

HIPERMUTACIÓN SOMÁTICA: UNA VISIÓN GLOBAL

Alberto Bugallo Bordetas

e- mail: escobuga@gmail.com

Resumen

Trabajo Fin de Grado

Tutora:

- África González- Fernández

Departamento de Bioquímica,

Genética e Inmunología

Facultad de Biología

Universidad de Vigo.

En esta revisión bibliográfica se presenta a la hipermutación somática, un mecanismo que permite a los linfocitos B añadir mutaciones a los genes de la inmunoglobulina, generando variabilidad. Junto a una selección al estilo darwiniano, en el cual los linfocitos B compiten según la facilidad de su anticuerpo por reconocer al antígeno, los linfocitos acaban produciendo inmunoglobulinas de mayor afinidad por el antígeno. Esta selección junto a la hipermutación, son la base del desarrollo de la inmunidad frente a los patógenos.

Palabras clave: *hipermutación somática, linfocito B, AID, centro germinal, inmunoglobulina, anticuerpo, antígeno, selección clonal*

INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo, se sabe que muchas enfermedades no afectan con la misma gravedad a una persona que ya la ha padecido una vez que a alguien que la sufre por primera vez, es decir, desarrollan inmunidad.

Por el siglo XVIII, Jenner desarrolló la vacuna, la cual permitía que un individuo desarrollase inmunidad frente a la viruela, sin exponerse al virus per se, sino a una variedad más benigna, la viruela bovina (Lombard, Pastoret & Moulin, 2007). Más adelante, esta técnica acabo siendo adaptada a patógenos gracias a las investigaciones de L. Pasteur, pues se observó que los patógenos atenuados también generaban inmunidad (Ganesh & Neuberger, 2011).

La gran duda era como se generaba la inmunidad. Según se desarrollaba el estudio de la inmunología, se descubrieron los anticuerpos, glicoproteínas presentes en el plasma sanguíneo producidas por los linfocitos B y las células plasmáticas, que permitían al organismo reconocer de forma específica ciertas sustancias (antígenos) y, de esta forma, descubrir a los patógenos. Los anticuerpos demostraron ser moléculas de una diversidad sin precedentes, la cual les permitía detectar un amplio espectro de moléculas. Pero, si los anticuerpos son los responsables de la inmunidad y ya están presentes cuando tiene lugar la infección, ¿cómo es posible que estos les resultase más sencillo reconocer al patógeno en nuevas infecciones?

Parte de la pregunta se resolvió con la teoría de la selección clonal de Burnet (Burnet, 1957). Según su teoría, los linfocitos B serían seleccionados según la afinidad del anticuerpo que producen, por los antígenos el patógeno. Esta teoría, que se asemejaba a la selección natural de Darwin, precisaba de la existencia de un mecanismo que generase, aleatoriamente, diversidad en los anticuerpos (Neuberger, 2008). Ese mecanismo, es nada más ni nada menos, que la Hipermutación Somática (SHM, Somatic HyperMutation).

El objetivo de este artículo de revisión, es presentar y describir la hipermutación somática a través de sus principales modelos, ofreciendo una visión global del mecanismo.

Sobre los anticuerpos y su diversidad

Los anticuerpos, conocidos también como inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas muy diversas. Son

sintetizadas por los linfocitos B, funcionando como parte del receptor de membrana de estas células (BRC, B Cell Receptor), y por las células plasmáticas, las cuales los secretan.

Las Ig se componen de cuatro cadenas: dos pesadas y dos ligeras. Las cadenas pesadas son iguales entre sí, al igual que las ligeras (Regueiro, 2011) (figura 1). En mamíferos, existen cinco tipos diferentes de cadenas pesadas y dos de ligera, pero son las cadenas pesadas las que permiten distinguir los diferentes isotipos de Ig, proporcionándoles características y funciones particulares.

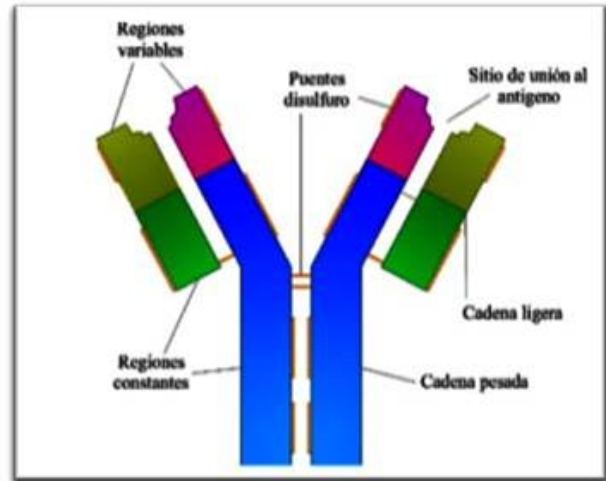


Figura1. Esquema general de un anticuerpo

Las cadenas, se dividen en varias regiones, las constantes y la variable. Es en esta zona variable, donde se acumulan las principales diferencias entre anticuerpos y es la responsable de la afinidad del anticuerpo por su antígeno, además de ser donde se une a él. En las regiones variables se encuentran, a su vez, las tres regiones que determinan la complementariedad por el anticuerpo, los CDR (*Complementarity Determining Region*). Entre estas regiones se encuentran las FR (*Frame Regions*). En los CDR se acumulan la mayoría de las mutaciones y cambios (González-Fernández *et al.*, 1994; Insel & Varade, 1994, Takahashi *et al.*, 1998). Por el otro lado, las FR se mantienen bien conservadas con pocos cambios o ninguno (Insel & Varade, 1994).

A diferencia del resto de proteínas, la diversidad de los anticuerpos no se puede explicar con la diversidad intrínseca del genoma. De hecho, la diversidad de anticuerpos supera con creces la del genoma (Noia & Neuberger, 2007).

Existen tres mecanismos que generan variabilidad: la recombinación V(D)J, la conversión génica y la hipermutación somática. De los tres, solo la SHM genera nueva diversidad, pues los otros dos, en realidad, aprovechan la diversidad del genoma para producir nuevos anticuerpos. Para ello, realizan combinaciones usando los componentes ya presentes en el genoma.

Dinámica celular de la SHM

La SHM sucede durante el estadio de centroblasto de los linfocitos B, en los centros germinales (CG) (MacLennan, 1991; Neuberger & Milstein, 1995; Takahashi *et al.*, 1998), observándose que el incremento de la afinidad por el antígeno (maduración de la afinidad), tiene lugar durante el la reacción de los CG.

Los CG se forman en los órganos linfoides secundarios, únicamente durante una respuesta T-dependiente, es decir, mediada por linfocitos T helper (MacLennan, 1991; Neuberger & Milstein, 1995; Rajewsky, 1996; Oprea & Perelson, 1997). Los CG aparecen sobre el 6º y 7º día después de la exposición al patógeno y desaparecerían sobre el 32º día (Takahashi *et al.*, 1996).

Los CG conforman una red de linfocitos B (Figura 2), que también incluyen células dendríticas foliculares (FDC) y linfocitos T (MacLennan, 1991; Rajewsky, 1996; Regueiro, 2011). En los CG se distinguen dos zonas: una clara y otra oscura. En la zona oscura se concentran linfocitos B en proliferación, los centroblastos y no expresan BCR, mientras que los de la clara se encuentran en reposo y se conocen como centrocitos. La SHM tiene lugar en la zona oscura, mientras que la selección tiene lugar en la clara, pues solo los centrocitos expresan BCR (MacLennan,

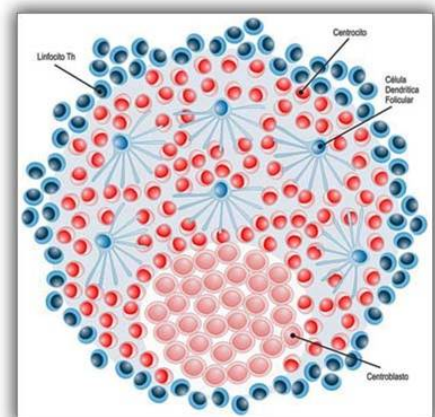


Figura 2. Esquema de un centro germinal y las células que lo componen. Tomado de Regueiro (2011)

1991; Rajewsky, 1996).

Las células pueden pasar de una zona a otra, diferenciándose en centrocitos o centroblastos según el caso. El paso de una zona a otra es bastante limitado (Figge *et al.*, 2008). Este paso es bastante aleatorio, pero hay una preferencia al paso oscura→clara. Se sospecha que esta preferencia está determinada por quimiocinas. Además, entre los centrocitos seleccionados, son los que reciben el aprobado los que suelen hacer el regreso a la zona oscura, permitiéndoles llevar a cabo nuevas rondas de SHM e incrementar todavía más la afinidad por el antígeno.

Selección clonal

La selección clonal es un proceso que hace competir entre ellos a los centrocitos de un mismo CG por reconocer al antígeno. Esta selección está determinada por la búsqueda de la afinidad por el antígeno y, explica que ciertos patrones acaben prevaleciendo en los anticuerpos (Alzari *et al.*, 1990), pues son los más afines. Además, no todos los linfocitos B empiezan con las mismas posibilidades la competición, pues ciertas recombinaciones V(D)J serán más afines por el antígeno desde el principio (Takahashi *et al.*, 1998).

Los centrocitos tendrán que detectar el antígeno que se encuentra en la superficie de las FDC mediante sus BCR, que posee su anticuerpo particular (Rajewsky, 1996). De esta forma se activan, para luego recibir una señal de los linfocitos T. Sin esta señal, la célula muere por apoptosis, pues el antígeno detectado sería uno propio, no el del patógeno. Por el contrario, los centrocitos seleccionados positivamente, pueden salir del CG y diferenciarse en linfocitos B de memoria o en células plasmáticas, o volver a la zona oscura y revertir a centroblasto, o proliferar en la zona clara (Oprea & Perelson, 1997; Figge *et al.*, 2006).

Como el número de FDCs, sólo supone el 10% de la población total de células en el CG, el número de sitios disponibles para los centrocitos es muy limitado. Que haya tan pocos sitios parece favorecer la competitividad, lo que se traduce en mutantes con mayor afinidad. De hecho, aparecen mutantes de mayor afinidad cuanto menor sea la cantidad de antígeno disponible en el organismo, pues así se reduce el número de sitios que los FDCs pueden expresar para la activación de los centrocitos (Oprea & Perelson, 1997; González-Fernández & Milstein, 1998).

Aunque la afinidad promedio se incrementa, esta no tiene porqué ser de forma muy significativa. Esto podría deberse a que el patrón de mayor afinidad precisaría muchas mutaciones o mutaciones poco probables. Aquí juega un papel importante la recombinación V(D)J, pues puede acercar o alejar a los anticuerpos del patrón adecuado, necesitando más o menos tiempo para que el patrón aparezca.

Además de la selección en los CG, parece existir otra selección más, fuera de los CGs. Esto se debe a que la maduración de la afinidad en cada CG, es independiente de los demás CGs (Takahashi *et al.*, 1998). Por lo tanto, muchos CGs podrían no haber generado mutantes de alta afinidad, y haría falta una selección para eliminar los mutantes de menor afinidad.

Características de la SHM

La tasa de mutación aproximada de la SHM ronda sobre los 10^{-3} cambios de base por generación (French *et al.*, 1989; Insel & Varade, 1994; Neuberger & Milstein, 1995; Yélamos *et al.*, 1995). Este valor es muy alto comparado con los $2,5 \times 10^{-8}$ normales en humanos (Nachman & Crowell, 2000).

Las mutaciones que el mecanismo genera son sobre todo sustituciones (Yélamos *et al.*, 1995), con una clara preferencia por las transiciones sobre las transversiones, que son cerca de la mitad, en vez del tercio que se esperaría con total aleatoriedad (González-Fernández *et al.*, 1994; Insel & Varade, 1994; Neuberger & Milstein, 1995; Yelanos *et al.*, 1995; González-Fernández & Milstein, 1998). Además, las mutaciones en los pares A:T tienen lugar sobre todo en la cadena que se transcribe (Roa *et al.*, 2010).

La hipermutación afecta, casi en exclusiva, a la región variable de los loci de la Ig, y sobre todo a los CDR. Concretamente en los primeros 1,5-2 kb corriente abajo del promotor. Ahora bien, otros loci pueden

verse afectados por la SHM, como el BCL-6, así como otros genes si se intercambian por la región V (Rada *et al.*, 1994; Yélamos *et al.*, 1995; Tumas-Brundage & Manser, 1997; Neuberger *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 1998).

Las mutaciones tienden a concentrarse en posiciones concretas, denominadas puntos calientes o hot spots y suelen evitar otras, conocidas como puntos fríos (Alzari *et al.*, 1990; González-Fernández *et al.*, 1994; Insel & Varade, 1994; Neuberger & Milstein, 1995; Jolly *et al.*, 1996; Neuberger *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1998). Los puntos calientes suelen aparecer en los CDR, mientras que los fríos en los FR. Esto se explica con las diferentes funciones de cada región: los CDRs detectan el antígeno, mientras que los FR mantienen la estructura, para que los CDRs estén en la disposición correcta.

Los puntos calientes y fríos se determinan por patrones de nucleótidos, y no por su posición en el locus (Yaari *et al.*, 2013); como por ejemplo WRCY para los calientes (siendo W a A o T, R una purina y Y una pirimidina). Prueba de ello es que los puntos calientes y fríos aparecen incluso si esa secuencia no se expresa (González-Fernández *et al.*, 1994; Rada *et al.*, 1994), o si el gen es sustituido por otro (Yélamos *et al.*, 1995; Tumas-Brundage & Manser, 1997). Ahora bien, es posible que otras estructuras sean necesarias para que dichos puntos se aparezcan, como secuencias palindrómicas, que faciliten a la maquinaria de la SHM el acceso (Neuberger & Milstein, 1995; Neuberger *et al.*, 1998; Noia & Neuberger, 2007, Yaari *et al.*, 2013). La preferencia por ciertos puntos sobre otros se explica por las afinidades particulares de las enzimas de la maquinaria (Noia & Neuberger, 2007).

Elementos reguladores de la SHM

Ciertos elementos presentes en los loci recombinados de la Ig, permiten que el mecanismo de la SHM reconozca a estos loci y evite a los demás (Weber *et al.*, 1991).

Uno de estos elementos es el propio promotor de la transcripción de los loci (Betz *et al.*, 1994; Tumas-Brundage & Manser, 1997). Este indica a la maquinaria la posición y dirección de la SHM, pero esta función no es exclusiva y podría desempeñarla otro promotor distinto. Ahora bien, podría ser que fuesen regiones cercanas al promotor las que realmente hagan ese trabajo (Rada *et al.*, 1994)

Otros elementos, más importantes, son los enhancers E3', E1 y la región MAR (Matrix Attachment Region) (Meyer & Neuberger, 1989; Betz *et al.*, 1994; Goyenechea *et al.*, 1997). Los enhancers son fundamentales para la correcta transcripción de los genes de la Ig, estableciendo una relación entre la maquinaria de la SHM y la transcripción. MAR, por otro lado, mantiene al genoma en una disposición concreta al permitir que la cadena se adhiera a elementos de la matriz. Por lo tanto, la función de este último es la de asegurar que los genes de la Ig estén accesibles para la maquinaria de la SHM.

Inicio de la SHM: AID

La SHM se inicia con la acción de una enzima concreta, AID (Activation-Induced Deaminase), que pertenece a la superfamilia APOBEC y cuya actividad consiste en desaminar las bases de citosina del ADN, convirtiéndolas en uracilo (Petersen-Mahrt *et al.*, 2002; Neuberger, 2008; Häsler *et al.*, 2012). Esto genera una lesión doble en el ADN: por un lado, se está usando una base no canónica y, por el otro, U:G no es un par válido.

Como AID es mutagénico por sí mismo (Petersen-Mahrt *et al.*, 2002), este se encuentra altamente regulado. Hay evidencia de que su expresión está controlada mediante microARN y que solo se expresa en los linfocitos B durante etapas concretas de su desarrollo o como posible mecanismo de defensa ante retrovirus (Crouch *et al.*, 2007; Teng *et al.*, 2008). Por si eso no fuese suficiente, es posible que AID quede retenido en el citoplasma al asociarse a proteínas que se adhieren al citoesqueleto (Figura 3), las cuales parecen jugar un papel importante en su importación al núcleo (Noia & Neuberger, 2007; Häsler *et al.*, 2012). La enzima se exporta con facilidad del núcleo, además de que se puede degradar con facilidad dentro del mismo.

AID actúa a través de la ARN-exosoma, la cual se encarga de degradar ARN. En el modelo propuesto por Basu et al. (2011), durante la transcripción, la ARN polimerasa II podría retroceder, lo cual dejaría expuesto el extremo 3' del ARN que se estaba sintetizado. Al ser una cadena de ARN incompleta, el exosoma intentaría degradarlo y en ese momento, AID sería reclutado. El retroceso de la ARN polimerasa II sería consecuencia de estructuras que se generan durante la transcripción de los loci de la Ig, pues estos loci las favorecen.

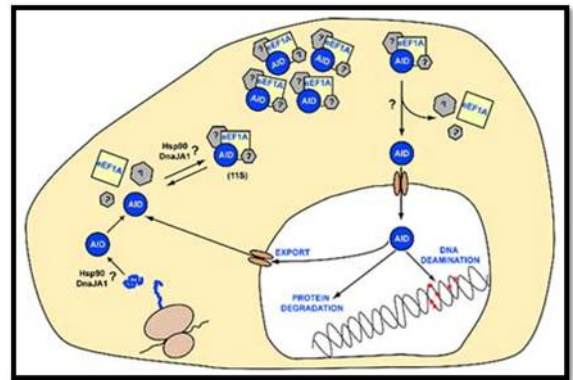


Figura 3. Modelo del ciclo de AID. Tomado de Häslér et al., 2012

Las dos fases de la SHM

Aunque AID es capaz de generar mutaciones por sí mismo en el ADN, los cambios C→U no suelen perdurar pues, en realidad, son los precursores de las mutaciones, mediante un mecanismo que recuerda al de la reparación del genoma (Noia & Neuberger, 2007; Saribasak & Gearhart, 2012). Por lo tanto, son polimerasas propensas al error las que acaban introduciendo las mutaciones.

Las mutaciones se añaden en dos fases (Figura 4), apareciendo una u otra en función de como se resuelva la lesión G:U. A pesar de que en cada fase intervienen enzimas diferentes, estas se complementan (Rada et al., 1998; Neuberger & Rada, 2007). Las dos fases solo pueden tener lugar en células en proliferación (como los centroblastos). Eso se debe a que necesitan una PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) monoubiquitinada para reclutar las polimerasas implicadas en el mecanismo: la polimerasa η en la fase A:T y la polimerasa REV1 en la fase G:C (Arakawa et al., 2006; Saribasak & Gearhart, 2012).

Mutaciones en pares G:C

Cuando la lesión G:U es reconocida por la enzima UNG (Uracil-DNA glycosylase), tiene lugar las mutaciones en los pares G:C. La UNG elimina las bases de uracilo, dejando un sitio abásico, es decir, dejando el esqueleto de desoxirribosa (Neuberger & Rada, 2007). Luego, el sitio abásico se elimina mediante la APE1, dejando una rotura en la hebra de ADN (Saribasak & Gearhart, 2012). Esta rotura permite reclutar a las TLS polimerasas (TransLesion Synthesis polymerases) que añaden las mutaciones (Noia & Neuberger, 2007). De estas, la Rev1 la más importante. Ahora bien, estas enzimas sólo son capaces de añadir un nuevo nucleótido para sustituir el sitio abásico.

Para añadir mutaciones en el resto de la cadena desde ese punto, hacen falta otras polimerasas. La polimerasa ζ es la principal candidata, pues ésta trabaja preferentemente en sitios abásicos, colaborando con la REV1 en un complejo o en solitario (Daly et al., 2012). Se sospecha que la polimerasa ζ también podría colaborar con las polimerasas responsables de la fase A:T.

Mutaciones en pares A:T

Cuando la lesión G:U es reconocida por el dímero Msh2/Msh6 (MutSa), tienen lugar las mutaciones en los pares A:T. Entonces, se recluta a la exonucleasa Exo1, que abre la hebra de ADN al eliminar un segmento. A continuación, se recluta a la polimerasa η, que según reconstruye la cadena, introduciría las

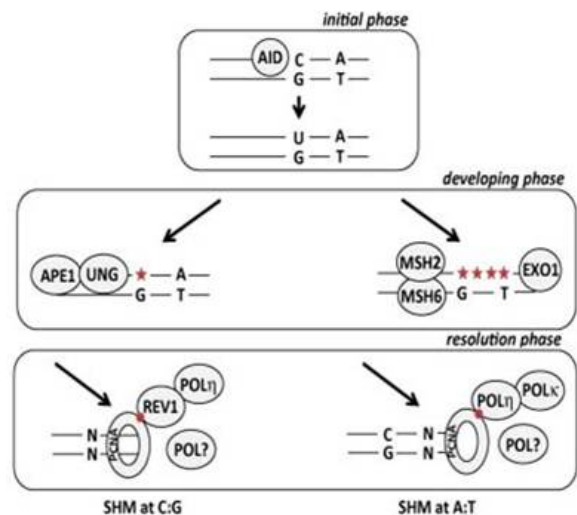


Figura 4. Esquema del mecanismo de las dos fases de la SHM. Tomado y modificado de Sariibasak & Gearhart (2012)

mutaciones en los pares A:T (Noia & Neuberger, 2007; Sariabasak & Gearhart, 2012). Se piensa que esta polimerasa replica fielmente cuando se trata de pares G:C. Otras polimerasas, como la polimerasa κ , podrían apoyar o sustituir a la polimerasa η (Delbos *et al.*, 2006; Sariabasak & Gearhart, 2012).

A diferencia de la otra fase, esta fase produce mutaciones mayormente en la cadena que se transcribe, pues el MutS α tiene preferencia por esta cadena (Roa *et al.*, 2010).

Relación entre las fases y el ciclo celular

Ambas fases comienzan con la misma lesión para empezar a introducir mutaciones. Se podría pensar que las fases compiten entre ellas, pero no es el caso. Una fase tiene lugar u otra en función de en qué momento del ciclo celular se reconoce la lesión G:U, según el modelo de Li et al. (2013) (Figura 5). Las mutaciones en los pares G:C sucederían en la fase G1, mientras que las de los pares A:T sucederían en el fase S. Si la lesión G:U se produce durante la fase S, entonces es tratada por MutS α . Si la lesión tiene lugar durante la fase G1, ésta es tratada por UNG, dejando el sitio abásico. Si la lesión pasa desapercibida, esta genera una transición durante la replicación. Si la lesión es reconocida antes de la fase S, ésta será reparada fidelignamente por escisión de base (BER, *Base Excision Repair*). Si el sitio abásico se reconoce durante la fase S, será tratada por las TLS polimerasas y tendrá lugar una mutación de pares G:C normal.

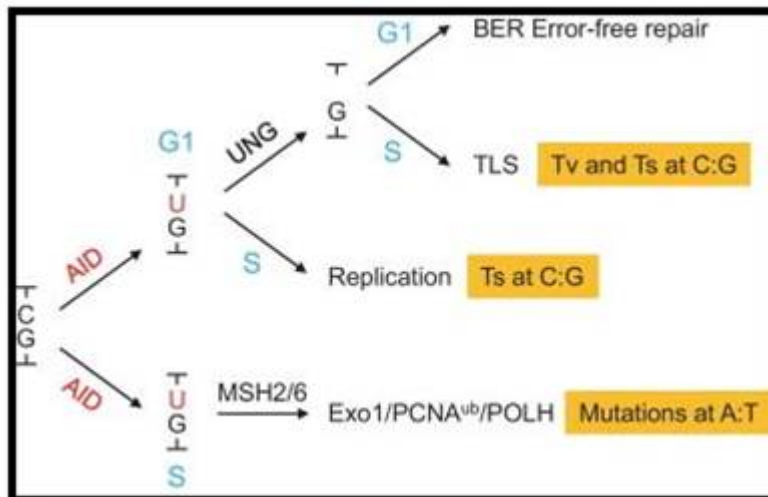


Figura 5. Esquema del modelo de Li et al. Ts y Tv hacen referencia a Transiciones y Transversiones, respectivamente. Tomado de Li *et al.* (2013).

Este modelo, explica en buena medida la preferencia de la SHM por las transiciones sobre las transversiones, debido a que la mayor parte de la acción de AID tiene lugar durante la fase G1, sería de esperar que algunas lesiones U:G no fuesen reconocidas por UNG a tiempo y terminasen como transiciones tras la replicación.

CONCLUSIONES

Se ha avanzado mucho en el estudio de la SHM, ya desde que se publicaron las primeras pruebas concluyentes de su existencia en 1970 con el trabajo de Weigert et al. Pero como cualquier otro mecanismo que se estudie en biología, no existe una idea totalmente exacta de los pequeños detalles y son muchas las dudas que el proceso genera en la comunidad científica. Por ejemplo, aún no se conoce exactamente como selecciona AID a los genes sobre los que actúa. Esto se puede observar en el propio artículo, donde se observa que ciertas cosas de las que se habla, en particular del mecanismo, son conjeturas, hipótesis o modelos que, aunque perfectamente plausibles, no tienen demasiada evidencia empírica. Pero seguramente, muchas de estas dudas se solucionen en los próximos años.

Luego, SHM es, sin lugar a dudas, un proceso de gran interés para la biología. Esto se debe no solo por su papel fundamental en las defensas de la mayoría de vertebrados, sino que también por ser un proceso fisiológico sin precedentes, pues permite a los organismos alterar su genoma para obtener una ventaja frente a su entorno, dándole un gran interés desde el punto de vista de la evolución. Esto se debe a que los genes de la Ig se “sacrifican” altruistamente al someterse a la SHM para que el organismo pueda seguir a delante. Esto se entiende así, porque los genes existen únicamente como un patrón en una cadena de nucleótidos. Por lo tanto, un cambio en dicho patrón, supone que el gen recibe un “daño”. Obviamente, el resto de genes no siguen este comportamiento, lo cual hace distinguir a los genes de la Ig del resto y convirtiéndolos en los únicos genes “altruistas”.

BIBLIOGRAFÍA

- Alzari, P. M., Spinelli, S., Mariuzza, R. A., Boulot, G., Poljak, R. J., Jarvis, J. M., Milstein, C. (1990). Three-dimensional Structure Determination of an Anti-2-phenyloxazolone Antibody: The Role of Somatic Mutation and Heavy/light Chain Pairing in the Maturation of an Immune Response. *The EMBO Journal*. 9: 3807-3814.
- Arakawa, H., Moldovan G.-L., Saribasak, H., Saribasak, N.S., Jentsch, S., Buerstedde, J.-M. (2006). A Role for PCNA Ubiquitination in Immunoglobulin Hypermutation. *PLoS Biology*. 4: E366.
- Basu, U., Meng, F.-L., Keim, C., Grinstein, V., Pefanis, E., Eccleston, J., Zhang, T., Myers, D., Wasserman, C. R., Wesemann, D. R., Januszky, K., Gregory, R. I., Deng, H., Lima, C. D., Alt, F. W. (2011). The RNA Exosome Targets the AID Cytidine Deaminase to Both Strands of Transcribed Duplex DNA Substrates. *Cell*. 144: 353-363.
- Betz, A. G., Milstein, C., González-Fernández, A., Pannell, R., Larson, T., Neuberger, M. S. (1994). Elements Regulating Somatic Hypermutation of an Immunoglobulin κ Gene: Critical Role for the Intron Enhancer/matrix Attachment Region. *Cell*. 77:239-248.
- Burnet, F. M. (1957). A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production Using the Concept of Clonal Selection. *Australian Journal of Science* 20:67-69.
- Crouch, E. E., Li, Z., Takizawa, M., Fichtner-Feigl, S., Gourzi, P., Montano, C., Feigenbaum, L., Wilson, P., Janz, S., Papavasiliou, F. N., Casellas, R. (2007). Regulation of AID Expression in the Immune Response. *Journal of Experimental Medicine*. 204:1145-1156.
- Daly, J., Bebenek K., Watt, D. L., Richter K., Jiang, C., Zhao, M.-L., Ray, M., McGregor, W. G., Kunkel, T. A., Diaz, M. (2012). Altered Ig Hypermutation Pattern and Frequency in Complementary Mouse Models of DNA Polymerase ζ Activity. *The Journal of Immunology*. 188:5528-5537.
- Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A. (2006). DNA Polymerase Eta Is the Sole Contributor of A/T Modifications during Immunoglobulin Gene Hypermutation in the Mouse. *The Journal of Experimental Medicine*. 204:17-23.
- Dominguez, O., Ruíz, J. F., de Lera, T. L., García-Díaz, M., González, M. A., Kirchoff, T., Martínez, C., Bernad, A., Blanco, L. (2000). DNA Polymerase Mu (Pol Micro), Homologous to TdT, Could Act as a DNA Mutator in Eukaryotic Cells. *The EMBO Journal*. 19:1731-1742.
- Figge, M. T., Garin, A., Gunzer, M., Kosco-Vilbois, M., Toellner, K.-M., Meyer-Hermann, M. (2008). Deriving a Germinal Center Lymphocyte Migration Model from Two-photon Data. *Journal of Experimental Medicine*. 205:3019-3029.
- French, D., Laskov, R., Scharff, M. (1989). The Role of Somatic Hypermutation in the Generation of Antibody Diversity. *Science*. 244:1152-1157.
- Ganesh, K., Neuberger, M. S. (2011). The Relationship between Hypothesis and Experiment in Unveiling the Mechanisms of Antibody Gene Diversification." *The FASEB Journal*. 25:1123-1132.

- González-Fernández, A., Gupta, S. K., Pannell, R., Neuberger, M. S., Milstein C. (1994). Somatic Mutation of Immunoglobulin Lambda Chains: A Segment of the Major Intron Hypermutates as Much as the Complementarity-determining Regions. *PNAS* 91:12614-12618.
- González-Fernández, A., Milstein, C. (1998). Low Antigen Dose Favours Selection of Somatic Mutants with Hallmarks of Antibody Affinity Maturation. *Immunology*. 93:149-153.
- Goyenechea, B., Klix, N., Yélamos, J., Williams, G. T., Riddell, A., Neuberger, M. S., Milstein, C. (1997). Cells Strongly Expressing Igk Transgenes Show Clonal Recruitment of Hypermutation: A Role for Both MAR and the Enhancers. *The EMBO Journal* 16:3987-3994.
- Häsler, J., Rada, C., Neuberger, M. S. (2012). The Cytoplasmic AID Complex. *Seminars in Immunology*. 24: 273-280.
- Insel, R. A., Varade, W. S. (1994). Bias in Somatic Hypermutation of Human V Genes. *International Immunology*. 6:1437-1443.
- Jolly, C. J., Wagner, S. D., Rada, C., Klix, N., Milstein, C., Neuberger M. S. (1996). The Targeting of Somatic Hypermutation. *Seminars in Immunology*. 8.3: 159-168.
- Li, S., Zhao, Y., Wang, J.-Y. (2013). Analysis of Ig Gene Hypermutation in Ung^{-/-}Polh^{-/-} Mice Suggests That UNG and A:T Mutagenesis Pathway Target Different U:G Lesions. *Molecular Immunology*. 53:214-217.
- Lombard, M., Pastoret, P.-P., Moulin, A.-M. (2007). A Brief History of Vaccines and Vaccination. *Rev Sci Tech*. 26:29-48.
- MacLennan, I. (1991). The Centre of Hypermutation. *Nature*. 354:352-353.
- Meyer, K. B., Neuberger, M. S. (1989). The Immunoglobulin Kappa Locus Contains a Second, Stronger B-cell-specific Enhancer Which Is Located Downstream of the Constant Region. *The EMBO Journal*. 8:1959-1964.
- Nachman, M. W., Crowell, S. L. (2000). Estimate of the Mutation Rate per Nucleotide in Humans. *Genetics*. 156:297-304.
- Neuberger, M. S., Rada, C. (2007). Somatic Hypermutation: Activation-induced Deaminase for C/G Followed by Polymerase for A/T. *Journal of Experimental Medicine*. 204:7-10.
- Neuberger, M. S., and Milstein C. (1995). Somatic Hypermutation. *Current Opinion in Immunology* 7:248-524.
- Neuberger, M. S. (2008). Antibody Diversification by Somatic Mutation: From Burnet Onwards. *Immunology and Cell Biology*. 86:124-132.
- Neuberger, M. S., Ehrenstein, M. K., Klix, N., Jolly, C. J., Yelamos, J., Rada, C., Milstein C. (1998). Monitoring and Interpreting the Intrinsic Features of Somatic Hypermutation. *Immunological Reviews*. 162:107-116.
- Noia, J., Di, M., Neuberger, M. S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annual Review of Biochemistry*. 76.1: 1-22.
- Oprea, M., Perelson, A. S. (1997). Somatic Mutation Leads to Efficient Affinity Maturation When Centrocytes Recycle Back to Centroblasts. *The Journal of Immunology*. 158:5155-5162.
- Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S., Neuberger, M. S. (2002). AID Mutates E. Coli Suggesting a DNA Deamination Mechanism for Antibody Diversification. *Nature*. 418:99-104.
- Rada, C., González-Fernández, A., Jarvis, J. M., Milstein, C. (1994). The 5' Boundary of Somatic Hypermutation in a V λ Gene Is in the Leader Intron. *European Journal of Immunology*. 24:1453-1457.
- Rada, C., Ehrenstein, M. R., Neuberger, M. S., Milstein, C. (1998). Hot Spot Focusing of Somatic Hypermutation in MSH2-Deficient Mice Suggests Two Stages of Mutational Targeting. *Immunity*. 9: 135-141.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal Selection and Learning in the Antibody System. *Nature*. 381:751-758.
- Regueiro, J. R. (2011). *Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmunitario*. Madrid: Médica Panamericana.
- Roa, S, Li, Z., Peled, J. U., Zhao, C., Edelman, W., Scharff, M. D. (2010). MSH2/MSH6 Complex Promotes Error-Free Repair of AID-Induced DU:G Mispairs as Well as Error-Prone Hypermutation of A:T Sites. *PLoS ONE*. 5:E11182.

- Saribasak, H., Gearhart, P. J. (2012). Does DNA Repair Occur during Somatic Hypermutation?. *Seminars in Immunology* 24:287-292.
- Shen, H M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X., Storb, U. (1998). Mutation of BCL-6 Gene in Normal B Cells by the Process of Somatic Hypermutation of Ig Genes. *Science*. 280: 1750-1752.
- Takahashi, Y., Dutta, P. R., Cerasoli, D. M., Kelsoe, G. (1998). In Situ Studies of the Primary Immune Response to (4-Hydroxy-3-Nitrophenyl)Acetyl. V.Affinity Maturation Develops in Two Stages of Clonal Selection. *Journal of Experimental Medicine*. 187:885-895.
- Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., Papavasiliou, F. N. (2008). MicroRNA-155 Is a Negative Regulator of Activation-Induced Cytidine Deaminase. *Immunity* 28:621-629.
- Tumas-Brundage, K., Manser, T. (1997). The Transcriptional Promoter Regulates Hypermutation of the Antibody Heavy Chain Locus. *Journal of Experimental Medicine*. 185:239-250.
- Wagner, S. D., Milstein, C., Neuberger, M. S. (1995). Codon Bias Targets Mutation. *Nature*. 376:732.
- Weber, J. S., Berry, J., Manser, T., Claflin, J. L. (1991). Position of the Rearranged V Kappa and Its 5' Flanking Sequences Determines the Location of Somatic Mutations in the J Kappa Locus. *Journal of Immunology*. 146:3652-3655.
- Weigert, M. G., Cesari, I. M., Yonkovich, S. J., Cohn, M. (1970). Variability in the Lambda Light Chain Sequences of Mouse Antibody. *Nature* 228:1045-1047.
- Yaari, G., Vander Heiden, J. A., Uduman, M., Gadala-Maria, D., Gupta, N., Stern, J. N. H., O'Connor, K. C., Hafler, D. A., Laserson, U., Vigneault, F., Kleinstein, S. H. (2013). Models of Somatic Hypermutation Targeting and Substitution Based on Synonymous Mutations from High-Throughput Immunoglobulin Sequencing Data. *Frontiers in Immunology*. 4: Publicación Electronica.
- Yélamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y. L., González Fernández, A., Pannell, R., Neuberger, M. S., Milstein, C. (1995). Targeting of Non-Ig Sequences in Place of the V Segment by Somatic Hyper Mutation. *Nature*. 376:225-229.
- Zhao, Y., Gregory, M. T., Biertumpfel, C., Hua, Y.-J., Hanaoka, F., Yang, W. (2013). Mechanism of Somatic Hypermutation at the WA Motif by Human DNA Polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 8146-8151