

Contribuciones al estudio de la función del IFN gamma y su receptor en la fisiopatología de enfermedades que involucran al sistema inmune

Iraldo Bello, Pedro López, Yeny Torres, Cimara Bermúdez

División de Ensayos Clínicos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología,
Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacan, Playa,
CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: iraldo.bello@cigb.edu.cu

REPORTE

RESUMEN

El interferón gamma (IFN γ) es una citocina de tipo Th1. El estudio del sistema del IFN γ y su receptor es esencial para el empleo terapéutico más eficaz de esta molécula. Se identificaron diferentes formas moleculares del IFNGR1 entre 84 y 13 kDa, y el receptor soluble (60 a 67 kDa) como consecuencia de procesamientos proteolíticos, con capacidad de unir al IFN γ . Se describe una nueva forma de interacción entre los receptores para IFN α e IFN γ , dependiente de la presencia de IFN α . El IFNGR1 soluble en el plasma de pacientes con artritis reumatoide (AR) es superior al de los controles. El IFN γ modula de manera negativa el CCR-4, un receptor de quimiocina elevado de manera significativa en pacientes con artritis reumatoide juvenil (ARJ). Se desarrolló un antagonista anti-IL-2-IFN γ recombinante, que inhibe las acciones biológicas de IL-2 e IFN γ , y convierte esta proteína en un antagonista de tipo Th1 (AnTh1), con un gran potencial para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Introducción

El sistema del interferón (IFN) es uno de los mecanismos de defensa del organismo que participa en las respuestas inmunes innata y adaptativa. Al enfrentar una infección por algún microorganismo, el sistema del IFN se estimula y responde para controlar la propagación de esta. En dependencia de las características de la invasión y del individuo, la respuesta del sistema del IFN puede ser protectora o dañina.

La función inmunomoduladora del IFN γ es clave para la regulación de la presentación antigénica, la diferenciación a células Th1 o Th2 y la regulación de la migración celular a los sitios de inflamación. Junto al IFN γ , la IL-2 también participa en la regulación del sistema inmune, y de forma independiente interviene de manera crucial en la activación, el crecimiento y la diferenciación de linfocitos T y B, además de que ocurre la activación de células asesinas naturales (NK) y de células asesinas activadas por linfocinas (LAK) [1, 2].

Para ejercer su acción, el IFN γ interacciona con el IFNGR1 dispuesto en la superficie de casi todos los tipos celulares. Este último garantiza la ejecución de las actividades biológicas y participa en su regulación. La propiedad de los receptores solubles de unir a sus ligandos ha promovido el uso de estas proteínas en la terapia de enfermedades, en las cuales sus ligandos tienen una participación patogénica.

De acuerdo con sus funciones biológicas, se pueden esperar efectos terapéuticos del IFN γ en el tratamiento del asma, de enfermedades infecciosas y otras. Sin embargo, el IFN γ y la IL-2 actúan como factores patogénicos en varias enfermedades. Un grupo de enfermedades autoinmunes tienen como base una acción inadecuada del IFN γ y de la IL-2. Entre estas está el lupus eritematoso sistémico (LES), la miastenia gravis (MG), la esclerosis múltiple recurrente remitente (EMRR), la diabetes mellitus de tipo I y la AR.

Por todo ello es muy importante desarrollar el estudio del sistema compuesto por el IFN γ y el IFNGR1, así como las posibles acciones terapéuticas y/o patogénicas de esta citocina, además de que se deben encontrar vías para neutralizar su acción y la de otras citocinas relacionadas con aquellos estados patológicos en que estas juegan un papel importante.

Materiales y métodos

Para este estudio se emplearon técnicas clásicas de inmunoquímica (cromatografías de inmunoafinidad, afinidad por el ligando, marcaje de proteínas con yodo radiactivo, *dot blot*, *western-blot*) para la purificación de los receptores de IFN, su identificación y caracterización. Para la evaluación de la expresión de genes se empleó la metodología de la amplificación génica, combinando la reacción de reverso transcripción, seguida de la reacción en cadena de la polimerasa. La cuantificación de citocinas en suero se realizó por ELISA comerciales. Se utilizaron técnicas de biología molecular para el clonaje de las cadenas del fragmento de IL-2 y de la región extracelular del IFNGR1, así como ensayos biológicos para evaluar la actividad de IL-2 utilizando la línea murina dependiente de IL-2 CTLL-2, la actividad antiproliferativa del IFN γ en la línea Hep-2 (carcinoma de laringe) y de la inhibición de la expresión de HLA-DR por el AnTh1 en la línea celular Colo 205.

Resultados y discusión

Aislamiento, identificación y caracterización del IFNGR1 (membrana y soluble)

En la figura 1A se muestra la cromatografía de competencia con el IFNGR1 marcado con yodo 125 que se pasa a través de una matriz que tiene acoplada de forma covalente al IFN γ . La cromatografía se realizó en presencia (1) o ausencia (2) de un exceso de IFN γ , el cual compete, durante la cromatografía, por el

1. Minami Y y cols. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 1993;11:245-67.

2. Kuziel WA y cols. Interleukin-2 and IL-2 receptor: New insights into structure and function. *J Invest Dermatol* 1990;94(Suppl 6):275-325.

✉ Autor de correspondencia

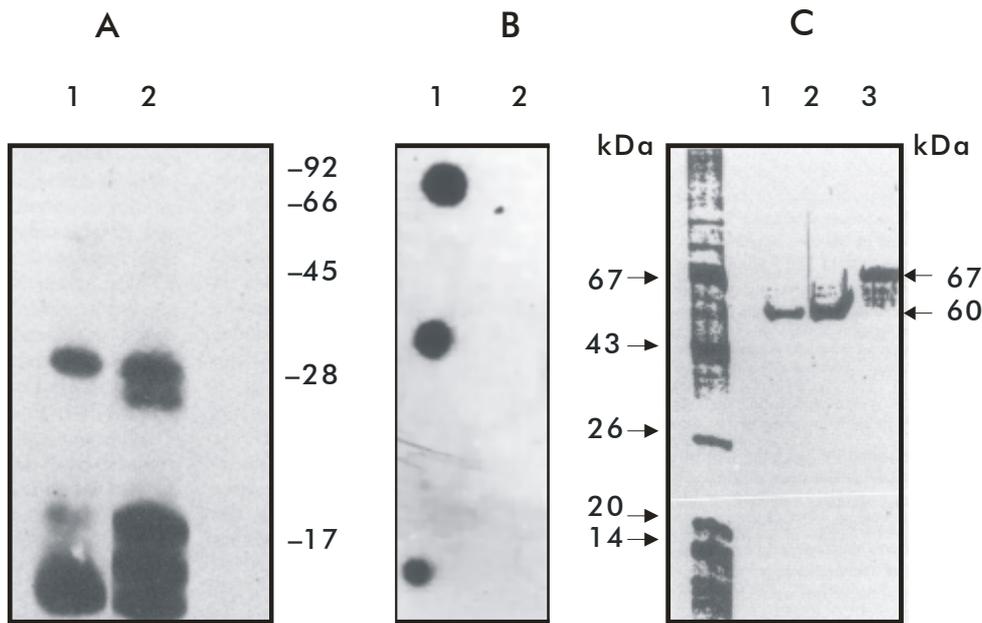


Figura 1. Cromatografía de competencia (A), Dot blot (B) y electroforesis y western-blot del IFNGR1 soluble aislado del suero (C).

IFNGR1 marcado en su unión por el IFN γ acoplado a la matriz, desplazando las bandas de 27, 17 y 13 kDa. En la figura 1B se muestra un dot-blot en el que identifican al receptor soluble de IFN γ de diferentes fuentes. Este se une al IFN γ marcado con 125 I en ausencia (1) y no en presencia (2) de IFN γ no marcado, en exceso. En la figura 1C se muestra la identificación por western-blot en condiciones no reductoras (1) y el patrón electroforético (tinción con azul de Comassie) del IFNGR1 soluble purificado por afinidad por el ligando en condiciones no reductoras (2) y reductoras (3) [3, 4].

Entrecruzamiento entre las cadenas de unión de los IFN α e IFN γ

En la Figura 2 se puede identificar que las proteínas p100 y p70, que previamente habían sido purificadas por su capacidad de unirse al IFN α 2b (A), en una

segunda cromatografía y después de ser marcadas con 125 I, pueden ser reconocidas por el AcMA6 que compete con el IFN γ por su unión al IFNGR1 (AcMA6), pero solo si el IFN α está presente durante la cromatografía. Esto indica que las proteínas purificadas en soporte con IFN α , contienen elementos del IFNGR1, y que estos dos tipos de componentes se asocian.

Niveles elevados de IFNGR1 soluble en pacientes con artritis reumatoide

El estudio se realizó con pacientes con AR e individuos aparentemente sanos (control) cubanos y suizos. Los niveles de receptor soluble para IFN γ se midieron en el plasma de 19 pacientes con AR y de 24 controles. Las evaluaciones se realizaron con preparaciones de IFNGR1 soluble obtenidas del plasma. Las concentraciones de receptor soluble fueron mayores en los pacientes con AR (media = 2 415 fren-

3. Bello I y cols. Receptores solubles para interferón. *Biotechnología Aplicada* 1990;7:290-300.

4. Bello I y cols. High levels of soluble IFN γ receptor a chain in the plasma of rheumatoid arthritis patients. *Biotherapy* 1998;11:53-7.

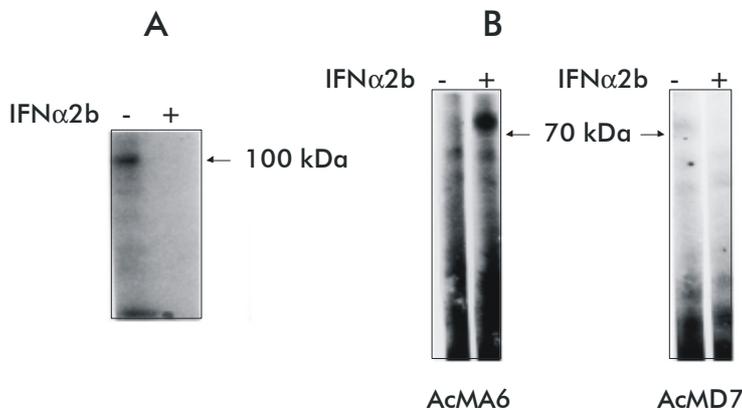


Figura 2. (A) Autorradiografía del material eluido de una cromatografía, en presencia o no de IFN α 2b, (B) y de proteínas que se unen a IFN α 2b en una matriz con AcM contra el IFNGR1 que compiten (AcMA6) o no (AcMD7) por la unión al receptor del IFN γ .

Tabla 1-. Valores relativos de IFNGR1 en pacientes con AR y pacientes control aparentemente sanos. Los valores están expresados en unidades arbitrarias de densidad óptica.

Individuos	N	Niveles de IFNGR1 soluble (Media ± DE)
Control	Cubanos	1 533 ± 135
	Suizos	1 116 ± 255
	Todos	1 411 ± 123
Pacientes con AR	Cubanos	2 263 ± 650
	Suizos	2 470 ± 344
	Todos	2 415 ± 297

te a 1411 unidades arbitrarias de densidad óptica. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), según la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. No se evidenciaron diferencias entre las poblaciones suiza y cubana [4].

Regulación diferencial de CCR-4 en pacientes con ARJ y AR

Con estos experimentos (Figura 3) se demostró que existe una disminución de la expresión del CCR-4 cuando las células PBMN de los niños afectados de artritis reumatoide juvenil (ARJ) fueron tratadas con IFN γ , tanto durante la terapia *in vivo*, como *in vitro*. Debe destacarse que esta disminución de la expresión del CCR-4 fue estadísticamente significativa en aquellos casos en los que las células de los pacientes fueron tratadas con el IFN γ *in vivo* y luego *in vitro*. Esto puede ser indicativo de que con mayor dosis quizás se pueda lograr una mayor reducción. La disminución de la expresión del CCR-4 por el IFN γ en la ARJ y no en la AR concuerda con el resultado clínico de respuesta a la terapia con IFN γ en el caso de los niños con ARJ tratados [6, 7] y no de los adultos [8].

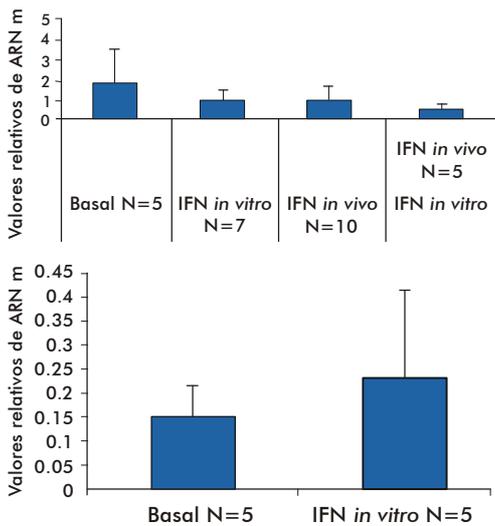


Figura 3. Evaluación de la regulación de la expresión de ARNm para CCR-4 por IFN γ en pacientes con ARJ (A) y AR (B). Las diferencias fueron estadísticamente significativas con una $p < 0.05$, según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Desarrollo de un antagonista contra IL-2 e IFN γ

La proteína AnTH1 rec se expresó en *Escherichia coli* (*E. coli*) en cuerpos de inclusión, y representó aproximadamente el 30% del total de proteínas expresadas, lo que facilitó su posterior purificación. Está compuesta por los aminoácidos 1-60 del extremo amino de la IL-2, seguido del péptido Ala-Hist-Met-Met y de los 231 aminoácidos de la región extracelular del IFNGR1 [9].

La actividad del AnTH1 se evaluó en ensayos biológicos *in vitro*. Se determinó la capacidad del AnTH1 de inhibir la proliferación de células T como respuesta a la IL-2 humana. Probablemente los primeros 60 aminoácidos del extremo amino de la IL-2 pueden interferir con la unión de alta afinidad de la IL-2 por su receptor de membrana en esas células. Esta hipótesis se sustenta en que en el terminal amino

5. Bello I, y cols. Antibodies against IFN gamma-binding proteins recognize a member of IFN alpha R complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;Feb 2; 280(4):1197-202.

6. Coto C y cols. Use of recombinant interferon gamma in pediatric patients with advanced juvenile chronic arthritis. *Biotherapy* 1998;11:15-20.

7. García I y cols. Informe Final. Uso del interferón gamma recambiante en pacientes con artritis reumatoide juvenil. Fase II. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Código: IG/IG/AJ/9501;2004.

8. Del Rosario M y cols. Informe Final. Tratamiento de la artritis reumatoide con interferón gamma recombinante. Fase III. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología 1998.

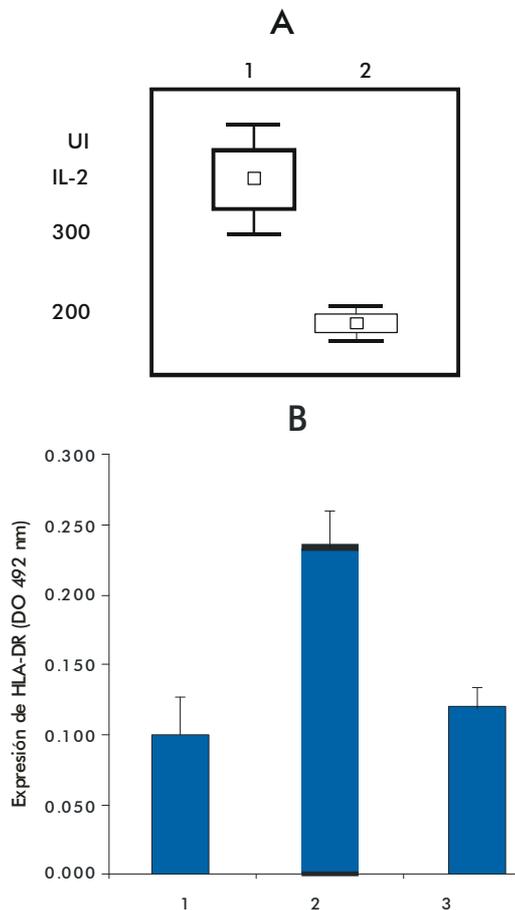


Figura 4. (A) Resultado de la inhibición por AnTH1 de la estimulación de la proliferación de las células CTLL-2 por la IL-2 humana. Los resultados son el producto de tres réplicas experimentales. La inhibición fue estadísticamente significativa con una $p < 0.05$, según la prueba de Kruskal-Wallis. (B) Inhibición de la inducción de HLA-DR por el AnTH1. Barra 1: Nivel basal de HLA-DR, barra 2: IFN γ 500 UI/mL (71 ng/mL), barra 3: IFN γ 500 UI/mL + 1.5 μ g/mL de AnTH1. Los resultados son el producto de tres réplicas experimentales. La diferencia entre la estimulación (barra 2) y la inhibición (barra 3) fue estadísticamente significativa con una $p < 0.05$, según la prueba de Kruskal-Wallis.

de la IL-2 se localizan todos los aminoácidos que hacen contacto con la cadena RaIL-2 (Lys 35, Arg 38, Phe 42, y Lys 43), así como otros aminoácidos que interactúan con la subunidad RβIL-2 [10], lo que debe interferir con la unión de la IL-2 a su receptor de alta afinidad RαβγIL-2. Estos datos explican por qué el AnTH1 interfirió con la actividad biológica de la IL-2.

El AnTH1 también inhibe la actividad antiproliferativa y de estimulación del HLA-DR inducidas por IFNγ, probablemente uniéndose a este en el medio extracelular y evitando o interfiriendo con su unión al IFNGR1 en la membrana de las células.

Conclusiones

La regulación diferencial de receptores de quimiocinas por IFNγ permite seleccionar pacientes con ARJ que, al ser tratados con IFNγ puedan tener una respuesta clínica favorable al tratamiento con este

producto. La interacción de los IFNα e IFNγ de forma cruzada con sus receptores es un elemento nuevo sobre las formas de comunicación celular de estos tipos de IFN, lo que posibilita explicar las acciones biológicas sinérgicas observadas durante su uso de forma combinada. La presencia de niveles elevados de IFNGR1 soluble en la AR, contribuye a definir la función fisiopatológica de este sistema en las enfermedades autoinmunes. La existencia de receptores solubles para IFNγ, así como la evidencia de que el IFNγ podría emplear otro receptor para generar sus actividades biológicas contribuyeron a definir que el tipo de antagonista contra IFNγ que se debía desarrollar tenía que actuar a nivel del ligando y no del IFNGR1, y que el propio receptor podía hacer esta función. En este estudio se logró la creación de un potencial candidato terapéutico para un grupo de enfermedades autoinmunes, en que estas citocinas de tipo Th1 realizan una función patológica.

9. Bello-Rivero I y cols. Construction, purification and characterization of a chimeric TH1 antagonist. *BMC Biotechnol* 2006;May22;6(1):25.

10. Sauve K y cols. Localization in human interleukin 2 of the binding site to the α chain (p55) of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1991;88:4636-40.