RAG (115).

Para distinguir entre los rearreglos secundarios de Ig en células inmaduras y células maduras se acuñó el término de "revisión de receptor" (110).

El paralelismo en los fenómenos observados en las células que sufren revisión de receptor y células inmaduras apoyan la hipótesis de que los linfocitos B de centros germinales son capaces de reactivar programas genéticos característicos en células B menos maduras. A este concepto se le ha denominado "neotenia" (110). La reprogramación pudiera ser activada por una mutación letal en V_H o V_L . Estas mutantes podrían ser muy parecidas a las células pro-B o pre-B, u otros fenotipos en los cuales la expresión de RAG pudiera ser activada.

Las similitudes entre las células de la médula ósea y las células en los centros germinales que expresan RAG, abren la posibilidad de que la edición de receptor observada en la periferia sea producto de células B inmaduras que han emigrado a este sitio. En estudios más recientes, se ha analizado la expresión de RAG utilizando ratones indicadores de la expresión de esta enzima(200-202). Nussenzweig y cols., generaron un ratón transgénico que contiene el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) en los elementos cis del gen RAG (200). En estos ratones, las células B de la periferia que expresan GFP tienen un fenotipo de células que recientemente arribaron de la médula ósea. Además al utilizar estímulos que se relacionaron con la reexpresión de RAG *in vitro* o *in vivo*, no fueron capaces de activar la expresión de la GFP en estas células (200). Alt y col., introdujeron el gen de la GFP en el locus de RAG-2 (201). Estos ratones perdieron la expresión de la GFP conforme las células B maduraron. Esto se debe a que este gen es en parte regulado a través de su estabilidad proteínica. Después de la inmunización de estos ratones, se encontró la generación de centros germinales y la expresión de RAG en células con poca expresión de Ig de superficie que no se sabe si son típicas del centro germinal (201). En otro estudio Sakaguchi y cols. (202), introdujeron el gen de la GFP en el locus de RAG-1 y estudiaron la expresión de la proteína en linfocitos B-1 (en los cuales se ha reportado la expresión de RAG (118)). En

estos ratones se encontró que sólo el 1% de las células B-1 CD5* expresaron RAG. No obstante, se encontró también que un grupo de linfocitos B B-2 aparentemente nuevo, expresó RAG. En conjunto estos estudios sugieren que en la periferia son pocos los linfocitos que llevan a cabo la recombinación V(D)J y sugiere que las células que expresan RAG en la periferia son fenotípicamente inmaduras.

Para reconciliar las evidencias estos estudios con los que muestran revisión en células llevando a cabo hipermutación, debemos asumir que las células B inmaduras pueden participar en la reacción del centro germinal, o bien que las células B que revisan su receptor son muy raras o difíciles de detectar.

Ciertas características de la revisión de receptor son paradójicas. La expresión de RAG en células B maduras se ha asociado fuertemente con la muerte del linfocito B tanto *in vivo* como *in vitro*. Así mismo, la expresión de RAG se ha descrito en células que son fagocitadas por macrófagos (109,114). El análisis histológico de los centros germinales ha revelado que la expresión de las proteínas RAG se localiza principalmente en el citoplasma, y no tanto en el núcleo de las células (109,110). Los productos de los genes RAG inducidos *in vivo* e *in vitro* fueron capaces de producir cortes de DNAdc adyacentes a las señales de recombinación (113) y la expresión de nuevas cadenas L (112,113,116). La revisión de receptor podría dar como resultado uniones fuera de marco de lectura, induciendo la muerte de las células Ig⁻. Esto pudiera explicar por qué, otros estudios, encontraron la expresión de RAG principalmente en células moribundas.

Uno de los aspectos más intrigantes es que la fracción celular que expresa RAG expresa a su vez otros marcadores característicos de precursores de células B incluyendo la componentes de la cadena surrogada (117), IL-7R (115), el marcador celular GL-7 (110) y en células humanas de centro germinal, la TdT (117). La reexpresión de los

componentes de la cadena surrogada es particularmente interesante ya que muchos eventos de edición silencian inicialmente la producción de la cadena L, por lo que es probable que la cadena L surrogada se utiliza para unirse temporalmente a la cadena H. La expresión de los componentes de la cadena surrogada ha sido observado también en centroblastos que entran en el ciclo celular (117). Estas similitudes inesperadas señaladas por Han, Kelsoe y col. (110,111,115) entre células en la periferia en proceso de revisión del receptor y células inmaduras sugieren que muchos elementos del desarrollo de linfocitos B son repetidos durante la respuesta inmune, o bien que existe la presencia de una población de células B inmaduras que llegan a la periferia.

Existen otras diferencias en la expresión de la recombinasa en los procesos de edición y revisión del receptor. En el microambiente de la médula ósea, las células B inmaduras requieren únicamente de la unión del antígeno con el BCR para llevar a cabo la edición del receptor, mientras que en células del centro germinal, diversos estímulos son capaces de inducir la revisión de receptor, aquí la estimulación del BCR en estas condiciones, bloquea la expresión de la recombinasa (116,117).

En un estudio la expresión *in vivo* de RAG se pudo determinar en un grupo de centrocitos del centro germinal que fue definido como una población con baja expresión de CD45 y con uso subóptimo de genes para el inmunógeno en cuestión (111). Por todos estos motivos, es poco probable que se induzca tolerancia inmunológica por rearrreglos de V(D)J en las células de los centros germinales. La contribución más importante de este mecanismo sería la diversificación del repertorio.

Weigert y col. identificaron una clona anti-DNA_{dc} proveniente de un ratón MLR/lpr la cual contenía inserciones dirigidas de transgenes L y H que codifican para un anticuerpo con especificidad anti-DNA. En esta clona, el transgen L estaba altamente mutado y todos los miembros de la clona

mostraron una mutación que codifica para una señal de paro de la transcripción, la cual es letal. La clona expresó una segunda cadena L proveniente del otro alelo κ , que había sufrido algunas mutaciones; asumiendo que el rearreglo del nuevo gene κ apareció tiempo después de la iniciación de la mutación somática, estos resultados implican que la revisión puede ocurrir en células que sufrieron hipermutación y que la edición puede ser estimulada específicamente por la pérdida de la expresión del BCR (108). Otro estudio propone que la edición de receptor puede ocurrir en células B-1 de ratón (118), células que no se cree que participen en la reacción del centro germinal. Las células B de peritoneo IgM^+B220^{bajo} , particularmente las provenientes de los ratones de la cepa NZB son muy propensas a la autorreactividad, éstas mostraron la expresión de RNAm y la presencia de cortes de DNA de doble cadena en las RSS de los segmentos $J\kappa$. En ratones con inserciones dirigidas y funcionales de los genes variables de H y L, se perdió el determinante de idiotipo en las células B-1, lo cual es indicativo de edición de receptor. La función de dichas modificaciones no es clara y, como en el caso de las células B de los centros germinales, tiene implicaciones importantes en la generación de autoanticuerpos. Es de suma importancia determinar las señales que estimulan la edición en células B-1.

En todos los estudios arriba mencionados (111-113,115,117,118) la revisión de receptor ocurrió en los genes de la cadena L. Un solo estudio dio evidencia de que probablemente la revisión del receptor ocurre en el *locus* IgH (113). En este último trabajo se observó que la revisión de receptor operó a través de la recombinación no fisiológica D a VDJ, quedando abierta la posibilidad de la recombinación fisiológica V a VDJ. Este modelo representa una herramienta ideal para estudiar la contribución de la revisión del receptor a través del *locus* IgH , eventos que por cierto son extremadamente raros en células B normales. Queda pendiente determinar

si la revisión del receptor en el *locus* H puede ocurrir mediante reemplazos V a VDJ.

4.6 Posibles funciones de la revisión del receptor:

La revisión del receptor podría ser ventajosa en diversas circunstancias, dependiendo de la relación temporal que guarde con otros mecanismos de diversificación como la hipermutación somática y del linaje celular en donde ocurre. La inserción de mutaciones que introdujeran codones de terminación en las secuencias de DNA sería abortiva, por lo que la revisión de receptor podría rescatar a las células que sufren este proceso. Alternativamente o adicionalmente, la revisión del receptor podría preceder a la mutación somática. La revisión después de la proliferación celular, producto del encuentro con el antígeno, podría permitir probar nuevas combinaciones H + L que posiblemente serían mejores que las ya seleccionadas; a su vez, la revisión en el alelo no expresado permitiría la evolución más rápida de las clonas ya que se expresaría transitoriamente una cadena L por inclusión alélica, lo cual permitiría a la célula probar una cadena L mientras conserva la anterior. Posteriormente, la selección clonal en conjunto con la mutación o la recombinación podrían inactivar el alelo menos funcional, posibilidad que ha sido corroborada experimentalmente en ratones transgénicos expresando múltiples copias del transgene (119). La revisión de la cadena H podría ocurrir en el segundo alelo, esto podría explicar los hallazgos inesperados obtenidos en células B autoinmunes de ratones transgénicos para la cadena H (120). Existen múltiples evidencias de que la revisión de receptor ocurre antes, durante o después de la mutación somática; no obstante, la frecuencia de la revisión de receptor sigue siendo una pregunta sin respuesta (108).

4.7 Implicaciones y problemas del concepto de selección de receptor a través de los rearrreglos secundarios de Ig:

Se han propuesto dos hipótesis para explicar la manera en que el repertorio de la respuesta inmune es regulado: La primera es a través de la selección clonal que regula el crecimiento y muerte de la célula y la segunda es la selección de receptor en donde la señalización a través del receptor de Ig juega un papel importante en regular la modificación o el reemplazo de un receptor funcional. En este proceso de selección de receptor participarían los rearrreglos secundarios de Ig junto con la hipermutación somática y la conversión de genes (108).

Existe una gran controversia acerca de la contribución fisiológica de cada uno de estos mecanismos tanto en la inducción de tolerancia como en inmunidad. Por ejemplo, en el ratón existen cuatro regiones J funcionales para la cadena κ lo cual permitiría un máximo de ocho rearrreglos y otros cuatro para λ . En el humano existe un mayor número teórico de rearrreglos posibles para la cadena L. Sin embargo, las evidencias experimentales muestran que los linfocitos B del repertorio preinmune han rearrreglado sólo una de sus alelos κ (121). Por otro lado, la mayoría de las células B de bazo en los ratones usan $J_{\kappa 1}$ o $J_{\kappa 2}$ en sus cadenas κ funcionales (58).

Estos datos sugieren que la edición de receptor no es frecuente en el repertorio preinmune del ratón. Una posible explicación de la ausencia de edición en células con cadena κ , es que la mayoría de las células que hubieran modificado su receptor, estarían representadas en la población de linfocitos B que expresan cadenas L λ . En la mayoría de estas células se ha demostrado la presencia de rearrreglos en el locus κ . De esta manera, es posible imaginarse que la edición de receptor sería más útil para rescatar combinaciones VDJ_H que son intrínsecamente propensas a la

autorreactividad, permitiéndoles participar en el repertorio al combinarse con nuevas cadenas L.

Una crítica general al concepto de edición de receptor es que aunque la edición podría ser un mecanismo para mantener la tolerancia, ésta ocurre en medio de un gran desperdicio celular en todos los niveles. Diariamente se generan alrededor de 5×10^6 células B en la médula ósea de un ratón. No obstante, sólo es necesario reemplazar alrededor de 10^5 células por día (122). Si el salvar células B en desarrollo es tan importante para necesitar de un mecanismo como la edición de receptor, entonces ¿por qué se permite tanta extravagancia hematopoyética?. Es probable que la edición de receptor sirva para disminuir la gran pérdida diaria de células o permita evitar la pérdida de ciertas especificidades poco representadas en el repertorio, o también podría evitar la pérdida de genes que rearreglan poco y de esta forma compensar las preferencias de rearreglos en unos segmentos durante el desarrollo de los linfocitos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La complejidad del proceso de reconocimiento y la heterogeneidad de los receptores del linfocito B y sus ligandos es enorme, por lo que el repertorio debe ser regulado de manera muy estricta para evitar que se produzca autoinmunidad y al mismo tiempo para producir una respuesta eficiente contra los microorganismos. A pesar de que el repertorio teórico de Igs es muy extenso, sólo muy pocas familias de genes Ig son representadas tanto en el repertorio disponible como en el repertorio útil durante una respuesta inmune, por lo que no se conoce cuanto del enorme repertorio teórico es realmente necesario para producir inmunidad. Un ejemplo de la regulación sobre los receptores es el hecho de que el 95% del repertorio disponible de anticuerpos del ratón y de los humanos expresan cadenas L κ ya que el rearreglo de estas cadenas es favorecido durante la selección de receptores en la exclusión isotípica. Este fenómeno se mantiene durante la respuesta inmune, por lo cual la mayoría de los anticuerpos protectores contra patógenos descritos hasta ahora expresan la cadena L κ . Por todo lo anterior, no se sabe si los anticuerpos que expresan cadena L λ son capaces de realizar las mismas funciones que los L κ .

Por otro lado, para la formación del repertorio útil, en particular en la formación de anticuerpos protectores, se ha descrito ampliamente la participación de la recombinación V(D)J. Sin embargo, la participación de otros procesos como los rearreglos secundarios de Ig y la hipermutación somática en la generación de anticuerpos protectores no ha sido estudiada, pues estos mecanismos han sido analizados principalmente en los procesos de inducción de tolerancia en linfocitos B autorreactivos y en la maduración de la afinidad de los anticuerpos.

IV HIPÓTESIS

La capacidad para producir anticuerpos protectores en ratones con el repertorio de Igs moderada o severamente reducido, sigue siendo suficiente para inducir inmunidad debido a que existen mecanismos alternos para la generación de la diversidad y funciones redundantes en los componentes del sistema. Por lo tanto, en una situación en donde se carezca de anticuerpos con cadena L κ , los anticuerpos con cadena L λ serían capaces de desempeñar las mismas funciones que los anticuerpos con cadena L κ . Por otra parte, los mecanismos de rearreglos secundarios de Ig y de hipermutación somática serían capaces de diversificar el repertorio para la producción de anticuerpos contra múltiples antígenos y anticuerpos protectores contra diversos patógenos.

V. OBJETIVOS

a) General

Estudiar la contribución de la cadena L λ y de los rearrreglos secundarios de Ig en la generación de anticuerpos protectores.

b) Particulares

Estudiar la supervivencia y capacidad de generar anticuerpos protectores en ratones deficientes de la cadena L κ infectados con los virus de la estomatitis vesicular (VSV), linfocoriomeningitis linfocítica (LCMV) o inmunizados con el virus de la poliomielitis humana (PV) o con porinas de *S. typhi*.

Estudiar la supervivencia y la capacidad de generar anticuerpos protectores en ratones "Quasimonoclonales" (QM) infectados con el VSV, LCMV e inmunizados con PV, o con porinas de *S. typhi*.

Analizar las secuencias nucleotídicas de los anticuerpos protectores contra VSV generados en los ratones QM por medio de la expresión de cadenas simples de estos anticuerpos en fagos filamentosos, para de esta forma identificar los mecanismos involucrados en su generación.

VI. MODELOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS

1. Ratones deficientes de la cadena L κ ($C\kappa^{f'}$):

Se han generado varias cepas de ratones deficientes en la expresión de la cadena L κ por medio de la substitución de la región J κ C κ (126), o bien del elemento iE κ (127,128), o de la región C κ (57) con el gene de la resistencia a neomicina (neo^r). Los ratones mutantes J κ C κ y los iE κ no reorganizan, eliminan o expresan el locus κ , mientras que los ratones mutantes en donde el elemento iE κ es substituido por *loxP* son capaces de reorganizar V κ J κ , aunque de manera reducida (129). La substitución de C κ con el gene neo^r elimina la producción y la expresión de superficie de κ , pero no evita los reorganizos de V κ J κ (57). Por otro lado, la substitución del 3'E κ con la secuencia *loxP* alteró la relación $\kappa:\lambda$, disminuyendo la preferencia de los reorganizos κ *versus* λ de manera significativa e inhibió parcialmente la expresión del locus κ en células B en reposo (130). La substitución del 3'iE κ con el gen de neo^r causó un fenotipo similar, sin embargo, se observó una disminución más pronunciada en la preferencia κ *versus* λ , ya que la eliminación del iE κ tiene un efecto inhibitor de la recombinación V κ -J.

Todos los ratones deficientes de la cadena L κ arriba descritos tuvieron un desarrollo normal, sin alteraciones en las poblaciones de linfocitos T. No obstante, el total de linfocitos B se vio reducido en algunos casos hasta un 50%. No se logró detectar la presencia de linfocitos B con cadena L κ en los ratones homocigotos, ya que estos ratones sólo tenían linfocitos B con cadena λ . Al ser comparados con los ratones control, los heterocigotos mostraron un incremento del doble de linfocitos B con cadena

L λ , mientras que los homocigotos tenían de 7 a 10 veces más linfocitos B con cadena λ .

Estos resultados mostraron que los rearrreglos de la cadena λ pueden ocurrir en ausencia de señales provenientes de la cadena κ . Los ratones deficientes de la cadena L κ son un excelente modelo para investigar la habilidad del limitado grupo de cadenas L λ para interactuar con el repertorio H en respuesta a diferentes antígenos y a infecciones. En el presente estudio se utilizaron ratones a los que se les eliminó la región C κ (57).

2. Ratones “Quasimonoclonales” (QM):

Los ratones QM (95) fueron generados por medio del reemplazo de los elementos endógenos J_H con la región de genes rearrreglados V_H(D)J_H 17.2.25 aislados de un hibridoma con especificidad anti- (4-hidroxi-3-nitro-fenil)acetilo (NP), mientras que el otro alelo fue inactivado por medio de la eliminación de todos los segmentos J_H. Adicionalmente, los ratones QM no poseen cadena ligera κ debido a que se cruzaron con los ratones deficientes de esta cadena. De esta forma, la cadena pesada transgénica sólo se puede combinar con las cadenas ligeras λ rearrregladas. Cuando esta cadena pesada se combina con la cadena ligera λ 1, el anticuerpo resultante tiene únicamente especificidad contra NP mientras que la unión a λ 2 daría especificidad anti-NP parcial además de otras. Estas combinaciones hacen que el ratón QM tenga un repertorio teóricamente oligoclonal casi monoespecífico. Sin embargo, a pesar de esta predisposición genética, el 20% de los linfocitos B periféricos de los ratones QM no unen NP (131). En ausencia de inmunización, se observaron intermediarios de la reacción de reemplazo de regiones V_H en linfocitos B de

médula ósea y de bazo de los ratones QM, además que se observaron transcritos del gene RAG-1 en el bazo de estos (94). Debido a estas características, los ratones QM son un modelo muy útil para estudiar la contribución de los rearreglos secundarios, en especial del mecanismo de reemplazo de regiones V_H en la generación de una respuesta humoral protectora.

Con el fin de estudiar la capacidad de generar anticuerpos protectores en una situación donde el repertorio de inmunoglobulinas se encuentra moderadamente o severamente comprometido y estudiar la contribución de los mecanismos de rearreglos secundarios en la generación de anticuerpos protectores, se infectaron o inmunizaron ratones $C\kappa^{-/-}$ y QM con diferentes virus y antígenos proteínicos y se evaluó la respuesta inmune humoral.

3. El Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV):

El VSV es un virus de la familia *Rhabdoviridae* del género conocido como *vesiculovirus* y está relacionado al virus de la rabia. El VSV infecta primordialmente a mamíferos. No obstante, algunos insectos y artrópodos pueden ser infectados también por este patógeno. Existen dos especies o serotipos de este virus denominados VSV Indiana (VSV-IND) y VSV New Jersey (VSV-NJ). Estos virus ocasionan infecciones principalmente en ganado bovino y porcino (132).

El VSV es un virus que tiene forma de bala de 180 nm de longitud por 75 nm de ancho y está compuesto por un centro o nucleocápside (RNP) y una bicapa membranal. La nucleocápside contiene RNA de cadena sencilla antisentido (contiene 11,161 nucleótidos) fuertemente asociada con la proteína mayor N (de 422 aminoácidos), las polimerasas menores L y P. En la membrana se asocian la glicoproteína G (VSV-G) que atraviesa la bicapa y proteína periférica M, la cual se adhiere a la superficie de la parte interna

de la bicapa y une al núcleo de RNP. La membrana del VSV contiene aproximadamente 1,200 moléculas de la glicoproteína G, las cuales forman alrededor de 400 puntas triméricas reorganizadas de forma altamente organizada en la superficie viral. La proteína G es una proteína tipo I clásica, contiene dos sitios en el dominio externo que se encuentran unidos a azúcares y la mayor parte se encuentra expuesta en la superficie viral (132). Estas características hacen que esta proteína induzca una respuesta inmune humoral muy intensa (133,134).

En el modelo experimental del ratón, la infección con el VSV causa parálisis progresiva que termina con la muerte del animal si no se cuenta con anticuerpos neutralizantes, que son los encargados principales de mediar la protección contra esta infección (135,136,146). La mayoría de los anticuerpos neutralizantes, específicos contra VSV reconocen sitios inmunodominantes de la VSV-G (137-139). La respuesta primaria de anticuerpos está constituida por IgM (días 3-5) y se induce sin la cooperación de células T (140,141), mientras que el cambio de isotipo ocurre alrededor de los días 6-8 y depende de la cooperación de células T (142).

4. El virus de la Coriomeningitis Linfocítica murina (LCMV):

El LCMV es un virus no citopático de RNA de doble cadena, de la familia *Arenaviridae*, y es un patógeno natural del ratón. El virus está formado por partículas envueltas esféricas de un diámetro de 50-300nm. La superficie del virus es lisa y presenta picos en forma de T compuestos de la glicoproteína que se extienden de 7-10 nm sobre la envoltura (143). La infección aguda por LCMV es controlada primordialmente por linfocitos T citotóxicos a través de la perforina (144,145). La respuesta celular es responsable de las manifestaciones clínicas y desarrollo de la enfermedad,

ya que al destruir a las células infectadas se ocasiona a su vez la meningitis (143). Inmediatamente después de la infección, alrededor del día 8, se produce una respuesta muy intensa de anticuerpos específicos contra la nucleoproteína del LCMV, que no tiene capacidad de neutralización (147,148). En etapas tardías de la infección, entre los días 30 y 60, se monta una respuesta de anticuerpos en contra de la glicoproteína del virus. Estos anticuerpos son capaces de neutralizar al virus (149,150,151) y participan de manera importante en la protección contra la reinfección. (152-154). La infección en el humano es raramente fatal y ocasiona fiebre, mialgias, afecta al sistema nervioso central con presencia de virus en la sangre e inmunopatología similares a las ocasionadas por las fiebres hemorrágicas virales (VHF). Los pocos casos fatales han presentado una enfermedad sistémica incontrolable muy parecida a la VHF(143).

5. El virus de la Poliomiелitis humana (PV):

El PV es un virus citopático de cadena positiva de ácido ribonucleico (RNA) perteneciente a la familia *Picornaviridae*, del género *Enterovirus*. El virión es de forma icosaédrica con un diámetro de aproximadamente 30.5 nm. EL PV infecta a humanos específicamente, causando entidades clínicas variables en donde las formas más graves producen parálisis y muerte. El PV infecta células de la nasofaringe y del intestino, de donde se propaga, mientras que las formas que causan la parálisis tienen un tropismo muy específico por las células de las astas anteriores de la médula espinal. El virus entra a las células por medio de un receptor específico (PVR) que está constituido por tres dominios tipo Ig y se encuentra codificado en el cromosoma 19. La superficie viral contiene 4 proteínas ordenadas regularmente (VP1-4), contra de las cuales se dirigen los anticuerpos neutralizantes (155). En los ratones BALB/c, el PV induce una respuesta

temprana de anticuerpos IgM de tipo timo-independiente, seguida por una respuesta de IgG timo dependiente (156). En el presente estudio, se utilizó como antígeno la vacuna de virus inactivado de Salk. Esta vacuna está hecha de una mezcla de los tres poliovirus: Mahoney tipo 1, MEF1 tipo 2 y Saukett tipo 3 en una proporción 1:2:1 respectivamente. Los virus son cultivados *in vitro* en células de riñón de mono verde africano de cultivo secundario o terciario (riñones de monos sanos libres del virus de simio 40 (SV40)) o de la línea celular Vero (del mismo origen). Los virus se obtienen del sobrenadante del cultivo celular y son inactivados con formalina (157)

6. Las porinas de *Salmonella typhi*:

Salmonella entérica serovar typhi es el agente causal de la fiebre tifoidea, esta es una enfermedad aguda y generalizada del sistema retículo-endotelial, tejido linfoide intestinal y vesícula biliar que se adquiere por la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria (158,159,160). Actualmente existen en el mercado algunas vacunas contra la fiebre tifoidea. Estas vacunas son poco eficientes para conferir una inmunidad duradera y poseen efectos colaterales (161-169). La respuesta inmune humoral y celular son importantes para la protección (161). La respuesta de anticuerpos en humanos se dirige principalmente contra antígenos de la superficie de la bacteria como lo son el lipopolisacárido (LPS), el flagelo y las proteínas de la membrana externa (PME) en especial contra las porinas (170,171). Las porinas de *S. typhi* fueron purificadas de la bacteria por diversos métodos y su participación en el efecto protector se evaluó en ratones NIH (172,173). Las porinas fueron capaces de inducir una protección del 90% contra el reto de hasta 500 DL₅₀ de *S. typhi* (173). La transferencia pasiva de los anticuerpos anti-porinas fue también capaz de

inducir protección contra *S. typhi* y de inducir protección cruzada contra *S. typhimurium*. También se demostró que estas proteínas son el blanco no sólo de los anticuerpos sino también de los linfocitos T de humanos que se recuperan de la enfermedad y de individuos vacunados (171,174).

En conjunto, estos virus y antígenos bacterianos se utilizaron como modelos experimentales para estudiar los mecanismos moleculares responsables de la generación de anticuerpos protectores en ratones con un repertorio reducido de inmunoglobulinas, en este caso, los ratones $C\kappa^{-/-}$ y QM.

VII. MATERIALES Y METODOS.

1. *Ratones y Virus:*

La generación de los ratones QM (95) y $Ck^{-/-}$ (57) ha sido descrita previamente. Los ratones C57BL/6 fueron proporcionados por el Institut für Labortierkunde, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Zurich, Zurich (Suiza). Los experimentos se desarrollaron con ratones de la misma edad y sexo mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Los animales utilizados tenían una edad entre 8 a 16 semanas.

VSV-IND. (virus de la estomatitis vesicular serotipo indiana aislado de Summers) fue obtenido originalmente de D. Kolakofsky (Universidad de Ginebra, Suiza), y fue crecido en células BHK, en medio MEM complementado con 5% de suero fetal bovino hasta que el stock viral llegó a contar con 10^9 unidades formadoras de placa (PFU) por mililitro. El virus de la Poliomiелitis (PV) con los serotipos I, II y III fue proporcionado por el Instituto Suizo de Sueros y Vacunas (Berna, Suiza). El virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV-WE) fue proporcionado por F. Lehmann-Grube (Heinrich Pette Institute für Experimentelle Virologie und Immunologie, Universidad de Hamburgo, Hamburgo, Alemania). El virus fue crecido en células L-929 por 48 horas en medio MEM suplementado con 5% de FCS después de la infección inicial con 0.01 unidades de multiplicidad de infección.

2. Inmunizaciones:

Los ratones fueron inmunizados por vía intravenosa el día 0 con una dosis estándar de 2×10^6 unidades formadoras de placa (PFU) del VSV-IND o con 200 PFU de LCMV-WE como se indica en las gráficas. Para los experimentos con PV se inocularon 0.5 ml de la vacuna de Salk (157) (con un contenido de 30 unidades de contenido mínimo (mini) de antígeno D tipo U 1, 6 mini de antígeno D tipo U 2.. 24 mini de antígeno D tipo U 3, en fenoxi-etanol) proveniente de Poliomieltis-Impstoff Berna, del Instituto Suizo de Sueros y Vacunas. Esta se inoculó por vía intravenosa los días 0 y 14.

La inmunización con porinas se llevó a cabo por vía intraperitoneal utilizando una mezcla de porinas de *S. typhi* obtenidas por el método de Nikaido (175) resuspendidas en solución balanceada de fosfatos (PBS) y emulsificadas en adyuvante incompleto de Freund (IFA).

En todos los casos, las muestras de sangre fueron obtenidas de la cavidad retro-orbital de los ratones los días indicados en las gráficas.

3. Ensayos de Neutralización para el VSV y PV:

Se mezclan diluciones seriadas 1:2 de las muestras de suero (previamente diluidas 1:40) con un volumen igual de una solución con el VSV o el PV (serotipo II) a una concentración de 500 PFU/mL, la mezcla se incubó por 90 min a 37° C en una atmósfera con 5% de CO₂. Se transfirieron 100 µL de la mezcla a una placa con una monocapa de células Vero y las placas se incubaron por 37° C 1 H. A la monocapa con el virus se le adicionaron 100 µL medio DMEM con 1% de Metil-celulosa. Las placas se incubaron durante 24 H. (hasta 48 H para el caso del PV) a 37° C. Después de la incubación, se removió el sobrenadante de las placas por decantación vigorosa y la monocapa de células se tiñió con una mezcla de 0.5% de

cristal violeta disuelto en 5% de formaldehído, 50% de etanol, y 4.25% de NaCl. La dilución que mostró reducción a la mitad en el número de placas totales se toma como el título (176). Para determinar los títulos de IgG, el suero no diluido se trató con un volumen igual de una solución de 0.1 M de 2-Mercaptoetanol en medio MEM 1H, a temperatura ambiente para realizar la reducción de la IgM. Después de la reducción, la mezcla de reacción se sometió a calentamiento en baño María 56° C, durante 30 min. Las muestras se utilizaron de la misma forma que las muestras sin reducir.

4. Ensayo de Neutralización para el LCMV:

Es un ensayo de reducción de focos infecciosos. El ensayo de neutralización se lleva a cabo *in vitro* como se ha descrito previamente (177). En resumen, se incuban diluciones 1:2 seriadas de una muestra de suero previamente diluida 10 veces con LCMV, 90 min, a 37°C en placas de 96 pozos. A esta mezcla se le adicionaron fibroblastos de ratón de la línea MC57 G, y se incubó por 4 H para dejar que las células se sedimentaran en el fondo de la placa y sean infectadas por el virus no neutralizado. A los pozos se les adicionó una mezcla de 1% de metilcelulosa en DMEM. Después de 48 H, la monocapa de células se fijó con formalina al 4% y los focos infecciosos se detectaron por medio de tinción intracelular para el LCMV. Para esto se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata anti-LCMV denominado VL-4 (177). Para determinar los títulos totales de anticuerpos anti-LCMV se utilizó suero total, mientras que para determinar los títulos de IgG, el suero se redujo por medio de la adición de 2-Mercaptoetanol a una concentración final de 0.05 M por 1H. Todas las muestras de suero se inactivaron a 56° C por 30 min con el fin de eliminar el complemento.

5. Detección de Anticuerpos por medio de ELISA:

Para detectar anticuerpos específicos contra la nucleoproteína del LCMV, se recubrieron placas de 96 pozos con nucleoproteína obtenida a través de un sistema de baculovirus (149,178). Las placas fueron incubadas a 4° C toda la noche, después se lavaron 3-5 veces con PBS 0.05% Tween 20, y se bloquearon con 1% de BSA en PBS por 2-3 H a temperatura ambiente. El suero fue diluido con PBS con 0.1 % de BSA y se adicionó a las placas. La mezcla se incubó por 90 min a temperatura ambiente. Al final de la incubación, las placas se lavaron con la solución de lavado y después se adicionó un anticuerpo de cabra anti-ratón (IgG o sus isotipos) marcado con peroxidasa de rábano (1:1000, Zymed laboratories).

Las placas se incubaron 1 H y la reacción se reveló por medio de una solución de 0.04 mM de ABTS (Boehringer Mannheim) en NaH₂ PO₄ 0.1 M, pH 4.0, 0.01% H₂O₂. La densidad óptica se midió a 405 nm, usando un lector de placas (BioRad modelo 3555). Los títulos fueron determinados tomando como valor de 1 título el promedio de las absorbancia de los controles negativos multiplicado por tres. Para medir los títulos de los diferentes isotipos de IgG contra el VSV, las placas de ELISA fueron recubiertas con 10 µg/mL de VSV-IND precipitado con polietilenglicol y el ensayo se realizó como se describió arriba. Para el caso de los anticuerpos anti-porinas, las placas fueron recubiertas con porinas de *S. typhi* a una concentración de 10 µg/mL de la proteína.

6. Expresión de fracciones variables de anticuerpos (Fv) en fagos filamentosos:

Para estudiar el origen y los mecanismos involucrados en la producción de anticuerpos anti-VSV en los ratones QM es necesario

determinar las secuencias de las regiones V_H de estos. Existen diversas formas para realizar esto: una opción es aislar anticuerpos monoclonales antes de la infección y después de la infección durante la respuesta primaria, secundaria y de memoria. Obtener el DNA de las clonas, amplificar y secuenciar las regiones V_H para comparar las diferentes secuencias. Debido a que conocemos la secuencia original de los anticuerpos antes de la infección, es posible determinar cuales fueron los cambios ocurridos en la secuencias V_H de los anticuerpos producidos contra el VSV en los ratones QM. Este proceso es largo y muy laborioso, sin embargo, permitiría estudiar otras características de dichos anticuerpos.

Por otro lado se cuenta con el sistema de expresión de las fracciones variables de los anticuerpos en fagos filamentosos. Esta técnica permite un análisis más rápido de las secuencias V_H de los anticuerpos de los ratones QM en este caso, antes y después de la infección con VSV. De esta forma se pueden estudiar los procesos involucrados en la generación de estos anticuerpos. Esta tecnología se describe a continuación.

El primer paso es generar una biblioteca genómica a partir del RNAm obtenido de los bazo de los ratones antes y después de la infección con el VSV. La biblioteca fue construida siguiendo los procedimientos descritos previamente (179). En resumen, el RNA mensajero se obtuvo de 10^7 células de bazo usando el kit de "QuickPrep" para purificación de mRNA (Amersham-Pharmacia Biotech). El mRNA se sometió a la acción de la transcriptasa reversa usando una mezcla de iniciadores hexaméricos aleatorios de acuerdo a las especificaciones del fabricante (síntesis de la primera hebra por medio de RT-PCR, Amersham Life Science). La región variable de la cadena pesada (V_H) se amplificó usando una mezcla de iniciadores degenerados denominados primers V_H back y primers V_H for. Mientras que la región variable de la cadena ligera (V_L) se amplificó usando los iniciadores específicos para la cadena lambda $LB\lambda$ y $LF\lambda$ como se

describió anteriormente (179). Los productos de PCR correspondientes a V_H y V_L se purificaron y ensamblaron usando una PCR de traslape y extensión para adquirir una configuración de cadena sencilla Fv (scFv). La cadena completa de scFv se purificó del gel, se digirió con la enzima SfiI y posteriormente se ligó en el vector de expresión pAK100 (donado por el Dr. Andreas Plückthum, Universidad de Zurich-Irchel, Zurich, Suiza).

La mezcla de ligación se electroporó en bacterias electrocompetentes XL1-Blue (Stratagene, Inc). Las colonias se recuperaron de la placa y las que expresaron las scFv fueron rescatadas a través de la infección con el fago de ayuda VCS-M13 (Stratagene, Inc.). Las partículas de fagos se precipitaron dos veces con PEG y se resuspendieron con PBS.

Los fagos capaces de reconocer al VSV se seleccionaron por medio de tubos recubiertos con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del virus precipitado con PEG (Maxisorp, Nunc). Los fagos se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en los tubos. Los tubos se bloquearon con leche descremada al 4% disuelta en PBS y se lavaron 20 veces con PBS-tween 0.1%. Los fagos que se unieron al tubo se separaron utilizando una solución de 0.1M de glicina/HCl, pH 2.2, durante 10 min. Inmediatamente después se neutralizaron con una solución 2M de Tris/HCl, pH 8.5. Los fagos recuperados se utilizaron para infectar células XL1-Blue que fueron nuevamente plaqueadas y sometidas a un segundo proceso de purificación-selección. Los fagos obtenidos fueron analizados por medio de ELISA.

Las colonias aisladas de la segunda purificación fueron crecidas en placas de 96 pozos y rescatadas con el fago de ayuda VCS-M13. Después de incubar durante toda la noche, se adicionaron 100 μL del sobrenadante conteniendo al fago, a las placas recubiertas con el VSV (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó por 90 min. Las placas fueron lavadas 5 veces con PBS 0.1 % de Tween y después se les adicionó el anticuerpo anti-fago M13 marcado con peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech) las placa se incubaron durante

90 min, después, se lavaron nuevamente 5 veces y se revelaron con O-fenilendiamina (Sigma) y H₂O₂. La reacción se detuvo adicionando HCl 1 N, y la absorbancia se leyó a 490 nm usando el equipo arriba mencionado.

7. Cepas bacterianas:

Se empleó la cepa *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d aislada de un paciente con fiebre tifoidea, tipificada por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de México (INDRE).

8. Cultivo de bacterias:

Salmonella typhi fue cultivada en medio mínimo "A" (KH₂PO₄ 3 g/l, K₂HPO₄ 7 g/l, Citrato de Sodio 0.5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 1 g/l, MgSO₄ 1 g/l) durante 16-18 H en cultivo estacionario y posteriormente se transfirió la semilla a garrafrones de 4 L los cuales se cultivaron en agitación durante 8 H (fase de crecimiento logarítmico) a 37°C y 200 rpm (New Brunswick Scientific Co.) en medio mínimo A complementado con 0.1% de extracto de levadura y 0.5% de glucosa. Posteriormente, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 1650 x g durante 15 min a 4°C. El sedimento que contiene a las bacterias fue resuspendido en amortiguador de HEPES 0.01 M pH 7.4, conservándose a -20°C hasta su uso (173,180).

9. Obtención de las porinas:

La obtención de las porinas se efectuó empleando el método descrito por Nikaido (175). Las bacterias cosechadas en la fase de crecimiento logarítmico se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 a 660 nm, posteriormente se rompieron por sonicación (Lab line Ultratrip Labsonic

system sonicator) por períodos de dos minutos en baño de hielo hasta disminuir la densidad óptica a 0.3. Seguido de la eliminación de las bacterias enteras por centrifugación a 7000 x g/15 min. La envoltura celular se concentró por ultracentrifugación a 100 000 x g / 30 min. a 20°C, ésta se homogenizó en Tris 10 mM, pH 7.7 adicionado de SDS al 2% y se incubó 30 min. a 32°C. Posteriormente, se ultracentrifugó y el sedimento se sometió a una segunda solubilización en las condiciones descritas anteriormente. El sedimento de este segundo proceso, contiene la peptidoglicana de donde se extrajeron las proteínas unidas a ella con amortiguador de Nikaido (Tris 50 mM, pH 7.7, SDS al 2%, EDTA 5 mM, NaCl 0.4 M y β-mercaptoetanol al 0.05%). Después de un período de incubación de 2 H a 37°C, la muestras fueron ultracentrifugadas a 100 000 x g / 30 min. a 25°C y el sobrenadante se pasó a través de una columna de Sephacryl S-200 (80 cm x 2.6 cm, Pharmacia Chemical Co.) con una velocidad de flujo de 4 mL/H. Se recuperó la fracción que sale inmediatamente después del volumen vacío, a través del monitoreo por absorbancia a 280 nm.

10. Electroforesis en geles de poliacrilamida:

La electroforesis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (181). Se utilizó dodecil sulfato de sodio en condiciones reductoras y un sistema amortiguador discontinuo. La prueba se realizó en una unidad de electroforesis vertical (LKB Instruments, Inc., Rockville, MD.). El gel introductor se preparó a una concentración final de 5% de acrilamida, 0.13% de bis acrilamida, 0.1% de SDS disueltos en Tris-HCl 0.125 M a pH 6.8. El gel separador se preparó con 11.2% de acrilamida, 2.5% de bis-acrilamida, 0.19% de SDS disueltos en Tris-HCl 0.35 M a pH 8.8. El corrimiento electroforético se llevó a cabo empleando 30 mA por placa y como

amortiguador de corrimiento Tris-HCl 0.025 M, glicina 0.192 M pH 8.3, SDS 0.1%.

11. *Cuantificación de proteínas:*

La cuantificación del contenido proteínico en el extracto final de la purificación de las porinas se realizó de acuerdo al método de Lowry (182), se utilizó albúmina sérica bovina como proteína de referencia (Sigma).

VIII. RESULTADOS

1. La cadena ligera λ puede sustituir funcionalmente a la cadena κ para la formación de anticuerpos protectores:

Los ratones deficientes de la cadena κ tienen el fondo genético de los ratones C57BL/6 y presentan anticuerpos con cadena ligera λ únicamente. Por lo tanto, teóricamente su repertorio de Ig se encuentra reducido unas 100 veces. En general los ratones singénicos adultos y no inmunizados presentan una proporción de anticuerpos κ/λ de 95:5 (57); así mismo en los ratones C57BL/6, el 95% de los anticuerpos que se producen contra patógenos como VSV, LCMV utilizan la cadena ligera κ (146). Los ratones deficientes de la cadena κ no presentan anomalías físicas aparentes ni anomalías en la arquitectura esplénica. Estos ratones mostraron una respuesta inmune humoral comparable a los controles C57BL/6, al ser inmunizados con: a) antígenos timo-independientes tipo I (TI-1) como lo son el VSV y VSV inactivado con luz ultravioleta (U.V.) (133,134) Fig. 1. b) antígenos timo-independiente tipo II (TI-2) como lo son la VSV-G expresada en células de insecto a través del sistema de Baculovirus (Bac VSV-G) o en vaccinia como antígeno recombinante (Vacc-VSV-G). Fig. 2. y c) antígenos timo-dependientes como porinas de *S. typhi* (Fig. 3) o LCMV vivo (Fig. 4).

Sin embargo, en los ratones $C_{\kappa}^{-/-}$ se observó que la producción de anticuerpos ligeramente retrasada respecto a los controles, en particular los anticuerpos de clase IgG.

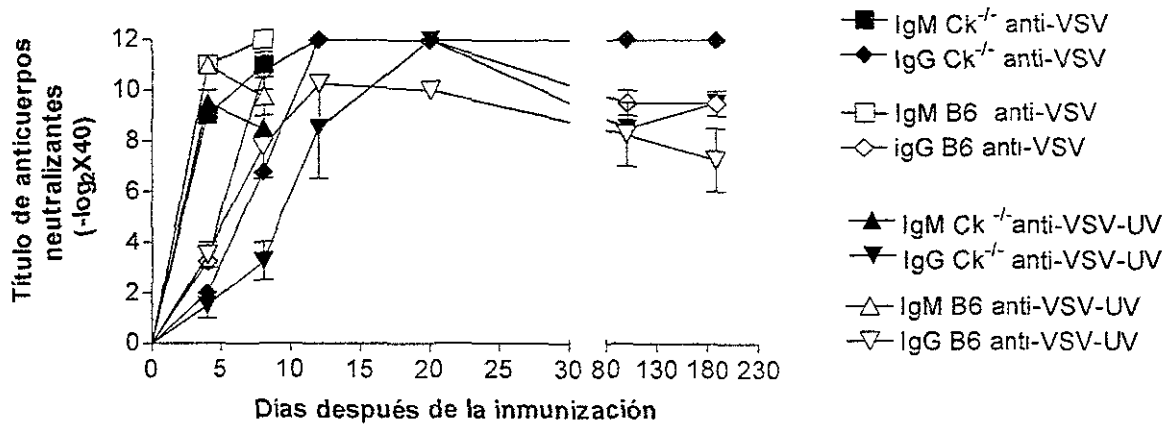


Fig. 1. Inducción de anticuerpos neutralizantes contra el VSV en ratones CK^{-/-} y C57 BL/6. Los ratones fueron infectados i.v. con 2 X 10⁶ pfu de VSV-IND o inmunizados i.v. con 2 X 10⁷ pfu de VSV-UV. A los tiempos indicados, se tomaron muestras de sangre de la cavidad retroorbital de los ratones y se determinó el título de anticuerpos neutralizantes por medio del ensayo de neutralización *in vitro*. Cada grupo consistió en tres ratones. tlg: anticuerpos totales.

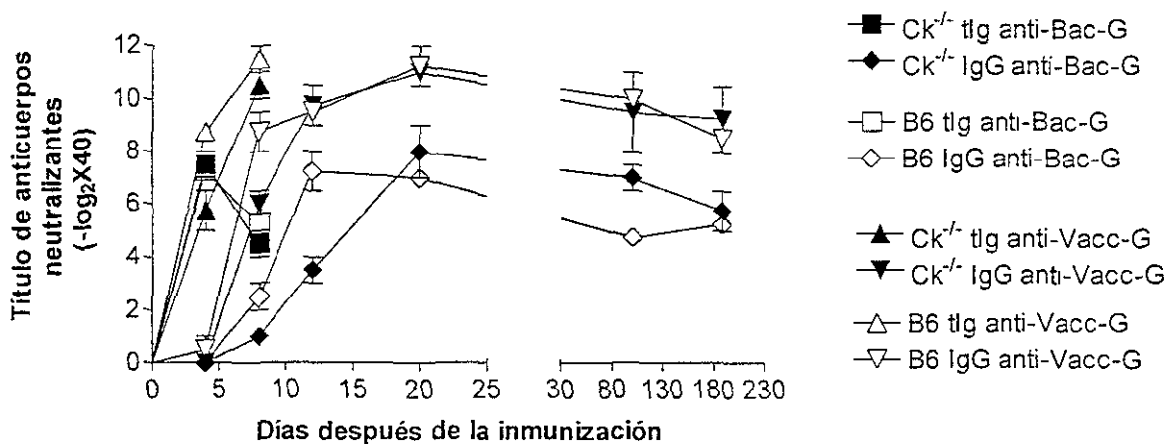


Fig. 2. Inducción de anticuerpos neutralizantes contra el VSV en ratones CK^{-/-} y C57BL/6 inmunizados con antígenos timo independientes tipo II. Los ratones fueron inmunizados i.v. con 5 µg de Baculo-G o infectados i.v. con 2 X 10⁶ pfu de Vaccinia-G. A los tiempos indicados se tomaron muestras de sangre de la cavidad retroorbital de los ratones y se determinó el título de anticuerpos neutralizantes por medio del ensayo de neutralización *in vitro*, cada grupo consistió en tres ratones. tlg: anticuerpos totales.

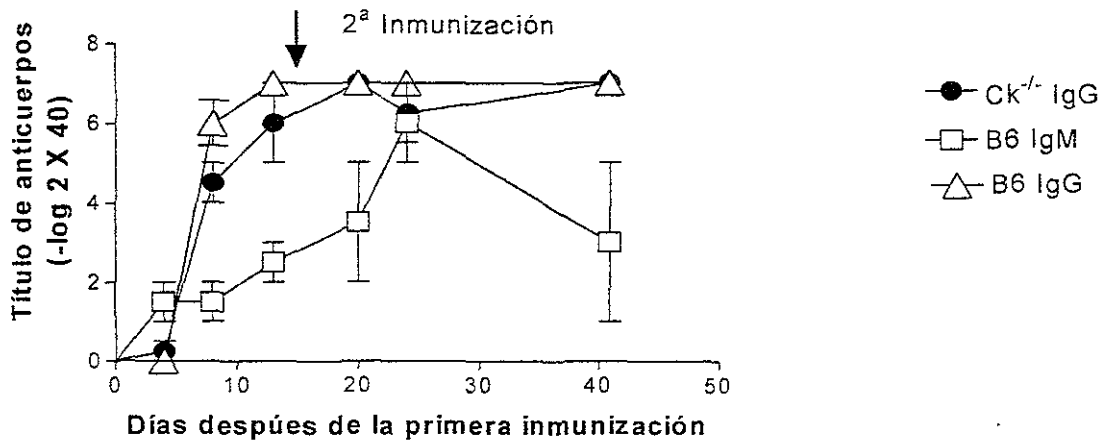


Fig 3. Respuesta de anticuerpos anti-porinas de *S. typhi* en ratones Ck^{-/-} y C56BL/6. Grupos de tres ratones fueron inmunizados i.p. con 6 µg de porinas de *S. typhi* en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Una segunda dosis de 10 µg de porinas en IFA fue administrada i.p. 15 días después de la primera inmunización. La respuesta de anticuerpos fue monitoreada durante 40 días. Cada punto representa el promedio de los valores obtenidos de cada ratón.

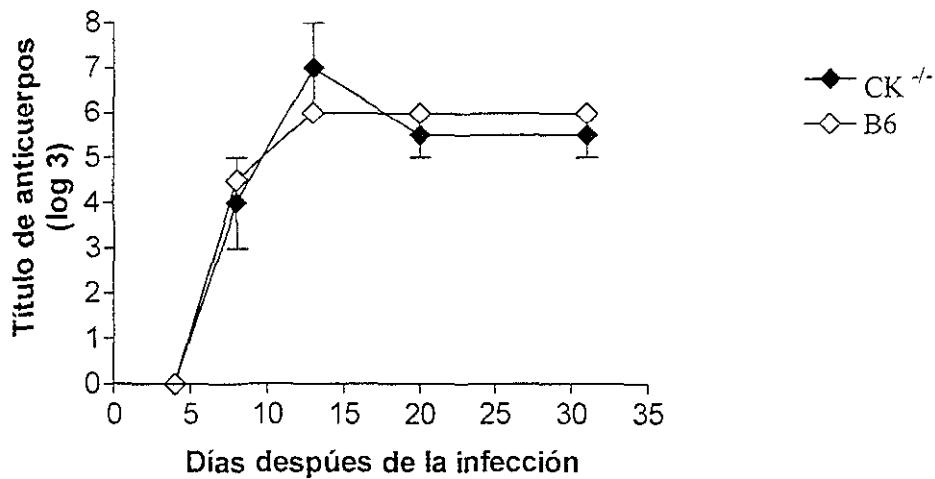


Fig. 4. Respuesta de anticuerpos anti- LCMV-NP en ratones Ck^{-/-} y C57BL/6. Grupos de tres ratones fueron infectados con 10² PFU de LCMV WE. Los títulos de anticuerpos fueron determinados en el suero de los ratones por medio de la técnica de ELISA, en los tiempos indicados en la gráfica. Cada punto representa el promedio de los valores obtenidos de los tres ratones.

Estos resultados muestran que la cadena κ , a pesar de ser dominante en los ratones de tipo silvestre, puede ser substituida por la cadena λ para formar anticuerpos protectores. Los anticuerpos protectores con cadena λ fueron producidos en cantidades similares y mostraron la misma capacidad protectora que los anticuerpos que usan la cadena κ . La reducción en el repertorio teórico de Ig en estos ratones sólo afectó ligeramente la cinética de aparición de los anticuerpos. Non obstante, en términos generales, la respuesta de anticuerpos no fue afectada durante las infecciones y los retos antigénicos empleados (Fig. 1-4).

2. Los Rearreglos secundarios e hipermutación somática de los genes de las inmunoglobulinas como mecanismos de generación de diversidad de anticuerpos e inmunidad protectora.

2.1 Producción de anticuerpos neutralizantes contra VSV en ratones QM:

Con el fin de estudiar la capacidad de generación de anticuerpos protectores en modelos con un repertorio de Ig altamente limitado se utilizaron los ratones QM (95). A pesar de que el repertorio teórico primario de células B en los ratones QM es monoespecífico, el 20% de los linfocitos B periféricos de estos ratones no reconocen NP (131). Este repertorio oligoclonal de anticuerpos representa un excelente modelo para el estudio de los mecanismos de generación de diversidad de anticuerpos en contra de agentes infecciosos.

Los ratones QM se infectaron con el VSV, ya que esta infección es controlada principalmente por anticuerpos neutralizantes. De no estar presentes estos anticuerpos, la infección viral causa la muerte de los ratones por medio de una parálisis progresiva. Por lo tanto, la infección del

VSV ejerce una gran presión selectiva para la formación de anticuerpos neutralizantes y es un buen modelo para el análisis de la respuesta humoral en ratones que poseen un repertorio oligoclonal .

En los ratones QM el 80% de los anticuerpos tienen especificidad anti-NP, por lo que cuentan con un repertorio de anticuerpos altamente reducido. Sin embargo, estos ratones fueron capaces de sobrevivir a la infección por VSV y montar una respuesta de anticuerpos neutralizantes suficiente para controlar al virus, aunque la cinética de producción de estos anticuerpos fue considerablemente más lenta que en los ratones C57BL/6 utilizados como controles (Fig. 5). Las inmunoglobulinas totales anti-VSV se empezaron a detectar a los 4 días post-infección. No obstante, los títulos fueron aproximadamente 30 veces inferiores que los encontrados en los controles. En los ratones QM se detectó el cambio de IgM a IgG 6 días después que en los ratones control. Los títulos de anticuerpos IgG en los ratones QM fueron similares a los de los controles alrededor del día 40 post-infección, y se mantuvieron elevados durante los 150 días que duró el período de observación (Fig. 5). A pesar del retraso en la cinética de aparición de los anticuerpos neutralizantes, los ratones QM fueron capaces de controlar la infección viral y sobrevivieron. Sin embargo, la dosis letal media (DL_{50}) fue 10 veces menor para los ratones QM (2×10^7 PFU) mientras que para los ratones C57BL/6 fue de 2×10^8 PFU (datos no mostrados).

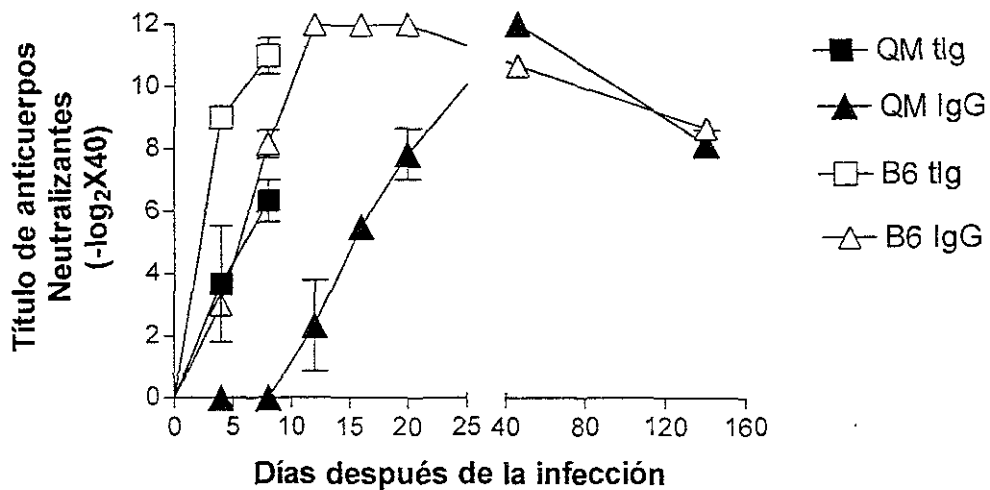


Fig. 5. Producción de anticuerpos neutralizantes contra el VSV en ratones QM. Grupos de tres ratones fueron infectados i.v. con 2×10^6 PFU de VSV. Muestras de sangre fueron tomadas de la cavidad retroorbital de los ratones en los tiempos indicados. La presencia de anticuerpos neutralizantes fue determinada por medio de un ensayo de neutralización *in vitro*. tlg: anticuerpos totales. Cada punto representa el promedio de los títulos de los tres ratones.

Los isotipos de IgG que predominaron en los ratones QM después de la infección con VSV fueron IgG2a e IgG2b (Fig. 6). De manera similar, los ratones QM no inmunizados mostraron mayores títulos de anticuerpos de estos isotipos lo cual indicaría una cierta tendencia hacia una respuesta Th1 en estos ratones (95).

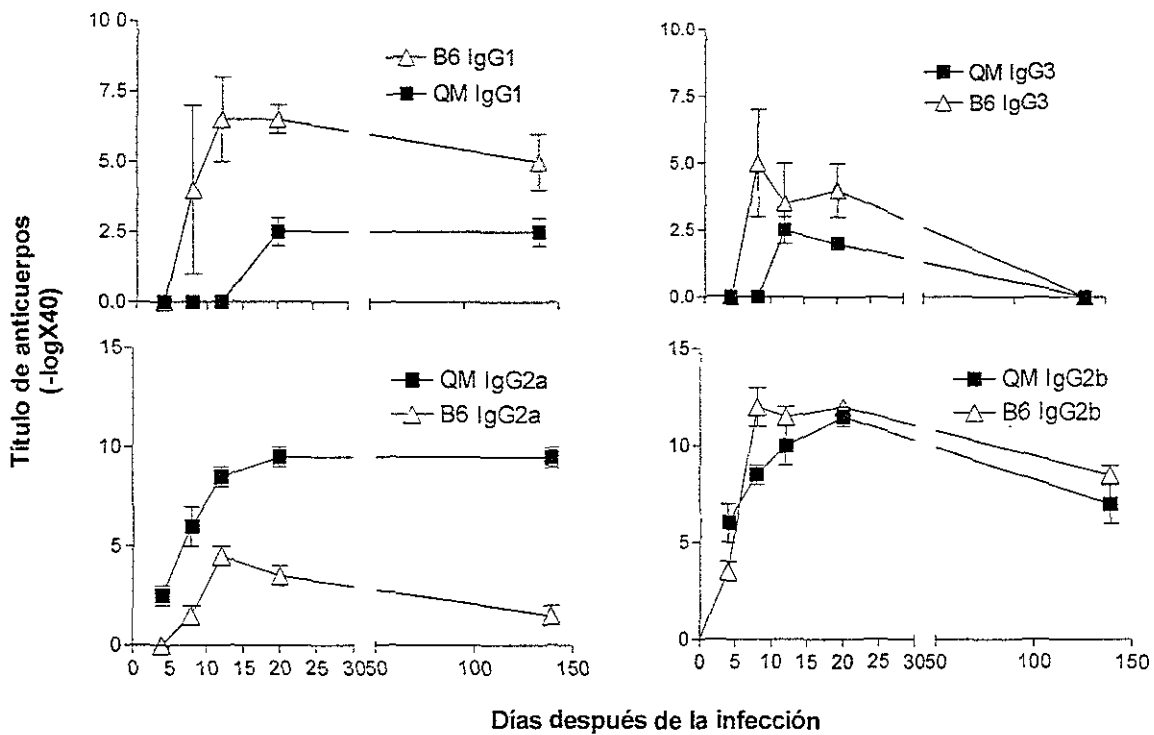


Fig. 6. Cinética de expresión de los Isotipos de IgG producidos en los ratones QM después de la infección con VSV. El suero de los ratones QM infectados con VSV fue analizado a los tiempos indicados en la gráfica. Los títulos de los diferentes isotipos de IgG fueron determinados por medio de ELISA. Cada punto representa el promedio obtenido de tres ratones. El valor de un título corresponde al valor de 3 veces el valor promedio de los controles negativos.

El retraso en la cinética de aparición de los anticuerpos neutralizantes en los ratones QM, se debe quizá a la ausencia de cadena κ ; como se observó en los ratones $C\kappa^{-/-}$. Este retraso en la aparición de los anticuerpos neutralizantes, podría atribuirse a su vez al tiempo que requiere un pequeño número de células B precursoras anti-VSV para expandirse y producir la cantidad suficiente de anticuerpos en el suero que permita su detección en el ensayo de neutralización.

Se ha reportado previamente que la cantidad de anticuerpos séricos de clase IgG1 disminuyó de un 13.1% en ratones QM de 4-5 semanas de

edad a 2.8 % en ratones de 20-24 semanas. Estos datos apoyan la idea de que las células B de estos ratones modifican su receptor conforme el ratón va envejeciendo (131). Este fenómeno podría inducir, durante el envejecimiento de los ratones QM, un incremento en la cantidad de precursores contra el VSV, y por lo tanto se podría esperar en ratones QM viejos una cinética de producción de anticuerpos neutralizantes más acelerada que en ratones QM jóvenes.

Para responder a estas interrogantes, ratones QM y C57BL/6 de 4, 9 y de 56 semanas fueron infectados con VSV y se determinó la cinética de producción de los anticuerpos neutralizantes. Los resultados nos mostraron que los ratones QM tanto jóvenes como viejos responden contra el VSV utilizando la misma cinética de producción de anticuerpos (Fig. 7).

Estos resultados sugieren que no hay correlación directa entre el incremento de células que no expresan la inmunoglobulina con especificidad contra NP (idiotipo negativo) en los ratones QM adultos con un posible incremento en los precursores con especificidad contra el VSV.

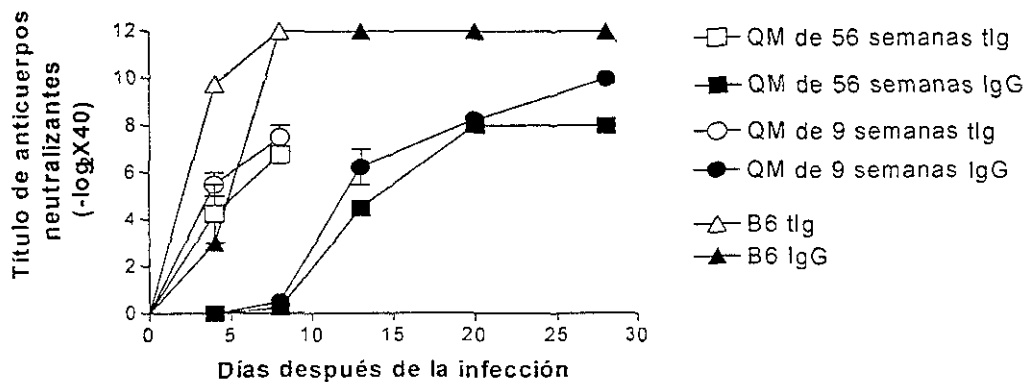


Fig. 7. Respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el VSV en ratones QM jóvenes vs viejos. Grupos de tres ratones fueron infectados i.v. con 2×10^6 PFU de VSV-IND. Las edades de los ratones QM fueron de 9 y 56 semanas, mientras que para los C57BL/6 fue de 8 semanas (no se han observado diferencias considerables en la cinética de producción de anticuerpos neutralizantes en ratones de diferentes edades de esta cepa). La cinética de producción de anticuerpos neutralizantes fue similar en ratones QM de 4 semanas de edad (resultados no mostrados). El título de anticuerpos neutralizantes fue determinado en el suero de los ratones por medio de un ensayo de neutralización *in vitro* tlg: Ig totales.

2.2 Análisis de las regiones V_H de los anticuerpos anti-VSV provenientes de los ratones QM:

Con el fin de analizar las secuencias de la región V de los anticuerpos contra el VSV producidos por los ratones QM, se utilizó la técnica de expresión de bibliotecas de cDNA utilizando fagos filamentosos. Se obtuvieron mRNA de bazos de ratones QM sin infectar e infectados una o dos veces con VSV. En las pruebas de ELISA que se utilizaron para monitorear la presencia de fagos específicos para VSV se encontró que el 37% de los fagos aislados en la biblioteca hecha con el RNAm obtenido de los bazos de los ratones no infectados reconocieron al VSV, mientras que, para los ratones con una o dos infecciones el 57% de los fagos aislados reconocieron al virus. Estos resultados nos indican que, previo a la infección, ya existían clones contra el VSV en los ratones QM a pesar de que en el suero de éstos no se encontró ningún título de anticuerpos anti-VSV. Las clones específicas contra el virus se concentraron y se precipitaron con PEG y se probó su potencial de unión al virus en un segundo ELISA. Los fagos que expresan la región V en forma de cadenas simples (scFv) con las especificidades anti-VSV mostraron una capacidad de unión específica y dosis dependiente contra el VSV (Fig.8a). A su vez, las moléculas producidas por estas clones fueron capaces de neutralizar al virus (Fig. 8b). Las regiones V de 12 clones productoras de la ScFv neutralizantes, fueron secuenciadas y posteriormente alineadas con la secuencia de la región V_H 12.2.25 que se expresa originalmente en los ratones QM. De las 12 clones analizadas (2 provenientes de cada biblioteca de un total de tres bibliotecas), se tomaron 6 clones independientes, las cuales se identificaron y analizaron en ensayos de unión al VSV y de neutralización . Así, las clones 0B1 y 0G6 fueron aisladas de la biblioteca proveniente de ratones QM no infectados, las clones 1A10 y 1E12

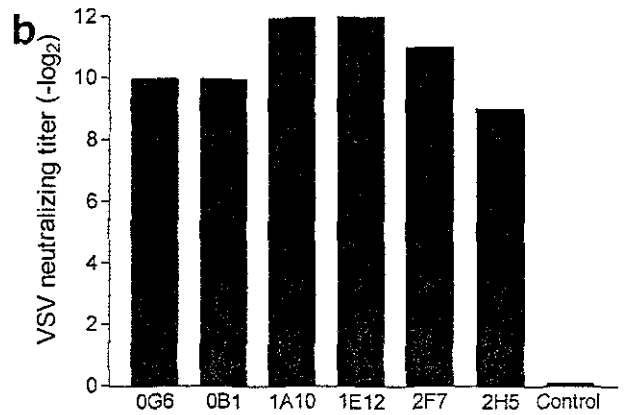
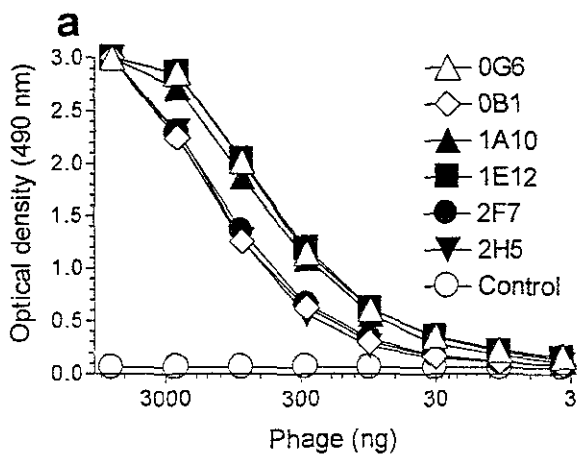
proviene de los ratones infectados una vez y las clonas 2F7 y 2H5 provienen de los ratones infectados dos veces (Fig. 8c). Las otras seis clonas fueron múltiples aislados de la clona 0G6 (4 copias) y de la clona 1A10 (2 copias); estos aislados repetidos son frecuentemente una consecuencia de la amplificación de clonas de unión provenientes del proceso de "panning". Cada una de estas seis clonas independientes usaron el fragmento de V_L perteneciente a la familia $\lambda 1$ además sufrieron del reemplazo del gene V_H . En sustitución de la secuencia original del gene V_H .17.2.25, todas las clonas usaron un gene V_H diferente perteneciente a la familia VH1 (J558) la cual ha sido previamente involucrada en la respuesta secundaria e hiperinmune contra el VSV en ratones BALB/c (146). Todas las clonas analizadas tenían rearrreglos secundarios de inmunoglobulinas; las secuencias analizadas mostraron evidencias de recombinación de un segmento V_HD con el elemento D del segmento V_HDJ_H transgénico presente previamente en el ratón QM (Fig. 8c). Este tipo de rearrreglo V_HD en V_HDJ_H ha sido reportado previamente en las células B idiotipo negativo de los ratones QM no inmunizados (95,131).

No obstante, a diferencia de lo reportado en nuestro estudio, otros autores han descrito una proporción pequeña de células idiotipo negativo que presentan rearrreglos secundarios denominados canónicos los cuales se caracterizan por reemplazar regiones V_H por V_HDJ_H . Es posible que los rearrreglos V_HD en V_HDJ_H sean favorecidos sobre los canónicos durante una respuesta inmune ya que probablemente también generen mayor diversidad en el paratopo a través de la modificación de la longitud del CDR3, lo cual a su vez, incrementaría las posibilidades de generar nuevas especificidades.

No es claro si la secuencia consenso ("motif") heptamérica embebida en el extremo 3' del segmento V_H 17.2.25 o algún otro gene V_H estuvieron involucrados en estos rearrreglos, debido a que los puntos de corte de la recombinación no pudieron ser determinados. Además, a los lados de los

segmentos D insertados, se encontraron regiones N en todas las clonas analizadas (Fig. 8c), lo cual sugiere que la maquinaria normal utilizada para los rearrreglos de Ig se encuentra activa durante este proceso. Estas observaciones indican que enzimas como la TdT, la cual se expresa en los linfocitos B de la médula ósea y algunas veces se reexpresa en linfocitos B de centros germinales, participaron en la generación de diversidad en los ratones QM (121).

Adicionalmente al fenómeno de rearrreglos secundarios, se mostró que las seis clonas secuenciadas específicas contra el VSV sufrieron de extensa hipermutación en los segmentos DSP2.10 y J_H4 provenientes de la clona 17.2.25 con una frecuencia de 3.8% (15 mutaciones en 393 pares de bases). Estas mutaciones se presentaron también en las clonas provenientes de los ratones no inmunizados, confirmando así lo reportado para células B aisladas de sangre periférica de ratones QM, que también tienen una frecuencia alta de mutaciones somáticas (95).



C

Clone	VH	N	D	N	DSP2.3	N	JH4	Inserted D	
17.2.25	TACTGTGCTAGA			TACTATAGGTAC CCT TACTATGCTATGGACTAC					
0G6	TTCTGTGCAAGA	TGGG	GCC	ACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	Q52		
0B1	TACTGTGCAAGA	GGA	CTAA	CCGCA	TACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	SP2.2	
1A10	TTCTGTGCAAG	GGGGC	TTAC	CGCA	TACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	SP2.2	
1E12	TTCTGTGCTAG	GT	CCTACTATAGGTACGCC	GTGG	ACTATAGGTAC	GCT	TACTATGCTATGGACTAC	SP2.11	
2F7	TTCTGTGCAAGA	GGGGGT	TGTTA	AGGGTCAG	ACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	SP2.n	
2H5	TACTGTGCAAGA	GAATT	CTGGGAC	AGGGAA	TACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	Q52	

Fig. 8. Análisis de la secuencia, capacidad de unión y de neutralización de los fragmentos scFv aislados de la librería de expresión de fagos filamentosos. a) Las clonas de fagos expresando los fragmentos scFv aislados de una librería de ratones QM no inmunizados (0B1 y 0G6) y librerías generadas de ratones QM después de la infección primaria (1A10 y 1E12) ó secundaria (2F7 y 2H5) con VSV, fueron capaces de reconocer al virus en una prueba de ELISA con placas recubiertas con el VSV. b) Títulos de anticuerpos neutralizantes anti-VSV de partículas de fagos precipitadas con PEG. c) Análisis de la secuencia nucleotídica de las seis clonas obtenidas y su comparación con la secuencia del transgene parental 17.2.25 (94) (mostrada en negritas). Las mutaciones de los segmentos DSP2.10 y J_H4 remanente se muestran subrayadas. La secuencia 3' del segmento J_H4 no mostró hipermutación somática. Las secuencias completas de los fragmentos scFv se encuentran accesibles en el banco de datos EMBL/GenBank/DDBJ, con el código de acceso AF127092-AF127097.

2.3 Inducción de anticuerpos específicos contra LCMV y PV en ratones

QM:

Debido a que los anticuerpos de línea germinal pueden neutralizar de forma eficiente al VSV (139) y ya que a través de un repertorio de células B relativamente reducido se pudo montar una respuesta de anticuerpos anti-VSV eficiente, es posible que una combinación adecuada de cadenas V_H/V_L en los ratones QM pudiera haber generado por coincidencia la especificidad contra este virus pero no para otros virus y otros antígenos microbianos. Por este motivo se estudió la capacidad de los ratones QM de generar anticuerpos específicos contra LCMV, PV y contra porinas de *S. typhi*.

Los ratones QM y C57BL/6 se infectaron por vía intravenosa con 10^2 PFU de LCMV-WE y se midió la respuesta de anticuerpos tanto contra la nucleoproteína como los neutralizantes. Los ratones QM desarrollaron una respuesta tardía contra la nucleoproteína en comparación con los controles: en el día 12, los títulos de anticuerpos anti-nucleoproteína fueron unas 10 veces menores en los ratones QM que en los controles hasta que eventualmente los títulos fueron similares, alrededor del día 32 (Fig. 9).

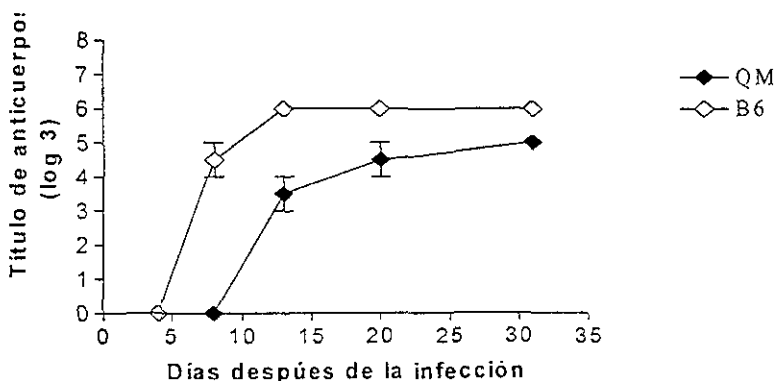


Fig. 9. Respuesta de anticuerpos anti-LCMV-NP en ratones QM y C57BL/6. Grupos de tres ratones fueron infectados con 10^2 pfu de LCMV WE. Los títulos de anticuerpos IgG fueron determinados en el suero de los ratones por medio de la técnica de ELISA, en los tiempos indicados en la gráfica. Cada punto representa el promedio de los valores obtenidos de cada ratón.

La respuesta de anticuerpos neutralizantes contra LCMV aparece normalmente después del día 30-60 de infección (149,150,151). En los ratones QM del mismo modo que en los controles se presentó la misma cinética de aparición de estos anticuerpos. Se detectaron títulos bajos de anticuerpos neutralizantes después de 30 días de la infección y para el día 70 títulos evidentes de anticuerpos neutralizantes fueron detectados en ambas cepas de ratones (Fig. 10). Este tiempo tan largo en el que aparecen normalmente los anticuerpos neutralizantes contra LCMV pudo haber permitido la generación de los precursores específicos contra LCMV necesarios para desarrollar la respuesta de anticuerpos observada en los ratones QM, por lo cual la cinética en la que aparecen estos anticuerpos fue similar a la de los controles. Por otro lado, no se conocen las razones por las cuales toma tanto tiempo generar la respuesta de anticuerpos neutralizantes contra LCMV, algunos datos experimentales sugieren la participación de un proceso inmunopatológico más que una baja frecuencia de precursores de células B específicas contra el LCMV (195).

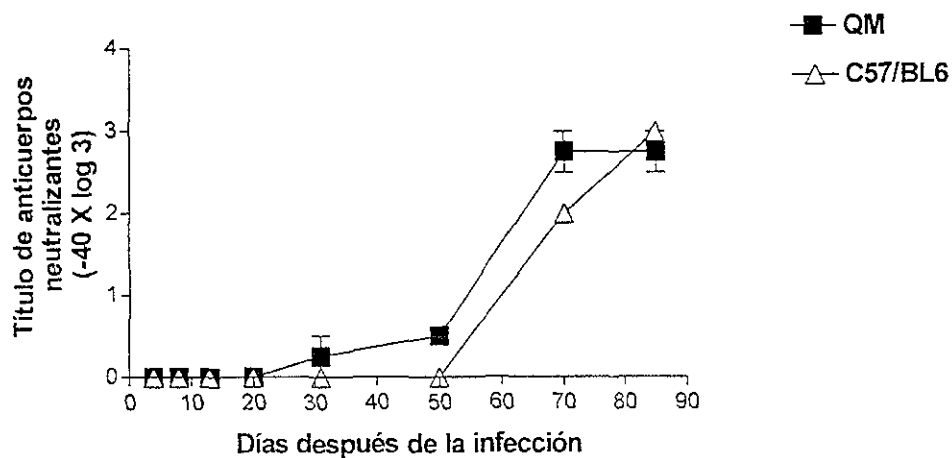


Fig. 10. Producción de anticuerpos neutralizantes anti-LCMV WE en ratones QM. Grupos de tres ratones fueron infectados i.v. con 10^2 PFU de LCMV-WE. La producción de anticuerpos neutralizantes fue determinada en el suero de los ratones en los días indicados en la gráfica utilizando un ensayo de neutralización *in vitro*.

Poco después de la inmunización con el virus inactivado con formalina (vacuna de Salk), la respuesta total de anticuerpos contra el PV fue similar tanto en los ratones QM como en los controles (Fig. 11). La respuesta inicial de IgG fue tardía, no obstante, 20 días después de la inmunización se observó una reducción de dos a tres veces en los títulos de anticuerpos de los ratones QM con respecto a los controles (Fig. 11). Esto puede ser el reflejo de las diferencias en los números o en la capacidad de expansión de células B específicas generadas en los ratones QM. Además, la vacuna contra PV inactivada pudo haber producido un estímulo mucho menor para la selección y expansión de las clonas anti-PV en los ratones QM.

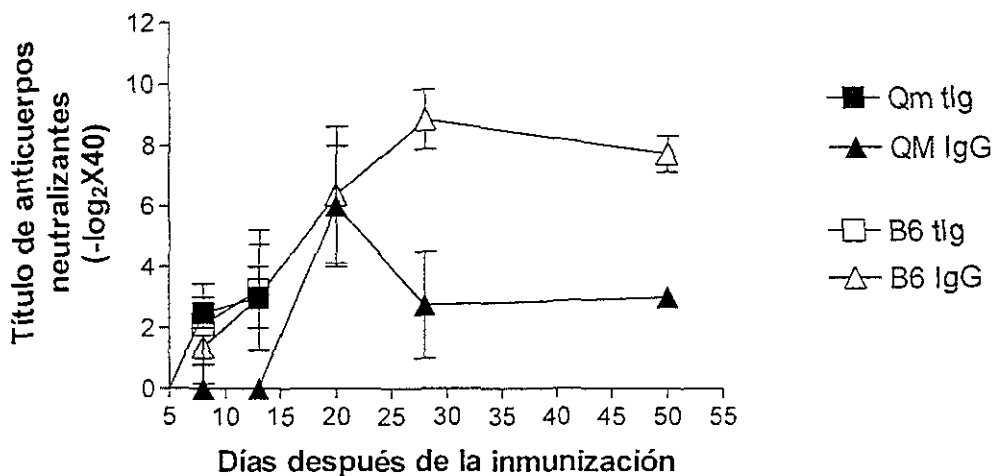


Fig. 11. Producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la Polio (Salk Vaccine) en ratones QM. Grupos de tres ratones fueron inmunizados i.v. con 500 μ l de una solución conteniendo: 15 unidades de antígeno-D tipo I, 3 unidades de antígeno D tipo II y 12 unidades de antígeno-D tipo III de la vacuna anti-poliomielítica-Limpfstoff (Salk). Los títulos de anticuerpos neutralizantes fueron medidos en el suero de los ratones por medio de un ensayo de neutralización *in vitro* utilizando el virus de la Polio tipo II.

2.4 Inmunización de ratones QM con porinas de *S. typhi*:

Con el fin de evaluar la capacidad de los ratones QM de montar una respuesta de anticuerpos ante un reto antigénico no tan fuerte y de presión selectiva tan alta como una infección viral, se utilizaron porinas de *S. typhi* que son buenos inmunógenos provenientes de un patógeno bacteriano y se comportan como un antígeno de tipo timo dependiente a pesar de la contaminación con LPS.

La respuesta de anticuerpos en los ratones QM presenta una cinética tardía comparada con los controles, es hasta aproximadamente el día 20 que los títulos en los ratones QM alcanzan los niveles de los controles. La respuesta de anticuerpos de clase IgG permaneció elevada durante los 270 días de observación tanto en los ratones QM como en los controles C57BL/6.

Por otro lado, la cinética de aparición de los anticuerpos IgM en los ratones C57BL/6 presentó un pico alrededor del día 25, disminuyendo paulatinamente hasta el día 40. Después los títulos se mantuvieron al mismo nivel hasta el día 100 para posteriormente disminuir a títulos bajos después del día 200. En los ratones QM no se observó la presencia de IgM anti-porinas (Fig. 12).

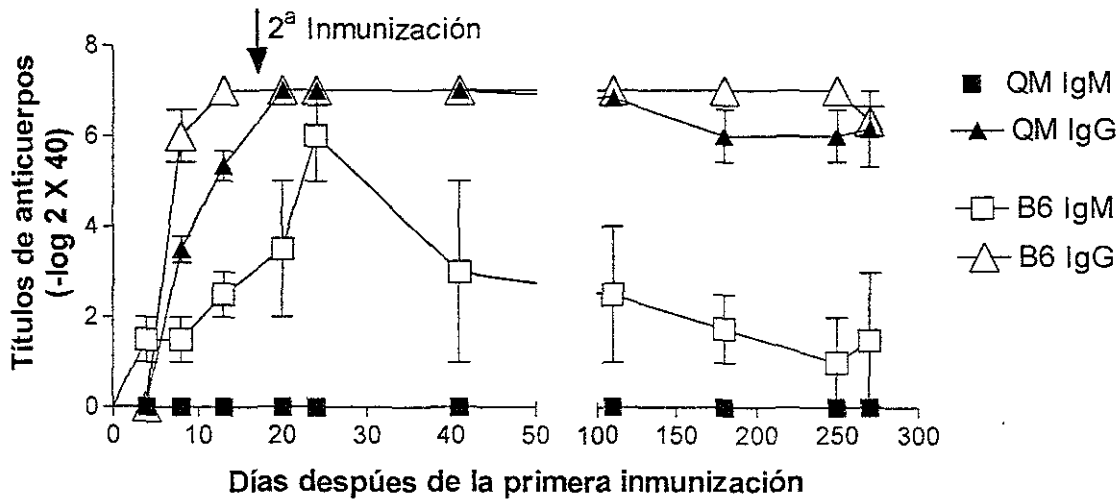


Fig. 12. Respuesta de anticuerpos anti-porinas de *S. typhi* en ratones QM y C56BL/6. Grupos de tres ratones fueron inmunizados i.p. con 6 μ g de porinas de *S. typhi* en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Una segunda dosis de 10 μ g de porinas en IFA fue administrada i.p. 15 días después de la primera inmunización. La respuesta de anticuerpos anti-porinas fue monitoreada durante 270 días en el suero de los ratones mediante la prueba de ELISA. Cada punto representa el promedio de los títulos de anticuerpos medidos en los ratones de cada grupo.

En conjunto, estos experimentos muestran que el reemplazo de V_H y la hipermutación generaron los anticuerpos observados en los ratones QM después de la infección con VSV. Esto demuestra el gran potencial de diversificación del repertorio de células B en los ratones QM y dicha capacidad permite a estos ratones responder ante diversos retos antigénicos, tanto en el transcurso de una infección natural como en infecciones y vacunación experimentales.

IX. DISCUSIÓN

El trabajo aquí presentado muestra un análisis sistemático de la respuesta de anticuerpos contra una serie de infecciones virales y retos antigénicos en ratones con un repertorio de inmunoglobulinas moderada o severamente reducido. Se evaluó la protección en estos animales y se analizaron los mecanismos involucrados en la generación de los anticuerpos protectores y de los anticuerpos contra antígenos microbianos.

Los ratones deficientes en la cadena κ fueron capaces de generar una respuesta inmune humoral eficiente ante los retos empleados, a pesar de que normalmente la proporción κ/λ es >10 (57). Durante la respuesta inmune contra diversos antígenos y patógenos se ha observado cierta tendencia a producir anticuerpos con cierta cadena ligera. Por ejemplo, durante la infección con VSV el 95 % de los anticuerpos producidos expresan cadena κ (146), mientras que la inmunización con el hapteno o de NP selecciona principalmente anticuerpos que expresan cadena λ (183).

Los resultados obtenidos muestran que la ausencia de cadena κ no afecta de manera significativa la supervivencia de los ratones ni la respuesta contra otros antígenos. Es decir, los efectos biológicos estudiados no se vieron afectados. Sin embargo, en todos los casos se observó un retraso en la cinética de aparición de los anticuerpos; este fenómeno pudiera deberse a que el tiempo necesario para rearmar la cadena λ es mayor que el necesario para rearmar la cadena κ de acuerdo al modelo ordenado o preferencial de exclusión isotípica de la cadena L (184).

Durante el desarrollo de células B en la médula ósea, las células con cadena λ emergen 24 horas después que las células con cadena κ (185), en contraste, el análisis de hibridomas productores de anticuerpos con cadena λ ha mostrado que la mayoría de las células λ^+ sufrieron rearmos

de un sólo gene λ , estos datos sugieren que la recombinación del gen λ es ineficiente y ocurre en un período de tiempo limitado (74). De manera similar a lo que ocurre con los rearrreglos de los genes de la cadena H, los rearrreglos de la cadena L parecen ocurrir de manera ordenada (modelo ordenado o preferencial de exclusión isotípica) (184). Tanto en humanos como en ratones la mayoría de las células que expresan κ no han rearrreglado λ , mientras que virtualmente todas las células que expresan λ generalmente presentan rearrreglos no productivos o eliminaciones en ambos genes κ (74, 76,117,186,187). De esta forma, el retraso en la cinética de aparición de anticuerpos observada después de la inmunización en los ratones $C\kappa^{-/-}$ podría deberse a ambos fenómenos. No obstante, no se puede descartar que el retraso se deba a que exista un menor número de precursores contra los diversos antígenos ya que el número total de linfocitos B en estos animales se encuentra reducido aproximadamente un 50% (2.3 veces) en el bazo (57). Aunque por otro lado en la médula ósea, el porcentaje tanto de células de linaje como de precursores B se encuentra incrementado (57). Por lo tanto, el retraso en la cinética pudiera deberse al tiempo en que los precursores son movilizados de la médula a la periferia.

En conjunto, estos resultados muestran la redundancia de funciones biológicas alcanzada por los anticuerpos que expresan cadena L κ ó λ . También nos indican que a pesar de la reducción en número total de linfocitos en el bazo de estos ratones, dichos linfocitos B fueron suficientes para enfrentar las infecciones y retos antigénicos. La respuesta primaria, secundaria y de larga duración en estos animales fue comparable con la de los controles.

El análisis de la respuesta humoral en los ratones QM nos indica que el repertorio de anticuerpos en estos ratones es funcional, que existe una

gran capacidad para diversificar su repertorio de Ig por lo que son capaces de enfrentar tanto infecciones letales como retos antigénicos de diversa índole. Los mecanismos de reemplazo de regiones V_H e hipermutación, son los responsables de la generación de diversidad en estos animales. Sin embargo, el lugar en dónde ocurrió este reemplazo de regiones V_H y los causantes de activar a este mecanismo no han sido identificados.

Para el caso de los ratones QM y $C\kappa^{-/-}$ y C57BL/6 inmunizados con porinas, la aparición de IgG antes de IgM podría explicarse como una activación de células B con IgG en su superficie, que fueron activadas y diferenciadas con anterioridad por epitopos compartidos entre las porinas de *S. typhi* y porinas de bacterias Gram negativas presentes en la flora intestinal de los ratones. A pesar de que éstos se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Este fenómeno ha sido observado también en ratones mantenidos en un bioterio convencional aunque en este caso la cinética de aparición de IgG contra porinas de *S. typhi* fue más rápida, lo cual indicaría que efectivamente se están activando los linfocitos B específicos contra regiones conservadas entre las porinas mientras que las IgM que se observan corresponderían a los epitopos específicos de *S. typhi*. Para el caso de los ratones QM, la ausencia de IgM nos indica que se está llevando a cabo preferentemente una respuesta secundaria de clonas que reconocen regiones compartidas de las porinas, al igual que en los ratones control; o bien pudiera indicar que no se activa la edición de receptor de linfocitos B con receptor IgM. Probablemente no sea necesaria la activación de IgM ya que los ratones QM cuentan con las clonas para la respuesta secundaria.

La ausencia de anticuerpos IgM contra porinas en estos ratones también podría indicar que la revisión o edición de receptor está favorecida en linfocitos B con IgG en su superficie presentes normalmente en estos ratones o bien que, junto con la edición de receptor y quizá mediante la

ayuda del LPS presente en las porinas, se esté llevando a cabo simultáneamente la activación del linfocito B y el cambio de isotipo de Ig.

El modelo actual de edición de receptor en el desarrollo de células B incorpora dos eventos diferentes (188). Durante fases tempranas del desarrollo de los linfocitos B, la edición de receptor es inducida en la médula ósea y el fenómeno es causado por la interacción entre un autoantígeno y el receptor de la célula B en desarrollo (85-87). En fases posteriores, una interacción débil entre el antígeno y el receptor de la célula B periférica induce el la edición del receptor, mientras que una unión fuerte entre estos apaga el mecanismo (116,121). Existen evidencias de que en el bazo y médula ósea de los ratones QM no inmunizados se presenta el reemplazo de las regiones V_H (94). Sin embargo, la acumulación de células idiotipo negativo en el bazo comparado con la médula ósea de estos ratones, sugiere que el bazo podría ser el sitio donde ocurren estos rearrreglos secundarios (94). Además, se ha detectado una mayor proporción de células B idiotipo negativo en el peritoneo de estos animales que en sangre periférica (131). Así pues, pareciera que existe una necesidad continua de diversificación del repertorio de las células B de los ratones QM a través del desarrollo y en los diferentes tejidos.

Los eventos moleculares involucrados en la inducción de los rearrreglos secundarios no están claramente definidos aún. Los mecanismos de activación que pudieran participar en los fenómenos que aquí se reportan son de diversa índole. Primero, las células B pudieran tener una capacidad intrínseca para llevar a cabo las modificaciones del receptor de una manera antígeno-independiente, a través de la cooperación de células T, citocinas u otros estímulos. Aunque este escenario no se puede descartar, hay suficiente evidencia experimental que sugiere que la activación a través del receptor del linfocito B es requerida para la inducción de los rearrreglos secundarios de Ig tanto en médula ósea (100,101) como

en la periferia (111,113,116). No se espera que el receptor de las células B en los ratones QM reconozca o sea capaz de unirse a otro antígeno diferente a NP con alta afinidad, sin embargo, se puede argumentar que un entrecruzamiento débil entre la célula B con especificidad contra NP y diferentes antígenos pudiesen inducir el reemplazo de regiones V y generar de esta manera los anticuerpos contra los diversos antígenos probados. Segundo, se ha propuesto que la presión selectiva de antígenos provenientes del medio ambiente pudiese ser la causa detrás de la diversificación del repertorio de genes V en los ratones QM no inmunizados (131).

Otros datos sugieren que los rearrreglos secundarios de Ig en células B-1 peritoneales pueden contribuir a la generación de autoanticuerpos (118). En este estudio, se propone que la exposición frecuente al LPS de las células B-1, pudiera bajar el umbral de estimulación requerido para activar los rearrreglos secundarios resultando en un cambio rápido del repertorio de anticuerpos. Bajo la perspectiva de los datos encontrados en los ratones QM, este mecanismo pudiera estar generando no sólo células B autorreactivas, sino también células B con especificidades potencialmente útiles para producir anticuerpos contra antígenos de patógenos. Por otro lado el cambio *de novo* de las regiones V_H en los ratones QM infectados pudo haber sido desencadenada por una reacción cruzada entre el receptor del linfocito B con especificidad a NP y los antígenos de los patógenos utilizados. Aunque los antígenos utilizados participen en la expansión y mantenimiento de las células B específicas en los ratones infectados o inmunizados, estas interacciones podrían ser excluidas como el evento inicial, ya que fue posible aislar anticuerpos ScFv de la biblioteca de expresión en fagos obtenida de ratones QM no inmunizados. Por lo tanto, existían células B específicas (o de respuesta cruzada) contra el VSV desde

antes de la infección. Hay que considerar también que los ratones QM sufren frecuentemente de reemplazamientos de las regiones V_H (95,131).

Es muy difícil evaluar la contribución de estos mecanismos en la complejidad de una respuesta normal de anticuerpos. Sin embargo, evidencias recientes muestran que los rearrreglos secundarios de Ig participan en el desarrollo de células B normales (75). Además el análisis de las secuencias de la región V de la cadena pesada y ligera de anticuerpos humanos, sugiere que la edición de receptor ocurre en linfocitos B periféricos (189). Tomando en cuenta estos resultados y lo observado en los ratones QM, se sugiere que junto con la hipermutación somática, los rearrreglos secundarios de Ig pueden participar en la generación de la diversidad del repertorio de anticuerpos. Una observación interesante es que en substitución de la secuencia original del gene V_H .17.2.25, todas las clonas usaron un gene V_H diferente perteneciente a la familia VH1 (J558) la cual ha sido previamente involucrada en la respuesta secundaria e hiperinmune contra el VSV en ratones BALB/c (146), por lo tanto el repertorio útil de los ratones QM se formó a partir del repertorio teórico. Esta observación sugiere que estos mecanismos estarían involucrados en la generación del repertorio útil en ratones normales, ya que estos expresan un repertorio disponible con un reducido número de familias de V_H mientras que durante una respuesta inmune estas familias no se ven expresadas totalmente en el repertorio útil.

El desarrollo de los linfocitos B ha sido descrito como una serie de estadios en donde se expande una célula de cierta especificidad para producir una clona que produce un solo tipo de anticuerpo, esta visión no concuerda con los datos experimentales más recientes. Al parecer el desarrollo de los linfocitos B es dependiente de una serie de rearrreglos tipo ensayo y error, de los genes del receptor a través de los cuales se evita la autorreactividad y se mantiene la especificidad contra los antígenos

iniciales. En este contexto se han descrito hasta ahora tres mecanismos: mutación somática, edición de receptor y revisión de receptor que en conjunto han sido agrupados como mecanismos de selección del receptor (190). La selección del receptor se propone como un mecanismo que actuaría en complementación con el de selección clonal. Cada mecanismo regularía de forma independiente, pero coordinada, la proliferación y supervivencia de los linfocitos. Al promover la proliferación o la muerte celular, la selección clonal reduciría la diversidad, mientras que la selección del receptor amplificaría la diversidad. En el caso de un receptor autorreactivo la selección de receptor puede inactivarlo y salvar la célula y en el caso de que una célula cuente con un receptor eficiente, este mecanismo lo puede fijar para permitir la expansión clonal. En el caso de un receptor de baja afinidad, la selección de receptor permitiría mejorar substancialmente la afinidad aunque con el riesgo de producir un receptor autorreactivo, que en el último de los casos sería controlado por la selección clonal. Trabajando de manera conjunta, la selección del receptor y la selección clonal, permitirían explicar la asombrosa rapidez con la que ocurre la evolución somática de la especificidad inmunológica.

Es ahora claro que las inmunoglobulinas son capaces de regular el desarrollo de los linfocitos B durante las fases independientes del antígeno y que además de los procesos de selección celular, el sistema inmune hace uso de una selección de receptores para dar forma a su repertorio. Sin embargo, no se ha definido con precisión la contribución de cada proceso de selección de receptor en situaciones "normales", ni los umbrales de estimulación, ni las señales intracelulares involucradas en las distintas poblaciones de linfocitos B requeridos para cada uno de estos procesos.

La capacidad de adaptación de los organismos a través de la mutación y cambios genéticos es al parecer mucho mayor y más rápida de lo que se había especulado teóricamente. La visión de cambios genéticos, y

por tanto la evolución de las especies como resultado de cambios pequeños y aleatorios en genes individuales, va cambiando con los resultados experimentales y observaciones hechas en diversos campos de la biología (191). En situaciones de presión selectiva elevada se hacen evidentes mecanismos que quizás no se pueden observar con facilidad en situaciones convencionales. De esta manera han sido observados cambios evolutivos muy rápidos en diversos organismos, por lo cual se ha propuesto que dentro del genoma se encuentran secuencias de DNA que son capaces de promover cambios genéticos importantes y rápidos (191). En el caso del sistema inmune, se ha descrito que la enzima RAG es una reliquia proveniente de un transposón ancestral y que además esta enzima es capaz de actuar como transposasa (192-194), lo cual adicionaría un nivel más de capacidad de acción para la diversificación del repertorio inmunológico. Además se ha sugerido que esta enzima pudiera participar en los rearrreglos aberrantes que dan origen a ciertos tumores linfoides (194).

La enorme diversidad que presenta la respuesta inmune es una muestra de la capacidad evolutiva y de adaptación de los organismos. El descubrimiento de estas propiedades y del origen de las enzimas RAG ayuda a explicar el por qué el sistema inmune apareció de forma tan abrupta durante la evolución, el sistema inmune adaptativo no tiene contraparte en los invertebrados y representa un magnífico ejemplo del cómo piezas completas de DNA movable han tenido un impacto importante en la evolución (191).

A pesar de que un gran número de mecanismos han sido descritos para explicar la enorme variedad y capacidad de respuesta del sistema inmune, muchas de las reglas que regulan a este fenómeno no han sido identificadas. En particular, no se conoce con exactitud toda la maquinaria que participa en estos procesos. Además, no se ha podido determinar si el repertorio útil y el repertorio (útil) para la protección se generan bajo las

mismas reglas y si provienen de la misma fuente ya que las señales que participan en su desarrollo conllevan una presión selectiva mayor que antígenos no peligrosos. A su vez, no se sabe si el repertorio útil es una representación aleatoria y representativa del repertorio disponible o si se forma de acuerdo a reglas estrictas del desarrollo que permanecen desconocidas.

X. CONCLUSIONES

1.- Los anticuerpos que expresan la cadena λ son capaces de sustituir las funciones desempeñadas por los anticuerpos que expresan cadenas κ en la generación de inmunidad, por lo que el repertorio de Igs de los ratones $C\kappa^{-/-}$ es funcional y capaz de proteger a los animales contra diversas infecciones.

2.- El reemplazo de regiones V_H es un mecanismo con un gran potencial para diversificar un repertorio muy restringido y este repertorio expandido es definitivamente funcional.

3.- La hipermutación somática junto con el reemplazo de regiones V_H participan en la generación de anticuerpos protectores contra diversos patógenos virales y en la formación de anticuerpos contra diversos antígenos en los ratones QM. De esta manera, los rearrreglos secundarios de Ig y la hipermutación somática son responsables de la formación de los repertorios disponible y útil de estos ratones.

mismas reglas y si provienen de la misma fuente ya que las señales que participan en su desarrollo conllevan una presión selectiva mayor que antígenos no peligrosos. A su vez, no se sabe si el repertorio útil es una representación aleatoria y representativa del repertorio disponible o si se forma de acuerdo a reglas estrictas del desarrollo que permanecen desconocidas.

X. CONCLUSIONES

1.- Los anticuerpos que expresan la cadena λ son capaces de sustituir las funciones desempeñadas por los anticuerpos que expresan cadenas κ en la generación de inmunidad, por lo que el repertorio de Igs de los ratones $C\kappa^{-/-}$ es funcional y capaz de proteger a los animales contra diversas infecciones.

2.- El reemplazo de regiones V_H es un mecanismo con un gran potencial para diversificar un repertorio muy restringido y este repertorio expandido es definitivamente funcional.

3.- La hipermutación somática junto con el reemplazo de regiones V_H participan en la generación de anticuerpos protectores contra diversos patógenos virales y en la formación de anticuerpos contra diversos antígenos en los ratones QM. De esta manera, los rearrreglos secundarios de Ig y la hipermutación somática son responsables de la formación de los repertorios disponible y útil de estos ratones.

XI. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

El presente trabajo explora la posibilidad de que existan características moleculares y mecanismos moleculares especiales involucrados en la generación de anticuerpos protectores. El estudio de estas características, permitirá mejorar el entendimiento del proceso de generación de la diversidad de los anticuerpos, el uso de los diferentes repertorios de inmunoglobulinas y quizá acercarnos a la respuesta de lo que ha sido denominado el enigma de los anticuerpos (13). ¿Cuánto de este gran repertorio es realmente necesario para protegernos de los patógenos?, ¿Qué características tienen los anticuerpos protectores?, ¿Qué mecanismos participan en la generación de estos? y ¿Cómo podemos utilizar este conocimiento para el diseño de nuevas y mejores vacunas?.

El análisis del fenómeno de inmunidad, es decir del conjunto de mecanismos celulares y humorales que participan en la generación de un estado de protección contra patógenos, es de suma importancia para entender el funcionamiento del sistema inmune ante la presión selectiva que ejerce el medio ambiente sobre los organismos, los sistemas de evolución y de adaptación que participan en este. Si bien los estudios desarrollados con haptenos sintéticos han permitido estudiar muchos de los mecanismos involucrados en el desarrollo del estado inmune, es necesario ahora, evaluar si dichos mecanismos son los mismos que operan durante una presión selectiva como la generada por las infecciones de patógenos..

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Seder, A., Hill, V.S.A. 2000. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 406:793-798. Finley J.H. Jr. 1951.
 - 1.1 The complete Writings of Thucydides: The Peloponnesian War. Modern Library, New York.
2. Paul, W. 1999. The Immune System: An Introduction. In "Fundamental Immunology" (W.E. Paul, Ed.). 4th ed. Lippincott-Raven, New York. pp. 1-18.
3. Landsteiner, K. 1936. The specificity of serological reactions. Dover publications, New York.
4. Burnet, F.M. 1959. The clonal selection theory of acquired immunity. The University Press, Cambridge.
5. Talmage, D.W. 1959. Clonal selection theory. *Science* 129:1643-1648.
6. Nossal, G.J.V. & Lederberg, J. 1958. Antibody production by single cells. *Nature* 181:1419-1420.
7. Pernis, B.G., Chiappino, G., Kelus, A.S. & Gell, P.G.H. 1965. Cellular localization of immunoglobulins with different allotypes specificities in rabbit lymphoid tissue. *J. Exp. Med.* 122: 853-875.
8. Edelman, G.M. 1959 Dissociation of gamma globulin. *J. Am Chem. Soc.* 81,3155.
9. Porter, R.R. 1959. The hydrolysis of rabbit gamma globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73,119.
10. Kabat. E.A., Wu T.T. Reid-Miller, .M., Perry, H.M. and Gottesman, K.S. 1987 "Sequences of Proteins of Immunological Interest, "U.S. Dept. of Health and Human services, Washington, DC.

11. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., and Foeller, C. 1991 Sequences of Proteins of Immunological interest " U.S. Dept. of Health and Human Services Washington, D.C.
12. Max, E. E., 1993. Immunoglobulins: Molecular genetics In "Fundamental Immunology" (W.E. Paul, Ed.) 3rd ed., pp. 283-382. Reven Press, New York.
13. Kind, T.J. and Capra J.D. 1984.The nature of the problem. In "The antibody Enigma". Plenum Press, New York. pp. 1-15.
- 14 Landsteiner, K. 1945. The specificity of serological reactions. Harvard University Press, Boston.
15. Landsteiner, K. 1962. The specificity of serological reactions. Revised ed. Dover, New York.
- 16 Jerne N.K. 1955. The natural selection theory of antibody formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 41:849.
17. Silvertein. A. M. 1993. The history of immunology, In "Fundamental Immunology" (W.E. Paul, ed), 3rd ed., pp.21-41. Raven Press, New York.
18. Dreyer. W.J., and Bennett, W.C. 1965. The molecular basis of antibody formation; A paradox. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 54, 864.
19. Hozumi, and Tonegawa, S. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73,3628-3632.
20. Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581.
21. Maki, R., Kearney J.K. Paige, C., and Tonegawa, S. 1980 Immunoglobulin gene rearrangement in immature B cells. *Science.* 209:1366-1369.

22. Max, E. E., Seidman, J. G., and Leder, P. 1979. Sequences of five potential recombination sites encoded close to an immunoglobulin kappa constant region gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:3450-3454.
23. Sakano, H., Huppi, K., Heinrich, G. and Tonegawa, S. 1979 Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature.* 280:288-294.
24. Seidman, J.G., and Leder, P. 1978. The arrangement and rearrangement of antibody genes. *Nature.* 276:790-795.
25. Seidman, J.G., Edgell, M. H. and Leder, P. 1978. Immunoglobulin light-chain structural gene sequences cloned in a bacterial plasmid. *Nature.* 271:582-585.
26. Seidman, J.G., Max, E.E. and Leder, P. 1979. A kappa-immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation. *Nature.* 280:370-375.
27. Tonegawa, S., Brack, C., Hozumi, N., and Schuller, R. 1977. Cloning of an immunoglobulin variable region gene from mouse embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:3518-3522.
28. Tonegawa, S., Maxam, A.M., Tizard, R., Bernard, O. and Gilbert, W. 1978. Sequence of a mouse germ-line gene for variable region of an immunoglobulin light chain. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 75:1485-1489.
29. Blackwell, T.K., and Alt, F.W. 1989. Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 23:605-636.
30. Chen, J. and Alt, F. W. 1993. Gene rearrangement and B cell development. *Curr. Opin Immunol.* 5:194-200.

31. Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C. and Baltimore, D. 1990. RAG-1 and RAG-2 adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*. 248:1517-1523.
32. Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and Baltimore, D. 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59:1035-1048.
33. Gellert, M. 1997. Recent advances in understanding V(D)J recombination *Adv. Immunol.* 63:39-64.
34. Lewis, A., Rosenberg, N., Alt, F. and Baltimore, D. 1982 Continuing kappa-gene rearrangement in a cell line transformed by Abelson murine leukemia virus. *Cell*. 30:807-816.
35. Selsing, E., Voss J. and Storb, U. 1984. Immunoglobulin gene 'remnant' DNA implications for antibody gene recombination. *Nucleic Acids Res.* 15: 2699-2705.
36. Persiani, D.M., Durdick. J. and Selsing. E. 1987. Active lambda and kappa antibody gene rearrangement in Abelson murine leukemia virus transformed pre-B cells. *J. Exp. Med.* 165:1655-1674.
37. Cebra, J., Colberg, J.E. and Dray, S. 1966. Rabbit lymphoid cells differentiated with respect to α , γ , and μ heavy chain polypeptide chains and to allotypic markers Aa1 and Aa2. *J. Exp. Med.* 123:547.
38. Pernis, B.G., Chiappino, G., Kelus, A.S. and Gell, P.G.H. 1980. Cellular localization of immunoglobulins with different allotype specificities in rabbit lymphoid tissues. *J. Exp. Med.* 122:853-863.
39. Bernier, G.M. and Cebra, J.J. 1964. Polypeptide chains of human gamma globulin: Cellular localization by fluorescent antibody. *Science* 144:1590-1592
40. Rolink, A. and Melchers, F. 1991. Molecular and cellular origins of B lymphocyte diversity. *Cell*. 66:1081-1094.

41. Hardy, R.R., Camack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D. and Hayakawa, K. 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173:1213-1225.
42. Ehlich, A., Martín, V., Muller, W. and Rajewsky, K. 1994. Analysis of the B cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr. Biol.* 4:573-583.
43. Alt, F.W. and Baltimore, D. 1982. Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments. Implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 4118-4122.
44. Bollum, F. J. 1974. Terminal deoxynucleotidyl transferase. In "The Enzymes" (P.D. Boyer, ed.), pp. 145-171. Academic Press. New York.
45. Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C. and Mathis, D. 1993. Mice Lacking TdT Mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science.* 261:1175-1178.
46. Komori, T., Okada, A., Stewart, V. and Alt, F.W. 1993. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT- deficient lymphocytes. *Science.* 261:1171-1175 published erratum appears in *ibid* 262:1957. 1993.
47. Rajewsky, K. 1996 Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature.* 381:751-758.
48. Manser, T., Wysocki, L. J., Gridley, T., Near, R.I., and Geffer, M. 1985. The evolution of the immune response. *Immunol. Today.* 6:94.
49. Okada, A. and Alt, F.W. 1994. Mechanisms that control antigen receptor variable region gene assembly. *Semin. Immunol.* 6:185-196.
50. Blackwell, T.K., and Alt, F.W. 1988. Immunoglobulin genes. In "Molecular Immunology" (B.D. Hames and D.M. Glover, eds.). pp.1-60 . IRL. Washington, D.C.

51. Altenburger, W. Steinmetz, M. and Zachau, H.G. 1980. Functional and non-functional joining in immunoglobulin light gene of a mouse myeloma *Nature*. 287:603-607.
52. Bernard, O., Gough, N.M. and Adams, J.M. 1981. Plasmacytomas with more than one Ig kappa m RNA: Implications for allelic exclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:5812-5816.
53. Cohn, M. and Langman, R. E. 1990. The protection: The unit of humoral immunity selected by evolution. *Immunol. Rev.* 115:7-147.
54. Levy, S., Campbell, M. J. and Levy, R. 1989. Functional immunoglobulin light chain genes are replaced by ongoing rearrangements of germline V κ genes to downstream J κ segments in a murine B cell line. *J. Exp. Med.* 170:1-13.
55. Arakawa, H. Shimizu T. and Takeda, S. 1996. Re-evaluation of the probabilities for productive rearrangements on the κ and λ loci. *Int. Immunol.* 8:91-99.
56. Alonso, A. Hozumi, N. and Murialdo, H. 1985. The sequence of a nonexpressed lambda 3-chain gene. *J. Immunol.* 135:614-619.
57. Zou, Y. R., Takeda, S. and Rajewsky, K. 1993. Gene targeting in the Ig κ locus: Efficient generation of λ expressing B. cells independent of gene rearrangement in Ig κ . *EMBO J.* 12:811-820.
58. Wood, D. L. and Coleclough, C. 1984. Different joining region J elements of the murine kappa immunoglobulin light chain locus are used at markedly different frequencies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:4756-4760.
59. Selsing, E., Voss, J. and Storb, U. 1984. Immunoglobulin gene "remnant" DNA Implication for antibody gene recombination. *Nucleic Acids. Res.* 12:4229-4246.

60. Constantinescu, A. and Schlissel, M.S. 1997. Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development. *J. Exp. Med.* 185:609-620.
61. Clarke, S. and McCray, S. 1991. A shared kappa reciprocal fragment and high frequency of secondary Jk5 rearrangements among influenza hemagglutinin specific B cell hybridomas. *J. Immunol.* 146:343-349.
62. Feddersen, R.M. and Van Ness, B.G. 1985. Double recombination of a single Immunoglobulin kappa-chain allele: implications for the mechanism of rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4793-4797.
63. Feddersen, R.M., Martin, D.J. and Van, N. 1990. Novel recombination of the Ig kappa-locus that results in allelic exclusion. *J. Immunol.* 145:745-750.
64. Huber, C., Klobeck, H.G. and Zachau, H.G. 1992. Ongoing V kappa-J kappa recombination after formation of a productive V kappa-J kappa coding joint. *Eur. J. Immunol.* 22:1561-1565.
65. Lewis, S., Rosenberg, N., Alt, F. and Baltimore, D. 1982. Continuing kappa-gene rearrangement in a cell line transformed by Abelson murine leukemia virus. *Cell.* 30:807-816.
66. Prak, E.L., Trounstein, M., Huszar, D. and Weigert M. 1994. Light chain editing in kappa deficient animals: A potential mechanism of B cell tolerance. *J. Exp. Med.* 180:1805- 1815.
67. Shapiro, M.A. and Weigert, M. 1987. How Immunoglobulin V kappa genes rearrange. *J. Immunol.* 139:3834-3839.
68. Harada, K. and Yamagishi, H. 1991. Lack of feedback inhibition of V kappa gene rearrangement by productively rearranged alleles. *J. Exp. Med.* 173:409-415.

69. Shimizu, T., Iwasato, T. and Yamagishi, H. 1991. Deletions of immunoglobulin C kappa region characterized by the circular excision products in mouse splenocytes. *J. Exp. Med.* 173:1065-1072.
70. Moore, M.W., Durdik, J., Persiani, D.M. and Selsing, E. 1995. Deletions of kappa chain constant region genes in mouse lambda chain-producing B. cells involve intrachromosomal DNA recombinantions similar to V-J joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:6211-6215.
71. Muller, B., Stappert, H., and Reth, M. 1990. A physical map and analysis of the murine C kappa-RS region show the presence of a conserved element. *Eur. J. Immunol.* 20:1409-1411.
72. Klobeck, H.G., and Zachau, H.G., (1986). The human CK gene segment and the kappa deleting element are closely linked. *Nucleic Acids Res.* 14:4591-4603.
73. Durdik, J., Moore, M. W. and Selsing, E. 1984. Novel kappa light-chain gene rearrangements in mouse lambda light chain-producing B lymphocytes. *Nature.* 307:749-752.
74. Nadel, B., Cazenave, P.A., and Sánchez, P. 1990. Murine lambda gene rearrangements: The stochastic model prevails over the ordered model. *EMBO J.* 9: 435-440.
75. Retter, M.W. and Nemazee, D. 1998. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J. Exp. Med.* 188:1231-1238.
76. Hieter, P.A., Korsmeyer, S.J., Waldmann, T.A. and Leder, P. 1981. Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature.* 290:368-372.
77. Dunda, O. and Corcos, D. 1997. Recombining sequence recombination in normal kappa chain-expressing B cells. *J. Immunol.* 159:4362-4366.
78. Daitch, L.E., Moore, M, W., Persiani, D.M., Durdik, J.M. and Selsing, E. 1992. Transcription and recombination of the murine RS element. *J. Immunol.* 149:832-840.

79. Muller, B. and Reth, M. 1988. Ordered activation of the Ig lambda locus in Abelson B cells lines. *J. Exp. Med.* 168:2131-2137.
80. Rusconi, D. and Kohler, G. 1995. Transmission and expression of a specific pair of rearranged immunoglobulin mu and kappa genes in transgenic mouse line. *Nature.* 314:330-334.
81. Nossal, G.J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell.* 76:229-239.
82. Hartley, S.B., Crosbie, J., Brink, R., Kantor, A.B., Basten, A. and Goodnow, C.C. 1991. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature.* 353:765-769.
83. Nemazee, D.A., and Bürki, K. 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature.* 337:562-566.
84. Nemazee, D. and Bürki, K. 1989. Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:8039-8043.
85. Tiegs, S.L., D.M. Russell, and D. Nemazee. 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* 177:1009-1020.
86. Gay, D., T. Saunders, S. Camper, and M. Weigert. 1993. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* 177:999-1008.
87. Radic, M.Z., J. Erikson, S. Litwin, and M. Weigert. 1993. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J. Exp. Med.* 177:1165-1173.
88. Radic, M. Z., Mascelli, M. A. Erikson, J., Shan, H. H. and Weigert, M. 1991. Ig H and L chain contributions to autoimmune specificities. *J., Immunol.* 156:176-182.

89. Erikson, J., Radic, M.Z., Camper, S.A., Hardy, R.R., Carmack, C., and Weigert, M. 1991. Expression of anti- DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature*. 349:331-334.
90. Taki, S., Schwenk, F. and Rajewsky, K. 1995. Rearrangement of upstream DH and VH genes to a rearranged immunoglobulin variable region gene inserted into the DQ52-JH region of the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur. J. Immunol.* 25:1888-1986.
91. Chen, C., Z. Nagy, E.L. Prak, and M. Weigert. 1995. Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity*. 3:747-755.
92. Kleinfield, R.W., and Weigert, M.G. 1989. Analysis of VH gene replacement events in a B cell lymphoma. *J. Immunol.* 142:4475-4482.
93. Reth, M., Gehrmann, P., Petrac. E. and Wiese. P. 1986. A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature*. 322:840-842.
94. Bertrand, F.E., R. Golub, and G.E. Wu. 1998. V(H) gene replacement occurs in the spleen and bone marrow of non- autoimmune quasi-monoclonal mice. *Eur. J. Immunol.* 28:3362-3370.
95. Cascalho, M., A. Ma, S. Lee, L. Masat, and M. Wabl. 1996. A quasi-monoclonal mouse. *Science* 272:1649-1652.
96. Pewzner-Jung. Y., Friendmann, D., Sonoda, E., Jung S., Rajewsky, K. and Eilat, D. 1998. B cell deletion, anergy, and receptor editing in "knock in" mice targeted with a germline encoded or somatically mutated anti DNA heavy chain. *J. Immunol.* 161:4634-4645.
97. Somoda, E., Pewzner-Jung, Y., Schwers, S., Taki, S., Jung, S., Eilat, D. and Rajewsky, K. 1997. B. cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity*. 6:225-233.

98. Fanning, L., Bertrand, D., E., Steinberg, C. and Wu, G.E. 1998. Molecular mechanisms involved in receptor editing at the Ig heavy chain locus. *Int. Immunol.* 10:241-246.
99. Nadel, B., Tang, A., Escuro, G. and Feeney, A.J. 1998. Sequence of the spacer in the recombination signal sequence affects V(D)J rearrangement frequency and correlates with nonrandom V κ usage in vivo. *J. Exp. Med.* 187:1495-1503.
100. Chen, C., E.L. Prak, and M. Weigert. 1997. Editing disease-associated autoantibodies. *Immunity.* 6:97-105.
101. Pelanda, R., S. Schwers, E. Sonoda, R.M. Torres, D. Nemazee, and K. Rajewsky. 1997. Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity.* 7:765-775.
102. Chen, C., Radic, M.Z., Erikson, J., Camper, S.A., Litwin, S., Hardy, R.R. and Weigert, M. 1994. Deletion and editing of B cell that express antibodies to DNA. *J. Immunol* 152:1970-1982.
103. Carsetti, R., Kohler, G. and Lamers, M.C. 1995. Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J. Exp. Med.* 181:2129-2140.
104. Allman, D.M., Ferguson, S.E. and Cancro, M.P. 1992. Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigen and exhibit unique signaling characteristics. *J. Immunol.* 149:2533-2540.
105. Melamed, D. Kench, J.A., Grabstein, K., Rolink, A., and Nemazee, D. 1997. A functional B cell receptor transgene allows efficient IL-7-independent maturation of B cell precursors. *J. Immunol.* 159:1233-1239.

106. Rolink, A., Grawunder, U., Haasner, D., Strasser, A. and Melchers, F. 1993. Immature surface Ig⁺ B cells can continue to rearrange kappa genes in a transgenic mouse line. *Nature*. 314:330-334
107. Lin, W.C. and Desiderio, S. 1995. V(D)J recombination and the cell cycle. *Immunol. Today*. 16:279-289.
108. Nemazee, D. 2000. Receptor editing in B cells. *Advances in Immunol.* 74:89-126.
109. Hikida, M., Mori, M., Takai, T., Tomochika, K., Hamatani, K. and Ohmori, H. 1996. Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells. *Science*. 274:2092-2094.
110. Han, S., Zheng, B., Schatz, D.G., Spanopoulou, E., and Kelsoe, G. 1996. Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science*. 274:2094-2097.
111. Han, S., S.R. Dillon, B. Zheng, M. Shimoda, M.S. Schlissel, and G. Kelsoe. 1997. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science* 278:301-305.
112. Hikida, M., and Ohmori, H. 1998. Rearrangement of lambda light chain genes in mature B cells in vitro and in vivo. Function of reexpressed recombination-activating gene (RAG) products. *J. Exp. Med.* 187:795-799.
113. Papavasiliou, F., R. Casellas, H. Suh, X.F. Qin, E. Besmer, R. Pelanda, D. Nemazee, K. Rajewsky, and M.C. Nussenzweig. 1997. V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science* 278:298-301.
114. Hikida, M., Mori, M., Kawabata, T., Takai, R. and Ohmori, H. 1997. Characterization of mouse lymph nodes. *J. Immunol.* 158:2509-2512.

115. Han, S., Zheng, B., Takahashi, Y. and Kelsoe, G. 1997. Distinctive characteristics of germinal center B cells. *Semin. Immunol.* 9:255-260.
116. Hertz, M., V. Kouskoff, T. Nakamura, and D. Nemazee. 1998. V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling. *Nature* 394:292-295.
117. Coleclough, C., Perry, R.P. Karjalainen, K. and Weigert, M. 1981. Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. *Nature.* 290:372-278.
118. Qin, X.F., S. Schwers, W. Yu, F. Papavasiliou, H. Suh, A. Nussenzweig, K. Rajewsky, and M.C. Nussenzweig. 1999. Secondary V(D)J recombination in B-1 cells. *Nature* 397:355-359.
119. Neuberger, M. S., Caskey, H.M., Pettersson, S., Williams, G.T. and Surani, M.A. 1989. Isotype exclusion and transgene down-regulation in immunoglobulin-lambda transgenic mice. *Nature.* 338:350-352.
120. Roark, J.H., Kuntz, C.L., Nguyen, K.A. Mandik, L., Cattermole, M. and Erikson, J. 1995. B cell selection and allelic exclusion of an anti-DNA Ig transgene in MRL-lpr/ lpr mice. *J. Immunol.* 154:4444-4455.
121. Meffre, E., F. Papavasiliou, P. Cohen, O. de Bouteiller, D. Bell, H. Karasuyama, C. Schiff, J. Banchereau, Y.J. Liu, and M.C. Nussenzweig. 1998. Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells. *J. Exp. Med.* 188:765-772.
122. Osmond, D.G., Rico-Vargas, S., Valenzona, H., Fautex, L., Liu, L., Janani, R., Lu, L. and Jacobsen, K. 1994. Apoptosis and macrophage-mediated cell deletion in the regulation of B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Immunol. Rev.* 142:209-230.

123. Lenhard-Schuller, R., Hohn, B., Brack, C., Hiramata, M., and Tonegawa, S. 1978. DNA clones containing mouse immunoglobulin kappa chain genes isolated by *in vitro* packaging into phage lambda coats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 4709-4713.
124. Prak, E.L. and Weigert M. 1995. Light chain replacement: a new model for antibody gene rearrangement. *J. Exp. Med.* 182:541-548.
125. Siminovitch, K.A., Moore, M.W., Durdik, J. and Selsing E. 1987. The human kappa deleting element and the mouse recombining segment share DNA sequence homology. *Nucleic Acids Res.* 15:2699-2705.
126. Chen, J., Trounstein, M., Kurahara, C., Young, F., Kuo C.C., Xu, Y., Loring, J.F., Alt, F. W. and Huszar, D. 1993. B cell development in mice that lack one of both Immunoglobulin κ light chain genes. *EMBO J.* 12:821-830.
127. Takeda, S., Y.R. Zou, H. Bluethmann, D. Kitamura, U. Muller, and K. Rajewsky. 1993. Deletion of the immunoglobulin kappa chain intron enhancer abolishes kappa chain gene rearrangement in cis but not lambda chain gene rearrangement in trans. *EMBO J.* 12:2329-2336
128. Xu, Y., Davison, L., Alt, F.W. and Baltimore, D. 1996. Deletion of the Immunoglobulin kappa light chain intron enhancer/matrix attachment region impairs but does not abolish V-kappa J-kappa rearrangement. *Immunity.* 4:377-385.
129. Xu, Y., Davison, L., Alt, F.W. and Baltimore, D. 1996. Function of the pre-T-cell receptor α chain in T cell development and allelic exclusion at the T cell receptor β locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:2169-2173.
130. Gorman, J.R., van der Stoep, N., Monroe, R., Cogen, M., Davison, L. and Alt, F.W. 1996. The Ig kappa three prime enhancer influences the ratio of Ig kappa versus Ig lambda B lymphocytes. *Immunity.* 5:241-252.

131. Cascalho, M., J. Wong, and M. Wabl. 1997. VH gene replacement in hyperselected B cells of the quasimonoclonal mouse. *J. Immunol.* 159:5795-5801.
132. Wagner, R.R, and Rose, J.K. 1996. Rhabdoviridae: The viruses and their Replication. In "Virology" (Fields ed.) 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 1121-1135.
133. Bachmann, M.F., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. 1995. T helper cell independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction?. *Eur. J. Immunol.* 25:3445.
134. Fehr, T., Bachmann, M.F., Bluethmann, H., Kikutani, H., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. 1996. T- independent activation of B cells by vesicular stomatitis virus: no evidence for the need of a second signal. *Cell. Immunol.* 168:184.
135. Lefrancois, L. 1984. Protection against lethal viral infection by neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies: distinct mechanisms of action in vivo. *J. Virol.* 51:208-214.
136. Bachmann, M.F., T.M. Kündig, C.P. Kalberer, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1994. How many specific B cells are needed to protect against a virus? *J. Immunol.* 152:4235-4241.
137. Roost, H.-P., M.F. Bachmann, A. Haag, U. Kalinke, V. Pliska, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1995. Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:1257-1261.
138. Roost, H.-P., A. Haag, C. Burkhardt, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Mapping of the dominant neutralizing antigenic site of a virus using infected cells. *J. Immunol. Methods* 189:233-242.

139. Kalinke, U., A. Krebber, C. Krebber, E. Bucher, A. Plückthun, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Monovalent single-chain Fv fragments and bivalent miniantibodies bound to vesicular stomatitis virus (VSV) protect against lethal infection. *Eur. J. Immunol.* 26:2801-2806.
140. Burns, W., L.C. Billups, and A.L. Notkins. 1975. Thymus dependence of viral antigens. *Nature* 256:654-656.
141. Charan, S., H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1987. Antibodies against the two serotypes of vesicular stomatitis virus measured by enzyme-linked immunosorbent assay: immunodominance of serotype-specific determinants and induction of asymmetrically cross-reactive antibodies. *J. Virol.* 61:2509-2514.
142. Leist, T.P., S.P. Cobbold, H. Waldmann, M. Aguet, and R.M. Zinkernagel. 1987. Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J. Immunol.* 138:2278-2281.
143. Peters, C.J., Buchmeier, M., Rollin, P.E. and Ksiazek, T.G. 1996. Arenaviruses. In "Virology" (Fields ed.) 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 1521-1551.
144. Kägi, D., B. Ledermann, K. Bürki, P. Seiler, B. Odermatt, K.J. Olsen, E.R. Podack, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369:31-37.

145. Zinkernagel, R.M., T. Leist, H. Hengartner, and A. Althage. 1985. Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T cell activity, as well as with footpad swelling reaction, and all three are regulated by H-2D. *J. Exp. Med.* 162:2125-2141.
146. Kalinke, U., E.M. Bucher, A. Oxenius, B. Ernst, H.P. Roost, S. Geley, R. Kofler, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. The role of somatic mutation in the generation of the protective humoral immune response against vesicular stomatitis virus (VSV). *Immunity* 5:639-652.
147. Kimmig, B. and F. Lehmann-Grube. 1979. The immune response of the mouse to lymphocytic choriomeningitis virus. I. Circulating antibodies. *J. Gen. Virol.* 45:703-710.
148. Moskophidis, D., S.P. Cobbold, H. Waldmann, and F. Lehmann-Grube. 1987. Mechanism of recovery from acute virus infection: treatment of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice with monoclonal antibodies reveals that Lyt-2+ T lymphocytes mediate clearance of virus and regulate the antiviral antibody response. *J. Virol.* 61:1867-1874.
149. Battegay, M., D. Moskophidis, H. Waldner, M.A. Brundler, W.-P. Fung-Leung, T.W. Mak, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1993. Impairment and delay of neutralizing antiviral antibody responses by virus-specific cytotoxic T cells. *J. Immunol* 151:5408-5415.
150. Bruns, M., J. Cihak, G. Muller, and F. Lehmann-Grube. 1983. Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization. *Virology* 130:247-251.

151. Buchmeier, M.J., H.A. Lewicki, O. Tomori, and M.B.A. Oldstone. 1981. Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and pichinde viruses: generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology* 113:73-85.
152. Baldrige, J.R. and M.J. Buchmeier. 1992. Mechanisms of antibody-mediated protection against lymphocytic choriomeningitis virus infection: mother-to-baby transfer of humoral protection. *J. Virol.* 66:4252-4257.
153. Seiler, P., M.A. Brundler, C. Zimmermann, D. Weibel, M. Bruns, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1998. Induction of protective cytotoxic T cell responses in the presence of high titers of virus-neutralizing antibodies: implications for passive and active immunization. *J. Exp. Med.* 187:649-654.
154. Wright, K.E. and M.J. Buchmeier. 1991. Antiviral antibodies attenuate T-cell-mediated immunopathology following acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.* 65:3001-3006.
155. Roland, R.R. 1996. *Picornaviridae: The viruses and their replication*. In "Virology" (Fields ed.) 3rd ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp. 609-654.
156. Fehr, T., H.Y. Naim, M.F. Bachmann, A.F. Ochsenbein, P. Spielhofer, E. Bucher, H. Hengartner, M.A. Billeter, and R.M. Zinkernagel. 1998. T-cell independent IgM and enduring protective IgG antibodies induced by chimeric measles viruses. *Nat. Med.* 4:945-948.
157. Plotkin, S.A., Murdin, A. and Vidor, E. 1999. Inactivated Polio vaccine. In "Vaccines" (Plotkin and Orenstein eds.) 3rd ed. pp. 345-363.
158. Hoffman T. Ruiz C, Counts G, et al. 1975. Waterborne typhoid fever in Dade County, Florida. *Am. J. Med.* 59:481-487

159. Huckstep R. 1962. Typhoid fever and other Salmonella infections. Edinburgh, E & S Livingstone.
160. Levine MM, Kaper J, Black, R. et al. 1983. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* 47:510-550.
161. Levine, M. 1999. Typhoid Fever Vaccines. In: "Vaccines". (Plotkin, S.A. and Orenstein, W.A. ed.) 3rd ed. W.B Saunders Company USA. pp. 781-814.
162. Germanier R, Furer E. 1975. Isolation and characterization of gal E mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: A candidate strain for a live oral typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* 141:553-558
163. Klugman K, Gilbertson IT, Kornhoff HJ, et al. 1987. Protective activity of Vi polysaccharide vaccine against typhoid fever. *Lancet.* 2:1165-1169
164. Landy M. 1953. Enhancement of immunogenicity of typhoid vaccine by retention of the Vi antigen. *Am. J. Hyg.* 588:148-164.
165. Plotkin SA, Bouveret-Le Cam N. 1995. A new typhoid vaccine composed of Vi capsular polysaccharide. *Arch. Intern. Med.* 155:2293-2299.
166. Robbins J, Robbins, J. 1984. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide Vi antigen of *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.* 150:436-439
167. Walter Reed Army Institute of Research. 1964. Preparation of dried acetone inactivated and heath-phenol-inactivated typhoid vaccines . *Bull. World Health Org.* 30:635-646.
168. Walter Reed Army Institute of Research, International Laboratory for Biological Standards SS. 1964. Physical and chemical studies on two dried inactivated typhoid vaccines (vaccine K and L). *Bull. World Health Org.* 30:647-652.

169. Wong KH, Feeley JC, Northrup RS, et al. 1974. Vi antigen from *Salmonella typhosa* and immunity against typhoid fever: I. Isolation and immunologic properties in animals. *Infect. and Immun.* 9:348-353.
170. Calderón, I., Lobos, S.R., Rojas, H. A., Palomino, C., Rodríguez, L.H. and Mora, G. 1986. Antibodies to Porin Antigens of *Salmonella typhi* Induced during Typhoid Infection in Humans. *Infect. Imm.* 52(1): 209-212.
171. Ortiz, V., Isibasi, A., García, O. E y Kumate, J. 1989. Immunoblot Detection of Class-Specific Humoral Immune Response to Outer Membrane Proteins Isolated from *Salmonella typhi* in Humans with Typhoid Fever. *J. Clin. Microbiol.* 27:1640-1645.
172. Pelayo, R., Isibasi, A., Paniagua, J., Ortiz, V., Muy, M., González, C., Islas, S., Kumate, J., 1989. "Elaboración de un inmunoabsorbente para la purificación de porinas de *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d". *Arch. Inv. Med.* 20:279-286.
173. Isibasi, A., Ortiz-Navarrete, V., Paniagua, J., Pelayo, R., González, C.R., García, J.A. y Kumate, J. 1992. Active Protection of Mice Against *Salmonella typhi* by Immunization with Strain Specific Porins. *Vaccine.* 10:811-813.
174. Blanco, F., Isibasi, A., González, C. R., Ortiz, V. Paniagua, J. Arreguín, C y Kumate, J. 1993. Human Cell Mediated Immunity to Porins From *Salmonella typhi*. *Scand. J. Infect. Dis.* 25:730-736.
175. Nikaido, H. 1983. Proteins forming large channels from bacterial and mitochondrial outer membranes: porins and phage lambda receptor protein. *Methods in Enzymology.* 97:85-100.
176. Charan, S. and R.M. Zinkernagel. 1986. Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *J. Immunol.* 136:3057-3061.

177. Battegay, M., S. Cooper, A. Althage, J. Baenziger, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1991. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J. Virol. Methods*. 33:191-198.
178. Matsuura, Y., R.D. Possee, H.A. Overton, and D.H. Bishop. 1987. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 68:1233-1250.
179. Krebber, A., S. Bornhauser, J. Burmester, A. Honegger, J. Willuda, H.R. Bosshard, and A. Pluckthun. 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Methods*. 201:35-55.
180. Isibasi, A., Ortiz, V., Vargas M., Paniagua J., González C., Moreno J., Kumate J., 1988. "Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12,Vi:d". *Infect. Immun.* 56:2953-2959.
181. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
182. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol-reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-276.
183. Reth, M., Hammerling, G.J. and Rajewsky, K. 1978. Analysis of the repertoire of anti-NP antibodies in C57BL/6 mice by cell fusion. I. Characterization of antibody families in the primary and hyperimmune response. *Eur. J. Immunol.* 8:393.
184. Gorman, J.R. and Alt, F.W. 1997. Regulation of Immunoglobulin light chain isotype expression. *Adv. Immunol.* 69:113-181.

185. Arakawa, H., Shimizu, T. and Takeda, S. 1996. Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the kappa and lambda loci. *Int. Immunol.* 8:91-99.
186. Alt, F.W., Enea, V., Bothwell, A.L. and Baltimore, D. 1980. Activity of multiple light chain genes in murine myeloma cells producing a single, functional light chain. *Cell.* 21:1-12.
187. Korsmeyer, S.J., Hieter, P.A., Sharrow, S.O., Goldman, C.K., Leder, P. and Waldmann, T.A., 1982. Normal human B cells display ordered light chain gene rearrangements and deletions. *J. Exp. Med.* 156:975-985.
188. Nussenzweig, M.C. 1998. Immune receptor editing: revise and select. *Cell.* 95:875-878.
189. de Wildt, R.M.T., R.M.A. Hoet, W.J. van Venrooij, I.M. Tomlinson, and G. Winter. 1999. Analysis of Heavy and Light Chain Pairings Indicates that Receptor Editing Shapes the Human Antibody Repertoire. *J. Mol. Biol.* 285:895-901.
190. Nemazee, D. and Weigert, M. 2000. Revising B cell receptors. *J. Exp. Med.* 11:1813-1817.
191. Pennisi, E. 1988. How the genome readies itself for evolution. *Science.* 281:1131-1134.
192. Agrawal, A., Eastman, Q. and Schatz, D. 1998. Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature.* 394:744-751.
193. Plasterk, R. 1998. Ragtime jumping. *Nature.* 394:718-719.

194. Hiom, K., Melek, M. and Gellert, M. 1998. DNA transposition by the RAG1 and RAG2 proteins: a possible source of oncogenic translocations. *Cell*. 94:463-470.
195. Planz, O., P. Seiler, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1996. Specific cytotoxic T cells eliminate cells producing neutralizing antibodies. *Nature* 382:726-729.
196. Lang, J., M. Jackson, L. Teyton, A. Brunmark, K. Kane, and D. Nemazee. 1996. B cells are exquisitely sensitive to central tolerance and receptor editing induced by ultralow affinity, membrane-bound antigen. *J. Exp. Med.* 184:1685-1697.
197. Fang, W., B.C. Weintraub, B. Dunlap, P. Garside, K.A. Pape, M.K. Jenkins, C.C. Goodnow, D.L. Mueller, and T.W. Behrens. 1998. Self-reactive B lymphocytes overexpressing Bcl-xL escape negative selection and are tolerized by clonal anergy and receptor editing. *Immunity*. 9:35-45.
198. Freitas, A.A., Rocha, B. and Coutinho, A. A. 1986. Lymphocyte population kinetics in the mouse. *Immunol Rev.* 91:5-13.
199. Paige, J.C. and Wu, G.E. 1989. The B cell repertoire. *FASEB J.* 1818-1824.
200. Yu, W., Nagaoka, H., Jankovic, N., Misulovin, Z., Suh, H., Rolink, A., Melchers, F., Mefree, E. and Nussenzweig, M.C. 1999. Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature*. 400:682-687.

201. Monroe, R.j., Chen, F., Ferrini, R., Davison, L. and Alt, F.W. 1999. RAG2 is regulated differentially in B and T cells by elements 5' of the promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:12713-12718.
202. Kuwata, N., Igarashi, H., Ohmura, T., Aizawa, S. and Sakaguchi N. 1999. Cutting edge: absence of expression of RAG1 in peritoneal B-1 cells detected by knocking into RAG1 locus with green fluorescent protein gene. *J. Immunol.* 163:6355-6359.

XIII ANEXO DE PUBLICACIONES.

1.- Paniagua J, García JA, **López CR**, González CR, Isibasi A, Kumate J. **1992**. Vacunas Conjugadas contra infecciones bacterianas: Fiebre Tifoidea. *Salud Pública Mex.* **34**:268-273.

2.- Isibasi, A., Paniagua, J., Rojo, M.P., Martín, N., Ramírez, G., González, C.R., **López-Macías, C.**, Sánchez, J., Kumate, J. and Ortiz-Navarrete, V. **1994**. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. In *Microbial Pathogenesis and Immune Response*. Annals of the New York Academy of Sciences. **730**:350-352

3.- **C. López-Macías**, M. A. López-Hernández, C.R. González, A. Isibasi, and V. Ortiz-Navarrete. **1995**. Induction of antibodies against *Salmonella typhi* Omp C porin by Naked DNA Immunization. Annals of the New York Academy of Sciences. **780**:496-498.

4.- **Constantino López-Macías**, Ulrich Kalinke, Marilia Cascalho, Matthias Wabl, Hans Hengartner, Rolf M. Zinkernagel and Alain Lamarre. **1999**. Secondary Rearrangements and Hypermutation Generate Sufficient B Cell Diversity to Mount Protective Antiviral Immunoglobulin Responses. *J. Exp. Med.* 189(11):1791-1798.

5.- U. Karrer, **C. López-Macías**, A. Oxenius, B. Odermatt, M.F. Bachmann, U. Kalinke, A. Althage, H. Bluethmann, H. Hengartner and R.M. Zinkernagel. **2000**. Antiviral high avidity IgG and B cell memory in the absence of follicular dendritic cells and germinal centres in TNFR1^{-/-} mice. *J. of Immunol.* 164:768-778.

6- Stephan Oehen, Tobias Junt, **Constantino López-Macías** and Thomas Kramps. 2000. Antiviral protection after DNA vaccination is short-lived and not enhanced by CpG DNA. *Immunology* 99(2):163-169.

7.- B. Ludewig, K. Maloy, **C. López-Macías**, B. Odermatt, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel. 2000. Induction of optimal neutralizing B cell responses by dendritic cells required transport and release of virus particles in secondary lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 30:185-196.

8.- Fehr T., **López-Macías C.**, Odermatt B., Torres R.M., Schubarth D.B., O'Keefe T. L., Rajewsky K., Matthias P., Neuberger M.S., Hengartner H. and Zinkernagel R. 2000. Correlation of anti-viral B cell responses and splenic morphology with expression of B cell-specific molecules. *International Immunology* 12 (9):1275-1284

9.- Ulrich Kalinke, Annette Oxenius, **Constantino López-Macías**, Rolf M. Zinkernagel and Hans Hengartner. 2000. Virus neutralization by germ-line vs hypermutated Antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(18):10126-31.

10.- Maldonado Carmen, Trejo Wendy, Ramírez Antonio, Carrera Manuel, Sánchez Joaquín, **López-Macías Constantino**, and Isibasi Armando. 2000. Lipophosphopeptidoglycan of *E. Histolytica* induces an anti-inflammatory innate immune response and down regulation of Toll like receptor 2 (TLR-2) gene expression in human monocytes. *Archives of Medical Research* 31:S71-S73

CAPITULOS EN LIBROS

-A. Isibasi, J. Paniagua, C.R. González, **C.R. López-Macías**, N. Martín-Orozco y V. Ortiz-Navarrete. **1996**. Porinas: Inmunógenos experimentales contra la fiebre tifoidea. Cap. 9. Vacunas, Fundamentos para su desarrollo. Cabrera R., Cravioto A. y Gómez de León P. (Eds). Manual Moderno. 1 Ed. 145-152.

- Isibasi A., Patiño G., Paniagua-Solís J., Secundino I., Sánchez J., Tello-Solís S. y **López-Macías C.** **2001**. Empleo de proteínas quiméricas de regiones expuestas de la porina ompc de *Salmonella typhi*: subunidad B de la toxina del cólera, para la inducción de inmunidad humoral en un modelo murino. En: Las múltiples facetas de la investigación en salud, prioridades estratégicas del Instituto Mexicano del Seguro Social p. 13-30.

11.- Ma. del Carmen Maldonado, Alberto Ramos-Garibay, Héctor Serrano, Fermín Jurado, Josefa Novales, Manuel Carrera, **Constantino López-Macías** and Armando Isibasi. The Presence of *Mycobacterium tuberculosis* in lesions of patients with Tuberculids. (submitted for publication 2000).

12.- Stephan Oehen, Bernard Odermatt, Urs Karrer, Rolf Zinkernagel and **Constantino López-Macías**. 2001. Important collaboration between the innate and adaptive immune response for protection against viral infections (Submitted 2001)

13.- **Constantino López-Macías**, Alain Lamarre, Marilia Cascalho, Matthias Wabl, , Rolf M. Zinkernagel and Hans Hengartner. Receptor revision on Mature B cells after viral Infection. (Manuscript in preparation)

14.- **Constantino López-Macías**, Beatrice Senn, Alain Lamarre, Armando Isibasi, Rolf M. Zinkernagel, Hans Hengartner and Ulrich Kalinke. Repertoire diversification by hypermutation in an anti Virus Antibody transgenic Mouse. (manuscript in preparation)

15.- **Constantino López-Macías**, Ulrich Kalinke, Etienne Bucher, Rolf M. Zinkernagel and. The contribution of anti-viral non neutralizing antibodies in the protection against infection. (Manuscript in preparation).

Secondary Rearrangements and Hypermutation Generate Sufficient B Cell Diversity to Mount Protective Antiviral Immunoglobulin Responses

By Constantino López-Macias,* Ulrich Kalinke,* Marilia Cascalho,† Matthias Wabl,‡ Hans Hengartner,* Rolf M. Zinkernagel,* and Alain Lamarre*

From the *Institute of Experimental Immunology, Department of Pathology, University Hospital, CH-8091 Zürich, Switzerland; and the †Department of Microbiology and Immunology, University of California, San Francisco, California 94143-0670

Summary

Variable (V) region gene replacement was recently implicated in B cell repertoire diversification, but the contribution of this mechanism to antibody responses is still unknown. To investigate the role of V gene replacements in the generation of antigen-specific antibodies, we analyzed antiviral immunoglobulin responses of "quasimonoclonal" (QM) mice. The B cells of QM mice are genetically committed to exclusively express the anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl specificity. However, ~20% of the peripheral B cells of QM mice undergo secondary rearrangements and thereby potentially acquire new specificities. QM mice infected with vesicular stomatitis virus (VSV), lymphocytic choriomeningitis virus, or poliovirus mounted virus-specific neutralizing antibody responses. In general, kinetics of the antiviral immunoglobulin responses were delayed in QM mice; however, titers similar to control animals were eventually produced that were sufficient to protect against VSV-induced lethal disease. VSV neutralizing single-chain Fv fragments isolated from phage display libraries constructed from QM mice showed V_H gene replacements and extensive hypermutation. Thus, our data demonstrate that secondary rearrangements and hypermutation can generate sufficient B cell diversity in QM mice to mount protective antiviral antibody responses, suggesting that these mechanisms might also contribute to the diversification of the B cell repertoire of normal mice.

Key words: B cell gene rearrangement • vesicular stomatitis virus • mutation • viral antibodies • antibody diversity

The immune system of vertebrates has evolved complex mechanisms to generate sufficient lymphocyte receptor diversity to protect the organism against a wide range of pathogens. Ab diversity is the result of several distinct mechanisms, the major one being the rearrangement of V(D)J gene segments to generate the coding sequences of the V regions of the heavy and light chains of a functional Ab molecule (1). Secondary rearrangements have mostly been implicated in the elimination of autoreactive Abs in a process called receptor editing (2–9). However, recent experiments have suggested a role of receptor editing in the generation of peripheral B cell diversity (8, 10–13). Despite these observations, the actual contribution of secondary rearrangements to the shaping of the primary B cell repertoire is unclear because these rearrangements are often indistinguishable from the canonical V(D)J rearrangements. Fortunately, gene-targeted mice expressing a very limited B cell repertoire have been generated, one of which is the

"quasimonoclonal" (QM)¹ mouse (14), which should allow assessment of the role of V_H gene replacement in the generation of protective antiviral Ig responses.

The QM mouse was generated by gene-targeted replacement of the endogenous J_H elements by the rearranged 17.2.25 V_H(D)J_H region isolated from a (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl (NP)-specific hybridoma, whereas the other allele was rendered nonfunctional by the targeted deletion of all J_H segments. In addition, QM mice have no functional κ light chain allele; therefore, the transgenic heavy chain can only pair with endogenously rearranged λ chains. When paired with a λ light chain, the targeted heavy chain allows binding to NP-

¹Abbreviations used in this paper: LCMV, lymphocytic choriomeningitis virus; NP, (4-hydroxy-3-nitrophenyl) acetyl; PEG, polyethylene glycol; PV, poliovirus; QM, "quasimonoclonal"; VSV, vesicular stomatitis virus; VSV-IND, VSV Indiana serotype; VSV-G, VSV glycoprotein; scFv, single-chain Fv

happen, rendering the QM primary B cell repertoire theoretically monospecific. However, despite this genetic predisposition, 20% of the peripheral B cells of QM mice do not bind NP (15). In the absence of immunization, V_H gene replacement intermediates were observed in bone marrow and splenic B cells of QM mice, and recombinase-activating gene (RAG)-1 transcripts were detected in the spleen (16). To assess the extent of diversification generated through secondary rearrangements, we infected QM mice with different viruses and monitored their specific antiviral responses. Our results show that V_H replacements together with hypermutation can generate protective antiviral Ab specificities in QM mice and indicate that both mechanisms could contribute to diversify the B cell repertoire of normal mice.

Materials and Methods

Mice and Viruses. The generation of the QM mouse has been previously described (14). C57BL/6 mice were obtained from the breeding colony of the Institut für Labortierkunde, Faculty of Veterinary Medicine, University Zürich-Irchel, Zürich, Switzerland. Experiments were carried out with age- and sex-matched animals kept under specific pathogen-free conditions. All animals were 8–16 wk old unless indicated otherwise.

VSV-IND (vesicular stomatitis virus Indiana serotype; Mudd-Summers isolate) was originally obtained from D. Kolakofsky (University of Geneva, Switzerland), and was grown on BHK cells in MEM with 5% FCS to virus stocks containing 10^6 PFU/ml. Pochovirus (PV) stock solutions of serotypes I, II, and III were obtained from the Swiss Serum and Vaccine Institute (Bern, Switzerland). Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)-WE was originally provided by F. Lehmann-Grube (Heinrich Pette Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie, University of Hamburg, Hamburg, Germany), and was grown on L-929 cells for 48 h in MEM with 5% FCS after infection with an initial multiplicity of infection (moi) of 0.01.

Immunizations. Mice were immunized intravenously on day 0 with a standard dose of 2×10^6 PFU of VSV-IND or 200 PFU of LCMV-WE as indicated. For PV experiments, 0.5 ml of PV vaccine, Salk (minimal content [min.] 30 D-antigen U type 1, min. 6 D-antigen U type 2, min. 24 D-antigen U type 3, phenoxethanol; Poliomyelitis-Impfstoff Berna, Swiss Serum and Vaccine Institute) was injected intravenously on days 0 and 14. Blood was collected at various time points as indicated.

VSV and PV Neutralization Assay. Serial twofold dilutions of serum samples (previously diluted 1:40) were mixed with equal volumes of VSV or PV (PV serotype II was used) containing 500 PFU/ml, and the mixtures were incubated for 90 min at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. 100 µl of the mixture was transferred onto Vero cell monolayers in 96-well plates and incubated for 1 h at 37°C. Monolayers were overlaid with 100 µl of DMEM containing 1% methylcellulose, incubated for 24 h (up to 48 h for PV) at 37°C, then the overlay was removed and the monolayer was fixed and stained with 0.5% crystal violet dissolved in 5% formaldehyde, 50% ethanol, 4.25% NaCl. The dilution reducing the number of plaques by 50% was taken as titer (17). To determine IgG titers, undiluted serum was treated with an equal volume of 0.1 M 2-ME in MEM tissue culture medium for 1 h at room temperature.

LCMV Neutralization Assay; Infectious Focus Reduction Assay. LCMV neutralization in vitro was determined as described previously (18). In brief, serial 2-fold dilutions of 10-fold prediluted

sera were incubated with LCMV for 90 min at 37°C in a 96-well plate. MC57G mouse fibroblasts were added, and incubated for 4 h to allow cells to settle and be infected by nonneutralized virus; cells were then overlaid with 1% methylcellulose in DMEM. After 48 h, cell monolayers were fixed with 4% formalin and infectious foci were detected by intracellular LCMV staining of infected cells with the rat anti-LCMV mAb VL-4. For LCMV neutralization by total Ig, sera were tested under nonreducing conditions. For LCMV neutralization by IgG, sera were first reduced by addition of 2-ME (final concentration 0.05 M) for 60 min. All samples were heat inactivated at 56°C for 30 min to destroy complement.

Detection of Abs by ELISA. To detect LCMV nucleoprotein-specific Abs, 96-well plates were coated overnight at 4°C with recombinant baculovirus-derived LCMV nucleoprotein (19, 20), washed three to five times with PBS 0.05%/Tween 20, and blocked with 1% BSA in PBS for 2–3 h at room temperature. Sera diluted in PBS containing 0.1% BSA were added and incubated for 90 min. Horseradish peroxidase-labeled specific goat anti-mouse IgG Ab (1:1,000; Zymed Laboratories) was added for 1 h, and the reaction was developed by addition of 0.4 mM ABTS (Boehringer Mannheim), in NaH₂PO₄, pH 4.0, 0.01% H₂O₂. The OD was read at 405 nm using a microplate reader (model 3550; Bio-Rad Laboratories). Positive titers were defined as 3 SD above the mean value of negative controls. To measure the different IgG isotype-specific anti-VSV Abs, ELISA plates were coated with 10 µg/ml of polyethylene glycol (PEG)-precipitated VSV-IND, and the assay was performed as described above.

Phage Display Library Construction. Phage display libraries were constructed as described previously (21). In brief, mRNA was isolated from 10^7 spleen cells using the QuickPrep mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech) and reverse transcribed using random hexamer primers according to the manufacturer's instructions (first strand synthesis for RT-PCR; Amersham Life Science). The V region of the heavy chain (V_H) was amplified using the VHback and VHfor mixes of degenerate primers, and the light chain V region (V_L) was amplified using the λ -specific primers LBA and LFA as described previously (21). The V_H and V_L PCR products were purified and assembled in a single-chain Fv (scFv) configuration using splicing by overlap extension PCR. The full-length scFv fragment product was gel-purified, digested with SfiI, and ligated into the phage display vector pAK100 (gift of Dr. Andreas Plückthun, University of Zurich-Irchel, Zürich, Switzerland). The ligation mixes were electroporated into XL1-Blue electrocompetent cells (Stratagene, Inc.) and plated. Colonies were scraped off the plates, and the scFv displaying phages were rescued by infection with the VCS-M13 helper phage (Stratagene, Inc.). Phage particles were PEG precipitated twice and resuspended in PBS. VSV-binding phages were selected by panning using immunotubes (Maxisorp; Nunc, Inc.) coated with 100 µg/ml PEG-precipitated VSV-IND particles by overnight incubation at room temperature. Tubes were blocked with 4% dried skim milk powder in PBS and washed 20 times with PBS containing 0.1% Tween and 20 times with PBS. Bound phages were eluted with 0.1 M glycine/HCl, pH 2.2, for 10 min and immediately neutralized with 2 M Tris/HCl, pH 8.5. Eluted phages were used to infect XL1-Blue cells that were plated, rescued as described above, and subjected to another round of panning before isolated clones were analyzed by ELISA. Isolated colonies from the second round of panning were grown in 96-well plates and rescued with VCS-M13 helper phage. After overnight incubation, 100 µl of the phage-containing supernatant was added to VSV-coated plates (10 µg/ml) and incubated for 90

min. The wells were washed five times with PBS containing 0.1% Tween, and peroxidase-labeled anti-M13 antiserum (Amersham Pharmacia Biotech) was then added and the plates incubated for another 90 min. The plates were again washed five times with PBS/0.1% Tween, and the bound peroxidase was revealed by incubation with *O*-phenylenediamine (Sigma Chemical Co.) and hydrogen peroxide. The reaction was stopped with 1 N HCl, and the absorbance was read at 490 nm using a Bio-Rad 3550 microplate reader.

Results and Discussion

Induction of Neutralizing Abs against VSV-IND in QM Mice. VSV is a cytopathic RNA negative strand virus of the *Rhabdoviridae* family closely related to rabies virus (22). After VSV infection, virus-neutralizing Abs mediate protection against a progressive paralytic disease (23, 24). Most VSV-IND-specific mAbs are directed against overlapping subsites clustered within one major antigenic site of the viral glycoprotein (25–27). The early IgM response (days 3–5) can be induced in the absence of T cell help (28, 29), whereas the switch to IgG (days 6–8) is T cell help dependent (30).

QM and C57BL/6 mice were immunized with 2×10^6 PFU of VSV-IND intravenously, and neutralizing serum Abs were monitored for 150 d. VSV total Ig neutralizing titers were measurable in QM mice 4 d after infection, but these titers were ~ 30 -fold lower than in C57BL/6 control mice (Fig. 1 a). The switch to the IgG subclass was delayed by ~ 6 d in QM mice: VSV-neutralizing IgG Abs appeared ~ 12 d after infection, whereas in control mice they were first detected at about day 6 (Fig. 1 a). About 40 d after infection, total anti-VSV neutralizing Abs reached similar levels in QM and control mice, and remained elevated for the duration of the 150-d observation period (Fig. 1 a). Similar kinetics were observed after infection with 10^2 or 10^4 PFU of VSV-IND (data not shown). Despite the delayed kinetics of Ab production, QM mice were able to control the viral infection and survived. However, the LD₅₀ was decreased 10-fold from 2×10^8 in C57BL/6 control mice to 2×10^7 in QM mice (data not shown).

Determination of the isotypes of the VSV-specific IgG Abs revealed that IgG2a was more abundant in infected QM mice than in control mice (Fig. 1 b). In contrast, IgG1 titers were higher in the control animals than in QM mice, while IgG2b and IgG3 Ab titers were approximately the same (Fig. 1 b). Similarly to infected QM mice, naive QM mice also show elevated IgG2a and IgG2b levels, which may indicate a certain bias towards Th1 cell development in QM mice (14).

The delayed kinetics of the VSV-neutralizing Ig response in QM mice was not due to the absence of kappa light chains because C κ -deficient mice (31) mounted virtually normal anti-VSV Ig responses (data not shown). The delayed kinetics observed in QM mice is likely to be attributable to the time required for the small number of anti-VSV B cell precursors present in naive QM mice to be activated or expanded and to produce sufficient serum Abs to

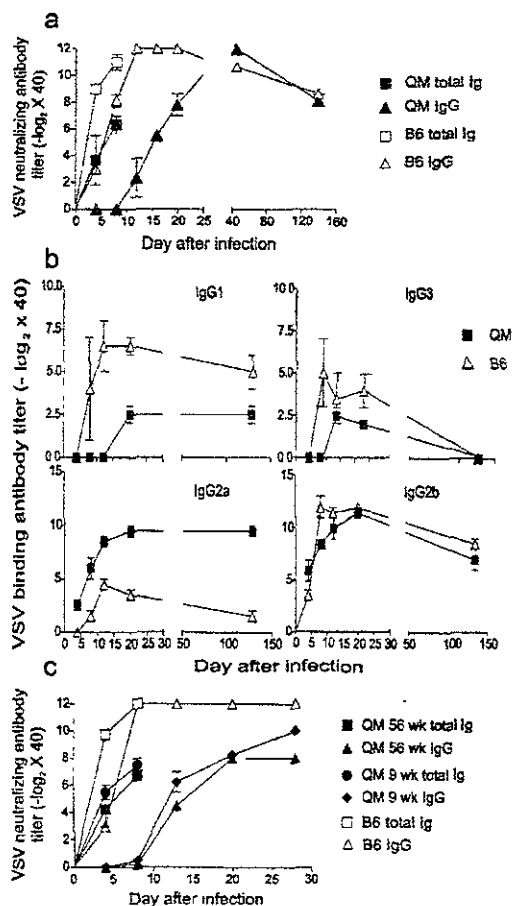


Figure 1. QM mice mount VSV-specific Ig responses. Groups of three QM and C57BL/6 mice were immunized with 2×10^6 PFU of VSV-IND intravenously. Blood was taken at the indicated time points, sera were separated and prefiltered 40-fold, and the Ig responses were analyzed. (a) Kinetics of VSV-neutralizing Ab responses in QM and C57BL/6 mice. (b) Titration of the different VSV-specific Ig isotypes in infected QM and C57BL/6 mice. Titers were defined as 3 SD above mean values of negative controls. (c) Kinetics of VSV-neutralizing responses of 9- and 56-wk-old QM mice. C57BL/6 mice were used as controls.

be detected in the neutralization assay. It has previously been reported that the amount of NP-specific serum IgG1 decreased from 13.1% of total IgG1 in 4–5-wk-old QM mice to 2.8% in 20–24-wk-old mice, which is consistent with the idea that B cells with variant receptors are preferentially expanded as QM mice age (15). This could lead to increased numbers of VSV-specific B cell precursors and an accelerated VSV-neutralizing Ab response in older mice. To test this hypothesis, 9- and 56-wk-old QM mice were infected with 2×10^6 PFU of VSV-IND. The anti-VSV neutralizing Ab response in both 9- and 56-wk-old QM mice displayed similar kinetics, suggesting that there was no significant increase in the number of VSV-specific B cell precursors in QM mice older than 9 wk (Fig. 1 c).

Analysis of VSV-specific scFv Fragments Isolated from QM Mice. To analyze V region sequences of VSV-specific neutralizing Abs generated in QM mice, phage display li-

libraries were constructed from splenic mRNA isolated from naive QM mice and from QM mice after primary and secondary VSV-IND infections. In a screening ELISA, 37% of the phages isolated from the naive library and ~57% of the phages isolated from QM spleens after primary or secondary VSV infections bound VSV. Thus, it can be concluded from this result that VSV-specific B cells were present in QM mice before infection. The serum of the mouse used to generate the naive library was tested for the presence of VSV-specific Abs and was found to be negative. In addition, it must be emphasized that mice kept in our facilities for prolonged periods of time have been tested repeatedly during the last 10 yr, and in no circumstances have we found the presence of VSV-IND-specific Abs, which could indicate accidental spreading of virus. Individual clones showing strong positive signals in the screening ELISA were concentrated by PEG precipitation and tested for their relative binding potential to VSV in a second ELISA. As shown in Fig. 2 a, scFv-displaying phages showed a specific dose-dependent binding to VSV-coated plates. To identify clones specific for the viral glycoprotein (VSV-G), binding of phages to VSV-infected EL4 cells expressing VSV-G on their surface was analyzed cytofluorometrically. From 48 tested clones, 15 showed binding to VSV-infected EL4 cells (data not shown). These 15 glycoprotein-specific clones were tested in a VSV-neutralization assay, which revealed that 12 out of 15 clones neutralized viral infectivity in vitro. The neutralizing titers of six independent scFv clones (see below) are shown in Fig. 2 b.

The V regions of the 12 VSV-neutralizing scFv Ab fragments were sequenced and aligned to the 17.2.25 V_H sequence expressed in QM mice. From the 12 clones ana-

lyzed, 6 independent sequences were identified, 2 from each of the three libraries (Fig. 2 c). Clones OB1 and OG6 were isolated from the naive library, clones 1A10 and 1E12 from the primary library, and clones 2F7 and 2H5 from the secondary library. The other six clones were multiple isolates of clone OG6 (four copies) and of clone 1A10 (two copies); such repeated isolation is often the consequence of the amplification of binding clones during the panning procedure. All six independent clones used a V_L fragment belonging to the $\lambda 1$ family. In addition, they all showed evidence for V_H gene replacement. Instead of the original 17.2.25 V_H gene segment, all clones used a different V_H gene segment belonging to the VH1 (J558) family that has previously been shown to play a role in secondary and hyperimmune responses against VSV in BALB/c mice (32). All six analyzed clones underwent secondary rearrangements by recombining a rearranged $V_H D$ segment with the D element of the rearranged $V_H D J_H$ segment of the QM mouse (Fig. 2 c). This type of $V_H D$ to $V_H D J_H$ rearrangement has previously been observed in naive QM mice in the majority of idiotype-negative sorted B cells (14, 15). However, unlike the events described here, a small proportion of idiotype-negative B cells did show signs of canonical V_H to $V_H D J_H$ secondary rearrangements (14, 15). Therefore, it is possible that such $V_H D$ to $V_H D J_H$ rearrangements are preferred to the canonical secondary rearrangements because they generate greater diversity by drastically varying the length of CDR3, which might in turn increase the chances of generating new specificities. It is unclear whether the heptamer motif embedded at the 3' end of the V_H gene segment of the 17.2.25 V region and most other V_H gene segments was involved in these rear-

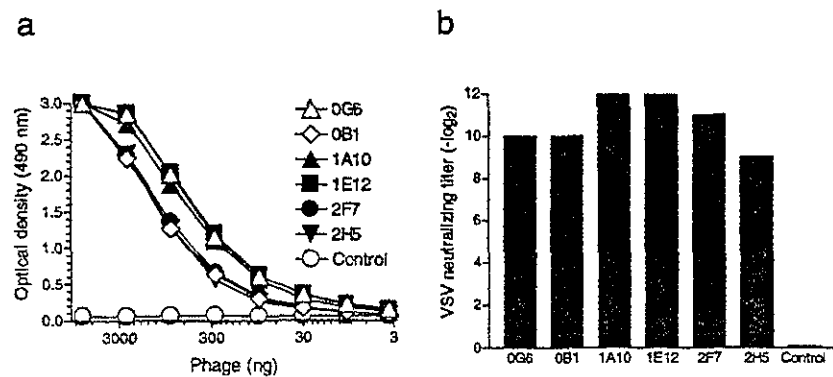


Figure 2. Binding, neutralizing capacity, and sequence analysis of VSV-specific scFv fragments isolated from phage display libraries (a) Phage clones displaying VSV-specific scFv fragments isolated from a naive QM mouse library (OB1 and OG6) and libraries generated from QM mice after primary (1A10 and 1E12) or secondary (2F7 and 2H5) infections were tested for their capacity to bind VSV-coated plates in ELISA (b) VSV-neutralizing titers of PEG-precipitated phage particles. (c) The nucleotide sequence of six VSV-specific clones is compared with the 17.2.25 transgene sequence (reference 16) shown in bold. Mutations in the DSP2.10 and $J_H 4$ segments are underlined. The remaining 3' sequence of the $J_H 4$ segments did not contain somatic hypermutations. The sequences of the complete scFv fragments are available from EMBL/GenBank/DBJ under accession nos. AF127092-AF127097.

Clone	VH	N	D	N	DSP2.10	N	JH4	Inserted D
17.2.25	TACTGTCTAGA				TACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	
OG6	TTCGTGCAAGA	TCCG		CCC	ACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	GS2
OB1	TACTGTCAAGA	GCA	CTAA	CCCA	TACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	SP2.2
1A10	TTCGTGCAAG	GGGCG	TTAC	CCCA	TACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	GF2.2
1E12	TTCGTGCTAG	GT	CCFACCTAGGTACCC	GTGG	ACTATAGGTAC	GCT	TACTATGCTATGGACTAC	SP2.11
2F7	TTCGTGCAAGA	GGGGAT	TGGTA	AGGGTCAG	ACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	SP1.n
2H5	TACTGTCAAGA	CAATT	CTGGAC	AGGGAA	TACTATAGGTAC	CCT	TACTATGCTATGGACTAC	GS2

rangements because the recombination breakpoint cannot be unambiguously determined. In addition, N regions flanking the inserted D elements were present in all analyzed clones (Fig. 2 c), which argues for the involvement of the normal rearrangement machinery including terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), which is expressed in bone marrow B cells and has recently been shown to be also reexpressed in germinal center B cells (13). Furthermore, the 6 VSV-specific clones sequenced showed extensive hypermutation in the remaining DSP2.10 and JH4 segments of clone 17.2.25 with a high frequency of 3.8% (15 mutations in 393 bp cumulated from the 6 scFv sequences). Interestingly, mutations were present in clones isolated from the naive library, confirming the results obtained in B cells isolated from the peripheral blood of unimmunized QM mice that also showed a high frequency of somatic mutations (14).

Induction of LCMV- and PV-specific Abs in QM Mice. Since germline Abs can already efficiently neutralize VSV infection in vitro and a relatively restricted B cell repertoire can mount an efficient early anti-VSV response (27), it is possible that by chance the right V_H/V_L pairing in QM mice could give rise to VSV-specific but not other virus-specific Abs. Therefore, in addition to the VSV-specific Ig response, the responses of QM mice to LCMV and PV were analyzed.

LCMV is a noncytopathic ambisense RNA virus of the *Arenaviridae* family for which the mouse is the natural host. Acute LCMV infection is predominantly controlled by CTLs in a perforin-dependent manner (33, 34). Early after infection, at about day 8, a strong Ab response specific for the LCMV nucleoprotein is mounted (20) that does not exhibit virus-neutralizing capacity (35, 36). Late after infection, between days 30 and 60, LCMV glycoprotein-specific neutralizing Abs develop (20, 37, 38) that have been shown to play an important role in protection against reinfection (39–41).

QM and C57BL/6 mice were immunized intravenously with 10^2 PFU of LCMV-WE, and the LCMV nucleoprotein-specific ELISA Ab and the LCMV-neutralizing Ab responses were monitored. QM mice mounted a delayed LCMV nucleoprotein-specific Ab response at about day 12 that was initially reduced by ~ 10 -fold in comparison with control mice, but which eventually reached similar levels by day 32 (Fig. 3 a).

Neutralizing Abs to LCMV normally appearing late after infection (20, 37, 38) followed the same slow kinetics in QM and control mice (Fig. 3 b). Low neutralizing Ab titers were first detected after 30 d of infection, and by day 70 a distinct neutralizing Ab response was measured in both QM and C57BL/6 mice (Fig. 3 b). The long time period required to mount a neutralizing response against LCMV could well have permitted the generation of sufficient LCMV-specific precursors to mount a neutralizing Ab response comparable to control animals. On the other hand, the reason for the long period of time needed to generate LCMV-neutralizing Abs is not well understood and could be dependent on factors other than low B cell precursor frequency (e.g., immunopathology [42]).

PV is a cytopathic positive strand RNA virus of the *Picornaviridae* family. The viral surface contains four regularly

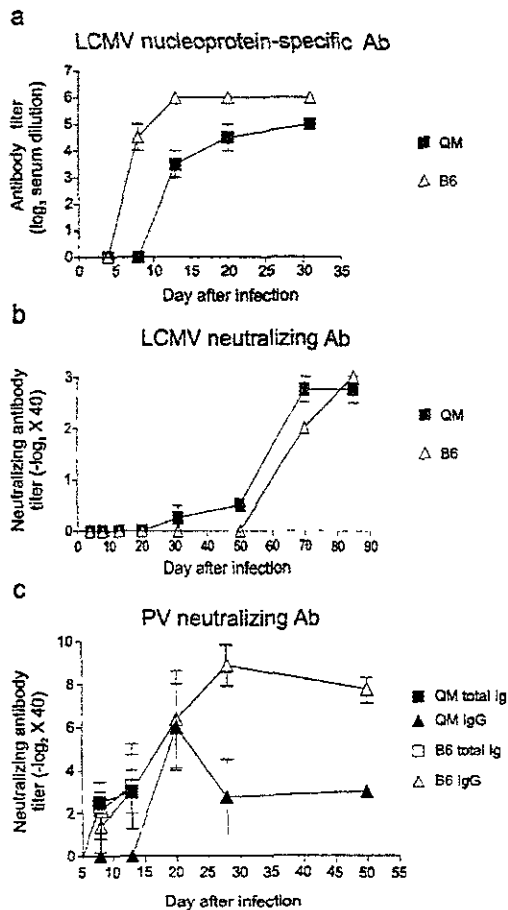


Figure 3. QM mice mount neutralizing Ig responses against LCMV and PV. Groups of three mice were immunized with 200 PFU of LCMV-WE or 0.5 ml of PV (Salk vaccine) intravenously. (a) LCMV nucleoprotein-specific Ab titers were measured by ELISA. (b) LCMV-neutralizing Abs and (c) PV-neutralizing Abs were measured as described in Materials and Methods.

ordered proteins (VP1–4) against which neutralizing Abs are directed (43). In BALB/c mice, PV induces an early T cell-independent IgM response followed by a T cell-dependent IgG response (44). Early after immunization with formalin-inactivated PV (Salk vaccine), total neutralizing Ig titers in QM mice were similar to control animals (Fig. 3 c). The IgG response was initially delayed, but 20 d after infection titers reached the levels observed in C57BL/6 control mice. Interestingly, in the memory phase after 28 d of infection, serum titers in QM mice showed a three- to fourfold reduction compared with controls (Fig. 3 c). This could reflect differences in the numbers or in the expansion potential of the PV-specific B cell clones generated in QM mice. In addition, the inactivated PV vaccine used in this experiment might have provided a weaker stimulus for the selection and expansion of PV-specific QM B cells.

Taken together, our experiments have shown that V_H replacement and hypermutation generated the VSV-specific immune response observed in QM mice and demonstrated the surprisingly great diversification potential of the

QM B cell repertoire, establishing that this phenomenon is not restricted to one particular viral antigen.

Where was V_H replacement taking place in QM mice, and what triggered it? The current model for the role of receptor editing in B cell development incorporates two different events (45). During the early phase of B cell development in the bone marrow, editing is induced by the interaction between a self-antigen and the receptor of a developing B cell (2-4). At a later phase, weak interaction between antigen and the B cell receptor of a mature peripheral B cell would induce editing, whereas strong binding turns it off (12, 13). Evidence for the occurrence of V_H replacement in both bone marrow and spleen of nonimmunized QM mice was recently reported (16). However, a slight accumulation of idiotype-negative cells in the spleen compared with the bone marrow suggests that the spleen might be a privilege site for ongoing secondary rearrangement (16). In addition, a higher proportion of idiotype-negative B cells was also observed in B cells isolated from the peritoneum when compared with peripheral blood (15). Thus, it would appear that there is a constant need for diversification of the QM mouse B cell repertoire throughout B cell development and in different tissues.

The molecular events involved in the induction of secondary rearrangements are still not clearly defined, but different triggering mechanisms could be envisaged. First, B cells could have a certain intrinsic capacity to undergo receptor editing in an antigen-independent fashion through help from T cells, cytokines, or other stimuli. Although this scenario cannot be ruled out, there is enough evidence supporting the notion that B cell receptor triggering is required for induction of secondary rearrangements both in the bone marrow (7, 8) and in the periphery (10-12) to make this unlikely. The B cell receptor in QM mice would not be expected to bind any other antigen than NP with high affinity. However, it could be argued that weak cross-reactive interactions between NP-specific B cells and dif-

ferent antigens could induce V gene replacement and generate virus-specific B cells. Second, it was proposed that environmental antigenic pressure could be the driving force behind the diversification of the V gene repertoire of naive QM mice (15). Recent data suggested that secondary rearrangements in peritoneal B-1 cells might contribute to the development of autoreactive Abs (46). In this study, the authors proposed that frequent exposure of B-1 cells to LPS may lower the threshold for activation of secondary rearrangements resulting in a rapid shift in the Ab repertoire. In view of our findings, this mechanism could generate not only autoreactive B cells but also potentially useful pathogen-specific Abs. On the other hand, de novo V_H replacement could have been triggered by cross-reactive binding of the NP-specific B cell receptor to the viral antigens used in this study. Although viral antigens might play a role in the expansion and maintenance of the virus-specific B cells in the infected mice, these interactions may be excluded as initial triggering events because VSV-specific scFv Abs were isolated from a phage display library constructed from a naive QM mouse. Therefore, virus-specific clones were generated in QM mice even before the introduction of viral antigens. In addition, nonimmunized QM mice undergo frequent V_H replacement (14, 15).

It is difficult to address the role of these events in the complexity of a normal Ab response. However, new evidence is emerging in favor of the frequent involvement of secondary rearrangements during normal B cell development (47). Moreover, sequence analysis of human heavy and light chain V domains suggested that receptor editing occurs in human peripheral B cells (48). Taken together with our results, these experiments suggest that, together with hypermutation, secondary rearrangement could participate in the shaping of the natural B cell repertoire. In conclusion, our data illustrate the potential of V_H gene replacements in the diversification of a restricted repertoire and definitely show that this expanded repertoire is functional.

We are grateful to K.J. Maloy, T. Fehr, and K. McCoy for reviewing the manuscript, and to N. Jeanguenat for excellent technical support. We would also like to thank Dr. Andreas Pluckthun for providing the pAK100 phage display vector.

This work was supported by the Kanton of Zurich, by a grant from the Swiss National Foundation (31-50884.97), by National Institutes of Health grant R01 AI41570, by a Howard Hughes Institute Transgenic Mouse grant, and by grants from the Junta Nacional de Investigaçao Científica e Tecnológica (Praxis XXI, BD 3763/94; to M. Cascalho) and Heuber Stiftung (to C. López-Macias). A. Lamarre acknowledges fellowship support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Medical Research Council of Canada (MRCC). C. López-Macias is a recipient of a Bundesstipendium from the Eidgenössische Stipendien Kommission, Bern, Switzerland, and acknowledges the support received from Fundación Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico.

Address correspondence to Constantino López-Macias, Institute of Experimental Immunology, Department of Pathology, University Hospital, Schmelzbergstrasse 12, CH-8091 Zurich, Switzerland. Phone: 41-1-255-2989. Fax: 41-1-255-4420; E-mail: citirim@pathol.unizh.ch

U. Kalinke's present address is EMBL Mouse Biology Programme, Adriano Buzzati-Traverso Campus, Via E. Ramarini 32, Monterotondo Scalo, I-00016 Rome, Italy.

Received for publication 14 March 1999.

References

1. Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 302:575-581.
2. Gay, D., T. Saunders, S. Camper, and M. Weigert. 1993. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* 177:999-1008.
3. Radic, M.Z., J. Erikson, S. Litwin, and M. Weigert. 1993. B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J. Exp. Med.* 177:1165-1173.
4. Tiegs, S.L., D.M. Russell, and D. Nemazee. 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* 177:1009-1020.
5. Chen, C., Z. Nagy, E.L. Prak, and M. Weigert. 1995. Immunoglobulin heavy chain gene replacement: a mechanism of receptor editing. *Immunity*. 3:747-755.
6. Lang, J., M. Jackson, L. Teyton, A. Brunmark, K. Kane, and D. Nemazee. 1996. B cells are exquisitely sensitive to central tolerance and receptor editing induced by ultralow affinity, membrane-bound antigen. *J. Exp. Med.* 184:1685-1697.
7. Chen, C., E.L. Prak, and M. Weigert. 1997. Editing disease-associated autoantibodies. *Immunity*. 6:97-105.
8. Pelanda, R., S. Schwerts, E. Sonoda, R.M. Torres, D. Nemazee, and K. Rajewsky. 1997. Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity*. 7:765-775.
9. Fang, W., B.C. Wemtraub, B. Dunlap, P. Garside, K.A. Pape, M.K. Jenkins, C.C. Goodnow, D.L. Mueller, and T.W. Behrens. 1998. Self-reactive B lymphocytes overexpressing Bcl-xL escape negative selection and are tolerized by clonal anergy and receptor editing. *Immunity*. 9:35-45.
10. Han, S., S.R. Dillon, B. Zheng, M. Shimoda, M.S. Schissel, and G. Kelsoe. 1997. V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science*. 278:301-305.
11. Papavasiliou, F., R. Casellas, H. Suh, X.F. Qin, E. Besmer, R. Pelanda, D. Nemazee, K. Rajewsky, and M.C. Nussenzweig. 1997. V(D)J recombination in mature B cells: a mechanism for altering antibody responses. *Science*. 278:298-301.
12. Hertz, M., V. Kouskoff, T. Nakamura, and D. Nemazee. 1998. V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling. *Nature*. 394:292-295.
13. Meffre, E., F. Papavasiliou, P. Cohen, O. de Bouteiller, D. Bell, H. Karasuyama, C. Schuff, J. Banchereau, Y.J. Liu, and M.C. Nussenzweig. 1998. Antigen receptor engagement turns off the V(D)J recombination machinery in human tonsil B cells. *J. Exp. Med.* 188:765-772.
14. Cascalho, M., A. Ma, S. Lee, L. Masat, and M. Wabl. 1996. A quasi-monoclonal mouse. *Science*. 272:1649-1652.
15. Cascalho, M., J. Wong, and M. Wabl. 1997. VH gene replacement in hyperselected B cells of the quasimonoclonal mouse. *J. Immunol* 159:5795-5801.
16. Bertrand, F.E., R. Golub, and G.E. Wu. 1998. V(H) gene replacement occurs in the spleen and bone marrow of non-autoimmune quasi-monoclonal mice. *Eur J Immunol*. 28: 3362-3370.
17. Charan, S., and R.M. Zinkernagel. 1986. Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *J. Immunol*. 136:3057-3061.
18. Bategay, M., S. Cooper, A. Althage, J. Baenziger, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1991. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *J. Virol Methods*. 33:191-198.
19. Matsuura, Y., R.D. Possee, H.A. Overton, and D.H. Bishop. 1987. Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J. Gen. Virol* 68:1233-1250.
20. Bategay, M., D. Moskopfidis, H. Waldner, M.A. Brundler, W.-P. Fung-Leung, T.W. Mak, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1993. Impairment and delay of neutralizing antiviral antibody responses by virus-specific cytotoxic T cells. *J. Immunol*. 151:5408-5415.
21. Krebber, A., S. Bornhauser, J. Burmester, A. Honegger, J. Willuda, H.R. Bosshard, and A. Piückthun. 1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J. Immunol. Methods*. 201:35-55.
22. Wagner, R.R. 1987. The Rhabdoviruses. Plenum Press, New York. 544 pp.
23. Lefrancois, L. 1984. Protection against lethal viral infection by neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies: distinct mechanisms of action in vivo. *J. Virol*. 51:208-214.
24. Bachmann, M.F., T.M. Kundig, C.P. Kalberer, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1994. How many specific B cells are needed to protect against a virus? *J. Immunol*. 152:4235-4241.
25. Roost, H.-P., M.F. Bachmann, A. Haag, U. Kalinke, V. Piiska, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1995. Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:1257-1261.
26. Roost, H.-P., A. Haag, C. Burkhardt, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Mapping of the dominant neutralizing antigenic site of a virus using infected cells. *J. Immunol. Methods*. 189:233-242.
27. Kalinke, U., A. Krebber, C. Krebber, E. Bucher, A. Pluckthun, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. Monovalent single-chain Fv fragments and bivalent miniantibodies bound to vesicular stomatitis virus (VSV) protect against lethal infection. *Eur. J. Immunol*. 26:2801-2806.
28. Burns, W., L.C. Billups, and A.L. Notkins. 1975. Thymus dependence of viral antigens. *Nature*. 256:654-656.
29. Charan, S., H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1987. Antibodies against the two serotypes of vesicular stomatitis virus measured by enzyme-linked immunosorbent assay: immunodominance of serotype-specific determinants and induction of asymmetrically cross-reactive antibodies. *J. Virol*. 61:2509-2514.
30. Leist, T.P., S.P. Cobbold, H. Waldmann, M. Aguet, and R.M. Zinkernagel. 1987. Functional analysis of T lymphocyte subsets in antiviral host defense. *J. Immunol*. 138:2278-2281.
31. Takeda, S., Y.R. Zou, H. Bluethmann, D. Kitamura, U. Muller, and K. Rajewsky. 1993. Deletion of the immunoglobulin kappa chain intron enhancer abolishes kappa chain gene rearrangement in cis but not lambda chain gene rearrangement in trans. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J* 12: 2329-2336.
32. Kalinke, U., E.M. Bucher, A. Oxenius, B. Ernst, H.-P. Roost, S. Geley, R. Kofler, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1996. The role of somatic mutation in the generation of the protective humoral immune response against vesicular stomatitis virus (VSV). *Immunity*. 5:639-652.
33. Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K.J. Olsen, E.R. Podack, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*. 368:246-249.

- ture. 369:31-37.
34. Zinkernagel, R.M., T. Leist, H. Hengartner, and A. Althage. 1985. Susceptibility to lymphocytic choriomeningitis virus isolates correlates directly with early and high cytotoxic T cell activity, as well as with footpad swelling reaction, and all three are regulated by H-2D. *J. Exp. Med.* 162:2125-2141.
 35. Kimmig, B. and F. Lehmann-Grube. 1979. The immune response of the mouse to lymphocytic choriomeningitis virus. I. Circulating antibodies. *J. Gen. Virol.* 45:703-710.
 36. Moskophidis, D., S.P. Cobbold, H. Waldmann, and F. Lehmann-Grube. 1987. Mechanism of recovery from acute virus infection: treatment of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice with monoclonal antibodies reveals that Lyt-2+ T lymphocytes mediate clearance of virus and regulate the antiviral antibody response. *J. Virol.* 61:1867-1874.
 37. Bruns, M., J. Cihak, G. Muller, and F. Lehmann-Grube. 1983. Lymphocytic choriomeningitis virus. VI. Isolation of a glycoprotein mediating neutralization. *Virology.* 130:247-251.
 38. Buchmeier, M.J., H.A. Lewicki, O. Tomori, and M.B.A. Oldstone. 1981. Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and pichinde viruses: generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology.* 113:73-85.
 39. Baldridge, J.R., and M.J. Buchmeier. 1992. Mechanisms of antibody-mediated protection against lymphocytic choriomeningitis virus infection: mother-to-baby transfer of humoral protection. *J. Virol.* 66:4252-4257.
 40. Seiler, P., M.A. Brundler, C. Zimmermann, D. Weibel, M. Bruns, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1998. Induction of protective cytotoxic T cell responses in the presence of high titers of virus-neutralizing antibodies: implications for passive and active immunization. *J. Exp. Med.* 187:649-654.
 41. Wright, K.E., and M.J. Buchmeier. 1991. Antiviral antibodies attenuate T-cell-mediated immunopathology following acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virol.* 65:3001-3006.
 42. Planz, O., P. Seiler, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1996. Specific cytotoxic T cells eliminate cells producing neutralizing antibodies. *Nature.* 382:726-729.
 43. Rueckert, R.R. 1990. *Picornaviridae* and their replication. In *Virology*. B.N. Fields and D.M. Knipe, editors. Raven Press, New York. 507-548.
 44. Fehr, T., H.Y. Naim, M.F. Bachmann, A.F. Ochsenbein, P. Spielhofer, E. Bucher, H. Hengartner, M.A. Biller, and R.M. Zinkernagel. 1998. T-cell independent IgM and enduring protective IgG antibodies induced by chimeric measles viruses. *Nat. Med.* 4:945-948.
 45. Nussenzweig, M.C. 1998. Immune receptor editing: revise and select. *Cell.* 95:875-878.
 46. Qin, X.F., S. Schwers, W. Yu, F. Papavasiliou, H. Suh, A. Nussenzweig, K. Rajewsky, and M.C. Nussenzweig. 1999. Secondary V(D)J recombination in B-1 cells. *Nature.* 397:355-359.
 47. Retter, M.W., and D. Nemazee. 1998. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J. Exp. Med.* 188:1231-1238.
 48. de Wildt, R.M.T., R.M.A. Hoet, W.J. van Venrootj, I.M. Tomlinson, and G. Winter. 1999. Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire. *J. Mol. Biol.* 285:895-901.

V. 11. 1
17-60

Induction of Antibodies against *Salmonella typhi* OmpC Porin by Naked DNA Immunization^a

C. LÓPEZ-MACÍAS, M. A. LÓPEZ-HERNÁNDEZ,
C. R. GONZÁLEZ, A. ISIBASI,
AND V. ORTIZ-NAVARRETE^b

*Unidad de Investigación Médica en Inmunología
Hospital de Especialidades
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS
P.O. Box 73-032
México D.F., C.P. 03020*

INTRODUCTION

Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, only affects humans. However, under certain experimental conditions it is possible to infect animals such as mice, and mimic some aspects of the natural infection enabling the study of the mechanisms of the immune response to the whole bacteria or the identification of protective antigens.¹ Thus, employing the murine model it has been demonstrated that outer membrane proteins (OMPs) isolated from *S. typhi* are able to elicit cellular² and humoral immune responses. Moreover, the administration of a mixture of OMPs¹ or porins³ isolated from *S. typhi* or purified recombinant OmpC⁴ induces protection in mice against the challenge with this bacterium. Nevertheless, this model also has other drawbacks. The OMP preparations obtained by conventional immunochemical methods always contain some contaminant lipopolysaccharide (LPS) because these two molecules are tightly associated. Since LPS has biological activities at very low concentrations, it is difficult to define the precise role of each molecule in the protection elicited. The demonstration that naked DNA is able to elicit specific immune response against those proteins it encodes represents an alternative strategy to overcome this problem. Here we report that the inoculation of DNA bearing the *S. typhi ompC* gene in the quadriceps of BALB/c mice induces specific antibody responses against the OmpC protein and, thus, could be used as a model to further analyze the immunological properties of this protein.

MATERIALS AND METHODS

Amplification of the ompC Gene

The *ompC* gene was amplified from the plasmid pST13⁵ by polymerase chain reaction (PCR). Two synthetic genes were obtained, one including the leader-peptide sequence, and the other lacking this sequence (FIG. 1).

^a Part of this work was supported by CONACYT (Grant 264100-5-3937M); C. L.-M. received a fellowship from PUIS DGAPA, UNAM.

^b Corresponding author.

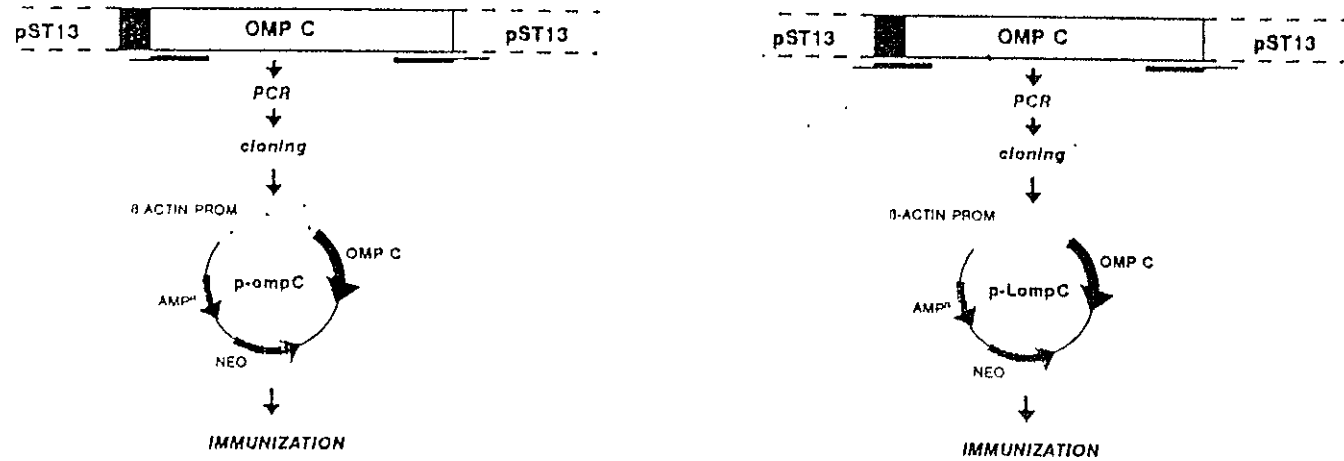


FIGURE 1. Amplification of the *ompC* gene and construction of the plasmid vectors. The *ompC* gene was amplified from the plasmid pST13¹ by polymerase chain reaction (PCR). By use of the *ompC* reported sequence⁹ three primers were designed. Primer F73 included an EcoRI site, ribosomal binding site (RBS), initiation codon (IC) and the leader OmpC sequence (CCGGG GAATTC AGGAG TAATTAATAATG AAA GTT AAA GTA CTG TCC), primer F72 included a HindIII site, RBS, IC, and the amino terminus sequence from the mature OmpC (CCGGG AAGCTT AGGAG TAATTAATAATG GATATC GTC GAA ATT TAT AAT AAA GAC GGC AAC AAA). The reverse primer, designed as F74, included a BamHI site and a stop codon (CCGGG GGATCC TT GAATTC GAA CTG GTA AAC CAG ACC CAG). Two synthetic genes were obtained, one including the leader-peptide sequence and the other lacking this sequence. The synthetic genes were inserted in the convenient restriction sites of the pFM92.1 expression vector under the β -actin promoter.

Construction of the Plasmid Vectors

The synthetic genes were inserted in the convenient restriction sites of the pFM92.1 expression vector⁷ under the β -actin promoter (FIG. 1). The resulting plasmids, p-LompC (with leader), p-ompC (without leader) and the pFM92.1, were purified by CsCl.

DNA Inoculation

Groups of five BALB/c mice were injected in the quadriceps four times, every two weeks, with 100 μ g of the constructs. Five days before the first DNA inoculation, a mixture of bupivacaine hydrochloride and methylparaben was injected in the quadriceps.

Purification of Porins

Porins were purified from *S. typhi* 9.12, Vi:d and recombinant OmpC was purified from *E. coli* UH302-pST13 by sodium dodecyl sulfate (SDS) extraction from bacterial membrane preparations by the method described previously.^{3,4}

Specific Antibody Responses

Two weeks after the last injection, the mice were bled and the antibodies against the OmpC porin were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot.³

RESULTS AND DISCUSSION

Mice immunized with four doses of p-LompC or p-ompC plasmids presented antibodies against the recombinant OmpC. These antibodies may have high affinity to the porin, since they resisted 0.3 M NaCl washes in the ELISA (FIG. 2), thus indicating that there is maturation of the B cell response after immunization with naked DNA. The titer of antibodies developed by mice immunized with the p-LompC was threefold higher than that obtained by the p-ompC. This may be due to the superior production and/or release of the protein to the extracellular

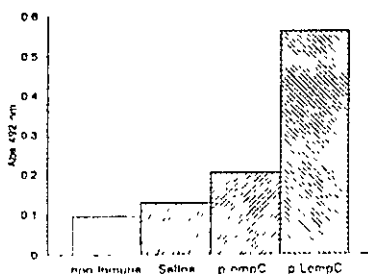


FIGURE 2. Induction of immunoglobulin G (IgG) against *Salmonella typhi* OmpC by immunization with naked DNA.

environment. Another possibility is that the p-LompC construct could prompt cell surface expression of the porin, making it more accessible to the B cells. The Western blot analysis confirmed the antibody response to OmpC, and neither antibodies against LPS nor cross-reacting with other porins was demonstrated. Therefore, DNA inoculation could be an alternative method for the induction of specific immune responses against *S. typhi* antigens. Many questions remain to be answered, such as, which is the mechanism involved in the higher antibody response induced by the vector bearing the leader sequence, whether there is indeed cellular immune response, and whether the immune response is protective. Considering that the current available vaccines against typhoid fever present undesirable side effects due to the contaminant LPS, naked DNA immunization could be explored as an approach in future vaccine development.

ACKNOWLEDGMENTS

Plasmid pST13 was provided by Dr. Felipe Cabello (Department of Microbiology and Immunology, New York Medical College, Valhalla, New York). Primers for OmpC amplification were donated from Dr. Fernando Noriega (Center for Vaccine Development, University of Maryland at Baltimore, Maryland). Plasmid pFM92.1 was provided by Prof. Günter J. Hammerling and Dr. Frank Momburg (Institute for Immunology and Genetics, German Cancer Research Center, Heidelberg).

REFERENCES

1. ISIBASI, A., V. ORTIZ-NAVARRETE, M. VARGAS, J. PANIAGUA, C. R. GONZÁLEZ, J. MORENO & J. KUMATE. 1988. *Infect. Immun.* 56: 2953-2959.
2. GONZÁLEZ, C. R., A. ISIBASI, V. ORTIZ-NAVARRETE, J. PANIAGUA, J. GARCÍA, F. BLANCO & J. KUMATE. 1993. *Microbiol. Immunol.* 37: 793-799.
3. ISIBASI, A., V. ORTIZ-NAVARRETE, J. PANIAGUA, R. PILAYO, C. R. GONZÁLEZ, J. A. GARCÍA & J. KUMATE. 1992. *Vaccine* 10: 811-813.
4. ISIBASI, A., J. PANIAGUA, M. P. ROJO, N. MARTÍN, G. RAMÍREZ, C. R. GONZÁLEZ, C. LÓPEZ-MACÍAS, J. SÁNCHEZ, J. KUMATE & V. ORTIZ-NAVARRETE. 1994. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 730: 350-352.
5. AGUERO, J., G. MORA, M. J. MROZENSKI-WILDEY, M. E. FERNÁNDEZ-BYROS, L. ARON & F. C. CABELLO. 1987. *Microb. Pathog.* 3: 399-407.
6. VENEGAS, A., I. GÓMEZ, I. ZAROR & A. YUDELEVICH. 1988. *Nucleic Acids Res.* 16(15): 7721.
7. MOMBURG, F., V. ORTIZ-NAVARRETE, J. NEEFFES, Y. GOULMY, H. SPITS, S. POWIS, O. BUTCHES, J. HOWARD, P. WALDEN & G. HAMMERLING. 1992. *Nature* 360: 174-177.

Other Formats: Links: *Immunology* 2000 Feb;99(2):163-169

Antiviral protection after DNA vaccination is short lived and not enhanced by CpG DNA.

Oehen S, Junt T, Lopez-Macias C, Kramps TA

University Hospital Zurich, Institute for Experimental Immunology, Zurich, Switzerland.

[Record supplied by publisher]

In this study, we investigated the potential of a DNA vaccine expressing the minimal cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitope gp33 of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein to protect against infection of a non-lymphoid organ and compared this to protection against a systemic infection. Furthermore, since immune stimulatory sequences have been shown to augment CTL responses, we examined the capacity of CpG DNA to enhance CTL memory. The data show that DNA vaccination with a gp33-based gene construct induced short-lived gp33-specific CTL which protected against a systemic infection but not against a peripheral infection. Immune stimulatory sequences were incapable of either prolonging CTL memory or promoting protection against infection of a peripheral organ.

PMID: 10692032

 the above report in format
 documents on this page through Loansome Doc

Correlation of anti-viral B cell responses and splenic morphology with expression of B cell-specific molecules

Thomas Fehr^{1,4}, Constantino López-Macías¹, Bernhard Odermatt¹,
Paul M. Torres⁵, Daniel B. Schubart^{2,6}, Theresa L. O'Keefe^{3,7}, Patrick Matthias²,
Sascha Hengartner¹ and Rolf M. Zinkernagel¹

¹Institute of Experimental Immunology, Department of Pathology, University Hospital, Schmelzbergstrasse 2, 8091 Zürich, Switzerland

²Friedrich Miescher Institute, Maulbeerstrasse 66, 4058 Basel, Switzerland

³Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK

⁴Present address: Department of Internal Medicine, University Hospital, Rämistrasse 100, 8091 Zürich, Switzerland

⁵Present address: Basel Institute of Immunology, Grenzacherstrasse 487, 4005 Basel, Switzerland

⁶Present address: Axxima Pharmaceuticals AG, Am Klopferspitz 19, D-82152 Planegg-Martinsried, Germany

⁷Present address: Leukosite Inc., 215 First Street, Cambridge, MA 02142, USA

Keywords: antibody, antiviral immunity, B cell activation, splenic morphology

Abstract

This study attempted to evaluate and compare the role of various B cell-specific markers for antiviral immune responses in mouse strains lacking molecules belonging to the B cell receptor (BCR) complex (IgM, Ig α and C κ), the co-stimulatory molecules (CD19 and CD22), the protein kinases (Src family tyrosine kinase (Btk)) or the transcription factors (OBF-1). These mice were tested in two model infections [vesicular stomatitis virus (VSV) and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)] using T cell-independent (TI) or T cell-dependent (TD) antigens. All mice controlled an LCMV infection indicating that cytotoxic T cell functions were within normal ranges. In contrast, OBF-1^{-/-} mice were partially protected and mb-1 ^{Δ C/C} mice not at all protected against VSV infection, a virus that is controlled virtually exclusively by neutralizing antibodies. Susceptibility to VSV infection was correlated with structural defects in the spleen: absence of mature B cells and follicles with marginal zone macrophages and absence of germinal centers with follicular dendritic cells correlated with lack or substantial reduction of protective IgM and IgG responses respectively. The lack of κ light chain did not affect the neutralizing response, indicating that it could easily be replaced by the λ chain. Absence of the co-stimulatory molecules CD19 and CD22 or of the signaling molecule Btk had modulating effects, but did not increase susceptibility to VSV or LCMV. Our findings suggest that there are crucial molecules for B cell activation at the beginning (BCR complex) and the end (transcription) of the signaling cascade, whereas fine-tuning factors modulating the response in between exhibit considerable functional overlap.

Introduction

A great number of molecules that play a role in B cell development and activation have been identified. Whereas a majority of them are expressed in various cell types of the immune system, some are B cell specific. They either belong to the B cell receptor (BCR) complex, to a heterogeneous group of tyrosine kinases and phosphatases as well as

other signaling molecules, to a group of B cell-specific co-stimulatory or inhibitory molecules, or they are B cell-specific transcription factors. The functions of these molecules have mainly been investigated by blocking studies with mAb, oligonucleotides or protein kinase inhibitors using cell culture systems. The generation of gene-targeted animals has offered

Correspondence to: R. M. Zinkernagel.

Transmitting editor: A. Radbruch.

Received 28 July 1999, accepted 16 May 2000

Antiviral B Cell Memory in the Absence of Mature Follicular Dendritic Cell Networks and Classical Germinal Centers in TNFR1^{-/-} Mice¹

Karrer,* C. López-Macías,* A. Oxenius,* B. Odermatt,† M. F. Bachmann,‡ U. Kalinke,*
J. Bluethmann,§ H. Hengartner,* and R. M. Zinkernagel^{2*}

TNFR1^{-/-} mice have been shown to lack networks of mature follicular dendritic cells (FDCs) and they do not form germinal centers. With nonreplicating Ags, IgG titers were inefficiently induced and not maintained. In this study, the neutralizing Ab response and the establishment of B cell memory in TNFR1^{-/-} mice after infection with vesicular stomatitis virus (VSV) were analyzed histologically and functionally. Immunization with VSV-derived protein Ags without adjuvant induced only IgM but no IgG Abs in TNFR1^{-/-} mice, whereas VSV glycoprotein emulsified in CFA or IFA induced IgM and IgG responses that were short-lived and of moderate titer. However, infection with live VSV induced excellent neutralizing IgM and IgG responses in TNFR1^{-/-} mice, and adoptively transferable B cell memory was generated and persisted for more than 300 days. In contrast, IgG cells and Ab-forming cells in the bone marrow declined within 300 days by 90–95% compared with controls. These findings suggest that 1) increased Ag dose and time of Ag availability can substitute for FDC-stored Ab-complexed Ag in the induction of efficient IgG responses in TNFR1^{-/-} mice devoid of classical germinal centers; 2) the induction and maintenance of adoptively transferable B cell memory can occur in the absence of Ag bound to mature FDCs; and 3) the long-term maintenance of elevated IgG titers is largely dependent on FDC-associated persisting Ag. However, about 5–10% of the Ab production remained in the absence of detectable persisting Ag in TNFR1^{-/-} mice, probably either due to immature FDCs being partially functional and/or due to long-lived plasma cells. *The Journal of Immunology*, 2000, 164: 768–778.

B cell memory is usually defined by three major characteristics: 1) The persistence of elevated levels of specific Ab. 2) The presence of memory B cells that are often type switched and recirculating through the lymphatic system. Secondary Ab responses after reexposure to Ag are faster, lead to higher Ab titers, and produce Ab of higher affinities than primary Ab responses (1–3). However, some memory B cells do not recirculate and some have been shown to be of the IgM isotype (4–6). Maintenance of elevated Ab titers vs survival of memory B cells seems to be regulated by distinct mechanisms. A large part of maintenance of memory Ig titers is thought to be dependent on presence of Ag persisting on follicular dendritic cells (FDCs)³

in secondary lymphoid organs, indicating that at least some memory B cells are activated by Ag to produce Abs (7–10). It has recently been shown that plasma cells in the BM can be long-lived (with a $t_{1/2}$ of 90–130 days), contributing to the maintenance of memory IgG titers in an Ag-independent fashion (11, 12). However, the relative contribution of the Ag-independent vs Ag-dependent Ab production for the maintenance of memory Ig titers is still a matter of debate.

The regulation of memory B cell survival occurs differently. Early experiments suggested that survival of memory B cells was Ag dependent, since they rapidly died after transfer into an Ag-free host (13, 14). However, other groups have shown that memory B cells divide rarely and have a prolonged life span without the obvious need of continuous Ag contact (3, 15). Although Ab-forming cells (AFCs) colocalize with persisting Ag within secondary lymphoid organs, most memory B cells recirculate throughout the lymphatic system, further indicating that they do not need continuous contact with persisting Ag (9). Thus, most of the current data suggests that memory B cells do not require persistent Ag for survival, but whether elevated specific Ig titers in the serum are largely Ag dependent or not is unclear.

Germinal centers (GCs) are specialized sites in secondary lymphoid organs where memory B cells are generated and selected for enhanced survival and for expression of high affinity surface IgG by Ag persisting on FDCs (2, 16–18). If the GC reaction is inhibited either by depletion of the complement component C3 or by blocking the interaction of CD40 with CD40L, memory B cells and secondary Ab responses are not generated (19–23). However,

¹Institute of Experimental Immunology, and ²Laboratory for Special Techniques, Department of Pathology, University Hospital of Zurich, Zurich, Switzerland, ³Basel Institute for Immunology, Basel, Switzerland, and ⁴Department CNS, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland

Received for publication January 14, 1999. Accepted for publication October 1999.

Costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

This work was supported by the Swiss National Science Foundation and the Kanton Zurich and by the Heuberg Stiftung. The Basel Institute for Immunology was funded and is supported by F. Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland). C.L.-M. is a recipient of a Bundesstipendium from the Eidgenössische Stipendienkommission, and acknowledges the support received from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Rolf M. Zinkernagel, Institute of Experimental Immunology, Schmelzbergstrasse 12, 8091 Zurich, Switzerland. E-mail address: rolf.zinkernagel@ptz.usz.ch

Abbreviations used in this paper: FDC, follicular dendritic cell; AFC, Ab-forming cell; BM, bone marrow; GC, germinal center; LN, lymph node; MLN, mesenteric lymph node; MZ, marginal zone; PALS, periarteriolar lymphoid sheath; PNA, peanut agglutinin; TD, T cell dependent; TI, T help-independent; VacciND₀, vaccinia virus recombinant for VSV-G; VSV, vesicular stomatitis virus; VSV-IND, VSV Indiana

strain; VSV-NJ, VSV New Jersey strain; VSV-G, glycoprotein of VSV-IND; CD40L, CD40 ligand.

VSV neutralization by germ-line vs. hypermutated antibodies

Ulrich Kalinke*, Annette Oxenius†, Constantino López-Macías‡, Rolf M. Zinkernagel, and Hans Hengartner

Institute of Experimental Immunology, 8091 Zurich, Switzerland

Contributed by Rolf M. Zinkernagel, June 19, 2000

Mice infected with vesicular stomatitis virus (VSV), a cytopathic virus closely related to rabies virus, mount a virus-neutralizing antibody response protecting against lethal disease. VSV-neutralizing monoclonal IgGs isolated from primary immune responses were devoid of somatic mutations, whereas most secondary and all hyperimmune response IgGs tested were hypermutated. A comparative analysis of recombinant single-chain antibody fragments (scFv-C κ) revealed that even the germ-line precursor of one hypermutated antibody bound and neutralized VSV. Four somatic amino acid substitutions in V_H increased by 10-fold the binding strength of monovalent scFv-C κ . The multivalent binding avidity of germ-line scFv-C κ was increased by more than 10-fold compared with the monovalent binding strength. In contrast, hypermutated scFv-C κ did not show such avidity effects. Thus, the overall binding difference between the germ-line and the hypermutated VSV-neutralizing antibody was only 10- to 15-fold. This may explain why primary germ-line antibodies and secondary hypermutated antibodies directed against pathogens such as viruses and bacteria expressing repetitive antibody determinants show rather similar binding qualities, whereas monovalently binding hapten-specific antibodies can show "affinity maturation" effects of up to 1000-fold.

Neutralizing antibodies against many human pathogenic viruses such as polio virus, influenza virus, and rabies virus are generated early—i.e., within the first week after infection (1, 7). Similarly, after infection of mice with vesicular stomatitis virus (VSV), a cytopathic unsegmented negative-strand RNA virus closely related to rabies virus (8), an early antibody response is observed, which can prevent dissemination of the virus to neuronal tissues and protects the host from a lethal progressive paralytic disease (9, 10). Within the first hours after VSV infection, when neutralizing antibodies are not yet induced, the interferon system critically contributes to the survival of mice (1, 12). As early as 2 days after infection, neutralizing antibodies are detectable in the serum (13). By 4 days after infection, hybridomas have been isolated that secrete VSV-neutralizing germ-line IgGs (14). All VSV-neutralizing antibodies analyzed were directed against one major antigenic site of the protein moiety of the viral glycoprotein (VSV-G) (14, 15).

The majority of primary response IgGs isolated 4 and 5 days after infection used V gene fragments of the heavy and the κ light chain (V_H and V _{κ}) belonging to the V_HQ52 and the V _{κ} 19–28 families. These antibodies bound one defined subsite within the major antigenic site of VSV-G. In contrast, IgGs isolated from VSV-specific secondary and hyperimmune responses were predominantly V_H7183-positive and V_HJ558-positive (14). The comparison of VSV-specific monoclonal antibodies isolated from secondary and hyperimmune responses did not reveal evidence of further, drastic avidity increases or enhanced specific neutralizing capacities (16). The neutralizing capacity of primary response IgGs isolated 4 and 5 days after immunization was exceeded by 10- to 100-fold compared with secondary and hyperimmune response IgGs (14). Because no genealogically related germ-line and hypermutated antibodies were identified, it was unclear whether the increased neutralizing capacity of secondary and hyperimmune response IgGs was due to newly

appearing antibody specificities binding to more efficiently neutralizing epitopes, or whether hypermutation had improved VSV-specific binding and neutralization of secondary and hyperimmune response IgGs.

To address this question, somatic variation of V_H7183-positive VSV-neutralizing monoclonal antibodies was analyzed. V_H sequence comparison of V_H7183/J_H2-positive antibodies revealed some amino acid substitutions, which were identical in different clones. The influence of these substitutions on VSV-specific binding and neutralization was studied in a comparative analysis of recombinant single-chain Fv-C κ antibody fragments (scFv-C κ) derived from one hypermutated antibody.

Materials and Methods

Mice and Viruses. Eight-week-old severe combined immunodeficient (SCID) BALB/c mice kept under specific pathogen-free conditions were obtained from Iffa Credo. VSV-IND (Mudd-Summers isolate) was originally obtained from D. Kolakofsky (University of Geneva, Switzerland) and was grown on BHK-21 cells (17).

Isolation and Sequencing of V_H and V_L Genes. The 7.8-kb *EcoRI* fragment encoding the functionally rearranged V_H of VI24 (pVH-VI24) was cloned from a λ -Zap library (Stratagene). V_Hs of other V_H7183/J_H2-positive hybridomas were isolated from cDNA by PCR, using the 5' primer 1229 (5'-GAGTCTGGGG-GAGGCTTAGT-3') and the 3' C γ primer 1411 (5'-CCGAT-GGGGCTGTGTTTTG-3'). V_L genes of VI26, VI30, VI22, and VI20 were amplified by using the 5' V κ 21 primer 2225 (5'-TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCT-3') and the 3' C κ primer 2236 (5'-ATGCTGTAGGTGCTGTCTTTGCTGT-3'). For V_L amplification of VI24, the 5' V κ 8 primer 2224 (5'-GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTA-3') and the 3' C κ primer 2335 (5'-TGTCGTTCACTCGTCCTTG-GTC-3') were used. PCR products were gel purified and sequenced automatically (Applied Biosystems). The reliability of the reverse transcription-PCR approach was verified by identical V_H sequences obtained for VI24 by PCR cloning and genomic cloning.

Generation of scFv-C κ Expression Constructs. V_H of VI24 was PCR amplified from pVH-VI24 by using the 5' primer 1211

Abbreviations: VSV, vesicular stomatitis virus; VSV-G, VSV glycoprotein; scFv-C κ , single-chain Fv-C κ antibody fragments; SCID, severe combined immunodeficient; pfu, plaque-forming units; CDR, complementarity-determining region.

*To whom reprint requests should be sent at present address: EMBL Mouse Biology Program, Via E. Ramarini 32, 00016 Monterotondo Scalo (Roma), Italy. E-mail: kalinke@embl-monterotondo.it

†Present address: Nuffield Department of Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DU, U.K.

‡Present address: Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Terpis Hospital de Especialidades, CMN XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330 col Doctores C.P. 06720, México D.F.

This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Induction of optimal anti-viral neutralizing B cell responses by dendritic cells requires transport and release of virus particles in secondary lymphoid organs

Ulrich Kuehn, Burkhard Ludewig, Kevin J. Maloy, Constantino López-Macías, Bernhard Odermatt, Hans Hengartner and Rolf M. Zinkernagel

Institute of Experimental Immunology, Zürich, Switzerland

Dendritic cells (DC) are sentinels of the immune system, transporting antigens from the periphery to secondary lymphoid organs. This study investigates the interactions of DC with B cells for the induction of anti-viral neutralizing antibody responses. Using the vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) as a model antigen, we show that DC contain infection with cytopathic VSV in the presence of a functional IFN system, facilitating transport and release of low levels of live virus in secondary lymphoid organs. DC exposed to live virus induced efficient neutralizing anti-viral B cell responses. In contrast, DC transporting UV-inactivated viral antigens were poor activators of anti-viral B cells, although they were capable of very efficiently inducing virus-specific Th cells. Transgenic DC expressing a membrane-bound form of VSV-G induced neutralizing B cell responses; however, this DC-induced, Th-dependent B cell response was significantly slower than the anti-viral B cell response induced by DC infected with live VSV, and was strongly dependent on concomitant priming of T help. These results suggest that DC may play a double role during infection with cytopathic virus: they transport and release live virus in secondary lymphoid tissues for optimal direct B cell induction and offer MHC class II-associated determinants for induction of T help.

Key words: Dendritic cell / Anti-viral B cell response / Neutralizing antibody / Antigen transport

Received	13/8/99
Revised	22/10/99
Accepted	22/10/99

1 Introduction

It is well established that dendritic cells (DC) function as sentinels of the immune system, capturing antigen in the periphery and initiating T cell-mediated immune responses after migration to the T cell areas of secondary lymphoid tissues [1]. In contrast, detailed knowledge about the role and mechanisms of DC-mediated B cell activation is limited. Based on the observation that DC can cluster B cells *in vitro* [2, 3] and *in vivo* [3], it has been postulated that direct interaction of DC with B cells may be important to elicit B cell responses. *In vitro*, B cell

responses to T cell-dependent antigens, such as DNP-KLH, are greatly enhanced in the presence of DC [2], and DC are able to non-specifically stimulate B cells to proliferate and to produce IgM and IgG [4]. *In vivo*, activation of B cells by DC has been shown using adoptive transfer of DC pulsed with soluble antigen [5, 6]. However, B cell responses induced by antigen-pulsed DC were weak, particularly when compared to immunization with the free antigen [6].

Neutralizing anti-viral antibodies and the rapid induction of efficient anti-viral B cell responses are important to protect against infection with cytopathic viruses [7]. Cytopathic viruses often possess highly organized, repetitive antigenic structures facilitating the induction of T cell-independent (TI) IgM responses, whereas isotype switching to IgG is mainly dependent on cognate help delivered by the CD4⁺ Th cell subset [8, 9]. Vesicular stomatitis virus (VSV) is a cytopathic rhabdovirus causing lethal neurological disease in mice devoid of an appropriate B cell response [10, 11], or lacking a functional IFN- α/β system [12]. The glycoprotein of VSV (VSV-G) is

[J 20023]

The first two authors contributed equally to this work.

Abbreviations: DC: Dendritic cell(s) VSV: Vesicular stomatitis virus VSV-IND: VSV serotype Indiana VSV-NJ: VSV serotype New Jersey G: Glycoprotein UV: UV inactivated GC: Germinal center(s) TI: T independent MOI: Multiplicity of infection CFSE: 5- and 6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester PNA: Peanut agglutinin

Role of Porins from *Salmonella typhi* in the Induction of Protective Immunity

A. ISIBASI,^{a,b} J. PANIAGUA,^a M. P. ROJO,^a
N. MARTÍN,^a G. RAMÍREZ,^a C. R. GONZÁLEZ,
C. LÓPEZ-MACÍAS,^a J. SÁNCHEZ,^c J. KUMATE,^a AND
V. ORTIZ-NAVARRETE^a

^aUnidad de Investigación Médica en Inmunología
CMN Siglo XXI

IMSS, Mexico City, Mexico

^cPatología Experimental
CISEI

INSP

Cuernavaca, Mor. Mexico

We previously demonstrated the ability of outer membrane proteins (OMPs) to induce protection against challenge with *Salmonella typhi* in mice; it was also possible to transfer this protective effect with immune sera against OMPs.¹ The antigens responsible for this protective status are two different porins.² Both cellular and humoral mechanisms of immunity might be involved in the protection achieved. The presence of cellular immunity is evidenced by the ability of these proteins to activate T lymphocytes from mice immunized with OMPs or with porins isolated from *S. typhi*.¹ A similar lymphocytic proliferative response is also observed in individuals vaccinated against typhoid fever or in patients in the convalescent phase of typhoid fever.¹ Nevertheless, the specific role that each porin plays in protection is unknown. Recently, the gene encoding Omp C was cloned³; therefore, we decided to assess its capacity to induce active protection against *S. typhi* in mice. We also identified hypothetical B-cell epitopes in this protein and demonstrated immunoreactivity for two of those proposed sequences.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Omp C Recombinant Porin Omp C recombinant porin (rOmp C) was isolated, according to a method described previously,² from *Escherichia coli* U11302 transformed with the plasmid pST13.⁴

Evaluation of Active Protection For active protection assays, groups of 10 BALB/c mice, each weighing 18–20 g, were twice immunized intraperitoneally with a 2

^bAddress for correspondence, P. O. Box 73-032, México, D.F., C.F. 03020, México