

Antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas de choque térmico

Antigenicity and immunogenicity of heat shock proteins

REQUENA, J. M., SOTO, M., QUIJADA, L. y ALONSO, C.

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (C. S. I. C. - U. A. M.), Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid. España.

RESUMEN

Los organismos eucariotas y procariotas responden frente a estímulos potencialmente dañinos, tales como temperaturas elevadas, aumentando la síntesis de una familia de proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (HSPs) o proteínas de estrés. Las HSPs se encuentran entre las proteínas más conservadas y abundantes presentes en la naturaleza. Estas proteínas han generado un mayor interés desde que fueron descritas como antígenos dominantes de microorganismos infecciosos. Se ha sugerido que el reconocimiento por el sistema inmune de las HSPs del patógeno sirve como una primera línea de defensa al tiempo que es la forma por la que se puede desencadenar un proceso autoinmune como consecuencia de la aparición de una reactividad cruzada con las HSPs propias. Como una consecuencia de su función chaperona, las HSPs se encuentran asociadas a un amplio espectro de péptidos derivados de las células de las que estas proteínas se aíslan. Por ello, no resulta sorprendente que los complejos HSP-péptidos se comporten como antígenos específicos de tumores. Resulta destacable que la vacunación con estos complejos HSP-péptidos induce respuestas inmunes protectoras frente al tumor del que fueron aislados dichos complejos. Finalmente, datos recientes indican que las características antigénicas de las HSPs pueden ser explotadas para aumentar la respuesta inmune humoral y celular frente a proteínas de interés.

Palabras clave: Proteínas de choque térmico. HSP90. HSP70. HSP60. Antígenos. Células tumorales. Respuesta inmune.

ABSTRACT

Prokaryotic and eukaryotic organisms respond to potentially damaging stimuli such as elevated temperature by increasing the synthesis of a family of proteins collectively known as heat shock proteins (HSPs) or stress proteins. HSPs are among the most highly conserved and abundant proteins found in nature. Much interest has been generated in HSPs since they were described as dominant antigens of infectious microorganisms. It has been suggested that this immune recognition of pathogen HSPs serves as a first line of defense as well as a means by which autoimmune cascades may develop due to the inappropriate cross reactivity with self-HSPs. As a consequence of their chaperone functions, HSPs are associated with a broad spectrum of peptides derived from the cells from which they are isolated. Hence, it is not surprising that HSP-peptide complexes

have been described as tumor specific antigens. Remarkably, it has been demonstrated that vaccination with these HSP-peptide complexes elicit protective immune response against the tumor from which complexes were isolated. Finally, recent findings indicate that the antigenic properties of HSPs can be exploited to enhance the humoral and cellular immune response to proteins of interest.

Key words: Heat shock proteins. HSP90. HSP70. HSP60. Antigens. Tumoral cells. Immune response.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 191-208]

La exposición de cualquier célula viva u organismo a un estrés ambiental, tales como temperaturas elevadas o daño por oxidación, conduce al aumento en la síntesis de una familia de proteínas colectivamente conocidas como proteínas de choque térmico (HSP, del inglés "heat shock protein") o proteínas de estrés. Las HSPs se encuentran entre las proteínas más conservadas y abundantes a lo largo de la evolución (1). Aunque, por su descubrimiento, las HSPs se asocian a situaciones de estrés celular, ahora se sabe que estas proteínas también desempeñan funciones fisiológicas importantes en condiciones celulares normales. Así, el término "chaperona molecular" se acuñó para designar su papel más general de proteínas fundamentales en el funcionamiento normal de la célula. Por otro lado, al encontrarse en cualquier tipo de organismo y su extrema conservación tanto en estructura como en función, no es sorprendente que las HSPs estén también implicadas en fenómenos de inmunidad y que el sistema inmune haya explotado ciertas características de las HSPs para realizar funciones particulares de defensa a infecciones y procesos patológicos. En este sentido, las HSPs se han descrito como antígenos importantes de agentes infecciosos. Además, probablemente debido a su extrema conservación, las HSPs también se han implicado en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Finalmente, la presencia de las HSPs en las preparaciones de antígenos de células tumorales y su papel en el desarrollo de inmunidad frente a tumores han puesto definitivamente tras la pista de una probable implicación de estas proteínas en el funcionamiento del sistema inmune. En esta revisión se resumen los hallazgos más recientes sobre las implicaciones de las HSPs en relación con la respuesta inmune.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PRINCIPALES FAMILIAS DE HSPS

Las HSPs se han venido definiendo de acuerdo con su peso molecular aparente en electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS. Los miembros de

cada familia, además de su similitud de tamaño, presentan características funcionales y estructurales muy conservadas, y se han descrito en especies muy alejadas evolutivamente donde desarrollan funciones muy similares. Muchas de las familias de HSPs presentan una elevada capacidad para asociarse con otras proteínas y modificarlas estructuralmente. A menudo, los procesos de asociación y disociación de la HSP con otras proteínas están asociados con la hidrólisis de ATP. A continuación, se resumen las características y funciones fisiológicas relevantes de las tres familias de HSPs más importantes: la familia HSP90, la familia HSP70 y la familia HSP60.

Familia HSP90

Dentro de esta familia, sus miembros se han denominado de diferente forma dependiendo de la especie en la que se han aislado. Así, por ejemplo, se denominan HSP83 en *Drosophila* y HSP90 en levaduras y humanos (1, 2). La proteína equivalente en *Escherichia coli* se denomina HtpG. Las HSP90s son proteínas citoplasmáticas muy abundantes incluso en condiciones normales de crecimiento y se les han descrito asociadas a diferentes proteínas celulares tales como quinasas, actina y tubulina. Como función más relevante está su implicación en el plegamiento inicial del receptor de hormonas esteroideas, impidiendo su interacción con el DNA nuclear antes de que se haya unido la hormona esteroídica o de estructura esteroídica. Dentro del retículo endoplasmático existe un miembro de esta familia denominado GRP94, probablemente involucrado en procesos de secreción de proteínas.

Familia HSP60

Miembros de esta familia se han descrito en todas las células en las que se han investigado, tanto eucariotas como procariontes (3). El primer miembro de esta familia, descrito en *E. coli*, fue denominado GroEL; posteriormente, se han descrito otros miembros presentes en cloroplastos y mitocondrias. Existe una elevada conservación de secuencia entre estas diferentes proteínas (46-54% de identidad de secuencia). Esta homología de secuencia junto con la localización subcelular de estas proteínas en células eucariotas son características que están a favor del origen endosimbiótico de mitocondrias y cloroplastos. Estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de proteínas homólogas a la familia HSP60 en el citoplasma de células animales y en levaduras (4), éstas se han denominado proteínas de la familia TCP-1 ("t-complex polypeptide 1").

La elevada conservación de secuencia entre todos los miembros de la

familia HSP60 hace pensar que todas estas proteínas tengan una función común. Así, se piensa que las HSP60s están encargadas de ayudar a otras proteínas en la adquisición de su estructura nativa. También presentan actividad ATPasa, necesaria para llevar a cabo su función.

Familia HSP70

Los miembros de la familia HSP70 son las proteínas, presentes en eucariotas y procariotas, más conservadas a lo largo de la evolución (3). Por ejemplo, entre el representante bacteriano de la familia HSP70, denominado dnaK, y los homólogos en eucariotas, la identidad de secuencia es superior al 45%. Dentro de una célula eucariótica, proteínas pertenecientes a la familia HSP70 se detectan en el citosol, la mitocondria, los cloroplastos y en el retículo endoplasmático. Algunos miembros de la familia son inducidos por varias condiciones de estrés, mientras que otros son expresados constitutivamente; los primeros se denominan propiamente HSP70 mientras que los constitutivos se denominan HSC70.

Estas proteínas se unen fuertemente a ATP y presentan actividad ATPasa. En la proteína se distinguen dos dominios funcionales distintos: en el extremo N-terminal (44 kDa) se localiza el sitio de unión a ATP y la actividad ATPasa, mientras que en el extremo C-terminal, la región de la molécula más divergente evolutivamente, se sitúa el dominio de unión a péptidos. Existen múltiples funciones fisiológicas en las que intervienen miembros de la familia HSP70. Las HSP70s previenen o deshacen interacciones proteína-proteína erróneas mediante su unión a las regiones expuestas. Proteínas de la familia HSP70 intervienen en la translocación de proteínas a través de membranas (de la mitocondria y del retículo endoplasmático). BiP, o grp78, descrita inicialmente por su interacción con las cadenas pesadas de inmunoglobulinas en células pre-B, es el miembro de la familia HSP70 que se localiza en el retículo endoplasmático y se postula que podría estar encargado de retener proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático, del ensamblaje de proteínas oligoméricas y de la translocación de proteínas al retículo endoplasmático.

Existe un menor número de estas proteínas, con un menor grado de conservación, que también son calificadas como HSPs o chaperonas moleculares. Enumeraciones detalladas de estas proteínas han sido publicadas recientemente (5, 6).

LAS HSPs Y EL SISTEMA INMUNE

La relación entre las HSPs y el sistema inmune empezó a considerarse cuando estas proteínas fueron identificadas como antígenos en un gran número

ro de patógenos. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto que la inmunoreactividad frente a las HSPs está relacionada con procesos autoinmunes (7). Posteriormente, se identificó a la proteína BiP, un miembro de la familia HSP70, como una proteína fundamental para el plegamiento correcto de las inmunoglobulinas. Asimismo, las características funcionales de las HSPs, es decir, su facilidad para asociarse con proteínas mal plegadas y su mediación en el transporte de proteínas a través de membranas, justifican la implicación de estas proteínas en procesos de procesamiento y presentación de antígenos (8, 9). Este último punto, como veremos, tiene un interés particular en el desarrollo de inmunidad frente a tumores. En este contexto, parece más que accidental que algunos genes codificantes para la HSP70 se encuentren en la región cromosomal donde se sitúan los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (10). Por otro lado, resulta muy interesante que la secuencia primaria de la HSP70 puede ser alineada con el dominio de unión a péptidos de las moléculas MHC clase I, sugiriendo la existencia de un surco de unión a péptidos similar para HSP70 y MHC clase I (11). En esta parte de la presente revisión nos hemos centrado en tres implicaciones de las HSPs en relación con aspectos particulares del sistema inmune. Primero, las HSPs como antígenos mayoritarios de agentes infecciosos. Segundo, las HSPs como antígenos de resistencia a tumores. Y, tercero, las HSPs como moléculas moduladoras del sistema inmune que, aunque iniciado muy recientemente, con seguridad será un importante campo de estudio en los próximos años.

LAS HSPS COMO ANTÍGENOS DE PATÓGENOS

Existe ya una revisión en castellano sobre la respuesta al choque térmico en parásitos, donde se dedica un apartado extenso a la descripción de las HSPs como antígenos mayoritarios de patógenos (12), por lo que en la presente nos vamos a limitar a una descripción de antígenos pertenecientes a la familia HSP70, cuyos datos sobre antigenicidad e inmunogenicidad pueden resultar de interés en el contexto más general de esta revisión.

La primera demostración de la antigenicidad de una HSP fue realizada simultáneamente en los trabajos de Bianco et al. (13) y Ardeshir et al. (14), que identificaron un antígeno de *Plasmodium falciparum* como un miembro de la familia HSP70. Una característica particular de la HSP70 de *P. falciparum* es la presencia, en su región carboxilo-terminal, de varias repeticiones con la secuencia de aminoácidos glicina-glicina-metionina-prolina (GGMP). No obstante, la localización de esta proteína en la membrana plasmática de merozoitos, permanece como un punto de controversia entre ambos grupos. Posteriormente, Peterson et al. (15) describieron otro miembro de la familia HSP70 de *P. falciparum* como antígeno, aunque esta nueva proteína carecía de las repeti-

ciones GGMP. El análisis de los epítomos reconocidos por los sueros de pacientes con malaria indicaron que éstos se encontraban tanto en regiones conservadas como divergentes de la HSP70 de *P. falciparum*. Además estos sueros de enfermos de malaria reaccionaban también con la HSP70 humana, con lo que se puede concluir que la HSP70 de *P. falciparum*, durante la infección, induce autoanticuerpos (16).

Miembros de la familia HSP70 también han sido descritos como antígenos mayoritarios en patógenos procariotas. La búsqueda y posterior caracterización de un antígeno mayoritario y común a las especies *Mycobacterium leprae*, *M. bovis* y *M. tuberculosis*, pusieron de manifiesto que se trataba del homólogo bacteriano de la HSP70 (17). En vista de la conservación de secuencia de este antígeno micobacteriano con las proteínas homólogas de mamíferos, no deja de llamar la atención que éste sea el antígeno frente al que más fuertemente responde el sistema inmune del hospedador. Estudios posteriores indicaron que la HSP70 de *M. leprae* induce, además de linfocitos B, respuesta de linfocitos T en sujetos expuestos a la micobacteria (18). La utilización de distintos subfragmentos de la proteína permitió identificar a la parte C-terminal de la HSP70 de *M. leprae*, que incluye la región de máxima divergencia con respecto a la HSP70 humana, como el blanco principal de la respuesta inmune humoral (19). Un análisis más fino, mediante el empleo de péptidos sintéticos, permitió identificar la existencia de, al menos, cuatro epítomos lineares, dentro de los 101 residuos C-terminales de la HSP70 de *M. tuberculosis*, que resultan reconocidos por los anticuerpos presentes en sueros de pacientes con tuberculosis (20). También resulta interesante destacar que la HSP70 de *M. tuberculosis* induce específicamente la proliferación, y la secreción de linfoquinas, de linfocitos intraepiteliales de varias cepas de ratón (21). Una diferencia significativa entre los linfocitos intraepiteliales y los linfocitos periféricos es que los primeros no proliferan en presencia de mitógenos o de anticuerpos monoclonales específicos del receptor de linfocitos T, estímulos que en cambio inducen fuerte proliferación de linfocitos T periféricos. Un estudio muy interesante realizado por Mustafa et al. (22) puso de manifiesto que los linfocitos T humanos reconocen a las HSPs de *Mycobacterium* presentadas en el contexto de múltiples moléculas HLA-DR, lo cual está de acuerdo con el hecho de que las HSPs son los blancos más frecuentes e importantes frente a los que el sistema inmune dirige su respuesta durante la infección por estas micobacterias. Quizás sea necesario aclarar que los linfocitos T CD4+ humanos reconocen a los antígenos extraños cuando son presentados por molécula HLA de clase II. En un trabajo posterior, estos autores mostraron la existencia de al menos seis epítomos de linfocitos T en la HSP70 de *M. leprae*, que son presentados por múltiples moléculas HLA-DR; alguno de estos epítomos presenta una elevada conservación de secuencia con el epítomo equivalente de la HSP70 humana (23).

Finalmente, cabe mencionar aquí, la existencia de varias publicaciones que han mostrado que las HSPs de micobacterias pueden proteger de la artritis experimental en el modelo ratón. Por ejemplo, la administración de 50 μ g de HSP70 de *M. tuberculosis* es suficiente para proteger completamente a ratas del desarrollo de la artritis reumatoide experimental (24).

Otro patógeno procariota donde la HSP70 se ha descrito como antígeno mayoritario es *Chlamydia trachomatis*, que pertenece a un grupo único de bacterias que forman inclusiones intracelulares. Estos organismos son patógenos importantes de humanos y causan enfermedades de los tractos ocular, respiratorio y reproductor. Las respuestas inmunes inducidas por la infección son fuertes y uno de los antígenos más frecuentemente reconocido se vio que correspondía al representante de la familia HSP70 presente en esta especie (25). Un análisis de la inmunogenicidad de esta proteína en conejos mediante el empleo de péptidos sintéticos puso de manifiesto la existencia de un gran número de epítomos B a lo largo de la molécula. Algunos de estos epítomos se encuentran en regiones funcional y estructuralmente conservadas con las HSP70s de mamíferos. Curiosamente, sólo un epítomo de linfocitos T se caracterizó en la HSP70 de clamidias por su capacidad de inducir proliferación de los linfocitos T obtenidos de un ratón inmunizado con antígeno total del patógeno (26).

Volviendo a los patógenos eucariotas, otros parásitos en los que se han descrito la HSP70 como antígeno prominente son los protozoos del género *Leishmania*. La primera evidencia de este hecho fue publicada por MacFarlane et al. (27), quienes identificaron a la HSP70 de *L. donovani* como el antígeno reconocido por el 50% de los sueros de pacientes con leishmaniosis visceral. Asimismo, durante la infección natural de *L. infantum* en perros se detectan anticuerpos anti-HSP70 en el 100% de los animales infectados. Estos estudios también pusieron de manifiesto que la respuesta inmune humoral era absolutamente específica frente a la HSP70 del parásito y en ningún caso se detectaron anticuerpos capaces de reconocer a la HSP70 del hospedador (28). Mediante el empleo de subclones, se ha identificado a la región C-terminal como la región más inmunodominante de la HSP70 de *L. donovani* en base al reconocimiento mostrado por sueros de pacientes con leishmaniosis visceral (29). Mediante el empleo de péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la HSP70 de *L. infantum* se han identificado tres regiones inmunodominantes, una de ellas localizada en la región C-terminal más divergente de la molécula. Estas regiones inmunodominantes se definen como aquellas secuencias de la molécula que son reconocidas por un alto número de sueros y muestran mayores valores de reactividad. Sin embargo, el 50% de los péptidos empleados resultan reconocidos por al menos uno de los sueros de leishmaniosis canina analizados, lo que indica que en la HSP70 de *L. infantum* existen muchos epítomos capaces de inducir una respuesta humo-

ral (30). Durante la infección, las HSPs de *Leishmania*, en paralelo a la inducción de fuertes respuestas humorales, inducen respuestas celulares y la producción de citoquinas. La magnitud de dicha respuesta parece ser un hecho distintivo que pudiera estar relacionado con el tipo de leishmaniosis, cutánea o mucocutánea, desarrollada en los pacientes (31). Estudios realizados en el sistema modelo de infección experimental por *L. major* de ratones indican que los linfocitos T $\alpha\alpha$ aumentan en número durante la infección experimental y que podrían estar implicados en la defensa frente al parásito (32). Aunque el papel que juega esta población de linfocitos dentro del engranaje del sistema inmune no está bien definido, sí que son muchos los hechos que relacionan estas células con las HSPs. Por ejemplo, resulta particularmente interesante la observación de que las células T $\alpha\alpha$ de pacientes con leishmaniosis mucocutánea proliferan frente a la estimulación con la HSP70 recombinante de *L. chagasi*, mientras que no responden a la estimulación con los dos antígenos mayoritarios de *Leishmania*, gp42 y gp63 (33).

Durante la infección del protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, las HSPs también se han revelado como antígenos mayoritarios. Así, tras una búsqueda inmunológica sobre una genoteca de expresión construida con cDNAs de *T. cruzi*, alrededor del 10% de los clones rescatados pertenecen a cDNAs codificantes para estas proteínas, lo que da idea de la inmunodominancia de las HSPs durante la infección de este parásito (34). El estudio de los determinantes antigénicos de la HSP70 de *T. cruzi*, que resultan reconocidos por los sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas, indicó la existencia de múltiples epítomos de células B distribuidos a lo largo de la molécula, tanto en regiones conservadas como divergentes en relación con la proteínas de la familia HSP70 de humanos (35). En otro miembro de la familia Trypanosomadae, *T. congolense*, la proteína BiP/GRP78, perteneciente a la familia HSP70, se ha descrito como un antígeno inmunodominante durante la tripanosomiasis bovina (36).

Finalmente, para concluir esta relación, indicar que la HSP70 también se ha descrito como inmunógeno mayoritario en la infección en humanos por trematodos del género *Schistosoma* (37). La respuesta inmune humoral, dirigida esencialmente frente a la región C-terminal de la HSP70, parece estar finisamente controlada y es capaz de producir anticuerpos específicos frente a la HSP70 de *S. japonicum* o frente a la HSP70 de *S. mansoni*, dependiendo del patógeno infectante, que no reaccionan cruzadamente con las HSP70s de la otra especie y tampoco con la HSP70 humana (38). Aquí tenemos otro ejemplo que sugiere que, dentro del contexto de la infección, los parásitos presentan la HSP70 de una manera en la que, por un lado, provocan una respuesta inmunodominante y, por otro, evitan una respuesta de anticuerpos frente a las regiones conservadas de la molécula que pudieran reconocer a las HSPs de los hospedadores.

Después de esta relación, con seguridad incompleta, de procesos infecciosos en los que las HSP70s de los patógenos resultan un blanco importante del sistema inmune del hospedador, nos tenemos que enfrentar a contestar la siguiente pregunta: ¿Por qué las proteínas de choque térmico resultan inmunorreactivas? Existen varias hipótesis que vamos a referir a continuación.

Primera hipótesis, las HSPs son proteínas muy abundantes en los patógenos, especialmente bajo las adversas condiciones impuestas por el ambiente en el hospedador en el que se van a desarrollar. Así, por ejemplo, durante la infección por *Leishmania* de macrófagos, su célula blanco, se observa una rápida inducción de las HSPs del parásito (39, 40).

Segunda hipótesis, las HSPs pueden ser intrínsecamente antigénicas debido a una facilidad para ser procesadas y presentadas por el sistema inmune debido a características estructurales o funcionales propias de estas proteínas. Como se ha indicado en apartados anteriores, las HSPs tienen tendencia a formar multímeros que son fácilmente fagocitados, procesados y, finalmente, presentados sobre la superficie de macrófagos en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Tercera hipótesis, las HSPs pueden ser factores de virulencia en el sentido de que estas proteínas pudieran desempeñar papeles fundamentales en la diferenciación de los parásitos y en el desarrollo de infectividad. De hecho existen muchos ejemplos en los que la inducción de las HSPs se correlaciona con la infectividad y supervivencia del patógeno dentro del ambiente hostil impuesto por su hospedador (41). Teniendo en cuenta, por tanto, que las HSPs podrían ser importantes para establecer la infección del patógeno, es lógico pensar que el hospedador se defiende montando una respuesta inmune frente a estos factores de virulencia.

Cuarta hipótesis, la presencia de epítomos conservados en las HSPs es una característica que ha podido ser explotada por el sistema inmune del hospedador. Basado en lo sorprendente que resulta que el sistema inmune concentre su atención sobre fragmentos de unas familias de proteínas tan conservadas evolutivamente, se ha sugerido que este reconocimiento inmune de las HSPs del patógeno podría servir como una primera línea de defensa frente a la infección, independientemente de la naturaleza del patógeno (42). En este sentido, en la figura 1 se ilustra el modelo propuesto por Cohen and Young (43) que, dentro de la teoría general del *homunculus* inmunológico, sirve para explicar la inmunodominancia de las HSPs durante muchos procesos infecciosos y también autoinmunes. Según el modelo, existen dos tipos de respuestas inmunes frente a las HSPs: los epítomos extraños inducirían una respuesta agresiva frente a la infección mientras que los epítomos conservados serían reconocidos por una población de linfocitos T autorreactivos finamente regulada. Asumiendo que este sistema funcionara bien en la mayoría de los casos, se podría predecir que la respuesta inmune frente a las HSPs de los patógenos

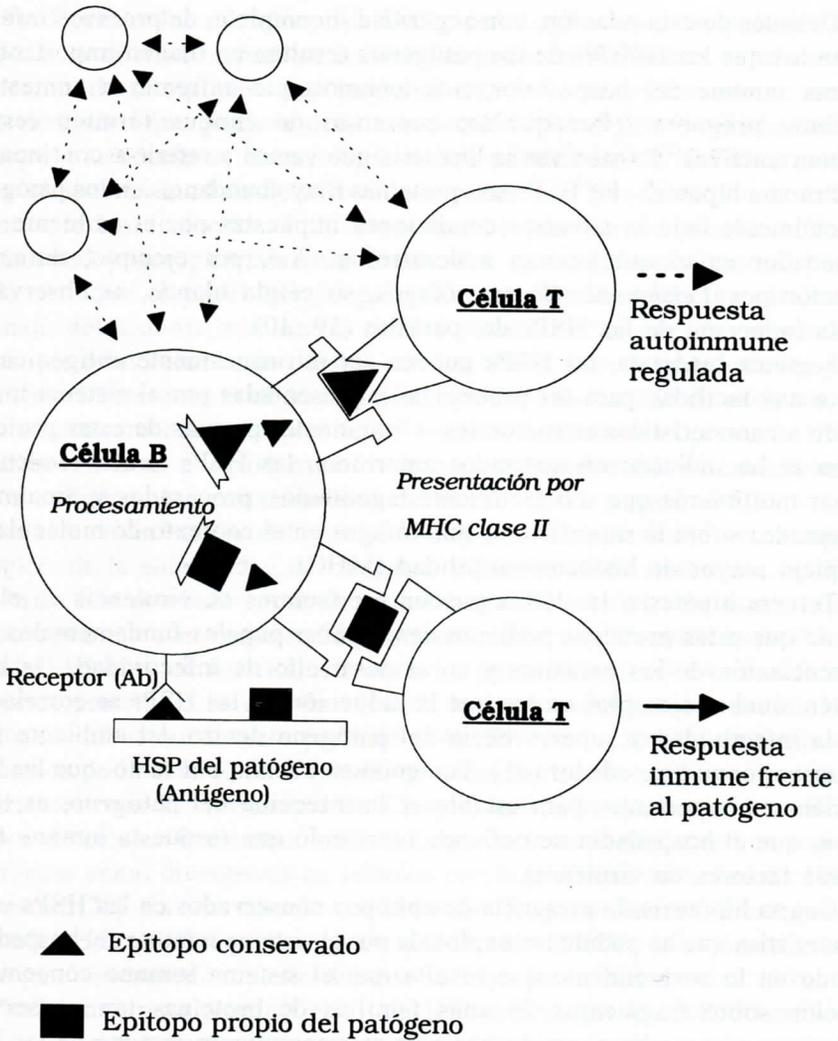


Fig. 1.—Modelo propuesto para explicar la inmunodominancia de las HSPs de patógenos. El modelo propone, de acuerdo con el modelo general del “homunculus inmunológico”, la existencia de células linfocitarias B y T con receptores específicos para secuencias conservadas de las HSPs que estarían regulados a través de una red inmune. Así, los epítomos conservados de las HSPs se unirían a anticuerpos (Ab) específicos presentes en la superficie de las células B, produciéndose la internalización de ambas moléculas. En el interior celular, las HSPs del patógeno entrarían en la ruta de procesamiento para la presentación en el contexto de moléculas MHC de clase II. Los péptidos generados y presentados pueden derivar de regiones conservadas o regiones divergentes. En el primer caso, los complejos MHC II-péptidos serían reconocidos por células T autorreactivas, cuya estimulación se encuentra regulada por la red inmune. En cambio, cuando lo que se presenta son los epítomos propios de las HSPs del patógeno, se induce una activación fuerte de las células T que generan una respuesta agresiva frente al patógeno.

iría dirigida predominantemente frente a los determinantes no conservados, lo cual está de acuerdo con muchas de las evidencias experimentales. Bajos estas circunstancias no hay razón para pensar que esta respuesta pueda ser perjudicial para el hospedador, pero es posible que el mecanismo de regulación se pueda romper durante algunas infecciones. Así, el escape de clones auto-reactivos del mecanismo de regulación podrían ser responsables de la aparición de procesos autoinmunes. De hecho, en pacientes con procesos autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, frecuentemente se encuentran autoanticuerpos frente a miembros de la familia HSP70 (44).

LAS HSPS Y LA INMUNIDAD FRENTE A TUMORES

Desde hace muchos años se conocía que era posible inducir inmunidad frente a un determinado tipo de tumor mediante la preinoculación de células inactivadas procedentes de ese mismo tipo de tumor (45). Estos datos dieron pie a que se generara la idea de la inmunogenicidad de las células cancerígenas y, por tanto, la existencia de antígenos específicos de tumores. La búsqueda de las moléculas que mediarían esta inmunogenicidad específica condujo a la identificación de una proteína llamada gp96 como el antígeno de rechazo de un tipo de tumor inducido por metilcolantreno (46). La importancia de este antígeno quedó demostrada cuando se observó que ratones inmunizados con 5-10 μ g de gp96 purificada resultaban inmunes al desarrollo del tumor del que la molécula gp96 fue aislada. La utilización de anticuerpos específicos frente a gp96 permitió demostrar que esta molécula también está presente en los tejidos normales (46). Sin embargo, la gp96 aislada de los tejidos normales era incapaz de inducir ningún tipo de inmunidad (45). Estas observaciones sugirieron la hipótesis de la existencia de mutaciones en los genes de gp96 de las células tumorales y que estas mutaciones serían distintas de un tumor a otro. Sin embargo, la secuenciación de los cDNAs de gp96 aislados de bazo de ratón y de los fibrosarcomas Meth A y CMS5 no reveló la existencia de mutaciones ni específicas de tejido ni específicas de tumor (47). La comparación de las secuencias de la gp96 con secuencias conocidas reveló la existencia de gran similitud con la proteína regulada por glucosa grp94, que es un miembro de la familia HSP90 que se localiza en el retículo endoplasmático. En ausencia de diferencias de secuencia en los genes gp96 entre los tejidos tumorales y normales, se postuló que la antigenicidad específica de tumores se debería no a la inmunogenicidad propia de la gp96 sino a los péptidos antigénicos que esta molécula llevaría asociados. Esto fue posteriormente demostrado cuando se observó que una vez que eran retirados los péptidos de las preparaciones de gp96, éstas perdían su inmunogenicidad (45).

Muchos otros antígenos específicos de tumores corresponden a miembros

de las familias de HSPs. Así, también se ha observado que la vacunación con preparaciones de HSP70 obtenidas de un sarcoma Meth A, pero no aquellas obtenidas de un tejido normal, hace que el ratón resulte inmune a una inoculación posterior con células de este tipo de tumor (48). También se ha visto que las preparaciones de HSP90 inducen inmunidad específica a tumores, aunque en menor grado que la GRP96/gp96 o la HSP70 (49).

Lo que inicialmente pudo suponer una paradoja, las HSPs que están entre las proteínas más conservadas y más abundantes en los seres vivos resultan antígenos específicos de tumores, puede no ser tal según se va conociendo más sobre el funcionamiento del sistema inmune. Para explicar esta inmunogenicidad específica de tumores se ha sugerido que los péptidos asociados a las HSPs son transferidos a las moléculas MHC clase I bien directamente o bien a través de la internalización de los complejos HSP-péptido, y que este proceso ocurriría en células especializadas en la presentación de antígenos. A continuación, los precursores de los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocerían a los complejos MHC clase I-péptido sobre las células presentadoras y se activarían (49). La asociación de péptidos con las HSPs no es un fenómeno específico de tumores, ya que se ha observado en tejidos normales donde las HSPs están también implicadas en el ensamblaje de las moléculas MHC clases I y II (50). También la asociación de péptidos antigénicos con las HSPs se observa en células infectadas por virus; así, se ha demostrado que los complejos HSP-péptidos aislados de tales células inducen CTL específicos de antígeno (51). Considerando la implicación de las HSPs en los procesos de procesamiento y presentación de antígenos (Fig. 2), se puede explicar de una forma relativamente sencilla cómo estas moléculas, las HSPs, se asocian con péptidos y, por tanto, resultan antígenos específicos de tumores.

Una vez analizado cómo las HSPs se pueden asociar con péptidos y cómo esta asociación resulta en la posibilidad de obtener preparaciones de HSPs con la característica de promover una inmunidad específica frente al tumor del que la preparación fue obtenida, queda por considerar el posible mecanismo por el que se induce dicha inmunidad. Se ha observado que la depleción de células T CD8+, pero no de CD4+, en la fase de primado elimina la inmunidad inducida por las preparaciones de gp96. Asimismo, la eliminación de macrófagos durante la fase de primado también resulta en la pérdida de inmunidad inducida por las preparaciones de gp96. Sin embargo, en la fase efectora se requieren linfocitos CD4+, CD8+ y macrófagos (52). Por otro lado, resulta interesante destacar que los CTLs pueden ser inducidos tanto en ratones que presentan el MHC idéntico a las células donadoras de la preparación de gp96 (haplotipo H-2d) como en ratones con MHC diferente (haplotipo H-2b). Así, las preparaciones de gp96, y probablemente otras HSPs, son capaces de primar CTLs de forma cruzada, es decir, la inducción de inmuni-

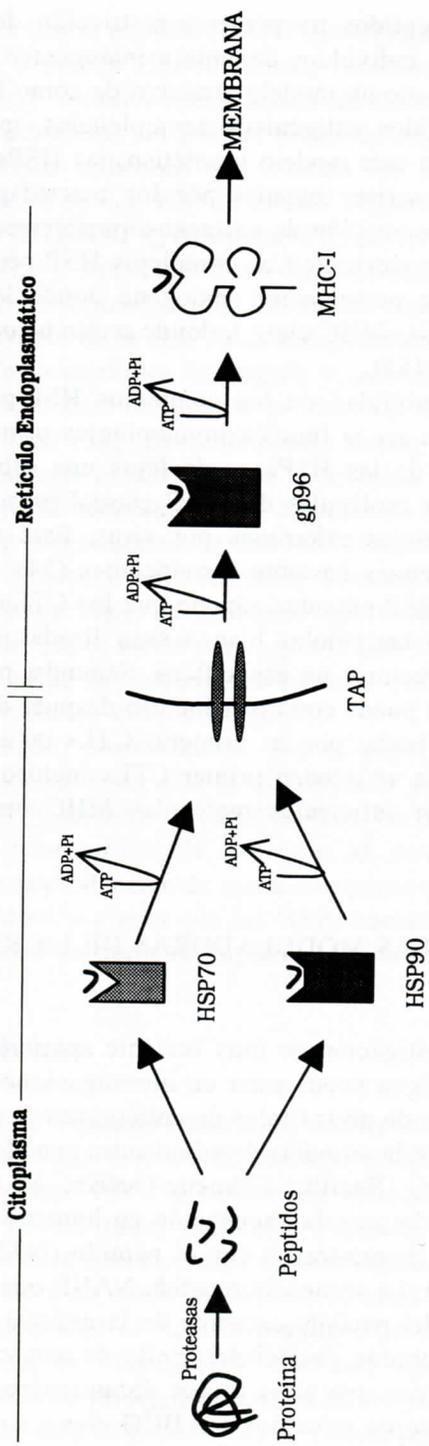


Fig. 2.—Esquema ilustrativo del procesamiento y presentación de antígenos en el contexto de MHC clase I. Este esquema sirve para explicar cómo las HSPs de las células tumorales (o células normales) interactúan con péptidos y, como consecuencia, los complejos HSP-péptido pueden resultar antígenos específicos de tumores. Los péptidos provenientes de la degradación en el citoplasma de proteínas interactúan con los miembros citoplasmáticos de las familias HSP70 y HSP90, quienes, a su vez, por un mecanismo dependiente de la hidrólisis de ATP, transfieren los péptidos a unas proteínas transportadoras (denominadas TAP) presentes en la membrana del retículo endoplasmático. Los péptidos, una vez en la cara interna del retículo endoplasmático, son transferidos a la gp96, proteína de la familia HSP90, que ayudará también en el ensamblaje de las moléculas MHC-I y su asociación con dichos péptidos.

dad por los complejos HSP-péptidos no presenta restricción debida a las características genéticas de los individuos donante e inmunizado (53).

Srivastava et al. (54) han dado un modelo atractivo de cómo las preparaciones de HSPs, con los péptidos antigénicos acomplejados, inducirían la respuesta CTL. De acuerdo con este modelo hipotético, las HSPs, asociadas con los péptidos antigénicos, serían tomadas por los macrófagos u otras células especializadas en la presentación de antígenos, posiblemente a través de un mecanismo mediado por receptor. Los complejos HSP-péptido serían entonces dirigidos a la vía de presentación endógena donde los péptidos serían transferidos a las moléculas MHC clase I, donde serían reconocidos por los precursores de CTL CD8⁺ (55).

Se ha postulado que la habilidad de los complejos HSP-péptido para primar los CTLs *in vivo* podría ser la función inmunológica principal de las HSPs, y que primar a través de las HSPs es de lejos una estrategia más versátil que primar a través de moléculas de MHC clase I presentes en las células tumorales o en las células infectadas por virus. Para apoyar este postulado se han dado tres razones bastante convincentes (54). Primera, el primar a través de complejos HSP-péptidos supone que los CTLs pueden ser primados incluso después que las células blanco sean lisadas debido a la infección, a anticuerpos o a efectores no específicos. Segunda, por este mecanismo el proceso de primado puede continuar incluso después de que todas las células blanco hayan sido lisadas por las primeras CTLs inducidas por la respuesta. Tercera, por esta vía se pueden primar CTLs incluso cuando las células infectadas no expresen suficientes moléculas MHC clase I en su superficie.

LAS HSPS COMO MOLÉCULAS MODULADORAS DE LA RESPUESTA INMUNE

Este es un campo de investigación de muy reciente aparición, pero tremendamente interesante. El origen puede estar en investigaciones en las que se observaba que la producción de altos títulos de anticuerpos, y sostenido en el tiempo, se podía conseguir en la ausencia de adyuvantes cuando los ratones eran pre-inmunizados con BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*, *M. tuberculosis* var. *bovis*, actualmente utilizado para la vacunación en humanos frente a la tuberculosis) y a continuación inmunizados con el péptido (NANP)₄₀ conjugado a la tuberculina PPD (56). La secuencia repetida NANP está presente en la proteína circumsporozoito del parásito causante de la malaria humana, *P. falciparum*, y se viene considerando para el desarrollo de una vacuna frente a malaria. Posteriormente, vieron que altos títulos de anticuerpos IgG anti-(NANP)₄₀ eran inducidos en ratones primados con BCG viva y a continuación

inmunizados con el péptido (NANP)₄₀ conjugado con la hsp65 (GroEL) de *M. bovis* BCG o con la HSP70 (dnaK) recombinante, también en ausencia de adyuvantes. A continuación, cuando se realizaron experimentos dirigidos a analizar directamente un posible papel de adyuvante de las HSPs, los resultados obtenidos indicaron que cuando los ratones controles, que no eran preinmunizados ni con HSP70 ni con BCG, fueron inmunizados con el conjugado HSP70-(NANP)₄₀ en ausencia de adyuvantes, se detectaban anticuerpos anti-(NANP)₄₀ y anti-HSP70 en niveles similares a los obtenidos en los animales preinmunizados (57). Estudios complementarios indicaron que el efecto adyuvante de la HSP70 es independiente de la cepa de ratón utilizada, de la secuencia peptídica conjugada y, además, este método puede ser utilizado con éxito para inducir la producción de anticuerpos frente a antígenos oligosacáridicos (57). Recientemente, Suzue y Young (58) han encontrado que con la simple inoculación de la proteína p24 del virus HIV-1 fusionada a la HSP70 de *M. tuberculosis*, en ausencia de cualquier otro tipo de adyuvante, se promueve la producción de una fuerte respuesta inmune, humoral y celular, frente a la proteína p24. Además, demostraron que para que este efecto adyuvante tenga lugar es necesario que ambas proteínas estén físicamente unidas, por lo que el modo por el que la HSP70 ejerce este efecto estimulador es diferente al de los adyuvantes clásicos que desarrollan su efecto al administrarse mezclados con el antígeno.

Relacionado, posiblemente, con el papel estimulador-adyuvante de las HSPs de micobacterias está la observación de que proteínas de las familias HSP60 y HSP70, aisladas de varias especies bacterianas (*Legionella pneumophila*, *E. coli*, *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. bovis*), son capaces de promover directamente la producción de varias citoquinas por parte de los macrófagos (59). Estos resultados sugieren que las HSPs bacterianas pueden modular la inmunidad mediante un aumento rápido y directo en la producción de citoquinas.

PERSPECTIVAS

Por todo lo expuesto hasta aquí, resulta fácil pensar que las preparaciones de HSPs obtenidas a partir de tumores podrían ser utilizadas para vacunar pacientes sin que fuera necesario un conocimiento previo de los epítomos antigénicos de un tumor particular. Además, la vacunación con complejos HSP-péptido hace que el escape inmunológico resulte virtualmente imposible ya que, debido a su modo de obtención, estas vacunas contendrían no uno, o pocos péptidos, sino el repertorio antigénico completo de un tumor (51, 60). Por otro lado, es muy posible que este tipo de preparaciones de HSPs, aisladas de células infectadas, puedan servir para desarrollar inmunidad frente a la infección de patógenos. Así, se podría pronosticar que estas preparacio-

nes de HSPs puedan constituir pronto una interesante alternativa para el desarrollo de vacunas frente a infecciones carentes actualmente de métodos profilácticos efectivos. Por otro lado, la utilización de las HSPs como adyuvantes, capaces de estimular fuertes respuestas inmunes frente a antígenos de interés, es muy posible que en poco tiempo sea ya una realidad. Finalmente, otro campo que promete ser interesante es el del estudio de la relación entre las HSPs y una subpoblación de linfocitos T, los linfocitos T $\alpha\alpha$ (61). En definitiva, con frecuencia uno se pregunta sobre cuántas sorpresas encierran aún este grupo de proteínas, tan conservadas y ya presentes en los orígenes de las primeras formas vivas.

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización del presente trabajo, el grupo ha sido financiado por los siguientes proyectos: I+D 0020/94 de la Comunidad Autónoma de Madrid, PTR94-0091 del Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo y BIO96-0405 del Programa Nacional de Biotecnología. También queremos agradecer la ayuda institucional de la Fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) LINDQUIST, S.: *Annu Rev Biochem* (1986), **55**:1151-1191.
- (2) LINDQUIST, S., CRAIG, E. A.: *Annu Rev Genet* (1988), **22**, 631-677.
- (3) LANGER, T., NEUPERT, W.: *Curr Topics Microbiol Immunol* (1991), **167**:3-30.
- (4) KUBOTA, H., HYNES, G., CANNE, A., ASHWORTH, A. AND WILLISON, K.: *Curr Biol* (1994), **4**:89-99.
- (5) MACARIO, A. J. L.: *Int J Clin Lab Res* (1995), **25**:59-70.
- (6) MINOWADA, G., WELCH, W. J.: *J Clin Invest* (1995), **95**:3-12.
- (7) YOUNG, D. B.: *Curr Op Immunol* (1992), **4**:396-400.
- (8) VANBUSKIRK, A., CRUMP, B. L., MARGOLIASH, E., PIERCE, S. K.: *J Exp Med* (1989), **170**:1799-1809.
- (9) DENAGEL, D. C., PIERCE, S. K.: *Immunol Today* (1992), **13**:86-89.
- (10) SARGENT, C. A., DUNHAM, I., TROWSDALE, J., CAMPBELL, R. D.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1989), **86**:1968-1972.
- (11) RIPPMMANN, F., TAYLOR, W.R., ROTHBARD, J.B. AND GREEN, N. M.: *EMBO J* (1991), **10**:1053-1059.
- (12) LÓPEZ, M. C., REQUENA, J. M., VEGARA, R., MARTÍN, F., ALONSO, C.: *Nuevas Tendencias: Parasitología Molecular* (1993), Vol. 24, pp. 145-161. L. Rivas López y M. C. López López (eds.), Madrid.
- (13) BIANCO, A. E., FAVALORO, J. M., BURKOT, T. R., CULVENOR, P. E., BROWN, G. V., ANDERS, R. F., COPPEL, R. L., KEMP, D. J.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1986), **83**:8713-8717.
- (14) ARDESHIR, F., FLINT, J. E., RICHMAN, S. J., REESE, R. T.: *EMBO J* (1987), **6**:493-499.