

## ACTUALIZACIONES

# MECANISMOS DE PROCESAMIENTO Y PRESENTACION DE ANTIGENO EN EL SISTEMA INMUNE

JEAN PAUL VERNOT\*

## INTRODUCCION

El sistema inmune muestra una gran versatilidad para reconocer y responder a una gran cantidad de macromoléculas extrañas o antígenos (Ag), eliminándolos y evitando a la vez reaccionar con constituyentes propios (1). Esto se realiza por la colaboración de linfocitos B (LB) y de linfocitos T (LT) que expresan un conjunto diferente de receptores. Aunque el receptor del LB (Inmunoglobulina) y el del LT (TCR) son similares en algunos aspectos y son codificados por secuencias de la misma familia de genes (2), difieren en la manera como reconocen el Ag. Mientras los LB reaccionan con el Ag en forma nativa, los LT son incapaces de discriminar entre la forma nativa y la denaturada (3).

Las células encargadas de fragmentar y/o denaturar el Ag ("procesamiento de antígeno") y presentarlo de una manera que sea reconocida por el receptor del LT se denominan "células accesorias" o "células presentadoras de antígeno" (APC) (4). Principalmente son las mostradas en el cuadro 1 (5).

Los LT cooperadores (LTh, por "Helper") reconocen el fragmento del Ag en la superficie de la APC en asociación con una glicoproteína del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de la clase II que se expresa en un número limitado de células. Recientemente también se demostró que otra subpoblación del LT, los denominados citotóxicos (LTc), reconocen la célula blanco una vez esta ha realizado el procesamiento del Ag y la presentación de uno de sus fragmentos. En este caso el Ag es reconocido en asociación

con los antígenos de la Clase I del CMH (6). Este fenómeno de reconocimiento independiente es lo que se ha denominado restricción a la Clase I o a la Clase II.

Generalmente los antígenos externos (exoantígenos) van a ser procesados y presentados en asociación con las moléculas de la Clase II, mientras que los antígenos de procedencia interna, los producidos por una infección viral, por ejemplo, estarían con restricción a la Clase I (7,8). Los mecanismos de discriminación de la Clase I y II son especulativos. Sin embargo, hay una presión selectiva fuerte para su existencia. Su ausencia ocasionaría la lisis mediada por LTc de APC no infectadas.

No se sabe si todas las APC presentan el Ag de la misma manera (9). Lo que si se cree es que lo hagan con diferente eficiencia. Hay algunos indicios que muestran que puede haber un procesamiento diferente dependiendo del tipo de célula involucrada. Por ejemplo, las células dendríticas presentan una alta concentración de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de manera constitutiva en la membrana celular. Esta célula tiene además la peculiaridad de formar agregados con LT activados con especificidad para un determinado Ag.

## PROCESAMIENTO DE EXOANTIGENOS

En general, los exoantígenos o antígenos externos son internalizados en los compartimentos endosomales periféricos donde son modificados para ser presentados con los antígenos de la clase II del CMH. Esto se ha demostrado por la utilización de sustancias

\*Biólogo, Ph.D., Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia.

lisosomotrópicas como la cloroquina y el cloruro de amonio que, al aumentar el pH, inhiben la función lisosomal, y por agentes como el ionóforo catiónico monensina que impide el transporte intracelular de organelos (10).

En relación con los mecanismos responsables de la degradación y la proteólisis no hay datos suficientes y parece ser que las enzimas involucradas dependen del tipo de Ag procesado. Parece ser que la alfa quimotripsina y la leupeptina juegan un papel en este proceso (11). Recientemente se ha propuesto también a las catepsinas B y D (12).

No se sabe exactamente donde es el sitio de unión intracelular del péptido producto de la degradación y las moléculas de clase II, pero es posible que se realice en la región *trans* del aparato de Golgi donde se presenta, una intersección entre la vía de biosíntesis de antígenos de la clase II y la vía de endocitosis y, todos los elementos necesarios para la presentación, es decir, proteasas, antígenos de la clase II, cadena invariante y, en el caso de plasmacitomas, inmunoglobulinas endocitadas (13). La cadena invariante es una glicoproteína que se asocia a los antígenos de clase II durante su ensamblaje y que aparentemente desempeña un papel importante para la presentación de los exoantígenos. Su asociación evita la unión de péptidos endógenos y permite llegar libres a ciertos compartimentos periféricos a los antígenos del CMH para que puedan adherir péptidos de origen externo (14).

#### PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS ENDOGENOS

Los antígenos endógenos (por ejemplo, los producidos por una infección viral) son modificados en el citoplasma y transportados a la superficie celular en asociación con antígenos de la clase I del CMH (15). La existencia de un transporte diferente para estos antígenos se puso en evidencia con la utilización del antibiótico brefaldina A que inhibe el transporte de vesículas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi (16).

Parece ser, que para que la "maduración" de los antígenos de la clase I pueda tener lugar, es necesario que el péptido endógeno se una a la molécula. Sólo así la beta-2 microglobulina puede asociarse y formar un complejo trimolecular capaz de llegar a la superficie

celular (17). La unión del péptido favorecería una conformación tridimensional adecuada de la cadena pesada que permitiría la unión y el posterior transporte.

Utilizando células mutadas que no responden a un antígeno citoplásmico (proteína de la matriz del virus de la influenza A) pero que responden a un péptido añadido extracelularmente, se ha podido demostrar que el defecto de las células mutadas se encuentra localizado en el cromosoma 6 en la región del CMH. La mutación podría representar una deficiencia de transporte del citosol al retículo endoplásmico donde tiene lugar el ensamblaje de los antígenos de la Clase I (18).

A pesar de que sobre la mayoría de los Ags opera esta discriminación de la clase II y de la clase I (produciendo una respuesta "cooperadora" o citotóxica, respectivamente), hay varios reportes que muestran la presentación del Ag endógeno con restricción a la clase II (antígeno o membranal del virus del sarampión (19), y la proteína de la matriz del virus de la influenza A (20). Lo contrario también se ha reportado: proteínas exógenas pueden ocasionar una respuesta de LTc (21).

#### PRESENTACION DE ANTIGENO

En 1987 se describió la estructura tridimensional del antígeno humano HLA-A2 (22,23). Esos estudios cristalográficos demostraron que la molécula posee cuatro regiones plegadas de manera similar llamadas dominios. La región distal a la membrana forma una plataforma de ocho cadenas beta antiparalelas, limitadas por dos hélices alfa.

El nicho entre las hélices alberga al péptido. Fue además en esta región donde se encontró la más alta densidad de aminoácidos polimórficos de toda la molécula. En esta región se encontró una alta densidad electrónica que no podía ser explicada por la secuencia de aminoácidos de la molécula y que correspondería a la densidad electrónica de un péptido de una docena de aminoácidos. Debido a la similitud entre los dominios, se cree que los antígenos de la clase II tendrían una estructura homóloga (o análoga) a aquella de los antígenos de clase I (24).

A pesar de que se sabe cual es el sitio físico de unión del péptido, se sabe mucho menos de éste y de

la manera cómo se realiza la unión. Sólomente 10 a 20% de los péptidos, productos de la degradación de una proteína, se unen a los antígenos del CMH. Debe haber por lo tanto un reconocimiento preferencial de ciertas secuencias de péptidos. En efecto, los primeros resultados muestran que hay tres tipos de estructuras (no excluyentes entre ellas) que pueden estar a la base de este reconocimiento selectivo: 1) péptidos anfifílicos que tendrían una parte hidrófoba, que haría contacto con el CMH, y una parte hidrofílica hacia el exterior, que haría contacto con el TCR; 2) aminoácidos cargados positivamente o glicinas, seguidos de 2 residuos hidrófobos y después un residuo polar o una glicina, y 3) péptidos que presentarían una homología con los antígenos del CMH (25,26).

#### PRESENTACION DE ANTIGENO POR LB

A mediados de la década del 80 se presentaron varios reportes en donde se muestra que el linfocito B es capaz de presentar antígeno a linfocitos de la misma especificidad (27, 28, 29). El LB utiliza sus Ig de membrana para la captura de antígeno y lo presenta al igual que otras APC con restricción a los antígenos del CMH. El LB puede presentar Ag a concentraciones de 3 ó 4 órdenes de magnitud menor que los macrófagos. Esto lo logra concentrando antígeno en el interior de la célula, a pesar de tener una fracción muy pequeña (1%) de las Ig de membranas uniendo

el Ag (30, 31). La presentación de Ag por LB a bajas concentraciones es importante pues se logra en una segunda etapa en la respuesta inmune, y permite una respuesta más específica y de posible control negativo por las Igs secretadas por el LB maduro (31). En este modelo de reconocimiento, cualquier LB de cualquier especificidad puede recibir ayuda de cualquier LT que reconozca una de las formas procesadas en la molécula. También permitiría a cualquier LT seleccionado por macrófagos de interactuar con la misma especificidad con cualquier LB independiente de su especificidad.

El hecho de que las vías de internalización de las proteínas que efectúan la endocitosis mediada por receptores es similar, existe la posibilidad de que ciertas proteínas del suero sean procesadas a través de la misma vía. Esto implicaría que éstas serían procesadas y presentadas en asociación a los antígenos del CMH. De esta manera habría una competencia entre los péptidos propios y los extraños. Además, debido al hecho de que debemos ser tolerantes a nuestros propios antígenos éstos tendrían que presentarse al timo para la eliminación de esas poblaciones del LT que pudiesen reconocer los antígenos propios.

El péptido unido al antígeno del CMH es la estructura reconocida por el TCR, y la capacidad de respuesta de un LT esta determinada por el ensamblaje

#### CELULAS PRESENTADORAS DE ANTIGENO

NOMBRE	LOCALIZACION	CARACTERISTICAS
Macrófagos	Varios tejidos y circulación	Alta actividad lisosomal
Langerhans	Piel, esófago y nódulos linfáticos	Alta actividad de ATPasa
Dendríticas	Bazo, nódulos linfáticos aferentes, placas de Peyer y circulación	Capacidad de formar agregados con Linfocitos T.
Linfocitos T	Circulación y nódulos linfáticos	Únicamente pueden procesar antígeno ciertos linfocitos T activados
Linfocitos B	Circulación y nódulos linfáticos	Inmunoglobulina como receptos de membrana.

Tabla I: Principales células presentadoras de antígeno (ACP) con su localización más usual y algunas de sus características. (Modificado de Poulter y Col.(5).

efectivo de este complejo tri-molecular. No se sabe exactamente que cantidad de complejos inducen una respuesta inmune, pero aparentemente el número es pequeño (300) lo que implica que la unión del péptido a menos del 1% de los antígenos de histocompatibilidad es suficiente para producir una respuesta a un Ag. Esto es fundamental si tenemos en cuenta que debe haber una competencia intracelular por los antígenos del CMH entre los péptidos propios y los extraños antes de poder ser reconocidos por el TCR.

#### IMPLICACIONES PARA LAS VACUNAS

La imposibilidad de ciertos antígenos de inducir la formación del complejo tri-molecular puede explicar la falta de respuesta de los LT a un determinado antígeno. En efecto, varios investigadores han mostrado que la incapacidad de unión del péptido a los antígenos del CMH era responsable de la tolerancia a ese antígeno. Así mismo, el no reconocimiento del complejo Ag-CMH por parte del TCR impedía una respuesta del LT.

Realizando sustituciones una a una de los aminoácidos de un péptido que inducía una respuesta de LT se pudo determinar cuales eran los residuos responsables de la unión de los antígenos del CMH (agrotepe) y aquellos responsables de la unión TCR (epítopes).

En la mayoría de los casos estas dos funciones son independientes una de la otra. Se cree que el mayor mecanismo responsable de la falta de respuesta a un Ag es un defecto en la asociación del agrotepe. Esto sugiere que la modificación de este es una estrategia ideal para la producción de vacunas sintéticas. en efecto, y a manera de ejemplo, investigadores japoneses lograron producir una respuesta en ratones I-Ak a un péptido del citocromo c de paloma substituyendo dos aminoácidos (residuos 46 y 54) en el agrotepe de un péptido que solamente producía respuesta en ratones de haplotipo I-Ab (32).

Puesto que la unión del péptido a los antígenos del CMH es indispensable para producir una respuesta de tipo T, la producción de péptidos que pudiesen competir más eficazmente con los péptidos "propios" es también una buena estrategia para "mejorar" la respuesta inmune portencial a un Ag. Otros factores que pueden modificar la respuesta deben ser también estudiados; por ejemplo, el papel que juegan en la estabi-

lización y conformación los residuos adyacentes al péptido (33). Recientemente se pudo demostrar que ciertos fosfolípidos como la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, los fosfoinositoles y la cardiolipina aumentan de manera significativa la unión del péptido a los antígenos del CMH, aparentemente al inducir una conformación mucho más favorable.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Pierce SL, Margoliash E. Antigen processing an interim report. *TIBS* 1988; 13: 27.
2. Kronenberg M, Jin G, Hood LE, Shastri N. The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recongnition. *Ann Rev Immunol.* 1986; 4: 529.
3. McDevitt HO, Benacerraf B. Genetic control of specific immune responses. *Adv Immunol.* 1969; 11: 31.
4. Unanue ER. Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann Rev Immunol.* 1984; 2: 395.
5. Poulter LW. Antigen presenting cells in situ: their identification and involvement in immunopathology. *clin. Exp. Immunol.* 1983; 53: 513.
6. Marrack P. New insights into antigen recognition. *Science* 1987; 235: 1311.
7. Germain RN. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 1986; 322: 687.
8. Gerlier D, Rabourdin-Combe C. Antigen processing-from cell biology to molecular interactions. *Immunol. Today* 1989; 10: 3.
9. Delovitch TL, Semple JW, Phillips ML. Influence of antigen processing on immune responsiveness. *Immunol. Today* 1988; 9:216.
10. Allen PM. Antigen processing at the molecular level. *Immunol. Today* 1987; 8: 270.
11. Yoshikawa M, Watanabe M, Hozumi N. Analysis of proteolytic processing during specific antigen presentation. *Cell. Immunol* 1987; 110: 431.
12. Blum JS, Cresswell P. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85: 3975.
13. Guagliardi LE, Koppelman B, Blum JS, Marks MS, Cresswell P, Brodsky FM. Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment.

14. Roche PA, Cresswell P. Invariant chain association with HLA- DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990; 345: 615.
15. Townsend ARM, Rothbard J, Gotch FM, Bahadin G, Wraith D, McMichael AJ. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*. 1986; 44: 959.
16. Nuchtern JG, Bonifacino JS, Biddison WE, Klausner RD. Brefeldin A implicates egress from endoplasmic reticulum in class I restricted antigen presentation. *Nature* 1989; 339: 223.
17. Mellins E, Smith L, Arp B, Cothert T, Celis E, Pious D. Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* 1990; 343:71.
18. Sekaly RF, Jacobson S, Richert JR, et al. Antigen presentation to HLA-Class II-restricted measles virus specific T-cell clones can occur in the absence of the invariant chain. *Proc Natl Acad Sci* 198; 85: 1209.
19. Nuchtern JG, Biddison WE, Klausner RD. Class II MCH molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 1990; 343: 74.
20. Yewdell JW, Bebbink JR, Hosaka Y. Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* 1988; 239: 637.
21. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. et al. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329: 506.
22. Bjorkman PJ, Sapper MA, Samraoui B, et al. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigen. *Nature* 1987; 329: 512.
23. Brown JH, Jardetzky T, Saper MA, et al. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988; 332: 845.
24. Delisi C, Berzofsky JA. T-cell antigenic sites tend to be amphiphatic structures. *Proc Natl Acad Sci*. 1985; 82:7048.
25. Guillet JG, Lai M-Z, Briner TJ. et al. Immunological self, nonself discrimination. *Science* 1987; 235: 865.
26. Kappler J, White J, Wegmann D, Mustain E, Marrack P. Antigen presentation by Ia+B cell hybridomas to H-2 restricted T-cell hybridomas. *Proc. Natl Acad Sci*. 1982; 79:3604.
27. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between Tand B cells. *Nature* 1985; 314: 537.
28. Kupfer A, Swain SL, Janeway CA, et al. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. *Proc Natl Acad Sci* 1986; 83: 6080.
29. Watts C, Davidson HV. Endocytosis and recycling of specific antigen by human B cell lines. *EMBO J* 1988; 7: 1937.
30. Lanzavecchia A. Clonal sketches of the immune response. *EMBO J*. 1988; 7: 2945.
31. Townsend ARM, C. Bastin J, Ljunggren HC, Foster L, Karre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989; 340: 443.
32. Ogasawara K, Wambua PP, Gotohda T, Onoe K. Modification of the T cell responsiveness to synthetic peptides by substituting amino acids on epitopes. *Int Immunol*. 1990; 2: 219.
33. Armah GE, Nishikawa S, Omata Y, Nakabayashi T, Tomita KI. Conformation and immunogenicity of engineered rearing segments of the circumsporozoite surface protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 38: 135.