

El anticuerpo monoclonal IOR-T1 reconoce un epítipo dentro del CD6 de los antígenos de diferenciación leucocitarios humanos

C.A. GARCÍA, A.M. BARRAL y K. TORRES

Grupo de Inmunología Clínica, Departamento de Biología, Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y E, Vedado, C.P. 10400, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en diciembre de 1990

Aprobado en septiembre de 1991

RESUMEN

Los anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen a los antígenos de diferenciación leucocitarios humanos se clasifican de acuerdo con la distribución celular y el peso molecular del antígeno que ellos identifican. Esto es lo que define a los *clusters* de diferenciación o CD.

En el presente trabajo se evaluó el reconocimiento que tiene el AcM IOR-T1 en comparación con otros AcM, utilizando el método de inmunofluorescencia indirecta y analizado por microscopía y citofluorometría de flujo, sobre diferentes líneas celulares de cultivo humanas, diferentes poblaciones hematopoyéticas separadas de sangre periférica y sobre células malignas de pacientes con leucemia linfocítica crónica B (LLCB). También se determinó el peso molecular del antígeno reconocido por el AcM IOR-T1 con el método de inmunoprecipitación, utilizando células mononucleares periféricas procedentes de individuos sanos.

Se encontró que el antígeno reconocido por el AcM IOR-T1 tiene un peso molecular de 120 kDa, similar al reconocido por el AcM T12.1.5 (anti-CD6), y se expresa en altas proporciones sobre las poblaciones de células T y en las células malignas de los pacientes con LLCB.

Se concluyó que el AcM IOR-T1 reconoce un epítipo dentro del CD6 de los antígenos de diferenciación leucocitarios humanos.

SUMMARY

Monoclonal antibodies (MAbs) identifying human leukocyte differentiation antigens are classified according to cellular distribution and molecular weight of the recognized antigen. On this basis, clusters of differentiation (CD) are defined.

In the present work, the recognition of IOR-T1 MAb is evaluated on different cell populations isolated from peripheral blood, on different human cultured cell lines and on malignant cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), by microscopy and flow cytometry using indirect immunofluorescence method. The molecular weight of the antigen recognized by IOR-T1 MAb was also determined using the immunoprecipitation method on peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals.

It was found that the antigen recognized by IOR-T1 MAb has a molecular weight of 120 kDa and is expressed in a high proportion only on cells of T lineage and in malignant B-CLL cells.

It is concluded that IOR-T1 MAb recognizes an epitope within CD6 molecule of human leukocyte differentiation antigens.

INTRODUCCION

Los anticuerpos monoclonales (AcM) han constituido una "herramienta" importante para el estudio de las moléculas que se encuentran en la superficie de la membrana celular de los leucocitos humanos. Con la ayuda de los AcM se han podido identificar y caracterizar hasta el presente 24 moléculas o *clusters* de diferenciación (CD) sobre la superficie de los linfocitos T humanos, los cuales también han sido denominados *antígenos de diferenciación leucocitarios (ADL)* (Knapp *et al.*, 1989). Para clasificar el CD que reconoce un AcM, es necesario determinar su peso molecular y cuál es su distribución en diferentes poblaciones celulares.

Utilizando los AcM como "sondas" se ha podido profundizar en el papel que tienen los CD en los mecanismos de reconocimiento (Oettgen y Therhorst, 1987), adhesión celular (Sánchez-Madrid *et al.*, 1982; Hemler, 1988), activación y proliferación (Nel *et al.*, 1987) durante la respuesta inmunitaria y su expresión durante el desarrollo ontogénico de las células linfoides (Lobach y Haynes, 1987; Acuto *et al.*, 1985).

En trabajos previos se demostró que el AcM IOR-T1 es una IgG2a murina (García, 1985), que reconoce a los linfocitos T humanos normales (García *et al.*, 1984) y células malignas de pacientes con linfomas de células T cutáneos (Rodríguez *et al.*, 1985), y que al parecer el antígeno reconocido por este AcM se expresa en estadios de diferenciación más avanzados que el resto de los CD relacionados con las células T (García *et al.*, 1986).

En el presente trabajo se precisa la clasificación dentro de los ADL, de la molécula reconocida por el AcM IOR-T1.

MATERIALES Y METODOS

Separación de subpoblaciones celulares

Las células mononucleares periféricas (CMP) se obtuvieron mediante centrifugación en gradientes de densidad con Urografín ($d = 1,077$) (García y Silva, 1979).

Para la obtención de los granulocitos se extrajo el *buffy coat* del botón celular de la purificación de CMP, se lisaron los glóbulos rojos y las células fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato pH 7,2 (SSTF). En esta misma preparación se pudieron evaluar los resultados con los glóbulos rojos y las plaquetas contaminantes.

Para la obtención de las CMP adherentes y no adherentes, se incubaron en placas de Petri durante 90 minutos a 37°C y 5% CO₂, 2×10^6 CMP/ml de medio RPMI suplementado con 2% de suero de ternera. Las células no adherentes se cosecharon del sobrenadante y las células adherentes se desprendieron con un raspado suave, previa incubación a 4°C durante 30 minutos. Las células se lavaron tres veces con SSTF y se le ajustó la concentración celular para su utilización (Hudson y Hay, 1980).

La separación de los linfocitos T se realizó utilizando el método de adhesión a la lana de nailon (Hudson y Hay, 1980).

Para la separación de linfocitos rosetas-E positivos se mezclaron CMP no adherentes con eritrocitos de carnero previamente tratados con neuroaminidasa; se centrifugó a $200 \times g$, 5 minutos, se incubó el botón celular a 4°C durante 30 minutos, se resuspendieron las células y se realizó una separación por gradiente de densidad sobre Ficoll-Paque, extrayéndose la interfase como linfocitos rosetas-E negativos y se lisaron los glóbulos rojos del botón celular, considerándose esta población como linfocitos rosetas-E positivos (García *et al.*, 1989). Este método también se utilizó para la separación de las células malignas de tres pacientes con leucemia linfocítica crónica B (LLCB).

Líneas celulares de cultivo

Para nuestro trabajo utilizamos las líneas celulares de cultivo humanas de origen T, Jurkat, Molt-4 y CCRF-CEM; de origen B, Raji y Daudi; la eritroblastoide K-562; y las mielomonocíticas HL-60 y U-937. Las líneas fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementadas con suero fetal de ternera al 10%, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml). Las células en crecimiento exponencial se cosecharon y lavaron con SSTF, antes de ser utilizadas.

Anticuerpos monoclonales

En nuestro estudio utilizamos los AcM comerciales OKT3 (anti-CD3) y OKT11 (anti-CD2) (Orthoclon, USA); Leu4 (anti-CD3) (Becton Dickinson, USA), y el T12 1,5 (anti-CD6). El AcM IOR-T1 utilizado fue purificado por afinidad a partir de líquidos ascíticos murinos malignos y ajustada previamente su concentración de trabajo según las características del ensayo realizado.

Inmunofluorescencia indirecta

Se utilizó el método descrito por Rabellino *et al.* (1971). Se incubaron $1-2 \times 10^6$ células a 4°C y durante 30 minutos, con $50 \mu\text{l}$ de la dilución de trabajo de cada AcM en SSTF-seroalbúmina bovina al 0,1%-azida sódica al 0,02%. Se lavaron tres veces por centrifugación, con igual tampón, y se incubaron con $50 \mu\text{l}$ de una dilución de suero anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína, de la misma forma que anteriormente. Se lavaron tres veces con SSTF y en el caso de las células separadas de sangre periférica, se resuspendieron las células con tampón SSTF-glicerol al 50% y se leyeron al menos 200 células en un microscopio de fluorescencia (Leitz). En el caso de las líneas celulares de cultivo y de las células de pacientes con LLCB, se realizó el análisis de las células resuspendidas en SSTF, directamente en un citofluorímetro de flujo (FACScan; Becton Dickinson, USA). Se analizaron 5 000 células por muestras y el 100% de las células incorporadas al equipo. Se incluyó como control del fondo de cada experimento la incubación del conjugado con la población celular analizada, la cual permitió establecer claramente las poblaciones positivas y negativas de cada muestra durante el análisis.

Inmunoprecipitación

Se yodaron con lactoperoxidasa (Marchalonis *et al.*, 1971) CMP de individuos sanos. Las células se incubaron 30 minutos, a 4°C , con tampón de lisis (fosfato 0,1 M, pH 8,0 + NP40 al 0,5%) y se centrifugaron a $20\,000 \times g$ durante 20 minutos y a 4°C . Se recogió el sobrenadante (lisado de membrana).

Los AcM IOR-T1 y T12 1,5 se preadsorbieron con $100 \mu\text{l}$ de proteína A-Sefarosa (Pharmacia) durante toda la noche y a 4°C , con agitación constante, para formar el complejo AcM-proteína A-Sefarosa, el cual se lavó cuatro veces con tampón fosfato 0,1 M, pH 8,0, y finalmente con tampón de lisis. El lisado se incubó con el complejo durante dos horas a temperatura ambiente con agitación.

Finalmente, el complejo se lavó con el mismo tampón hasta que no se detectó radioactividad en el sobrenadante de los lavados. Las muestras fueron eluidas del precipitado con tampón TRIS-HCl 0,0675 M pH 6,8, con 0,2% de SDS y otra alícuota fue sometida a reducción con la adición de un 5% de 2-mercaptoetanol en el mismo tampón. Ambas muestras se pusieron en ebullición durante 5 minutos y se les realizó una electroforesis (SDS-PAGE) en geles al 10% (Laemmli, 1970). Después de la corrida electroforética, los geles fueron procesados para realizarles la autorradiografía.

RESULTADOS

Al comparar la distribución del antígeno reconocido por los AcM IOR-T1 y OKT3, en células hematopoyéticas humanas, encontramos que se expresan en similares proporciones sobre las CMP, los linfocitos T y las células rosetas-E positivas. Por otra parte, los linfocitos no T, las CMP adherentes, los granulocitos, las plaquetas y los eritrocitos, no expresaron los antígenos que reconocen estos dos AcM (figura 1).

El estudio realizado sobre la expresión del antígeno reconocido por el AcM IOR-T1 y comparado con el OKT3, OKT11 y Leu4, sobre líneas celulares de cultivo humanas, se muestra en la figura 2. En las células Jurkat, el OKT11 mostró un reconocimiento mayor (80%) que el IOR-T1 (47%) y que el OKT3/Leu4 (25%). En la línea Molt-4 existió un 23% de células positivas al IOR-T1, un 21% al Leu4 y fue negativa para el OKT3 y OKT11. La línea CCRF-CEM no expresó ninguno de los antígenos reconocidos por los AcM utilizados. Solamente el IOR-T1 mostró un bajo reconocimiento en las líneas celulares Raji (9%), en la U-937 (9%) y en la K-562 (12%), y no así para el resto de los AcM utilizados.

En las células malignas de los pacientes con LLCB se expresó el antígeno reconocido por el AcM IOR-T1 en un $89 \pm 4\%$ ($\bar{X} \pm \text{DE}$).

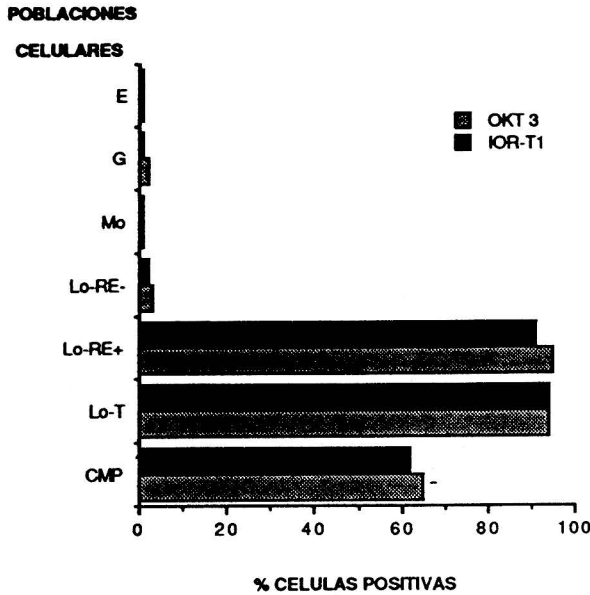


FIG. 1. Distribución de los antígenos reconocidos por los AcM IOR-T1 y OKT3 en subpoblaciones celulares de sangre periférica, *E*) eritrocito; *G*) granulocito; *Mo-CMP*) adherentes; *Lo-RE*⁻) linfocitos rosetas E negativos; *Lo-RE*⁺) linfocitos rosetas E positivos; *Lo*) linfocitos T purificados por lana de nailon; *CMP*) células mononucleares periféricas.

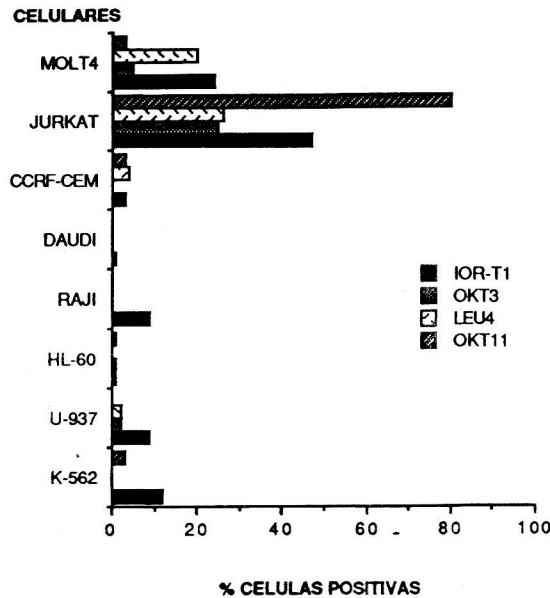


FIG. 2. Distribución de los antígenos reconocidos por los AcM IOR-T1, OKT3, OKT11 y Leu4, sobre diferentes líneas celulares de cultivo humanas. Origen T) Molt-4, Jurkat y CCRF-CEM; origen B) Daudi y Raji; origen mielomonocítica) HL-60 y U-937; origen eritroblastoide) K-562.

En la figura 3 se muestran los resultados de la inmunoprecipitación del IOR-T1 comparado con la obtenida con el AcM T12.1.5, sobre CMP normales. Se aprecia una banda de precipitación de 120 kDa para ambos AcM.

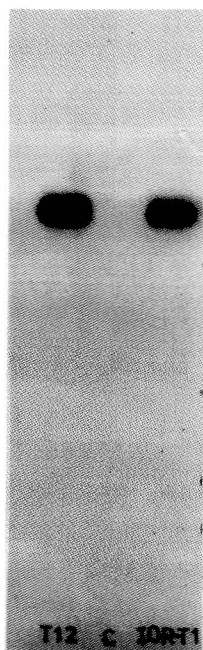


FIG. 3. Inmunoprecipitación de los AcM T12.1.5, control de proteína A-Sefarosa y del IOR-T1, contra un lisado de antígenos de membrana de CMP normales (bandas 1, 2 y 3 respectivamente). Las bandas de precipitación de los AcM tienen un peso molecular de 120 kDa, calculado contra un estándar de pesos moleculares comercial (Amersham).

DISCUSION

Dentro de los CD relacionados con las células T, conocidos hasta el presente, se pueden identificar aquellos que se encuentran restringidos a las células T y los que se expresan en otras subpoblaciones celulares. Este conocimiento permite precisar cuáles son las moléculas que

participan en las funciones particulares de una subpoblación determinada y cuáles participan en mecanismos comunes a varias de ellas.

El antígeno reconocido por el AcM IOR-T1 se expresó evidentemente en células linfoides de la estirpe T, tanto en las subpoblaciones de sangre periférica, como en las líneas de cultivo celulares humanas, tal y como se había sugerido en estudios anteriores (García *et al.*, 1984; Rodríguez *et al.*, 1985; García *et al.*, 1986). Sin embargo, en el presente estudio se demuestra que el AcM IOR-T1 reconoce a las células malignas de pacientes con LLCB, por lo que el CD que identifica no se puede considerar restringido a la estirpe de las células T humanas.

El peso molecular del antígeno reconocido por el AcM IOR-T1 fue de 120 kDa, similar al reconocido por el AcM T12.1.5 (Knowles, 1986).

Los resultados obtenidos con el IOR-T1 concuerdan con las características que tienen los AcM que identifican al CD6 dentro de los ADL (Haynes, 1986; McMichael y Gotch, 1987; Reiter, 1989), más aun cuando la línea celular COS transfectada para expresar el CD6 en su membrana fue positivamente reconocida por el AcM IOR-T1 (Rieber, 1989), por lo que consideramos que el IOR-T1 reconoce un epítopo dentro de esa molécula.

Otra molécula que tiene un peso molecular similar es la CD26, incluida dentro de los antígenos de activación, pero que tiene la particularidad de que no se expresa en las líneas de cultivo de origen T, ni en las células malignas de los pacientes con LLCB y linfomas de células T cutáneos (McMichael y Gotch, 1987; Stein *et al.*, 1989), lo cual excluye al IOR-T1 dentro de ese grupo.

El CD6 ha sido una de las moléculas menos estudiadas con relación al resto de los CD relacionados con los linfocitos T, la mayoría de los resultados logrados hasta el presente se han obtenido utilizando el AcM T12, uno de los primeros clasificados como anti-CD6 (Knowles, 1986). No se ha podido precisar la función que tiene esta molécula, aunque se conoce que se expresa en el área medular de los timocitos postnatales y en las CMP de individuos sanos en iguales proporciones que el CD3. El epítoto reconocido por el AcM IOR-T1 no reconoce los timocitos fetales, por lo que se ha planteado que es una molécula que aparece en un estadio de diferenciación más avanzado que el resto de los AcM anti-T (García *et al.*, 1986). Este resultado puede relacionarse con el CD6 a la luz de los conocimientos actuales.

Los AcM anti-CD6 son capaces de inducir una respuesta proliferativa de mediana intensidad en los linfocitos T (Fiebig *et al.*, 1987; Gangemi *et al.*, 1989), y donde se producen dos isoformas de 130 y 105 kDa de la misma molécula durante el proceso de activación (Cárdenas *et al.*, 1990) por lo que se ha sugerido que tiene una función fisiológica importante para la regulación de la activación de las células T (Gangemi *et al.*, 1989) e incluso de las células B (Reiter, 1989; Endres, 1989). Recientemente hemos encontrado que los AcM anti-CD3 son capaces de inducir la regulación negativa de la expresión del antígeno reconocido por el AcM IOR-T1, mecanismo dependiente de la proteína quinasa C (resultados no publicados), lo cual sugiere fuertemente que el CD6 se interrelaciona con otras moléculas implicadas directamente con los receptores fisiológicos que participan en los mecanismos de activación antígeno específica de las células T.

Está ampliamente aceptado que durante el proceso de transformación neoplásica, las células "congelan" los antígenos de membrana del estadio de diferenciación del cual se derivan. En nuestro estudio encontramos que, además de la expresión del antígeno reconocido por el IOR-T1 en células de pacientes con LLCB, también las líneas celulares de cultivo Molt-4, U-937 y K-562 expresaron el mismo en bajas proporciones. La interpretación de estos resultados debe ser cuidadosamente abordada en estudios futuros que puedan determinar si la expresión del CD6 tiene relación con los estadios de diferenciación maligna, o con las señales que participan en los mecanismos de crecimiento y proliferación de estas células.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Agencia Sueca de Cooperación para las Investigaciones (SAREC).

REFERENCIAS

- AÇUTO, O.; M. FABBI; A. BENSSUAN; C. MILANESE; T.J. CAMPEN; H.O. ROGER y E.L. REINHERZ (1985). The human T-cell receptor. *J. Clin. Immunol.* 5: 141-157.
- ENDRES, N.; G. RIETHMÜLLER y P. RIEBER (1989). "Functional characterization of a novel B-cell subset defined by the CD6 antigen." In: *Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens.* K. Knapp *et al.* (Eds.). Oxford Univ. Press., Oxford-New York-Tokyo, p. 340.
- CARDENAS, L.; A.C. CARRERAS; E. YAGUE; R. PULIDO; F. SANCHEZ-MADRID y M.O. DE LANDAZURI (1990). Phosphorylation-dephosphorylation of the CD6 glycoprotein renders two isoforms of 130 and 105 kilodaltons. Effect of serum and protein kinase C activators. *J. Immunol.* 145: 1450-1455.

- PIEBIG, H.; U. BEHN; W. HOMMEL; H. EICHLER y A. KUPPER (1987). "A comparison of three modulating pan T-cell antibodies with the workshop T-cell panel". In: *Leukocyte Typing III*. A.J. McMichael et al. (Eds.). Oxford Univ. Press, Oxford-New York-Tokyo, p. 231.
- GANGEMI, R.M.R.; J.A. SWACK; D.M. GAVIRA y P.L. ROMAIN (1989). Anti-T12, an anti-CD6 monoclonal antibody, can activate human T lymphocytes. *J. Immunol.* 143: 2439-2447.
- GARCIA, C.A. y C. SILVA (1979). Cultivo y estimulación de linfocitos humanos purificados con Verografín. Reporte preliminar. *Rev. CNIC* 10: 199-203.
- GARCIA, C.A.; J. GAVILONDO; A.M. VAZQUEZ; J.F. AMADOR y A. FERNANDEZ (1984). Obtención de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales que reconocen células T humanas. II. Caracterización de los anticuerpos monoclonales IOR-T1 e IOR-T2. *Interferón y Biotecnología* 1: 29-39.
- GARCIA, C.A. (1985). Algunas consideraciones para la identificación del isotipo de inmunoglobulina de los anticuerpos monoclonales murinos obtenidos en líquidos ascíticos malignos. *Interferón y Biotecnología* 2: 41-44.
- GARCIA, C.A.; A.M. VAZQUEZ; E. RENGIFO; M. BJÖRKHOLM, J. GAVILONDO y G. HOLM (1986). "Anticuerpo monoclonal contra un antígeno de las células T humanas, ausente en los timocitos fetales." En: *II Seminario Cubano sobre Interferón y I Seminario Cubano sobre Biotecnología*. Ed. Instituto de Cooperación Iberoamericana, II Parte, pp. 151-154.
- GARCIA, C.; A. ROSEN; E. KIMBY; M. AGUILAR-SANTELISES; M. JONDAL; M. BJÖRKHOLM; G. HOLM y H. MELLSTEDT (1989). Higher T-cell imbalance and growth factor receptor expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) as compared to B-cell monoclonal lymphocytosis of undetermined significance (B-MLUS). *Leukemia Res.* 13: 31.
- HAYNES, B.F. (1986). "Summary of the T-cell studies performed during the Second International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens." In: *Leukocyte Typing II*. E.L. Reinherz et al. (Eds.). Vol. 1. Springer Verlag. New York-Berlin-Heidelberg-Tokyo, chap. 1, pp. 3-30.
- HEMLER, M.E. (1988). Adhesive protein receptor on hematopoietic cells. *Immunology Today* 9: 109-113.
- HUDSON, L. y F. HAY (1980). *Practical Immunology*. 2nd Ed. Black-well Sci. Pub. Oxford-London-Edinburg-Boston-Melbourne.
- KNAPP, W.; B. DORKEN; W.R. GILKS; E.P. RIEBER; R.E. SCHMIDT; H. STEIN y A.E.G. VON DEM BORNE (Eds.). *Leukocyte Typing. White Cell Differentiation Antigens*. Oxford Univ. Press. Oxford-New York-Tokyo.
- KNOWLES, R.E. (1986). "Immunochemical analysis of the T-cell specific antigens." In: *Leukocyte Typing II*. E.L. Reinherz et al. (Eds.). Vol. 1. Springer Verlag. New York-Berlin-Heidelberg-Tokyo. Chap. 22, pp. 259-288.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LOBACH, D.F. y B.F. HAYNES (1987). Ontogeny of the human thymus during fetal development. *J. Clin. Immunol.* 7: 81-96.
- MARCHALONIS, J.J.; R.E. CONE y V. SANTOS (1971). Enzymatic iodination: a probe for cell surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. *J. Biochem.* 124: 921-927.
- McMICHAEL, A.J. y F.M. GOTCH (1986). "T-cell antigens new and previously defined clusters." In: *Leukocyte Typing III*. A.J. McMichael et al. (Eds.). Oxford Univ. Press. Oxford-New York-Tokyo, p. 81.
- NEL, A.E.; M.W. WOOTEN y R.M. GALBRAITH (1987). Molecular signaling mechanism and T-lymphocyte activation pathways: A review and future prospects. *J. Clin. Immunol.* 7: 81-96.
- OETTGEN, H.C. y C. THERHORST (1987). A review of the structure and function of T-cell receptor T3 complex. *CRC Critical Review in Immunology* 7: 131-167.
- RABELLINO, E.; S. COLON; H.M. GREY y E.R. UNANUE (1971). Immunoglobulin on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation. *J. Exp. Med.* 33: 156-167.
- REITER, C. (1989). "Cluster Report: CD6." In: *Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens*. K. Knapp et al. (Eds.). Oxford Univ. Press., Oxford-New York-Tokyo, p. 339.

- RIEBER, E.P. (1989). "T-cell section report." In: *Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens*. K. Knapp *et al.* (Eds.). Oxford Univ. Press., Oxford-New York-Tokyo, p. 231.
- RODRIGUEZ, T.; C.A. GARCIA; A.M. VAZQUEZ; B. TORMO y J. GAVILONDO (1985). Obtención de hibridomas de ratón productores de anticuerpos monoclonales que reconocen células T humanas. III. Determinación del reconocimiento ultraestructural de los anticuerpos monoclonales IOR-T1 e IOR-T2. *Interferón y Biotecnología* 2: 41-47.
- SANCHEZ-MADRID, F.; A.M. KRENSY; C.F. WARE; J. ROBBINS; L. STROMINGER; S.J. BURAKOFF y T.A. SPRINGER (1982). Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2 and LFA-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 79: 7489-7493.
- STEIN, H.; R. SCHWARTING y G. NIEDOBITEK (1989). "Cluster report: CD26." In: *Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens*. K. Knapp *et al.* (Eds.). Oxford Univ. Press., Oxford-New York-Tokyo, p. 412.