

EL ANTICUERPO MONOCLONAL IOR-T1 (ANTI-CD6) NO INHIBE LA CITOTOXICIDAD CELULAR ANTÍGENO-ESPECÍFICA *in vitro*

María Elena Faxas, Ana María Barral, Carlos García

Grupo de Inmunología Clínica, Departamento de Biología. Inst. Nacional de Oncología y Radiobiología, 29 y E, Vedado, La Habana 4, C. Habana.

Recibido en junio de 1991. Aprobado en noviembre de 1992

Key words: Monoclonal antibodies, CD6, cellular cytotoxicity.

SUMMARY

Participation of the molecules present on lymphocyte membranes during adhesion, activation and differentiation had been studied using monoclonal antibodies (MAbs) against leukocyte differentiation antigens.

In the present work, the effect of anti-T cell MAbs IOR-T3 (CD3), IOR-T3A (CD3) and IOR-T1 (CD6) was evaluated on the lysis mediated by cytotoxic T-cells, previously sensitized with Raji culture cell line, in unidirectional mixed lymphocyte culture. It was found that IOR-T3 and IOR-T3A MAbs inhibited specific cell lysis up to 60 and 80% respectively. On the contrary, IOR-T1 MAb did not modify cell lysis. These results suggest that the epitope recognized by IOR-T1 MAb does not participate in the mechanisms of cellular adhesion of the human T-lymphocytes involved in the specific cellular cytotoxicity.

RESUMEN

Los anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen antígenos de diferenciación leucocitarios han permitido estudiar la participación de las moléculas presentes en la membrana celular, en los diferentes mecanismos de adhesión, activación y diferenciación de los leucocitos humanos.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de los AcM anti células T humanas IOR-T3 (CD3), IOR-T3A (CD3) e IOR-T1 (CD6), en el mecanismo de lisis mediado por los linfocitos T citotóxicos, sensibilizados previamente en cultivo mixto unidireccional con la línea de cultivo celular Raji. Se encontró que los AcM IOR-T3 e IOR-T3A inhibieron el 60 y 80% de la lisis celular específica respectivamente. Por el contrario, con el AcM IOR-T1 no se observó ningún efecto notable sobre la citotoxicidad estudiada. Nuestros resultados sugieren que el epítopo reconocido por el AcM IOR-T1 no participa en los mecanismos de adhesión celular durante la citotoxicidad mediada por los linfocitos T humanos.

INTRODUCCION

Los AcM que reconocen antígenos de diferenciación leucocitarios humanos, han permitido identificar el papel que tienen determinadas moléculas, presentes en la membrana celular de los linfocitos humanos, en los mecanismos de reconocimiento y adhesión (Oettgen y Terhorst, 1987; Makgoba *et al.*, 1989) y de activación y proliferación (Nel *et al.*, 1987; Alexander y Cantrel, 1989; Kabelitz, 1990) que ocurre durante la respuesta

inmunitaria. Estos AcM también han posibilitado el conocimiento de las etapas de diferenciación y maduración de las células linfoides (Acuto *et al.*, 1985; Finkel *et al.*, 1991).

Dentro de las moléculas que participan en el reconocimiento y adhesión celular de los linfocitos T, se pueden identificar aquellas que participan directamente en el reconocimiento del antígeno, como es el complejo CD3-receptor (Oettgen y Terhorst, 1987) y aquellas que son independientes de ese proceso, a las cuales se les ha reconocido una importante función para la regulación: transducción de la señal e incremento de la adhesión (Makgoba *et al.*, 1989; Dustin y Springer, 1991; Pandolfi *et al.*, 1992). Dentro de este último grupo se encuentran las interacciones ligando/receptor/LFA1/ICAMI y CD2/LFA3.

La molécula CD6 se expresa en los linfocitos T maduros y fue reconocida por primera vez con la utilización del AcM anti T12, el cual identificó una estructura de peso molecular de 120 kDa (Reinherz *et al.*, 1981; Swack *et al.*, 1989). Se ha demostrado que los AcM anti-CD6 inducen un efecto mitogénico en las células T, dependiente de la presencia de los macrófagos (Rieber *et al.*, 1986; Romain *et al.*, 1986, 1988), y este efecto mitogénico puede ser bloqueado por AcM anti-CD3 no mitogénicos (Gangemi *et al.*, 1989) o con AcM anti CD2.

Los estudios previos con el AcM IOR-T1 mostraron que este anticuerpo reconoce un epítopo dentro del CD6 (García *et al.*, 1992) y, por otra parte, no induce la pérdida de este receptor de la membrana linfocitaria (Faxas y García, 1990).

La función biológica del CD6 aún no ha sido esclarecida, aunque todos los resultados sugieren que el CD6 tiene una importante función como receptor en los linfocitos T humanos.

En el presente trabajo evaluamos la participación del AcM IOR-TI, comparándose con AcM anti-CD3, en los mecanismos de reconocimiento y adhesión de los linfocitos T citotóxicos sensibilizados previamente en cultivo mixto unidireccional con la línea celular de cultivo Raji. El AcM IOR-TI no inhibió la lisis de las células de cultivo Raji por los linfocitos T citotóxicos, lo cual sugiere que el antígeno que reconoce CD6 no interviene en la cascada de mecanismos que se producen durante el reconocimiento y adhesión de dichas moléculas.

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpos monoclonales

Se utilizaron los AcM murinos IOR-TI (CD6, IgG2a) (García *et al.*, 1984, 1992), IOR-T3 (CD3, IgG2a) e IOR-T3A (CD3, IgG2a) (Faxas y García, 1990), purificados a partir de líquido ascítico por cromatografía de afinidad con proteína A-Sefarosa, dializados contra solución tamponada con fosfato pH 7.2 (SSTF); se ajustó la concentración a 1 mg/ml y se filtró a través de una membrana miliporo de 0.22 μ m. Se alicuotaron y congelaron a -70°C. Para cada experimento se descongeló una alicuota. Cada AcM se diluyó en medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con suero fetal de ternera al 10%, Hepes 20 mM, glutamina y antibióticos (RPMI 1640 suplementado), para alcanzar concentraciones finales desde 0.5 μ g/ml hasta 100 ng/ml.

Células estimuladoras

Se utilizó la línea de cultivo Raji (Epstein *et al.*, 1966). Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado, fueron cosechadas en la fase exponencial de su crecimiento y se incubaron a 37°C durante 30 minutos con 50 μ g de mitomicina C (Sigma). Se lavaron tres veces con SSTF y se ajustó la concentración a 1×10^6 células/ml de medio RPMI 1640 suplementado.

Células respondedoras

Como células respondedoras se emplearon las células mononucleares periféricas (CMP) provenientes de sangre venosa heparinizada de individuos donantes voluntarios. Las CMP fueron

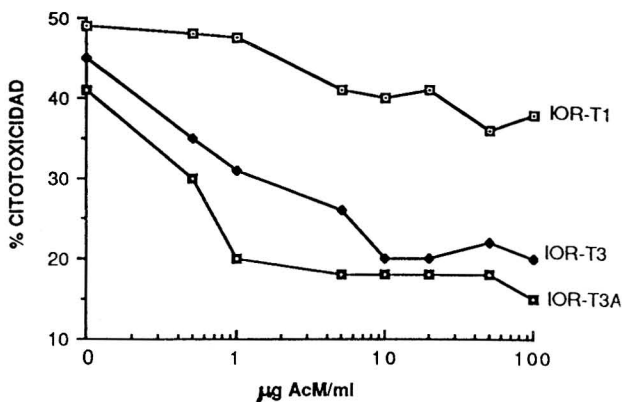


Fig.1. Efecto de los AcM anti-células T sobre el ensayo de citotoxicidad con linfocitos previamente sensibilizados en cultivo mixto unidireccional con la línea celular de cultivo Raji. Los puntos representan la media de dos experimentos independientes.

obtenidas por centrifugación en gradiente de densidad 1.077 (García y Silva, 1979). Se lavaron tres veces con SSTF y se ajustó la concentración a 10×10^6 células/ml de medio RPMI 1640 suplementado.

Generación de linfocitos T sensibilizados (citotóxicos)

Se mezclaron CMP y células Raji en una proporción de 1:1 y se cultivaron a 37°C durante 6 días en medio de cultivo suplementado en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las células se lavaron y se resuspendieron en medio suplementado.

Ensayo de citotoxicidad

Para el ensayo de citotoxicidad se incubaron a 37°C, 5% de CO₂ y durante 30 minutos, 200 μ Ci de Na₂CrO₄ (Amersham) con 10×10^6 células Raji en 0.5 ml de medio Raji suplementado con 2% de suero fetal de ternera. Se lavaron dos veces con el mismo medio y posteriormente se incubaron a 4°C durante 30 minutos adicionales; y se realizó un último lavado, ajustándose la concentración en medio RPMI suplementado. Se mezclaron las células blanco (Raji con cromo radioactivo incorporado) con las células efectoras (linfocitos T con seis días de sensibilización), de modo que la relación efectora:blanco fuese 40:1, 20:1, 10:1 y 5:1 en un volumen final de 100 μ l. Las células se depositaron en placas de cultivo de fondo en U de 96 pozos (Nunc) y seguidamente se añadieron 100 μ l de las respectivas diluciones de los AcM estudiados. Cada determinación se realizó por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 4 horas, y luego de una centrifugación se cosecharon alicuotas de 50 μ l de cada pozo para ser leídas en un contador gamma (LKB). Como control se utilizó el mismo diseño sin la adición de los AcM para cada proporción efectora:blanco. La liberación espontánea (LE) se determinó incubando las células blanco con medio de cultivo solo y la liberación máxima (LM) con tritón X-100 al 10%. El porcentaje de citotoxicidad (% CT) se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ CT} = (\text{cpm EXP} - \text{cpm LE}) / (\text{cpm LM} - \text{cpm LE});$$

donde cpm EXP corresponde al valor del experimento.

RESULTADOS

En los experimentos realizados, los AcM fueron añadidos justamente antes de iniciarse el ensayo de citotoxicidad, por lo que se midió el efecto de estas inmunoglobulinas durante la fase efectora de las células T sensibilizadas. Para expresar los resultados se seleccionó la relación efectora:blanco 20:1, porque con la misma se obtuvo la lisis óptima en nuestro sistema.

En la figura 1 se muestran los valores de citotoxicidad obtenidos al añadir dosis crecientes de AcM al sistema citolítico desde 0.5 a 100 μ g/ml. Se observa que en el caso de los AcM anti-CD3 los valores de citotoxicidad disminuyen desde un 45% hasta un 20% para el IOR-T3A y desde un 41% hasta un 15% para el IOR-T3. En el caso del AcM IOR-TI sólo se observa una ligera disminución desde un 49% hasta un 38%. En la figura 2 se muestran estos valores expresados como % de inhibición. El IOR-T3A

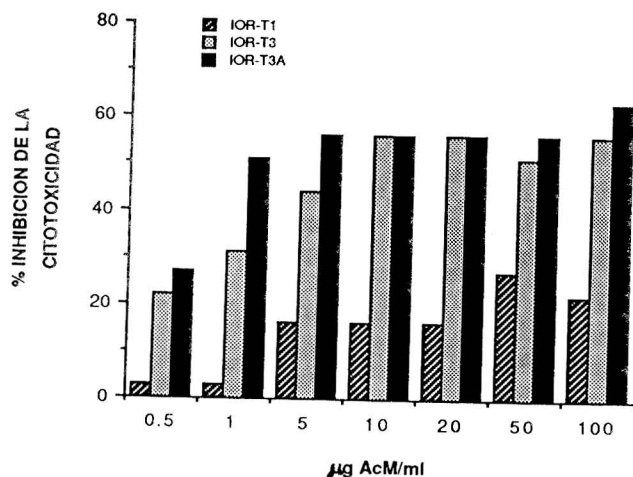


Fig. 2 Inhibición de la citotoxicidad celular antígeno específica por AcM anti-células T. El porcentaje de inhibición de la citotoxicidad se calculó mediante la relación: $100 - ((\% \text{ CT experimento} / \% \text{ CT máxima para cada AcM}) \times 100)$.

alcanzó su nivel máximo de inhibición (58%) a la dosis de 5 µg/ml, mientras que el IOR-T3 alcanzó ese valor a la concentración de 10 µg/ml. Por otra parte, el AcM IOR-T1 sólo logró inhibir como máximo un 27% de la citotoxicidad antígeno dependiente a la dosis de 50 µg/ml (figura 2).

DISCUSION

El reconocimiento de los linfocitos T durante la respuesta inmunitaria se realiza a través de una complicada cascada de mecanismos, donde las moléculas de adhesión juegan un papel importante. Se conoce que el fenómeno de adhesión es un proceso regulado, cuyas moléculas contribuyen a la transducción de la señal, y que, al parecer, esta señal es bidireccional entre la célula T y la otra célula (Makgoba *et al.*, 1989). Por otra parte, muchas de esas moléculas también participan directa e indirectamente en los mecanismos de activación de los linfocitos T (Haynes *et al.*, 1989; Rieber, 1989; Kabelitz, 1990).

Hasta el presente se han reconocido tres vías por las cuales los linfocitos T pueden activarse. La primera es la activación a través de la reacción del antígeno con el complejo CD3-receptor (Oettgen y Terhorst, 1987); la segunda vía es independiente del antígeno y se establece a través del CD2 (LFA-2) (Kabelitz, 1990); y la tercera, la cual es independiente del antígeno y del complejo CD3-receptor, es por el CD28 (Sánchez-Madrid, 1987).

En nuestro estudio encontramos que los AcM anti-CD3 evaluados inhiben el mecanismo de citotoxicidad celular utilizando linfocitos previamente sensibilizados. Este efecto se puede atribuir a tres causas fundamentales:

- a) a la modulación del complejo receptor de las células T por los AcM anti-CD3;
- b) por interferencia estérica de la molécula de AcM con una parte del complejo receptor de las células T;
- c) que los AcM anti-CD3 induzcan la regulación negativa de otras moléculas necesarias, para que se efectúe adecuadamente la respuesta citotóxica.

Nuestros resultados sugieren que el complejo CD3-receptor no es modulado en su expresión en la superficie celular, ya que, para que ese fenómeno se manifieste, es necesario que estén presente altas concentraciones de anticuerpos (Faxas y García, 1990). En estos experimentos observamos que, con concentraciones tan bajas como 1 µg/ml, se logra una inhibición importante del ensayo de citotoxicidad (51%). Por esa razón consideramos que el efecto producido pueda deberse a las otras dos causas. Es necesario señalar que nuestro sistema utiliza células previamente activadas, por lo que los mecanismos de activación de las células en reposo no son analizados.

La participación del CD6 en los procesos de adhesión y reconocimiento de las células T no ha sido estudiada en su totalidad hasta el presente. Se ha sugerido que el CD6 puede servir como receptor de señales de activación (Rieber *et al.*, 1986), aunque la respuesta proliferativa sea débil (Fiebig *et al.*, 1987) y puede estar asociada a la expresión de los receptores $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ de los linfocitos T (Pawlecec *et al.*, 1989). En nuestros resultados encontramos que el AcM IOR-T1 indujo una ligera disminución en la inhibición de la citotoxicidad, lo que sugiere que el epítipo que reconoce este AcM no juega un papel importante en los mecanismos de adhesión y posterior activación dentro de las diferentes etapas de la citotoxicidad antígeno específica.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

- ACUTO, O.; M. FABBI; A. BENSSUAN; C. MILANESE; T. J. CAMPEN; H. O. ROGER and E. L. REINHERZ (1985). The human T-cell receptor. *J. Clin. Immunol.* 5: 141-147.
- ALEXANDER, D. R. and D. A. CANTREL (1989). Kinases and phosphatases in T-cell activation. *Immunol. Today* 19: 200-202.

- DUSTIN, M. L. and T. A. SFRINGER (1991). Role of the lymphocyte adhesion receptor in transient interactions and cell locomotion. *Ann. Rev. Immunol.* **9**: 27-66.
- EPSTEIN, M. A.; B. E. ACHONG; Y. M. BARR; B. ZATAC and G. HENLE (1966). Morfoloical and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblast (strain Raji). *J. Natl. Cancer Inst.* **37**: 547- 559.
- FAXAS, M. E. y C. A. GARCIA (1990). Estudio de la modulación antigénica por los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-células T. *Biotechnol. Aplicada* **7**: 66-71.
- FIEBIG, H. I; U. BEHN; W. HOMMEL; H. ELCHERY and A. KUFFER (1987). A comparison of three modulating pan T-cell antibodies with the workshop T-cell panel. In: *Leukocyte Typing III* Eds. A.J. Mc Michael *et al.*, Oxford - New York -Tokio pp 251-253.
- FINKEL, T. H.; R. T. KUBO and J. C. CAMBIER (1991). T-cell development and transmembrane signaling: changing biological responses through an unchanging receptor. *Immunol. Today* **12**: 79-81.
- GANGEMI, R. M. R.; J. A. SWACK; D. M. GAVIRIA and P. L. ROMAIN (1989). Anti-T12, an anti-CD6 monoclonal antibody, can activate human T cell lymphocytes. *J. Immunol.* **143**: 654-659.
- GARCIA, C. A. y C. SILVA (1979). Cultivo y estimulación de linfocitos humanos purificados con Verografin. 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 humanas de origen T. Caracterización de los AcM IOR-T1 e IOR-T2. *Interferón y Biotecnología* **1**: 28-38.
- GARCIA, C. A.; A. M. BARRAL y K. TORRES (1992). El anticuerpo monoclonal IOR-Ti reconoce un epítipo dentro del CD6 de los antígenos de diferenciación leucocitarios humanos. *Biotechnología Aplicada* **9**: 70-77.
- HAYNES, B. F.; J. M. MARILYN; L. F. HALE and S. N. DENNING (1989). CD44 - A molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol. Today* **10**: 42-425.
- KABELITZ, D. (1990). Do CD2 and CD3-TCR-cell activation pathways activation function independently. *Immunol. Today* **11**: 44-46.
- MAKGOBA, M. W.; M. E. SANDERS and S. SHAW (1989). The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways relevance to T-cell recognition. *Immunol. Today* **10**: 417-420.
- NEL, M. E.; M. W. WOOTEN and R. M. GALBRAITH (1987). Molecular signaling mechanisms and T-lymphocyte activation pathways: a review and future prospects. *J. Clin. Immunol.* **7**: 81-96.
- OETTGEN, H. C. and C. TERHORST (1987). A review of the structure and function of T-cell receptor-T3 complex. *CRC Critical review in Immunol.* **7**: 131-167.
- PANDOLFI, F.; L. TRENTIN; L. A. BOYLE; I. STAMENKOVIC; R. BYERS; R. B. COLVIN and J. T. KURNICK (1992). Expression of cell adhesion molecules in human melanoma and their role in cytotoxicity mediated by tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer* **69**: 1165-1173.
- PAWLECEC, G.; A. REBBRIN; I. BALKO; V. REUSCII; K. SCHAUD and A. J. BUHRING (1989). Stimulatory capacity of workshop T-cell antibodies on T lymphocytes clones. *Tissue Antigens* **33**: 109-112.
- REINHERZ, E. L. and S. F. SCHLOSSMAN (1981). The characterization and function of human regulatory T lymphocyte subsets. *Immunol. Today* **2**: 69-73.
- RIEBER, P. C.; G. RANK; S. WIRTH; M. WILHELM; E. KOFF and G. RIETHMULLER (1986). Modulation of T-cell function by monoclonal pan T-cell antibodies not directed against the T-cell receptor complex. In: *Leukocyte Typing II. Human T-cell lymphocytes*. Eds. E. L. Reinherz *et al.* Springer-Verlag-New York, **Vol 1** pp 233-244.
- RIEBER E. F. (1989). T-cell section report. In: *Leukocyte Typing IV*. Eds. W. Knapp *et al.* Oxford Univ. Press, Oxford, New York Tokyo, pp 231-233.
- ROMAIN, F. L.; D. M. GAVIRIA and S. F. SCHLOSSMAN (1986). Selective enhancement of autologous mixed lymphocyte reactivity (AMLR) by an immunosuppressive monoclonal anti-T-cell antibody. *Arthritis Rheum.* **29**: 20-23.
- ROMAIN, P. L.; A. J. SWACK; R. M. R. GANGEMI and D. M. GAVIRIA (1988). Anti-T12, an anti CD-6 monoclonal antibody, activates resting T lymphocytes. *FASEB J.* **2**: A1827-A1829.
- SANCHEZ-MADRID, F. (1987). Linfocitos T: Diferenciación, subpoblaciones y activación. En: *Nuevas tendencias en inmunología*. Coordinadores V. Larraga *et al.* Eds. Revolucionarias, Ministerio de cultura, pp 121-124.
- SWACK, J. A.; R. M. R. GANGEMI; C. ERUDD; CII. MORIMOTO; S. F. SCHLOSSMAN and P. L. ROMAIN (1989). Structural characterization of CD-6: Properties of two distinct epitopes involved in T-cell activation. *Molecular Immunol.* **26**: 1037-1049.