



Recombinación Somática

Rodney Macedo Gonzales

El Sistema Inmune, ha sido dividido en Innato y Adaptativo, basándose principalmente en aspectos del tipo de respuesta frente al antígeno. Es así que el último, presenta ciertas características tales como: Especificidad, Diversidad, Memoria, Especialización, Autolimitación y no Autorreactividad. Pero es primordial recalcar que estas características son dadas gracias a mecanismos que se llevan a cabo en las células ejes de este Sistema Específico: los Linfocitos.

Los Linfocitos T y B (no los NK), en su proceso de maduración, tienen que dar los debidos pasos para llegar a su competencia funcional; pero es uno de estos pasos, uno de estos mecanismos, el que es la clave para entender la Especificidad (10^9) y Diversidad de los receptores de Linfocitos: La Recombinación Somática V(D)J.

En esta minirevisión se tocan aspectos generales y moleculares de este proceso 'enigmático', que nos da puerta abierta a entender otros aspectos más audaces quizás, como fenómenos evolutivos a nivel molecular e inmunológico.

A. MADURACIÓN DE LINFOCITOS

Toda célula es potencial de cualquier tipo celular (genéticamente hablando), por eso en la formación celular, son los factores epigenéticos los que determinan qué factores genéticos sean los expresados, llevando todo a que se dé un fenotipo adecuado.

Son las células madre pluripotenciales las que dan origen a las células sanguíneas (hematopoyesis), y dentro de éstas, son los precursores linfoides los que se diferencian en LB y LT. En este proceso participan Factores de Transcripción, Citoquinas, y otras moléculas.

Como se comentó anteriormente el proceso clave de esta maduración linfocitaria es la recombinación somática, proceso exclusivo de linfocitos, debido a la expresión de moléculas tales como las Recombinasas (RAGs). Este proceso permite generar un Repertorio de Diversidad (10^9) de manera que exista especificidad a las caprichosas formas antigénicas. Y solventando bases para la Hipótesis de la Selección Clonal.

Durante todo este proceso se va aprobando el desempeño de la célula en su maduración, gracias a la expresión de receptores, que permiten mandar señales de supervivencia al núcleo, evitando así la Apoptosis; que es un óptimo sistema de eliminación de entes de no beneficio a la sociedad corporal.

Finalmente para graduarse como célula linfocítica óptima o madura (pero virgen), los LT y LB, sufren dos procesos de selección: Positiva.- donde se eliminan células no funcionales, y Negativas.- donde se eliminan células subversivas al cuerpo, que reconozcan antígenos propios con alta afinidad. En el caso de LT es en el Timo y en el caso de LB en la Médula Ósea.

B. MECANISMOS GENERALES

Al hablar de Recombinación en Genética se entiende que es un proceso que reordena la secuenciación de nucleótidos codificantes de proteínas. Existen procesos recombinantes tales como el 'Splicing' que reordena o que selecciona genes a nivel del RNA; pero cuando este proceso se da a nivel del DNA, estamos hablando de un proceso de Recombinación Somática. Al finalizar este proceso se observa un acortamiento de la longitud del DNA en las células afectadas, tal como se vio en los primeros estudios de DNA linfocítico.

1. Organización

Los genes son clasificados como Exones (codificantes de proteínas) o Intrones (no codificantes), siendo estos últimos los más importantes en la regulación de la expresión génica.

Es así que, los Exones actores de este proceso se los identifica porque codifican péptidos que conforman los receptores antigénicos de LT y LB. Recordemos que estos receptores tienen una región Variable (lado amino) y una región Constante (lado carboxilo). De esta misma manera son llamados los genes codificantes: segmentos V (lado 5') y segmentos C (lado 3'). Pero entre estos dos, uniéndolos y codificando la región más hipervariable de los receptores antigénicos, están los segmentos D y J. Los segmentos L, codifican una secuencia Líder que tiene la función de guiar al péptido hasta el Retículo Endoplásmico.

Pero si existiese un solo Exón V por cada forma caprichosa de antígeno, tendríamos un Genoma ocupado sólo por estos genes. Es por eso que se genera una especie de lotería entre los exones V, D y J, que nos permite con un número pequeño de exones generar un resultado geométrico (10^9).

Ahora, no todos los cadenas peptídicas de receptores antigénicos tienen la misma secuenciación génica. Varían en el número de exones V, D (en algunos no está presente), J; en la ubicación específica (incluso en diferentes cromosomas). Pero en general se mantiene el mismo esquema general de organización y de recombinación.

Es importante recordar que también actúan Intrones, importantes reguladores de esta obra magna. Son secuencias muy conservadas (heptámeros y nonámeros) denominadas RSS (secuencias de reconocimiento de señales). Ubicadas estratégicamente a los lados 3' y 5' de los exones (dependiendo del caso), como diciéndoles cómo actuar. Pero estos serán mejor vistos en los mecanismos moleculares de la recombinación.

2. Recombinación.

Para este caso es que vamos a tomar como modelo al proceso que se da en la formación de la Inmunoglobulina. En este caso el primero en reordenarse es la cadena pesada y posteriormente la cadena ligera κ , en su defecto la λ , pasando por un fenómeno denominado exclusión alélica, donde al expresarse uno de los alelos (p.e. el de la madre) inhibe al otro (el del padre), de manera que sólo se expresa uno.

En la cadena pesada se elige un exon D y se une a algún J, cortando sus extremos internos y eliminándose todos los exones entre los elegidos; formándose una unión DJ. Luego se elige uno de los exones V para unirse con DJ, generando una unión VDJ, y eliminándose todos los exones no elegidos intermedios, luego de esto proceden como cualquier gen que se expresa: se transcribe, splicing, se traduce, etc...

En la cadena ligera, como carece de exones D, este proceso es más corto y sólo se selecciona un V para unirse con un J, dando como resultado VJ, de ahí lo mismo y además el ensamblaje con la cadena pesada.

C. MECANISMOS MOLECULARES

Dentro de la maquinaria de este mecanismo se encuentran como eje las denominadas Recombinasas V(D)J, que son un conjunto de enzimas que se encargan de llevar a cabo este reordenamiento basándose en escisión y ligado de los segmentos génicos. Son los productos de las RAGs (Genes Activadores de Recombinación), las que lideran todo. A nivel del DNA se unen a los RSS.

Estas RAG son de dos tipos la 1 y la 2 que actúan en coordinación entre ellas y con otras enzimas, para llevar a cabo el reordenamiento. Estas enzimas son expresadas sólo en Linfocitos, y durante su maduración, luego de esto son inactivados, evitando así reordenamiento luego de adquirirse la especificidad. Existe además otras enzimas que actúan como complementarias para todo este proceso.

1. RSS

Las Secuencias Señal de Recombinación son segmentos Intrónicos ubicados al lado 3' de los segmentos V, al lado 5' de los segmentos J y a ambos lados de los segmentos D; ubicación estratégica que determina el orden de pasos de la recombinación.

Se caracterizan por tener 2 secuencias conservadas, heptámero (CACAGTG) y nonámero (ACAAAACC), separadas por secuencias no conservadas en nucleótidos pero sí en número: 12 (12-RSS) ó 23(23-RSS). Estos números se traducen en 1 o 2 vueltas de DNA respectivamente, importante para poder entender el acoplamiento de la Recombinasa a estas RSS.

2. RAGs.

Los productos de los Genes Activadores de Recombinación son los que reconocen estos RSS, específicamente las RAG1, se encuentran activados en Linfocitos gracias a fenómenos epigenéticos.

En estudios in vitro se ha demostrado que estas enzimas de por sí pueden realizar todo el proceso de escisión y pegado, dándonos idea de su origen evolutivo como se verá más adelante.

La RAG1 es una proteína de 119 kDa, con un núcleo central de tamaño suficiente para unirse a la RAG2; presenta motivos en dedos de Zinc que participan en su dimerización. Presenta una región de unión a metales. Cuando existe una mutación en el gen RAG1 se da el Síndrome de Omenn, que es un tipo de inmunosupresión, donde están afectados las Igs y los TCR (este último no siempre afectado, lo que hace pensar en la posibilidad de acción de alguna otra enzima). En general se le encuentra bastante parecido con las Integrasas.

La RAG2 contiene 527 residuos, es más pequeña que RAG1, también tiene un núcleo de unión, pero no es muy conservado. Contiene una región ácida, necesaria para la unión V-DJ, su mutación también genera un Síndrome de Omenn.

3. Otras Enzimas.

No sólo las RAGs se ven envueltas, sino también un grupo de diversas enzimas no específicas de tipo celular. Que se ven envueltas en otros mecanismos similares, o de reparación de DNA.

Las HMG (High Mobility Group) 1 o 2 son proteínas de acodamiento del DNA, son proteínas no específicas de línea linfoide; se sabe que incrementan la eficiencia del clivado de las Recombinasa, al facilitar el acomodamiento tridimensional entre las RAG y las RSS.

La TdT o dexosinucleotidil Transferasa, es una enzima que sólo está activa en Linfocitos, como su nombre lo dice trasfiere nucleótidos necesarios para rellenar los vacíos en el momento del pegado de DNA. Importantísima para aumentar la Diversidad.

El NHEJ o complejo de unión de lados no homólogos, es un conjunto de enzimas, que se encargan de reparar y pegar los extremos cortados por las RAGs; son miembros de este complejo: la DNA-PKcs, la Ku70 y Ku80, Artemis, XRCC4, DNA ligasa IV, Polimerasa μ , entre otros.

4. Mecanismo.

En aspectos generales se ven 2 tipos de mecanismos: la Delección y la Inversión, que se presentan en relación a la dirección de los RSS comprometidos. Para el primer caso que es el más común los RSS se miran entre ellos, de manera que no se necesita una gran acomodación del DNA, pero en el segundo caso los RSS miran al mismo lado, siendo necesario hacer una vuelta (looping) del DNA para que se pueda acomodar la Recombinasa.

Se puede dividir en tres pasos: el primero es el de reconocimiento de la zona comprometida, para lo que son necesarios los RSS, y en especial aplicar la ley 12/23, donde se estima que para que una Recombinasa se una, debe primero reconocer una estructura tridimensional: de una vuelta de DNA (en una hebra) y de dos vueltas (en la otra), lo que es determinado por el acercamiento de un 12-RSS con un 23-RSS. Este mecanismo es un importante sistema de regulación y de control para evitar productos aberrantes (péptidos DJ o VD). Son las HMG, junto a otras enzima no identificadas, las que se encargan de sostener este nudo de DNA, para que la RAG1 venga y se una a las dos secuencias nonaméricas, estableciendo así el Complejo Sináptico.

El segundo paso es el de Clivado, para esto la RAG2 se une sobre este Complejo Sináptico, casi montan-

do a la RAG1, de manera que tiene acceso a las zonas de unión entre secuencias RSS y Exones V,D o J; introduce un 'nick' (muesca) de cadena simple en estas zonas de unión, esto genera un grupo OH 3' libre que ataca a la cadena opuesta por transesterificación para formar un DSB (corte de doble cadena), quedan entonces cuatro extremos de DNA libre. A este se le denomina el Complejo Post-Clivado.

El último paso, quizás el más crítico, es el de unión de los extremos de DNA. Aquí participan muchas otras enzimas, pero las RAGs son necesarias también. Primero las Ku se unen a los extremos de DNA y reclutan DNA-PKcs y Artemis que son necesarias para formar los denominados extremos de gancho de cabello (hairpin ends), de esta forma el DNA es más 'pegajoso'; a este se le denomina Complejo Transitorio de Reparación. Se reclutan otras enzimas necesarias, las TdT, las XRCC4, la DNA ligasa IV, etc. Y de ahí se divide en 2 complejos uno para pegar los extremos V,D o J; y otro para pegar el DNA intermedio.

EL NHEJ, se encarga de unir los extremos no homólogos, es decir los V,D,J. La Ligasa pega los nucleótidos presentes, y la TdT se encarga de transferir los nucleótidos faltantes. Mediante 2 sistemas, añadir segmentos N o segmentos P (palindrómicos). Finalmente la DNA Polimerasa completa todo.

El HEJ (Complejo de unión de lados homólogos RSS), se encarga de que el DNA 'sobrante' sea bien aprovechado, y que no se una a otros segmentos, evitando así variaciones, se piensa que este DNA se procesa en pequeños DNAs que son importantes reguladores epigenéticos de diversos genes.

D. MECANISMOS REGULADORES

La Regulación de todo este mecanismo de reordenamiento, es regulada principalmente a nivel intrínico, gracias a Promotores y Enhancers (intensificadores), ubicados dentro del complejo génico VDJC. Estos se unen a Factores de Transcripción, que desencadenan este mecanismo. Unos TF son los OCT-1 y OCT-2 (este sólo presente en Linfocitos) miembros de la familia de dominio POU, se unen a Tata-box y otros promotores. Los Enhancers son específicos de célula y de estadio de maduración. Como el ENHiH (intrínico de cadena pesada), o el ENH3'H (3' de cadena pesada) que son sólo de LB, y otros de cadenas ligeras. Pero que en general aumentan el reordenamiento. También existen segmentos intrínicos que inhiben el reordenamiento, y se les denomina Silenciadores, como p.e. los motivos-E y otros más.

E. ASPECTOS EN EVOLUCIÓN

Me encantaría resaltar la inmensa relación entre este mecanismo y algunos aspectos evolutivos que son importantes para entender la aparición del Sistema Inmune Adaptativo. Al revisar evolución del sistema inmune se ve que este tiene cierto orden de aparición de componentes y características que se ve ordenadamente desde seres protozoarios; dándonos así una idea de un proceso evolutivo vertical.

Pero es en el caso de la presencia de Anticuerpos específicos, TCR, o RAGs, que no se encuentran ancestros, sino que en cierto momento de la evolución aparecen 'bruscamente'; para ser más claros entre los Agnathans y los Chondrichthians (tiburones), existe una distancia de 50 millones de años aproximadamente, pero los primeros carecen de receptores específicos de antígeno o de mecanismo de reordenamiento, así como RAGs, o en su defecto presencia de moléculas predecesoras.

Por otro lado este mecanismo se parece mucho al que hacen los Retrovirus, y algunas bacterias. Recordando que en ambos casos es gracias a Elementos Trasposables (TE); los Retrovirus junto a los Pararetrovirus, Retrones, Retroposones son denominados Retroelementos, y existen otros presentes en bacterias como las Secuencias de Inserción (IS), Trasposones, que confieren resistencia antibiótica los cuales son denominados Trasposones.

Estos TE presentan en su secuencia genética, una Trasposasa o una Integrasa que corta y pega DNA, con mecanismos muy similares al de las RAGs (así como su secuenciación); llevándonos a pensar que en algún momento de la evolución, un Retrovirus o una Bacteria infectó a los Agnathans, dejando un mecanismo de reordenamiento de DNA en el DNA de estos. De manera que la RAG fuese parte de una Retrotrasposón. Pero al generar variaciones descontroladas en el Genoma, tuvo que ser 'domesticado', de ahí la participación de múltiples enzimas en el proceso de recombinación.

De esta misma manera se planteó el origen de los segmentos VDJ y los segmentos RSS, que gracias a estas enzimas que reconocían determinadas claves, se generaban un clon secuencial, del cual por el mecanismo de Duplicación, generó un número mayor de Exones o RSS.

Finalmente se sabe que existen otros mecanismos generadores de Diversidad en humanos u otros animales, que nos dan idea de los diversos caminos que pudo tomar esta Evolución Horizontal, que

luego continuo como Vertical. Casos como la Mutación Somática, la Conversión Génica y otros, son mecanismos acoplados, que generan mayor diversidad para beneficio de nuestro Sistema Adaptativo.

F. ASPECTOS FINALES

Se sabe tan poco de la exactitud de estos mecanismos, pero la necesidad de dar solución a diversas patologías, nos lleva a investigar más sobre estos aspectos. Si este mecanismo está implicado en enfermedades autoinmunes, en activación de Oncogenes, en entender como es que la evolución Horizontal pudo generar cambios, que fueron de beneficio único, generando un Sistema Específico como el que tenemos; entonces es la justa motivación para querer conocer más sobre estos y otros aspectos. Nosotros somos los que miramos dentro y afuera, para determinar en donde nos encontramos, y hacia donde vamos.

BIBLIOGRAFÍA:

- 01.- Abbas Abul. Inmunología Celular y Molecular, 4ta Edición. 2002
- 02.- Roitt Ivan. Immunology, 5ta Edición. 1999
- 03.- Roth David. Restraining the V(D)J Recombinase. Nature Reviews in Immunology. Agosto 2003
- 04.- Evolution by Transposition. 1998
- 05.- Sadofsky Moshe. The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. Nucleic Acids Research. 2001
- 06.- Laird Diana. 50 million year of chordate evolution: Seeking the origins of adaptative immunity. PNAS Junio 2000
- 07.- Lewis Susana. The Old and the Restless. J. Exp. Med. Mayo 2000
- 08.- Hassanin Alexandre. Evolution of the recombination signal sequences in the Ig heavy-chain variable region locus of mammals. PNAS Octubre 2000
- 09.- Kidwell Margaret. Trasposable elements and host genome evolution. 2000
- 10.- Mansilla-Soto Jorge. VDJ Recombination: Artemis and its in vivo role in hairpin opening. J. Exp. Med. Marzo 2003
- 11.- Tsai Chia-Lun. Evidence of a critical architectural function for the RAG proteins in end processing, protection, and joining in V(D)J recombination. Genes and Development 2002
- 12.- Lee Susan. Rearrangement of Immunoglobulin Genes in Shark Germ Cells. J. Exp. Med. Mayo 2000
- 13.- Lee Gregory. Targeted Trasposition by the V(D)J Recombinase. Molecular and Cellular Biology Abril 2002
- 14.- Neiditch Matthew. RAG trasposase can capture and commit to target DNA before or after donor cleavage. Molecular and Cellular Biology Julio 2001