

Entre ellos, dos Premios Nobel

CUATRO CIENTÍFICOS HABLARON SOBRE «LA NUEVA INMUNOLOGÍA»

■ Ciclo de conferencias de Askonas, Poljak, Tonegawa y Benacerraf

Los Premios Nobel de Medicina Susumu Tonegawa (1987) y Baruj Benacerraf (1980) y los científicos Brigitte A. Askonas, del National Institute for Medical Research, de Londres, y Robert J. Poljak, del Instituto Pasteur, de París, intervinieron en un ciclo sobre «La nueva inmunología» que organizó la Fundación Juan March en su sede del 29 de febrero al 21 de marzo pasados. Los citados científicos fueron presentados, respectivamente, por los doctores Michael Parkhouse, Carlos Martínez Alonso, Antonio Arnaiz Villena y Fernando Ortiz Maslloréns. Este ciclo continuaba la serie que viene celebrando la Fundación Juan March desde hace unos años, dentro de la especial atención que esta institución dedica al área científica y, concretamente, a la Biología Molecular y sus Aplicaciones, a través de conferencias y becas. Con los dos Premios Nobel citados, son ya trece los científicos galardonados con este Premio de la Academia sueca invitados por la Fundación a participar en estos ciclos.

Los ponentes

Brigitte A. Askonas es investigadora, desde 1953, en el National Institute for Medical Research, Mill Hill, de Londres, miembro fundador de la División de Inmunología de dicho centro y directora de la misma desde 1976. Es Fellow de la Royal Society de Londres y Miembro Honorario de la Sociedad Americana de Inmunología y de la Sociedad Francesa de Inmunología, entre otras distinciones.

Roberto J. Poljak nació en Buenos Aires en 1932. Nacionalizado norteamericano. Tras obtener el grado de doctor (Ph.D.) en la Universidad de La Plata, de 1958 a 1960 completó su formación en el Massachusetts Institute of Technology, de Boston, y

de 1960 a 1962 en el Davy Faraday Research Laboratory de Londres y en la Unidad de Biología Molecular del Medical Research Council, en Cambridge (Inglaterra). De 1962 a 1981 fue profesor de Biofísica en la Universidad John Hopkins de Baltimore (Estados Unidos) y desde 1981 es profesor y director de Investigación en el Instituto Pasteur, de París.

Susumu Tonegawa nació en Nagoya, Japón, en 1939. En 1963 fue a estudiar a Estados Unidos, doctorándose en la Universidad de California en San Diego. De 1971 a 1981 trabajó en el Basel Institute for Immunology, en Suiza. Desde 1981 trabaja en el Massachusetts Institute of Technology

de Cambridge (Estados Unidos). Es Miembro Honorario de diversas sociedades de Inmunología y pertenece al Consejo directivo del «Journal of Molecular and Cellular Immunology» desde 1985. En 1987 obtuvo el Premio Nobel de Medicina.

Baruj Benacerraf nació en Caracas en 1920. Desde 1970 es Fabyan Profesor de Patología Comparativa y director del Departamento de Patología de la Harvard Medical School, de Boston; y desde 1980, presidente del Dana Farber Cancer Institute, de Boston. Además del Premio Nobel de Medicina en 1980, el doctor Benacerraf ha obtenido a lo largo de su carrera científica numerosos galardones y distinciones.

«*POR QUE NECESITAMOS
APRENDER
INMUNOLOGIA CELULAR*»



Cuando un organismo es infectado por un virus se desencadena una respuesta en la que están implicadas un buen número de células diferentes: linfocitos B, linfocitos T, macrófagos, etc. El empleo de ciertos virus como sistemas modelo (virus de la gripe y virus respiratorio sincitial, SRV) ha permitido aclarar algunos aspectos relacionados con el papel de los linfocitos T en los procesos de infección y con la base molecular de las diferencias genéticas en la respuesta de los linfocitos T.

Los linfocitos T provienen de la médula ósea y maduran en el timo. Allí «aprenden» a reconocer antígenos, adquiriendo receptores de membrana que les permiten interactuar con otras células. Esta diferenciación implica una reorganización somática de los genes que codifican para estos receptores de membrana. Los linfocitos T no reconocen antígenos aislados, sino antígenos que se encuentran en la superficie de otras células y asociados a las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH).

La presencia de anticuerpos contra un virus no siempre garantiza una protección completa ante la infección. Los linfocitos T, tanto los T citotóxicos (T_c) como los T inductores o «helpers» (T_h), también contribuyen a la defensa del organismo.

Los estudios realizados sobre el virus de la gripe han revelado que los anticuerpos y los distintos tipos de células T

reconocen diferentes proteínas del virus. Los anticuerpos y los T_h reconocen bien las glicoproteínas externas, que son las más variables del virus, aunque los determinantes antigénicos son distintos. Los linfocitos T_c reconocen proteínas internas poco variables: nucleoproteínas y polimerasas víricas. La utilización del virus de la vacuna como vector de clonaje ha permitido expresar aisladamente genes del virus de la gripe e incluso fragmentos de genes. De esta forma se han identificado cuáles son las regiones de las nucleoproteínas virales que son reconocidas por los linfocitos T_c .

Según el modelo actualmente aceptado, cuando una proteína antigénica entra en contacto con una célula, es internalizada por endocitosis, es procesada en el interior y un determinado fragmento de ésta vuelve a la superficie celular en estrecha asociación con las proteínas del CPH. Los genes que codifican para estas proteínas son extremadamente polimórficos y en este hecho radican las diferencias observadas entre distintas líneas homocigóticas de ratones en la respuesta de los linfocitos T. Diferencias en las CPH determinan que diferentes fragmentos de la proteína antigénica sean reconocidos. Este hecho tiene una importante implicación en el diseño de vacunas mediante ingeniería de péptidos; es muy difícil que las

vacunas que emplean un número reducido de péptidos tengan aplicación general para una población, ya que sólo serán útiles para aquellos individuos que tengan los alelos del CPH apropiados.

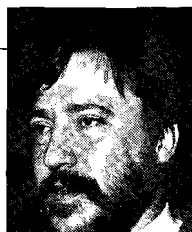
Una forma de estudiar el papel de los linfocitos T en infecciones víricas consiste en transferir clones de estas células T a ratones a los que se ha extirpado previamente el timo. En el caso del SRV se ha visto que la transferencia de linfocitos T_c reduce en varios órdenes el título de virus en el organismo y aminora los síntomas de la enfermedad, aunque no evita por completo la infección. En cambio, los linfocitos T_h no

resultan particularmente útiles e incluso pueden aumentar la severidad de los síntomas, ya que inducen reacciones inflamatorias. Sin embargo, este hecho no puede generalizarse a todos los virus.

Respecto al virus de la gripe, cabe preguntarse por qué el sistema inmune no es capaz de evitar las infecciones repetidas. En primer lugar, las células T son capaces de, si no evitar, sí controlar la infección, que resulta generalmente benigna excepto para individuos debilitados. La segunda razón es que la gripe consiste en realidad en un grupo numeroso de virus bastante diferentes que provocan síntomas parecidos.

Arnáiz Villena:

«ASKONAS Y LAS INFECCIONES VIRALES»



Hoy día hay pocos fármacos eficaces contra los virus (en contraste con la gran cantidad existente contra las bacterias); es necesario obtener vacunas contra algunos que afectan gravemente la salud humana o animal; encontrar una proteína viral (antígeno) común a muchas variantes que nos sirva para vacunar contra la gripe o el SIDA, por ejemplo.

La investigación de la doctora Askonas se ha centrado en ver cómo los linfocitos B (o los anticuerpos que producen) y los T luchan contra las infecciones virales. Tomando como modelos los virus de la gripe y el respiratorio sinticial, ha visto que, en general, los anticuerpos no son buenos defensores, ya que sólo distinguen una o dos variantes de un virus, pero no todas las demás; sin embargo, los linfocitos T son mejores

defensores y atacan a muchas más variantes de virus. Por todo ello es importante el estudio de los procesos moleculares que ocurren en los linfocitos T en el momento del reconocimiento y ataque de antígenos, para así montar una estrategia correcta en la elección de los antígenos para preparar vacunas.

Además, la doctora Askonas ha demostrado que la capacidad de defenderse un sujeto de las infecciones virales no sólo depende de sus linfocitos T, sino también de unos determinados genes que hereda de sus padres y que se denominan genes de Histocompatibilidad. No todos los individuos heredan los mismos genes de Histocompatibilidad.



«ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS»

Las inmunoglobulinas son proteínas complejas formadas por cuatro oligómeros: dos cadenas denominadas «ligeras», de 25.000 d, y otras dos cadenas «pesadas», de 50.000 d; los oligómeros se encuentran asociados por puentes de hidrógeno formando una estructura típica en forma de Y.

Los primeros estudios sobre la estructura tridimensional de las inmunoglobulinas por difracción de rayos X fueron realizados utilizando proteínas de mielomas humanos y de ratón. Estos estudios revelaron: 1) la presencia de dominios estructurales que presentan homología de secuencia y que corresponden a regiones variables o constantes; 2) un plegamiento tridimensional típico de todas las proteínas de la «superfamilia» de las inmunoglobulinas, común a las partes variables y constantes de las moléculas de los anticuerpos; 3) que los aminoácidos que forman los contactos más íntimos entre las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas son constantes o casi constantes, lo que explica que una misma cadena ligera pueda encontrarse asociada a diversas cadenas pesadas y viceversa; 4) que las zonas de hipervariabilidad de secuencia de ambas cadenas polipeptídicas se encuentran en proximidad espacial, sugiriendo que éstas determinan la complementariedad y la asociación específica con antígenos y haptenos.

La introducción de la técnica de hibridación celular entre lin-

focitos ha permitido la producción y el estudio por cristalografía de rayos X de anticuerpos monoclonales de especificidad predeterminada y, más recientemente, de complejos antígeno-anticuerpo. En el laboratorio hemos estudiado la especificidad fina de más de 40 anticuerpos monoclonales anti-lisozima, utilizando un panel de 8 lisozimas aviarias y una lisozima humana. Los determinantes antigénicos reconocidos por el conjunto de anticuerpos se sitúan sobre toda la superficie de la lisozima indicando que toda ella es potencialmente antigénica. La constante de asociación de estos anticuerpos con la lisozima varía entre $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Algunos de estos anticuerpos son heteróclitos, capaces de ligar antígenos heterólogos por reacción cruzada con constantes de asociación más elevadas que para el antígeno homólogo. Salvo en casos de impedimento estérico, los distintos anticuerpos se ligan de forma aditiva al antígeno. Un ensayo de actividad enzimática indica que la lisozima ligada al anticuerpo D1.3 retiene su actividad. Estos estudios indican que el antígeno retiene esa conformación espacial en solución aun cuando esté ligado a un anticuerpo específico.

El complejo entre el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal antiliszozima D1.3 y su antígeno específico, la lisozima,

ha sido cristalizado. Se ha determinado su estructura tridimensional a un nivel de resolución de 6 Å y de 2.8 Å. La estructura tridimensional de la lisozima en el complejo difiere poco o nada de la estructura que adquiere en forma libre. Igualmente, la comparación de la estructura del fragmento Fab en el complejo con aquellas de otros Fab que han sido previamente determinadas indican que no ha habido cambios de conformación mayores como consecuencia de la formación de un complejo con el antígeno.

La superficie de contacto an-

tígeno-anticuerpo, densamente ocupada por cadenas laterales de aminoácidos de ambos, presenta interacciones de Van der Waals y puentes de hidrógeno. Las tres regiones de complementariedad de la cadena pesada están en contacto con el antígeno. Dos aminoácidos que no pertenecen a esas regiones también establecen contactos con el antígeno. Dieciséis aminoácidos del antígeno hacen contacto con 17 del anticuerpo, sobre todo en la cadena pesada (10 residuos), y dentro de ella, con su tercera región de complementariedad (residuos 99 a 102).

Ortiz Maslloréns:

«POLJAK Y LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LOS ANTICUERPOS»



A parte de una serie de trabajos en que aplicó las técnicas de difracción de rayos X al estudio de estructuras biológicas, tales como enzimas, ácidos nucleicos, componentes virales, etc., desde 1974 las investigaciones del profesor Poljak se han concentrado sobre la Inmunología, campo en el que ha estudiado, sobre la base del modelo estructural derivado de los descubrimientos de Porter y de Edelman, las correlaciones entre las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos y sus actividades fisiológicas, así como su relación con el control genético de los mismos.

Los trabajos de Poljak representan contribuciones básicas al conocimiento de la estructura tridimensional de los anticuerpos. Asimismo ha estudiado los aspectos biofísicos de la interacción antígeno-anticuerpo y los cambios en una y otra molécula resultantes de ella. Ultimamente

viene aplicando la misma perspectiva al estudio de sistemas idiotipo-antiidiotipo, cuya capacidad reguladora de la actividad del sistema inmune es bien notoria; a la interacción entre el antígeno y el receptor de las células T, y al papel de los productos del complejo principal de histocompatibilidad en la restricción del reconocimiento celular de los determinantes antígenicos.

Se puede afirmar que el interés de los hallazgos de Poljak, con haber sido éstos fundamentales para el desarrollo de la moderna Inmunología, no se circunscribe al ámbito de esta ciencia; tanto técnica como conceptualmente, la investigación desarrollada por él encuentra aplicaciones y abre posibilidades al estudio de otros sistemas de interacción entre proteínas, de gran diversidad y selectividad.

«GENERACION SOMATICA DE LA RESPUESTA INMUNE»

Los principales componentes del sistema inmune son los linfocitos. Estas células se originan en la médula ósea y se desarrollan, bien en el timo (linfocitos T) o en el bazo (linfocitos B). Estos últimos son responsables de la producción de anticuerpos. Los anticuerpos son estructuras proteicas formadas por cuatro cadenas polipeptídicas: dos pesadas idénticas y dos ligeras idénticas, unidas entre sí por puentes disulfuro, formando una típica estructura en forma de Y. Dentro de ambos tipos de cadenas se encuentran dominios variables y constantes respecto a sus secuencias de aminoácidos. Dentro de los dominios variables se encuentran regiones de gran variabilidad (hipervariables). Estas regiones se unen en los extremos de cada brazo, constituyendo el sitio de unión con el antígeno. La especificidad de la unión depende de la estructura espacial de este sitio y de las propiedades de los radicales de los aminoácidos que contiene.

Cada linfocito B presenta en su superficie un tipo determinado de anticuerpo. La unión del anticuerpo con el antígeno específico desencadena un proceso de selección clonal que determina la multiplicación de este tipo de linfocito B. Este proceso es responsable de la inmunización. El problema que surge es: dada la inmensa variedad de antígenos posibles, ¿cómo logra el organismo sintetizar el anticuerpo correspondiente? Si cada molécula de anticuerpo fuera sintetizada por un solo gen, el número de genes impli-



cados en la respuesta inmune tendría que ser elevadísimo.

En 1965 Dreyer y Benett formularon una hipótesis según la cual en la línea germinal existen muchos genes que codifican para la región variable (V) y sólo uno para la constante (C); la maduración selecciona al azar uno de los genes V que se combina con el gen C para crear un único fragmento de DNA que codifica el polipéptido completo. Los experimentos realizados en los últimos diez años han demostrado que, en efecto, los genes de inmunoglobulina sufren recombinación somática, pero el proceso es mucho más complicado de lo que se suponía. Un gen que codifica para una cadena ligera está formado por dos segmentos V y D, correspondientes a la región variable, y otro C, para la región constante. Para una cadena pesada existen tres segmentos: V, J y D para la región variable. Estos segmentos se encuentran separados en el genoma por DNA no codificante. Durante la maduración de los linfocitos se producen recombinaciones somáticas en el DNA que determinan un ensamblaje de los segmentos V/D en las cadenas ligeras y V/J/D en las pesadas. El proceso culmina con la transcripción de los fragmentos ensamblados, procesamiento y traducción del mRNA. Las diferentes combinaciones entre

los distintos fragmentos V, J y D proporcionan la fantástica diversidad del sistema inmune.

Los linfocitos T determinan un tipo de respuesta inmune diferente, ya que no reconocen al antígeno si éste no se encuentra en la superficie de células infectadas, conjuntamente a las moléculas de clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad. En cualquier caso, los receptores de los linfocitos T también tienen que reconocer, en conjunto, un número muy alto de antígenos diferentes. Las técnicas de ingeniería genética han permitido identificar los mRNA correspondientes a estos

receptores y, a partir de la secuencia de nucleótidos, deducir la estructura general de estas proteínas, semejante a la de las inmunoglobulinas.

Se ha encontrado otro gen, denominado τ , que también podría sufrir recombinación somática. El producto de τ está constituido por dos cadenas: τ y δ . No existen datos directos sobre la proteína, pero podría tratarse de un receptor presente en la superficie de un nuevo tipo de células T presentes en tejidos epidérmicos. Estas células T podrían estar implicadas en algún mecanismo de defensa frente a infecciones.

Michael Parkhouse:

«TONEGAWA Y LOS MECANISMOS GENETICOS»

Tonegawa es el primer japonés ganador del Premio Nobel de Fisiología o Medicina y también es uno de los pocos ganadores del premio en solitario. En la mayoría de los casos el premio es compartido por dos o tres científicos. El galardón le fue concedido en 1987 por sus experimentos pioneros que demuestran «el principio genético en la generación de la diversidad de los anticuerpos».

¿Cuántos anticuerpos diferentes hay y qué extensión tiene el repertorio de anticuerpos a disposición de un individuo? La respuesta, por supuesto, debe ser: tan grande como el número total de todos los posibles agentes dañinos, que debe ascender a millones, ya que de otra forma estaríamos en peligro cada vez que apareciera un patógeno «inesperado». Surgen entonces dos cuestiones: primero, el genoma humano contiene menos de

un millón de genes; y segundo: la mayoría de los anticuerpos tienen la misma estructura básica. En 1976 publicó Tonegawa su trabajo en el que demostraba que durante el desarrollo de las células responsables de la síntesis de anticuerpos, alrededor de mil genes pueden hacer combinaciones al azar para producir un determinado anticuerpo. Este proceso introduce variaciones del motivo básico codificado por estos genes, dando lugar a un repertorio de anticuerpos del tamaño esperado.

En 1981 Tonegawa desarrolló, en el Massachusetts Institute of Technology, un abordaje similar para explorar la naturaleza y regulación de la respuesta inmune celular. En este campo, el trabajo de Tonegawa es también de fundamental importancia.



«PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE ANTIGENOS»

Los linfocitos T poseen receptores de membrana capaces de reconocer antígenos. Sin embargo, este reconocimiento sólo se produce si el antígeno se encuentra en la superficie de una célula, asociado a las proteínas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH), y no se produce si el antígeno se encuentra en forma soluble. El antígeno debe ser presentado por células del propio organismo a los receptores de membrana de los linfocitos T. La presentación del antígeno implica la internalización del mismo por endocitosis. En el interior de la célula el antígeno es procesado por enzimas hidrolíticas y un fragmento específico de él reaparece en la superficie celular asociado a las CPH. Muchas células somáticas pueden llevar a cabo este proceso, al igual que los linfocitos B; en este último caso el antígeno se une en la membrana celular a un anticuerpo específico y reaparece asociado a moléculas de CPH de clase II (en células somáticas, las CPH son algo diferentes y se denominan CPH de clase I).

Las proteínas del CPH constituyen un conjunto de glicoproteínas de membrana. En la región N-terminal presentan dominios semejantes a inmunoglobulinas y en la región C-terminal tienen un dominio hidrofóbico transmembranal. El esclarecimiento de la estructura tridimensional de las proteínas CPH I ha revelado la existencia de un surco donde se produce la interacción con el antígeno. El reconocimiento se produce



entre los receptores de células T y el complejo antígeno-CPH.

Antes de que se iniciara el estudio de estas proteínas se habían localizado los genes correspondientes a las CPH II en una región denominada H-2 (en ratones). Utilizando líneas consanguíneas de ratones se han definido varios genes, cada uno de los cuales controla respuestas dependientes de las células T. Los genes que codifican para las CPH I son muy polimórficos, existiendo decenas de variantes alélicas para cada locus. Este hecho determina diferencias de sensibilidad de los individuos de una población a diferentes patógenos y, por otra parte, garantiza que ningún agen-



te patógeno eliminará a toda la población.

La función biológica de las moléculas del CPH está en relación con la capacidad del sistema inmune de distinguir lo propio al organismo de lo ajeno. Durante la maduración en el timo son seleccionados aquellos linfocitos T que presentan baja afinidad para las CPH propias y alta para las CPH unidas a antígenos. El fenómeno de rechazo en trasplantes no es, evidentemente, la función de las CPH, ya que esta circunstancia no se presenta en la naturaleza.

La explicación al fenómeno del rechazo estriba en que los linfocitos T confunden las CPH ajenas como CPH propias unidas a antígenos.

Por lo tanto, el conocimiento del papel que juegan estas moléculas tendrá importantes consecuencias en las técnicas de trasplante de órganos. Congruentemente con este conjunto de datos, se ha visto que el tratamiento de ratones con anticuerpos contra sus propias moléculas del CPH II tiene un efecto inmunosupresor.

Martínez Alonso:

«EL CPH COMO RECEPTOR Y LA TEORIA DE BENACERRAF»

Una concepción funcional del CPH (Complejo Principal de Histocompatibilidad) lo definiría como «un grupo de genes que codifica para las moléculas que proveen el contexto para el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos T». Inicialmente descubierto en modelos marinos en 1936 por J. Gorer, su aislamiento y caracterización se extendieron muy pronto al resto de las especies.

Los estudios iniciales sobre el papel biológico del CPH fueron realizados en modelos experimentales de trasplante, demostrándose su preferencial reconocimiento por parte de los linfocitos T. Esta interacción CPH-linfocito T domina desde entonces la Inmunología y constituye uno de los paradigmas fundamentales de la misma. Su comprensión requiere, sin embargo, la aserción de una serie de principios fundamentales de aspectos diferenciados en el reconocimiento anti-

génico mediado por las células B y las células T. Así, en oposición a las células B, las células T reconocen: 1) antígenos únicamente asociados a la membrana celular; y 2) son específicos para secuencias peptídicas de aminoácidos, producidas como consecuencia de la degradación intracelular de las distintas estructuras antigénicas. Estos péptidos, procesados, son presentados ahora sobre la superficie celular en asociación con los antígenos del CPH. De esta forma, el CPH se elige como receptor específico de péptidos (propios o extraños) intracelulares y se hace responsable de su «presentación» al medio extracelular.

Esta consideración del CPH como «receptor», inicialmente demostrada por Benacerraf, es el principio fundamental de nuestra comprensión actual de la inmunología de las células T. ■

