

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PRECLÍNICAS VICTORIA  
DE GIRÓN. DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE SANCTI SPIRITUS

***Identificación de receptores que modulan las funciones  
de los linfocitos T citotóxicos humanos.***

Tesis presentada en opción al grado de Dr. en Ciencias Médicas.

AUTOR: Emilio Carpio Muñoz

TUTOR: Carlos Duarte Cano. Dr. Ciencias Biológicas

ASESOR: Dr. Pedro Aparicio Alonso. Catedrático de Inmunología.

## DEDICATORIA

*A las personas que más motivos me han dado para realizar este trabajo y que constituyen una fuente permanente de inspiración en mi vida, mi madre Delia, mi esposa Milagros y mi hijo Manuel.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Pedro Aparicio Alonso, por recibirme en su laboratorio de la Universidad de Murcia, permitir que fuera un miembro más de su grupo de investigación y propiciar mi participación en este atractivo proyecto. Por asesorarme tan acertadamente en el desarrollo de esta Tesis y brindarme su ayuda siempre que la solicité. Y por todas las enseñanzas relacionadas con la actividad científica que de él he recibido. También por su amistad.

A todos los miembros del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia por propiciar un buen ambiente para la investigación científica, por la ayuda que me ofrecieron durante mi aprendizaje de las nuevas tecnologías, particularmente a Esther, Trini, Enrique Aguado y José Yelamos. Estoy particularmente en deuda con Agustín Beltrán de Heredia quien desde un inicio me ofreció su apoyo, ayuda científico-técnica y el enorme privilegio de contar con su amistad.

A los compañeros de la Unidad de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Murcia que me ayudaron y orientaron en el trabajo con el citómetro de flujo, especialmente a Antonia y José.

A los doctores David Sancho y Pilar García por su participación en los experimentos de transfecciones con CD70 y microscopía confocal, respectivamente.

Al Dr. Carlos Duarte Cano, por aceptar ser mi Tutor, por las valiosas orientaciones que ha aportado para la escritura de esta Tesis, por haberme enseñado tantas cosas relacionadas con la investigación científica desde que nos conocimos en Suecia en 1988 y por su valiosa amistad.

Al Dr. Jorge Gavilondo, quien fuera mi primer mentor en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana y me sirviera de motivación, apoyo y ejemplo para mi incursión en el campo de la investigación biomédica.

A todos mis compañeros del Departamento de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Ciencias Médicas de Sancti Spiritus, principalmente a los Profesores de Histología, que ocuparon mi lugar en la docencia mientras yo hacía este trabajo en España.

A todos los miembros del CIGB de Sancti Spiritus que me han brindado ayuda y consejos para realizar este trabajo, especialmente a Carlos, Yosvani, Sheila, Julio, Vladimir y especialmente al Dr. Ibarrollín, quien me ayudo con los gráficos y todo lo relacionado con la computación.

A la dirección de la Facultad de Ciencias Médicas de Sancti Spiritus, especialmente a su Decana la Dra. Lucía Pérez por permitir mi estancia en la Universidad de Murcia y por su apoyo.

A todas las personas e Instituciones que me han ayudado para hacer posible esta Tesis y que por razones de espacio no puedo mencionar individualmente les ofrezco mi sincero agradecimiento y mis disculpas por omitir sus nombres.

## **SÍNTESIS**

Las funciones de los linfocitos T citotóxicos están reguladas por receptores de su membrana que transmiten señales activadoras o inhibitoras al interior de la célula. En este trabajo hemos utilizado la tecnología de los anticuerpos monoclonales para identificar moléculas de membrana que modulen las funciones de los linfocitos T citotóxicos humanos. Se inmunizaron ratones con un clon de linfocitos T humanos  $CD8^+\alpha\beta^+$  para obtener anticuerpos monoclonales que desencadenaran los mecanismos de citotoxicidad. Dos de los anticuerpos obtenidos reconocieron a CD70, molécula considerada ligando de CD27. La agregación del CD70 en la membrana de clones de linfocitos T provocó los siguientes eventos: inducción de la citotoxicidad, liberación de  $Ca^{2+}$  intracitoplasmático, secreción de  $TNF-\alpha$ , expresión de CD25 y fosforilación de enzimas. Otro de nuestros objetivos fue identificar receptores que transmitieran señales capaces de inhibir la citotoxicidad inespecífica y observamos que las moléculas del MHC-I, expresadas en la membrana de un clon de linfocitos T, inhibieron la citotoxicidad inespecífica cuando fueron agregadas con un anticuerpo anti-MHC-I. Concluimos que las moléculas CD70 y MHC-I podrían ser consideradas como receptores que modulan las funciones de los linfocitos T citotóxicos humanos y no sólo como ligandos de CD27 y TCR, respectivamente.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
2.1. Los Linfocitos T Citotóxicos .....	11
2.2.1. Las vías coestimuladoras convencionales.....	15
2.2.2. Otras vías de coestimulación.....	18
2.2.2.1. La familia CD28-B7.....	19
2.2.2.2. La vía TNF-TNFR .....	20
2.2.2.3. Los inmunoreceptores de la familia SLAM.....	26
2.2.2.4. Receptores de células NK que se expresan en linfocitos T CD8 <sup>+</sup> .....	27
2.2.2.5. Las moléculas del MHC-I como receptores que modulan las funciones de los linfocitos T .....	30
2.2.2.6. El papel coestimulador de CD70 .....	34
2.3. Citotoxicidad inespecífica (independiente de TCR) de los TCL.....	37
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	42
3.1. Identificación de receptores que desencadenen la citotoxicidad inespecífica en un clon de linfocitos T citotóxicos humanos.....	42
3.1.1. Reactivos, citoquinas y anticuerpos monoclonales.....	42

3.1.2	Cultivo de líneas celulares y obtención y cultivo de clones de linfocitos T humanos .....	43
3.1.3.	Obtención de anticuerpos monoclonales contra moléculas que inducen la citotoxicidad independiente de TCR en linfocitos T citotóxicos humanos .....	44
3.1.4.	Estimulación de las células, inmunoprecipitación y ensayo de Western blot.....	46
3.1.5.	Detección de la movilización intracitoplasmática de Ca <sup>2+</sup> .....	47
3.1.6.	Inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo .....	48
3.1.7.	Detección de la secreción de TNF- $\alpha$ .....	48
3.1.8.	Plasmidios y transfecciones .....	48
3.1.9.	Ensayos con genes reporteros.....	49
3.2.	Identificación de receptores que inhiben la citotoxicidad inespecífica en el clon de linfocitos T citotóxicos humanos K14B06 .....	50
3.2.1.	Inhibición de la citotoxicidad inespecífica por anticuerpos monoclonales.....	51
3.2.2.	Estimulación de las células con anticuerpos.....	51
3.2.3.	Ensayo de inhibición con dianas “frías” .....	52
3.2.4.	Ensayo de reordenamiento del centro organizador de microtúbulos (MTOC).....	52
3.3.	Análisis estadístico .....	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
4.1.	Identificación de receptores que desencadenen la citotoxicidad independiente de TCR en un clon de linfocitos T citotóxicos humanos .....	54

4.1.1. Obtención de anticuerpos monoclonales contra receptores que desencadenen la citotoxicidad independiente de TCR en un clon de linfocitos T citotóxicos humanos .....	54
4.1.2. El anticuerpo QA32 es específico para CD70 humano.....	56
4.1.3. El anticuerpo anti-CD70 (QA32) desencadena la lisis redirigida en varios clones de células T humanas .....	56
4.1.4. La activación de clones de linfocitos T mediante la agregación de CD70 con QA32 es capaz de provocar secreción de citoquinas como el TNF- $\alpha$ y aumentar la expresión de CD25.....	59
4.1.5. La agregación de CD70 provoca movilización de Ca <sup>2+</sup> intracitoplasmático .....	61
4.1.6. La señalización a través de CD70 involucra activación de las quinasas MAP .....	62
4.1.7. La transducción de señales a través de CD70 también se observa en células Jurkat transfectadas con CD70 humano .....	63
4.1.8. La agregación del CD70 por su ligando natural, CD27, provoca una inducción de la transcripción en células CD70 <sup>+</sup> .....	64
4.2. Identificación de moléculas que inhiben la citotoxicidad inespecífica generada a partir de receptores no clonotípicos en linfocitos T humanos.....	68
4.2.1. La lisis redirigida a través del CD94 es inhibida por los anticuerpos anti-MHC-I .....	69
4.2.2. Se requiere una amplia agregación de las moléculas del MHC-I en la membrana del clon K14B06 para provocar el efecto de inhibición de la citotoxicidad inespecífica inducida por CD94 .....	70
4.2.3. La inhibición de la lisis redirigida del anti-CD94 es producto de la agregación de las moléculas de MHC-I en la membrana del	



clon K14B06 y no depende de receptores para Fc presentes en la membrana del clon de linfocitos T .....	71
4.2.5. La agregación de MHC-I con anticuerpos monoclonales inhibe la movilización del centro organizador de los microtúbulos (MTOC) que causa el anti-CD94 en el clon K14B06.....	74
4.2.4. La inhibición de la lisis redirigida que causa MHC-I no es debido a la inducción de apoptosis a parálisis en el clon K14B06 .....	74
4.2.6. Los anticuerpos anti-MHC-I no inhiben el aumento en la expresión de CD25 causada por el anti-CD94.....	75
<b>5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>77</b>
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>95</b>
<b>7 RECOMENDACIONES.....</b>	<b>97</b>
<b>8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>98</b>
<b>9 AUTOBIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>114</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) juegan un importante papel en el sistema inmunitario, especialmente en la defensa contra infecciones intracelulares, el rechazo a los trasplantes y las enfermedades autoinmunitarias<sup>(1-6)</sup>.

Para realizar la función citotóxica los CTL descargan sus gránulos, que contienen perforinas y granzimas, hacia la célula diana<sup>(7)</sup>. Las perforinas propician la formación de poros en la membrana de la célula diana por donde penetran las granzimas que activan las cascadas de la apoptosis, produciendo la muerte celular<sup>(1,7)</sup>. Otro mecanismo de citotoxicidad incluye la expresión, en la membrana del CTL, de ligandos de la familia del TNF que al interactuar con su receptor en la célula blanco activan las vías de la apoptosis<sup>(7)</sup>. Los CTL también secretan citoquinas encargadas de regular varias funciones del sistema inmunitario<sup>(1,4)</sup>.

El mecanismo de la citotoxicidad celular no es exclusivo de los CTL. Las células citotóxicas naturales (NK) pueden matar a sus células diana por un mecanismo similar. Aunque los CTL y las NK tienen similitudes fenotípicas y funcionales, la activación de su maquinaria citotóxica ocurre por vías diferentes. Los CTL portan en su membrana un receptor de antígenos (TCR) que se encarga del reconocimiento específico y se asocia a otras proteínas (CD3 y cadenas  $\zeta$ ) para transducir la señal<sup>(1,6)</sup>. Este receptor es específico

para cada clon de linfocitos T y su ligando es el complejo formado por moléculas del MHC de clase I (MHC-I) y los péptidos antigénicos. Cuando ocurre el reconocimiento específico entre el TCR y las moléculas del MHC-I cargadas con péptidos en la membrana de la célula diana, el complejo TCR-CD3 transduce una señal al interior de la célula que desencadena los mecanismos de la citotoxicidad así como otras funciones que incluyen la secreción de citoquinas<sup>(1,4,6)</sup>.

Por otra parte, las células NK carecen de un receptor de antígenos con distribución clonal. En su lugar, presentan una gran variedad de receptores en la membrana; unos transmiten señales inhibitorias y otros activadoras<sup>(8)</sup>. La presencia o ausencia de los respectivos ligandos para estos receptores en la célula diana es quien provoca o evita que se descargue la maquinaria citotóxica de la célula NK, según sea el balance de las señales positivas o negativas.

La proliferación, diferenciación y desarrollo de las funciones de los CTL dependen de las señales que reciben a través de su receptor de antígenos<sup>(9)</sup>. Aunque esta señal es necesaria, pues garantiza la especificidad de la respuesta, no es suficiente. Cuando los linfocitos T vírgenes se estimulan sólo por el TCR, no ocurre su activación, más bien lo opuesto; esta "solitaria" señal provoca anergia o apoptosis del clon en cuestión. Hay otras moléculas en la membrana de los linfocitos T capaces de transducir señales activadoras que complementan la que se genera a partir de TCR. Estos receptores han sido nombrados coestimuladores. Por tanto, la función de los linfocitos T está

regulada por una primera señal, a partir del TCR, y una segunda señal, desencadenada por receptores coestimuladores.

La primera molécula coestimuladora descrita para los linfocitos T fue CD28<sup>(10)</sup>. El receptor CD28 se expresa en los linfocitos T vírgenes y sus ligandos, CD80 y CD86, en células presentadoras de antígenos como las dendríticas, macrófagos y células B. Recientemente, se han identificado varias moléculas, presentes en la membrana de los linfocitos T, con capacidad para transducir señales coestimuladoras<sup>(11)</sup>. La gran mayoría comienzan a expresarse después que el linfocito se ha puesto en contacto con su antígeno y se ha diferenciado en célula efectora o de memoria. No todas generan señales activadoras sino que algunas provocan la inhibición de la señal del TCR y conducen a la terminación de la respuesta inmunitaria.

Entre las principales moléculas coestimuladoras conocidas están las que pertenecen a la familia de receptores del TNF<sup>(12,13)</sup> como 1-1BB, OX40, CD27, CD30 y HVEM. Otro grupo importante está formado por los miembros de la familia del CD28<sup>(14-16)</sup> como ICOS, PD-1 y BTLA. A estos se han añadido, más recientemente, los miembros de la familia de los SLAM<sup>(17)</sup>, entre otros. Los ligandos para estos receptores se expresan tanto en células derivadas de la línea hematopoyética (dendríticas, macrófagos y linfocitos B), como en células de los tejidos periféricos como los endotelios y epitelios<sup>(11)</sup>.

Este notable incremento en el número de moléculas coestimuladoras conocidas ha provocado una revisión del paradigma de primera señal más segunda señal<sup>(11)</sup>. Se especula sobre la conveniencia de sustituirlo por otro

que contemple a la regulación de los linfocitos T como un fenómeno basado en múltiples señales generadas a partir de varias moléculas receptoras (estimuladoras e inhibidoras) presentes en su membrana<sup>(11)</sup>.

Una complejidad adicional a este tema la aporta el hecho de que los linfocitos T también pueden expresar los receptores activadores e inhibidores característicos de las células NK<sup>(18)</sup>. Estos llamados "receptores de NK" se expresan, principalmente, en células T con fenotipo efector/memoria y se ha comprobado que pueden potenciar o inhibir la señal del TCR, modificando la función de los CTL.

El punto de vista más tradicional sostiene que la función de los linfocitos T es controlada por el TCR y que los otros receptores sólo juegan un papel coestimulador y nunca pueden activar a la célula T de forma independiente al TCR. Sin embargo, la inhibición o coestimulación producida por estos receptores puede provocar que se sobrepase un umbral que decide el estado funcional del linfocito. Además, en determinadas circunstancias, los linfocitos T pueden activarse sin la señal del TCR<sup>(19-23)</sup>. En enfermedades autoinmunitarias o en la inflamación crónica, puede ocurrir activación de los CTL de forma independiente al TCR. Tanto en la artritis reumatoide<sup>(24,25)</sup> como en la enfermedad celíaca<sup>(21,26,27)</sup> y el infarto del miocardio<sup>(28-30)</sup>, la activación independiente de TCR juega un importante papel patogénico.

Si consideramos la relevancia que tienen las moléculas coestimuladoras o los receptores de células NK para el funcionamiento de los linfocitos T en condiciones normales y patológicas se hace evidente que, tanto estos

receptores como las vías de señales que ellos desencadenan, constituyen atractivos blancos para la terapéutica de enfermedades infecciosas, autoinmunitarias, alergias, rechazo a transplantes y la inmunoterapia del cáncer<sup>(31-42)</sup>. El bloqueo o la estimulación de muchas de estas vías ha sido ensayado como estrategia terapéutica en varios modelos de las enfermedades mencionadas con prometedores resultados<sup>(33-38)</sup>. Otro blanco muy atractivo para el bloqueo de la coestimulación o la activación antígeno independiente de los linfocitos citotóxicos pueden ser el síndrome coronario agudo, donde subpoblaciones de linfocitos citotóxicos participan en la inestabilidad y rotura de la placa de ateroma<sup>(28-30)</sup>.

De todo lo planteado anteriormente, podemos deducir que la identificación de nuevas moléculas coestimuladoras así como la caracterización de los mecanismos a través de los cuales se transmiten y controlan sus señales, se convierten en temas atractivos para la inmunología y la medicina. Con nuestro trabajo intentamos identificar "nuevas" moléculas en la membrana de los CTL que desencadenen o inhiban los mecanismos inespecíficos (independientes de TCR) de la citotoxicidad.

Para cumplir este propósito decidimos utilizar la tecnología de los anticuerpos monoclonales y el ensayo de la citotoxicidad reversa como método de selección. La racionalidad de esta elección descansa en los siguientes elementos:

- 1) En un trabajo previo<sup>(43)</sup> se reportó la inusual capacidad de un clon de CTL, con fenotipo  $CD3\alpha\beta^+CD8^+CD94^+$ , nombrado K14B06, para desencadenar la

citotoxicidad independiente de TCR a través de CD94. Este clon, que presenta una gran capacidad de multiplicación en cultivo, expresa receptores activadores e inhibidores de NK funcionales y podría expresar otros receptores aún desconocidos. Esto lo convierte en un inmunógeno atractivo para la obtención de anticuerpos monoclonales contra moléculas coestimuladoras.

2) El empleo del ensayo de lisis dirigida como método de selección permite escoger, desde un inicio, anticuerpos que pudieron haber sido descartados en trabajos anteriores donde la selección se hizo por métodos que miden la interacción molecular como son el ELISA, el Western blot o la inmunofluorescencia y citometría de flujo.

Un inconveniente de este abordaje podría radicar en el hecho de la gran cantidad de anticuerpos monoclonales que se han obtenido contra proteínas de membrana de linfocitos humanos desde que está disponible esta tecnología, por lo que la probabilidad de encontrar nuevas moléculas empleando esta estrategia podría ser baja.

Existen otras metodologías que pudieran emplearse para encontrar nuevas moléculas coestimuladoras, entre ellas se destacan el ensayo de doble o triple híbrido<sup>(44)</sup> y la búsqueda, en bases de datos, de genes con gran homología a las familias de coestimuladores conocidos. Sin embargo, a diferencia de estos procedimientos, nuestra estrategia no presupone la unión de los potenciales receptores con moléculas conocidas ni homología con otras familias génicas, sino que se basa en un ensayo eminentemente

funcional, donde al agregar moléculas de membrana, con un anticuerpo, se inducen los mecanismos de la citotoxicidad en el clon de células T. Además, los receptores que pretendemos identificar no tienen que ser, necesariamente, moléculas "nuevas" sino que pueden ser proteínas previamente conocidas pero para las que no se ha reportado una capacidad de transducir señales que desencadenen o inhiban la citotoxicidad independiente de TCR en CTL. Una estrategia similar a la nuestra fue utilizada recientemente para identificar tres nuevos receptores activadores en células NK<sup>(45-49)</sup>.

Por tanto, nuestra **hipótesis** de trabajo es la siguiente: "La aplicación de la tecnología de los anticuerpos monoclonales, en combinación con el ensayo de lisis redirigida, permite la identificación de moléculas de membrana que regulen las funciones de los CTL y cuyo papel en este proceso no haya sido descrito". Para refutar o aceptar esta hipótesis nos planteamos los siguientes **objetivos**:

- 1- Identificar moléculas en la membrana de un clon de linfocitos T citotóxicos humanos capaces de desencadenar el mecanismo de la citotoxicidad de forma independiente al TCR, así como moléculas que inhiban esta activación.
- 2- Caracterizar los eventos que ocurren en la célula T luego de la agregación en la membrana de los receptores identificados.

Las **tareas** trazadas para dar cumplimiento a estos objetivos fueron:



- 1- Obtención y cultivo de clones de linfocitos T humanos a partir de sangre periférica de donantes sanos.
- 2- Inmunización de ratones con uno de estos clones y obtención de anticuerpos monoclonales que al unirse a moléculas en la membrana del clon de células T desencadenen el mecanismo de la citotoxicidad.
- 3- Determinación de la identidad de las moléculas que reconocen los anticuerpos obtenidos, mediante ensayos de inmunoprecipitación, inmunofluorescencia y citometría de flujo.
- 4- Caracterización del efecto que tiene la unión del anticuerpo a las moléculas coestimuladoras identificadas para determinar si es capaz de inducir los siguientes eventos en clones de células T: liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmático, inducción de la citotoxicidad, secreción de  $\text{TNF-}\alpha$ , fosforilación de proteínas, aumento en la expresión de CD25 e inducción de la expresión de genes reporteros.
- 5- Evaluación de la capacidad de las moléculas coestimuladoras identificadas para transducir señales cuando son agregadas por su ligando natural expresado en la membrana de otra célula.
- 6- Evaluación de la capacidad de diferentes anticuerpos monoclonales, previamente conocidos, para inhibir la citotoxicidad que se genera luego de la agregación del CD94 en la membrana del clon K14B06.
- 7- Caracterización de los mecanismos involucrados en la inhibición de la citotoxicidad a partir de la agregación de moléculas de membrana por los anticuerpos inhibidores. Esta caracterización pretende evaluar si la

agregación, por un anticuerpo monoclonal, del receptor inhibidor en la membrana del clon K14B06, induce eventos como la apoptosis o inhibición de la reorganización del citoesqueleto de dicho clon.

Este trabajo presenta los siguientes **elementos de novedad**: Se describe, por primera vez, que el CD70, molécula considerada ligando natural de CD27, es capaz de funcionar como receptor en clones de linfocitos T citotóxicos  $\alpha\beta^+CD8^+$  y transmitir señales de activación. La agregación del CD70 en varios clones de linfocitos T provocó inducción de la citotoxicidad, secreción de TNF- $\alpha$ , fosforilación de proteínas y liberación de  $Ca^{2+}$  intracitoplasmático. La capacidad del CD70 para transmitir señales no sólo se observó cuando esta molécula fue agregado con anticuerpos sino también cuando se unió a su ligando natural en la membrana de otra célula.

El otro elemento novedoso consistió en demostrar que al agregar, con un anticuerpo monoclonal, las moléculas del MHC-I presentes en la membrana de un clon de CTL, se produce una inhibición de la citotoxicidad inespecífica cuando esta se induce a partir de receptores no clonotípicos como CD94. Por tanto, con este trabajo se aportan evidencias para considerar a CD70 y MHC-I como receptores capaces de modular las funciones de los linfocitos T citotóxicos en seres humanos y no sólo como ligandos “pasivos” de CD27 y TCR, respectivamente,.

La **importancia teórica** de estos hallazgos radica en que se describen nuevas formas para el control de las funciones de los CTL que pudieran tener relevancia biológica.

A pesar de ser este un trabajo de investigación básica, podemos prever una **importancia práctica** potencial de nuestros resultados. Las moléculas coestimuladoras tienen un papel relevante en la fisiología de los linfocitos. Estos receptores intervienen en la patogenia de varios problemas clínicos como el rechazo a los injertos, las enfermedades autoinmunitarias, las alergias, entre otros. Por tanto, el conocimiento de estas moléculas y de los mecanismos a través de los cuales realizan sus funciones de modulación, permite concebir nuevas drogas que actúen como agonistas o antagonistas de la coestimulación y comprobar su utilidad en el tratamiento de algunos de los trastornos mencionados anteriormente.

El documento está compuesto por los siguientes capítulos: Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y Referencias Bibliográficas. Además, un Índice, una Síntesis, las Abreviaturas y Acrónimos, los Agradecimientos y la Autobiografía. Se incluyen 16 Figuras y una Tabla en el capítulo de Resultados. El contenido de esta tesis ha sido recogido en tres publicaciones en las revistas Inmunología, Journal of Leukocyte Biology y European Journal of Immunology. Estos resultados se han presentados en dos Eventos Científicos Nacionales

La investigación se desarrolló en el Departamento de Bioquímica e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, España, y en la Facultad de Ciencias Médicas de Sancti Spiritus, Cuba, durante el período de 1999 a 2005.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Los Linfocitos T Citotóxicos

Los CTL están capacitados para eliminar células propias infectadas con virus y células tumorales<sup>(1-6)</sup>. También están involucrados en el fenómeno de rechazo a los trasplantes<sup>(1,6)</sup> y en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias<sup>(2,5)</sup>. Generalmente, los CTL son linfocitos T  $\alpha\beta^+CD8^+$  con una actividad restringida por las moléculas del MHC-I<sup>(1,6)</sup>.

La respuesta de los CTL puede dividirse en dos etapas<sup>(1,5,6)</sup>. La primera consiste en la activación, proliferación y diferenciación de los precursores de CTL (CTL-P) en CTL efectores. En un segundo momento, los CTL efectores reconocen a las células diana apropiadas y provocan su muerte. Posteriormente, la mayoría de los CTL mueren, en la llamada fase de contracción de la respuesta inmunitaria, mientras que algunos se convierten en células de memoria. Estas etapas están reguladas por señales que reciben los linfocitos T a través de moléculas receptoras en su membrana.

Para la transformación de CTL-P en CTL se requieren, básicamente, tres tipos de señales<sup>(1, 5)</sup>. La primera señal la brinda el receptor de antígenos de las células T (TCR-CD3) al interactuar con el complejo péptidos-MHC-I en la membrana de la célula presentadora de antígenos (APC). Esta señal garantiza la especificidad de la respuesta. La segunda señal, también llamada coestimulación, la brinda una serie de moléculas en la membrana

del linfocito al interactuar con sus respectivos ligandos en la célula diana o APC. La tercera señal la ofrecen moléculas solubles, como la IL-2, cuando se unen a su receptor en el linfocito T activado. Una vez que el CTL-P se ha transformado en un CTL efector ya está capacitado para destruir a las células diana apropiadas.

Los experimentos *in vivo* han demostrado que luego de una infección viral, el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para los antígenos virales aumenta considerablemente<sup>(50-54)</sup>.

Los mecanismos a través de los cuales un linfocito citotóxico es capaz de matar a las células diana han sido ampliamente estudiados, principalmente con experimentos *in vitro* que utilizan clones de CTL<sup>(1,50,53)</sup>.

Esta fase efectora requiere una secuencia de eventos que puede dividirse en cuatro etapas: formación del conjugado entre el CTL y la célula diana, golpe mortal a la célula diana disparando un mecanismo de muerte celular programada, disociación del CTL y muerte de la célula diana. Para la formación del conjugado es importante la unión del TCR al complejo MHC-I-péptidos y la interacción entre moléculas de adhesión en la membrana del CTL, como LFA-1, con su ligando, ICAM-1, en la membrana de la diana. La señal que recibe el CTL a través de TCR-CD3 hace que se descarguen los gránulos de esta célula hacia la membrana de la célula diana<sup>(1,52,55)</sup>. El contenido de los gránulos incluye proteínas tales como las perforinas y las granzimas<sup>(7)</sup>. Las perforinas, una vez en el espacio extracelular, cambian su conformación y se insertan y polimerizan en la membrana de la célula diana. De esta forma, crean poros por donde penetran las granzimas. Las granzimas son enzimas que inician una

cascada de reacciones en el interior de la célula diana que culmina con la fragmentación del ADN característica del proceso de apoptosis. Los experimentos con animales que presentan mutaciones en los genes que codifican para estas dos familias de proteínas han demostrado que tanto las perforinas como las granzimas son importantes en el proceso de la citotoxicidad. Otra vía que utiliza el CTL para matar a la célula diana es a través de la unión FasL-Fas<sup>(1,4,52)</sup>. Los CTL expresan FasL en su membrana que, al interactuar con la proteína Fas en la membrana de la diana, inicia el mecanismo de apoptosis en esta última célula. Los CTL también pueden secretar citoquinas como TNF- $\alpha$  e interferón- $\gamma$  las cuales participan en la eliminación de los agentes patógenos<sup>(52)</sup>.

Aunque los estudios iniciales de los CTL se realizaron con modelos *in vitro* o *ex vivo*, ya existen abundantes datos que avalan la importancia biológica de estas células en la defensa contra agentes infecciosos<sup>(1,50-55)</sup>. El mecanismo de citotoxicidad restringido por las moléculas del MHC-I parece idóneo para los parásitos intracelulares, especialmente los virus. Sin embargo, la importancia de los CTL para los diferentes tipos de virus no es homogénea. En algunos casos pueden ser muy importantes para eliminar la infección, en otros no tanto y, en algunos, es posible que no jueguen ningún papel. Varios estudios indican que el mecanismo de defensa de los CTL es efectivo para los virus no citopáticos pero que es incapaz de eliminar la infección por virus citopáticos<sup>(1,50-54)</sup>.

Muchos de los experimentos encaminados a determinar la importancia biológica de los CTL se han realizado con animales que presentan mutaciones en los genes de perforinas y granzimas<sup>(56)</sup>.

Los CTL, al estar capacitados para matar células propias, también pueden ocasionar daño en el organismo. Se sabe que están involucrados en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias<sup>(1,2,5)</sup> y el rechazo de los trasplantes<sup>(1,50)</sup>. Es necesario un riguroso control para que los CTL dirijan sus potentes “herramientas” de muerte celular hacia los blancos adecuados y provoquen un daño mínimo a los tejidos propios. Por tal motivo, las funciones de estas células están controladas por señales que transmiten moléculas en su membrana llamadas receptores. Estos receptores interactúan, de forma específica, con ligandos que están en la membrana de otras células. Las células que expresan los ligandos pueden localizarse tanto en los órganos secundarios del sistema inmunitario como en los diferentes tejidos y órganos por donde penetran y se diseminan los agentes infecciosos. El estudio de estas moléculas receptoras que regulan las funciones de los linfocitos T constituye una prioridad para la inmunología moderna.

## **2. 2. Moléculas coestimuladoras en los linfocitos T**

Los linfocitos T necesitan dos tipos de señales para su completa activación y ganancia de funciones efectoras<sup>(57)</sup>. La primera (señal 1) la proporciona el complejo TCR-CD3 al interactuar con los péptidos antigénicos unidos a las moléculas del MHC en la membrana de la APC. La segunda señal (señal 2), también llamada coestimulación, es proporcionada por una variedad de receptores que están en la membrana del linfocito T y que interactúan con sus respectivos ligandos presentes en la membrana de otras células. No todas estas moléculas coestimuladoras proporcionan una señal “positiva” sino que algunas brindan una señal

“negativa” que tiende a frenar o terminar la respuesta inmunitaria del linfocito. El balance entre las señales coestimuladoras positivas y negativas permite que los linfocitos participen en la destrucción de los antígenos extraños con un daño mínimo a los tejidos y que se atenúen los fenómenos de autoinmunidad.

En los últimos años, se han identificado varias moléculas coestimuladoras que se expresan en los linfocitos T y participan en la regulación de sus funciones. Es muy posible que la lista de coestimuladores conocidos aumente a medida que se identifican y caracterizan nuevas moléculas con esta función. Los ligandos de los coestimuladores no sólo se expresan en las APC sino también en células de los tejidos periféricos como endotelios y epitelios. A continuación ofrecemos un resumen del estado actual de los conocimientos sobre las principales moléculas coestimuladoras que se expresan en los linfocitos T.

### **2. 2. 1. Las vías coestimuladoras convencionales**

Se llaman “vías coestimuladoras convencionales” a aquellas que se conocen desde hace más de una década y sobre las que se tiene abundante información. Además, es muy probable que estas tengan un papel biológico más relevante en la coestimulación que otras vías descritas más recientemente. Analizaremos cada pareja receptor-ligando por separado.

**CD28/CTLA-4-B7:** La vía de coestimulación CD28-B7 fue la primera que se describió y es una de las mejor caracterizadas<sup>(11,58,59)</sup>. El receptor CD28 se expresa en las células T y tiene dos ligandos conocidos, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), que se expresan en las APC activadas como



células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Cuando las células T son activadas, aumentan la expresión de CTLA-4, una molécula que es similar, estructuralmente, a CD28 y que se une también a B7-1 y B7-2. Mientras que la interacción de CD28 con sus ligandos brinda una señal positiva, que trae como resultado la activación de los linfocitos T, su expansión clonal y producción de citoquinas, CTLA-4 transduce una señal negativa que trae como resultado la terminación de la respuesta inmunitaria de la célula T<sup>(59,60)</sup>. Una evidencia a favor de la importancia del CTLA-4 en el control de la respuesta inmunitaria es el hecho de que los ratones deficientes de este gen desarrollan un trastorno linfoproliferativo con enfermedades autoinmunitarias en varios órganos que resulta fatal<sup>(61)</sup>. El descubrimiento de esta vía de coestimulación (CD28-B7) sirvió de fundamento para la realización de estudios encaminados a comprobar si el bloqueo de estas señales podía representar una opción terapéutica en enfermedades autoinmunitarias y en el rechazo de injertos.

Los resultados de los ensayos preclínicos con el fin de demostrar la utilidad del bloqueo de la vía CD28/B-7 han sido muy prometedores. Se ha encontrado que la interrupción de esta vía previene la reacción aguda al trasplante e induce tolerancia específica en varios modelos animales<sup>(62-65)</sup>.

La creación de animales que no expresan los genes para CD28 o B7-1 y B7-2 ha permitido establecer, con más claridad, el papel de esta vía de coestimulación. Los ratones doblemente deficientes de B7-1 y B7-2 no rechazan los alotransplantes vascularizados mientras que los CD28<sup>-</sup> lo hacen pero con cierto retraso<sup>(60)</sup>.

La inhibición de la vía CD28-B7 también ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias en varios modelos animales. En un modelo de glomerulonefritis autoinmunitaria, los ratones tratados con una molécula híbrida compuesta por la porción extracelular de CTLA-4 unida a la región constante de las inmunoglobulinas (CTLA-4-Ig), mostraron una disminución muy significativa de la enfermedad<sup>(66)</sup>. Este abordaje también ha mostrado su eficacia en modelos de encefalomielitis autoinmune<sup>(67)</sup>, diabetes<sup>(68)</sup>, artritis<sup>(69)</sup>, tiroiditis<sup>(70)</sup>, miastenia gravis<sup>(71)</sup>, y algunos más<sup>(72)</sup>.

Estos alentadores resultados han conducido a la realización de ensayos clínicos con seres humanos en trastornos como la psoriasis<sup>(73)</sup> y otras enfermedades<sup>(60)</sup>.

**CD154-CD40:** CD154 (CD40L) se expresa en los linfocitos T activados y CD40 en las APC incluyendo a los linfocitos B. Las interacciones entre los miembros de esta pareja ligando-receptor proporcionan señales en ambas direcciones y tienen una gran importancia en las interacciones B-T y en la diferenciación de CTL-P a CTL. Los linfocitos B expresan CD40 y las señales que este transduce luego de su interacción con CD154 son imprescindibles para el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas. Una de las inmunodeficiencias humanas, el síndrome de hiper IgM ligada al cromosoma X, tiene como base molecular la ausencia de CD154.

Cuando se bloquea esta vía con un anticuerpo monoclonal anti-CD154, se previene el rechazo agudo al trasplante cardíaco en un modelo de ratón<sup>(74)</sup>.

Varios estudios han mostrado que hay un sinergismo de la acción al bloquear las vías CD154-CD40 y la CD28-B7 al mismo tiempo y, en muchos modelos de transplantes, esto es suficiente para evitar el rechazo<sup>(75)</sup>.

En numerosas enfermedades autoinmunitarias se ha demostrado que el bloqueo de la vía CD154-CD40 es capaz de suprimir o disminuir la enfermedad, principalmente en aquellas cuyo mecanismo patogénico involucra una activación de las células B como el lupus eritematoso sistémico (LES) y la miastenia gravis, ya que esta vía es muy importante en la interacción T-B. La administración de un anticuerpo monoclonal anti-CD154 retarda el desarrollo de LES en un modelo animal<sup>(76)</sup>. El bloqueo de la señal de CD40 impiden que se desarrolle la miastenia gravis en otro modelo de esta enfermedad<sup>(77)</sup>.

### **2. 2. 2. Otras vías de coestimulación**

La coestimulación a través de las interacciones CD28-B7 y CD154-CD40 se conocen desde hace más de una década y han sido estudiadas con relativa profundidad. Como hemos planteado, cuando se bloquean estas dos vías simultáneamente puede frenarse el rechazo al injerto y el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias en algunos modelos animales. Sin embargo, en varios modelos de transplante, a pesar de bloquear estas vías, los animales rechazan el injerto. Una posible explicación a este fenómeno es la existencia de otras vías de coestimulación que puedan funcionar cuando se bloquean las clásicas. Recientemente, se han identificado nuevas moléculas involucradas en la coestimulación y se ha venido demostrando que estas “nuevas” vías de

coestimulación pueden ser igualmente importantes y constituir un interesante blanco para ensayos terapéuticos.

### **2. 2. 2. 1. La familia CD28-B7**

**ICOS-B7RP-1:** ICOS es una molécula coestimuladora de las células T, homóloga a CD28, descrita por vez primera en linfocitos T activados<sup>(78,79)</sup>. ICOS humano presenta un 24% de homología con CD28 y un 17% con CTLA-4<sup>(79-82)</sup>. Sin embargo, ICOS es incapaz de unirse a B7-1 y B7-2 y su ligando es otra molécula: B7RP-1. Las señales que transduce ICOS traen como resultado un aumento en la proliferación y secreción de citoquinas por parte de las células T<sup>(79)</sup>. Además, aumenta la expresión de CD154 lo que permite una adecuada interacción B-T. B7RP-1 se expresa en las APC pero también en otras células parenquimatosas como la de los túbulos renales y la glándula próstata. Su expresión aumenta con la inflamación<sup>(80)</sup>.

Los efectos que provoca la agregación de ICOS han sido comprobados mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-ICOS. Estos anticuerpos causan un aumento de la proliferación celular y secreción de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-10, entre otras. Parece que ICOS juega un importante papel en el desarrollo de una respuesta de tipo Th2. La administración ICOS-Ig suprime la hiperreactividad bronquial que es mediada por un mecanismo tipo Th2<sup>(83)</sup>. Aunque el bloqueo de ICOS tiene un significativo efecto sobre el desarrollo de los linfocitos Th no sucede así con relación a los CTL que parecen no afectarse en absoluto<sup>(79)</sup>.

**PD-1:** PD-1 también pertenece a la familia de CD28. Es semejante a CTLA-4 (23% de homología) y al igual que este, tiene un solo dominio

extracelular y una cola intracitoplasmática con un motivo inhibidor basado en tirosinas (ITIM). Se expresa en linfocitos T y B activados así como en células de la línea mieloide como los macrófagos. Tiene dos ligandos conocidos, PDL1 y PDL2, que se presentan en APC profesionales como las células dendríticas (DC) y los monocitos, pero se expresan además en células parenquimatosas de pulmón, corazón y riñón, así como en subpoblaciones de linfocitos T y B<sup>(85)</sup>. Al igual que CTLA-4, PD-1 transmite señales inhibitorias que conllevan a una disminución de la proliferación celular y de la producción de citoquinas<sup>(85)</sup>. La deficiencia de PD-1 provoca también fenómenos de autoinmunidad con esplenomegalia, expansión de los linfocitos B, aumento de los anticuerpos en el suero, glomerulonefritis tipo lupus, artritis y cardiomiopatía autoinmunitaria<sup>(86)</sup>. Por tanto, una vez activados, los linfocitos T comienzan a expresar CTLA4 y PD-1, que sirven para contener la magnitud de la respuesta inmunitaria y ambas moléculas son importantes para mantener el estado de tolerancia a ciertos antígenos.

#### **2. 2. 2. 2. La vía TNF-TNFR**

La interacción entre CD154-CD40 constituye el prototipo de la vía coestimuladora de la familia TNF-TNFR. Recientemente, se han identificado otras moléculas de esta familia que están también involucradas en la coestimulación. La creciente lista de moléculas incluye varios pares ligando-receptor entre los que se encuentran 4-1BB-4-1BBL, CD30-CD30L, CD134-CD134L y CD70-CD27. Analizaremos cada uno de ellos por separado.

**4-1BB-4-1BBL:** CD137 (4-1BB) es miembro de la familia de TNFR y puede presentarse como un monómero de 30 KD o un homodímero de 55 KD<sup>(87)</sup>. Su ligando (4-1BBL) es miembro de la familia del TNF y se expresa como un homodímero unido por puentes disulfuro<sup>(88)</sup>. El 4-1BB se expresa en linfocitos T activados, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, así como en células NK activadas<sup>(89,90)</sup>. Su ligando (4-1BBL) se expresa en DC maduras, linfocitos B activados y macrófagos<sup>(90)</sup>. Debido a la baja expresión de 4-1BB en los linfocitos recién activados se ha sugerido que esta vía no debe ser muy importante para el inicio de la respuesta inmunitaria sino más bien para estadios más avanzados de la activación de los linfocitos, lo que concuerda con el hecho de que los anticuerpos anti-4-1BB tienen un mayor efecto sobre linfocitos T activados que sobre los linfocitos vírgenes, impidiendo que las células sufran la llamada muerte celular inducida por activación<sup>(91)</sup>.

La estimulación a través de 4-1BB induce mayor proliferación en linfocitos T CD8<sup>+</sup> que en los T CD4<sup>+</sup> y parece que esta señal es muy importante para que sobrevivan las células CD8<sup>+</sup><sup>(92)</sup>. Los ratones deficientes en 4-1BB tienen disminuida su capacidad para generar una respuesta de CTL contra el virus de la influenza<sup>(93)</sup>. Mientras que CD28 juega un papel importante para iniciar la expansión de las células T luego de la activación por el TCR, la interacción entre 4-1BB y 4-1BBL sirve más bien para mantener la proliferación ya iniciada y las funciones efectoras de los linfocitos<sup>(94)</sup>.

El tratamiento con un anticuerpo monoclonal estimulador anti-4-1BB aumenta el rechazo a transplantes de corazón y de piel en modelos de

ratones<sup>(95)</sup>. Los ratones deficientes para CD28 o para 4-1BB son capaces de desencadenar una respuesta de rechazo importante pero los ratones que tienen inactivados los dos genes, muestran una mayor supervivencia del injerto<sup>(93)</sup>.

Las señales coestimuladoras a través de 4-1BB no sólo son importantes en el rechazo a transplantes. Se ha comprobado que la transfección de B7-1 o B7-2 en ciertas líneas celulares de linfomas no las hace más inmunogénicas pero cuando se les adiciona el gen de 4-1BBL sí aumenta notablemente su inmunogenicidad y los animales se protegen del reto con las células tumorales no transfectadas<sup>(96)</sup>. Además, las células tumorales que expresan el ligando de 4-1BB son capaces de desencadenar una respuesta de CTL tanto para las células tumorales transfectadas como para las parentales, en ausencia de CD28<sup>(97)</sup>.

En el cultivo mixto de linfocitos se observa una significativa reducción de la respuesta cuando se agregan al medio CTLA-4-Ig o 4-1BB-Ig, aunque el mayor efecto se produce con CTLA-4-Ig<sup>(98)</sup>. En relación con la respuesta CTL, se ha observado que cuando a las células CD28<sup>+</sup> se les bloquea la coestimulación por 4-1BB-4-1BBL, la inhibición de la citotoxicidad no es muy significativa pero en células CD28<sup>-</sup> el bloqueo de la vía 4-1BB provoca una completa abolición de la respuesta<sup>(99)</sup>. Esto sugiere que CD28 y 4-1BB pueden tener funciones redundantes en la respuesta CTL.

**CD30-CD30L:** CD30 fue descrito originalmente como un marcador para las llamadas células de Reed-Stemberg de los linfomas Hodgkin y se expresa en linfocitos T y B activados pero no en los linfocitos vírgenes<sup>(100)</sup>.

La expresión de CD30 en los linfocitos T es dependiente de las señales coestimuladoras por CD28 y por IL-4. Su ligando, CD30L, es una proteína transmembránica que pertenece a la familia del TNF y se expresa en linfocitos T y B, macrófagos, y una variedad de células hematopoyéticas y tumorales<sup>(101)</sup>. CD30L se expresa, fundamentalmente, en los esplenocitos CD4<sup>+</sup>. En estas células, su expresión alcanza un máximo al segundo día de la estimulación mientras que CD30 se expresa, preferentemente, en linfocitos CD8<sup>+</sup>, cinco días después de haber sido estimuladas las células del bazo<sup>(102)</sup>.

Aunque la función de las interacciones CD30-CD30L no es bien conocida, los estudios *in vitro* han mostrado que tiene efectos tanto en la activación como en la muerte de las células<sup>(103)</sup>. La señal que se origina a partir de CD30 puede tener efectos coestimuladores o inducir apoptosis independiente de Fas. La coestimulación de células mononucleares con un anticuerpo agonista anti-CD30 origina clones T preferentemente del tipo Th2. En concordancia con esto, si se bloquea la interacción CD30-CD30L se obtienen clones de tipo Th1<sup>(104)</sup>. Esto sugiere que la coestimulación de células T por APC que expresen CD30L favorece las respuestas de tipo Th2.

La señal que transduce CD30 inhibe la proliferación de células CD8<sup>+</sup> efectoras potencialmente autoreactivas y protege a los ratones de la diabetes autoinmunitaria mediada por células T CD8<sup>+</sup><sup>(105)</sup>. Los alotransplantes de piel y de corazón se rechazan más rápidamente en los ratones deficientes de CD30 lo cual puede deberse a una disminución de



la apoptosis de los clones T aloreactivos o al desvío hacia una respuesta inmunitaria de tipo Th1<sup>(106)</sup>.

**CD134-CD134:** CD134 (OX40) fue identificado como un antígeno de superficie en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratas. Luego se clonaron los genes de CD134 de ratón, rata y seres humanos y se comprobó que pertenecen a la familia de los receptores de TNF<sup>(107)</sup>. El ligando de CD134 (OX40L) es una proteína de membrana tipo II que tiene cierta homología con el TNF y que se une y coestimula a las células CD134<sup>+</sup><sup>(108)</sup>. Cuando se agrega CD134 con un anticuerpo monoclonal o con su ligando natural, se genera una señal coestimuladora que puede ser tan potente como la inducida por CD28<sup>(109)</sup>. Las células efectoras estimuladas de esta forma aumentan su vida media y la producción de IL2.

El CD134 se expresa, fundamentalmente, en las células T activadas, tanto en ratones como en seres humanos<sup>(110)</sup>. Mientras que el CD134L se expresa en células dendríticas y endoteliales<sup>(111,112)</sup>. La activación de las células T vírgenes trae como resultado una expresión transitoria de CD134 con un pico entre las 24 y 48 h<sup>(113)</sup>.

La vía CD134-CD134L es importante para regular la expansión de los clones de linfocitos CD4<sup>+</sup> en la respuesta primaria y el mantenimiento de esta población celular en el tiempo<sup>(114)</sup>. Los ratones deficientes de CD134 producen menos linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos para los antígenos en la fase tardía de la respuesta primaria y también es menor la supervivencia de las células de memoria cuando se comparan con los ratones normales. Estos ratones CD134<sup>-</sup> no sólo tienen afectada la proliferación de las

células T sino también la producción de citoquinas, tanto tipo Th1 como Th2<sup>(115)</sup>.

La interacción CD134-CD134L juega un papel en la autoinmunidad pues la señal de CD134 puede romper la tolerancia de las células T<sup>(116)</sup>. Este concepto ha servido de base para realizar ensayos terapéuticos en enfermedades autoinmunitarias con varios modelos. La administración de CD134-Ig a ratones con colitis mejora la evolución de la enfermedad y reduce el infiltrado inflamatorio y la secreción de citoquinas en este modelo<sup>(117)</sup>. La administración de anti-CD134L también ha sido efectiva en el tratamiento de un modelo animal de esclerosis múltiple<sup>(118)</sup>.

Es posible que la coestimulación por CD28-B7 sea importante en los primeros momentos de la respuesta inmunitaria conduciendo a la entrada de las células en el ciclo celular y a la expansión inicial de células T mientras que la interacción CD134-CD134L promueva una proliferación y producción de citoquinas más sostenida. Por lo que el bloqueo de las dos vías pudiera ser de interés terapéutico.

**CD27-CD70:** El CD27 es otro miembro de la superfamilia de receptores del TNF y también está implicado en la activación de los linfocitos T y su interacción con los B. Su ligando, CD70, es una glicoproteína transmembránica tipo II perteneciente a la familia del TNF que se encuentra en el epitelio del timo y cuya expresión se induce rápidamente cuando se activan los linfocitos T y B. El desarrollo de ratones carentes del gen de CD27 ha mostrado que esta molécula es importante para el funcionamiento de los linfocitos T y B maduros y para la generación de CTL<sup>(119)</sup>. Como CD70 se expresa en la mayoría de las células T vírgenes

y CD27 en los linfocitos T activados podría haber interacciones receptor-ligando en la superficie de estas células. Esto se evita regulando negativamente la expresión de CD27 en células que expresen CD70. Por tanto, es difícil encontrar células T CD27<sup>+</sup>CD70<sup>+</sup>.

Hay reportes que indican que, en células B activadas, CD70 y CD134L brindan una señal coestimuladora independiente de CD28<sup>(120)</sup>. Esta interacción CD27-CD70 también complementa la señal de CD40 en las células B y juegan un papel importante en la respuesta B dependiente de linfocitos T<sup>(121)</sup>.

El tratamiento de ratones con un anti-CD70 previene el desarrollo de encefalitis autoinmunitaria<sup>(122)</sup>. El bloqueo de esta vía también es importante para el tratamiento del rechazo a injertos<sup>(13)</sup>.

### **2.2.2.3. Los inmunoreceptores de la familia SLAM**

A esta familia de moléculas receptoras pertenecen SLAM (del inglés signaling lymphocytes activation molecule), también conocido como CD150, 2B4 (CD244), CD84, Ly-9, NTB-A (Ly-08) y CRACC (del inglés CD2-like receptor activating cytotoxic cells). Todos los miembros de la familia poseen una estructura similar que incluye una porción extracelular con dos o cuatro dominios similares a inmunoglobulinas, un segmento transmembránico y otro intracitoplasmático. Este último presenta motivos basados en tirosinas que juegan un papel importante en la transmisión de señales. Estas moléculas se expresan, generalmente, en células del sistema inmunitario. La expresión de SLAM aumenta luego de la activación de los linfocitos. El 2B4 se expresa en células NK, linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células T $\gamma\delta$ <sup>+</sup> y basófilos<sup>(123)</sup>. Los demás miembros de la familia han

sido menos estudiados y se expresan en linfocitos B y T, células NK y en células dendríticas<sup>(124)</sup>. Cuando se agregan con anticuerpos monoclonales 2B4 y NTB-A, en la superficie de células NK, se desencadenan los mecanismos de citotoxicidad y la secreción de interferón  $\gamma$ <sup>(124)</sup>.

La función biológica específica de cada uno de los miembros de esta familia de moléculas coestimuladoras no está plenamente establecida pero se sabe que participan en la modulación de la respuesta inmunitaria y regulan las funciones de varios tipos de células como los linfocitos T, células NK y células dendríticas. Parece que son incapaces de estimular, por sí solas, a estas células y que necesitan la agregación simultánea de TCR u otros receptores activadores en la superficie de la célula. Su papel no parece ser tan central o decisivo como el de CD28, ICOS o CD40, sino que más bien garantizan un “ajuste fino” de la respuesta inmunitaria<sup>(124)</sup>.

#### **2.2.2.4. Receptores de células NK que se expresan en linfocitos T CD8<sup>+</sup>**

El término “receptores de células NK” se utiliza para designar un conjunto de moléculas estimuladoras o inhibitoras que se expresan en la membrana de células NK<sup>(125)</sup> pero que, en algunos casos, también pueden expresarse en otros tipos celulares, entre los que se incluyen los linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

**Miembros de la familia KIR y Ly49: receptores específicos para moléculas clásicas de MHC-I:** Los genes de la familia de los receptores de NK parecidos a las inmunoglobulinas, del inglés killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR), codifican una gran variedad de receptores específicos para las diferentes variantes alélicas de las

moléculas del MHC-I. Los Ly49 constituyen el equivalente a esta familia génica en ratones:

Como promedio, cada miembro individual de la familia de los KIR es expresado por hasta el 5% de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la sangre de los seres humanos<sup>(126)</sup> y se expresan tanto KIRs inhibidores como estimuladores. Algo similar ocurre con la familia de los Ly49 en ratones aunque aquí solo se han encontrado receptores inhibidores<sup>(126)</sup>.

Existen abundantes evidencias que indican que los KIR inhibitorios pueden transmitir señales que inhiben las funciones efectoras que desencadenan los antígenos en las células T como la citólisis y la secreción de citoquinas<sup>(18)</sup>. Tanto KIR como Ly49 sólo se expresan en células T con un fenotipo de memoria/efector y no en aquellos linfocitos vírgenes o no activados, lo que sugiere que su expresión se induce en linfocitos T maduros luego que estos interactúan con sus respectivos antígenos.

**Heterodímeros de CD94-NKG2:** Tanto NKG2A como NKG2C y NKG2E son receptores con gran parecido a las lectinas, y forman heterodímeros con la molécula CD94. NKG2A es inhibitorio mientras que los otros dos son estimuladores positivos. Estos receptores reconocen péptidos, derivados de la secuencia líder de varias moléculas del MHC-I clásicos, unidos a la molécula del MHC-I no clásica HLA-E. Por tanto, los receptores CD94-NKG2 verifican la expresión de MHC-I en las diferentes células del cuerpo<sup>(127)</sup>. Este heterodímero se expresa en menos del 5% de los linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>(18)</sup>.

En clones de CTL humanos se ha observado que CD94-NKG2A puede inhibir las funciones efectoras de estas células. Al igual que ocurre con los KIR, estos receptores comienzan a expresarse luego que las células T son activadas por los antígenos a través de CD3<sup>(18)</sup>.

**NKG2D:** Este es un receptor estimulador de células NK descrito más recientemente que, a pesar de su nombre, tiene poca homología con los otros receptores NKG2 y no forma heterodímeros con CD94<sup>(129)</sup>. Los ligandos de NKG2D incluyen múltiples miembros de al menos dos familias génicas y están estructuralmente relacionadas, aunque no de forma muy estrecha, con las moléculas del MHC-I. Sus ligandos descritos en ratones (Rae1 y H60) raramente se expresan en células normales pero muestran una alta expresión en muchas líneas de células tumorales<sup>(129,130)</sup>. El gen equivalente en los cromosomas humanos codifica para ULBP que, aunque no muestra una alta homología con H60 y Rae1, sí es capaz de unirse a NKG2D humano y muestra semejanza en los dominios de la proteína<sup>(130)</sup>.

Otros ligandos para NKG2D son MICA y MICB, que son moléculas cuyos genes se localizan en la región del MHC. La proteína MICA se expresa cuando las células son sometidas a estrés y se encuentra altamente expresada en líneas tumorales y células infectadas con Citomegalovirus (CMV)<sup>(131)</sup>. Por tanto, el patrón de expresión de los ligandos de NKG2D parece indicar que estos se inducen en células con transformación oncogénica o con infecciones virales. La función de NKG2D en linfocitos T CD8<sup>+</sup> ha sido investigada utilizando clones de células T humanas específicos para péptidos derivados de CMV<sup>(131)</sup> y se ha encontrado que

cuando las células presentadoras de péptidos son transfectadas con el ligando MICA, estas son capaces de aumentar las funciones en los CTL NKG2D<sup>+</sup> como la citotoxicidad y secreción de citoquinas. Sin embargo, las células MICA<sup>+</sup> son incapaces de estimular a las células T si no presentan el péptido anigénico al TCR por lo que se supone que la función de NKG2D sea como molécula coestimuladora.

Se han considerado varias hipótesis para explicar el sentido biológico que tendría la expresión de receptores de NK en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> pero la mayoría giran alrededor del hecho de que no sustituyen a la señal que parte de la estimulación del TCR sino que realizarían un ajuste fino de las funciones de estas células en diferentes contextos<sup>(18)</sup>.

#### **2.2.2.5. Las moléculas del MHC-I como receptores que modulan las funciones de los linfocitos T**

Desde hace varios años se conoce el papel que juegan las moléculas del MHC de clase I en la presentación de péptidos antigénicos a las células T CD8<sup>+</sup><sup>(132)</sup>. La interacción entre el complejo MHC-péptido en las células presentadoras de antígenos con el TCR en los linfocitos T vírgenes aporta la principal señal de activación que lleva a la proliferación celular y al desarrollo de las funciones efectoras. Este fenómeno es esencial para que se produzca la inmunidad específica<sup>(133)</sup>. También existe abundante información sobre los requisitos estructurales que debe cumplir un péptido para que pueda ser presentado por las moléculas del MHC-I, así como acerca de las vías de transducción de señales del complejo TCR/CD3 al interior de la célula que conducen a la activación, proliferación y desarrollo de funciones como citotoxicidad o secreción de citoquinas por parte de los

linfocitos T<sup>(132,133)</sup>. Por otra parte, está bien establecido el papel que juegan las moléculas del MHC-I como ligandos de los receptores inhibidores para las células NK<sup>(127,134)</sup>. Sin embargo, la noción de que las moléculas del MHC-I presentes en la membrana de los linfocitos T puedan actuar como receptores que transmitan señales activadoras o inhibitorias es relativamente nueva y los datos experimentales encaminados a caracterizar este fenómeno son escasos<sup>(135)</sup>.

Las moléculas del MHC-I forman un heterodímero compuesto por una cadena alfa de unos 45 KD, con tres dominios extracelulares, una porción transmembránica y una pequeña cola intracitoplasmática. Los genes que codifican estas moléculas muestran un alto grado de polimorfismo. Esta cadena alfa se asocia, de forma no covalente, a una cadena invariante: la  $\beta$ 2 microglobulina.

En 1988, TD Geppert y colaboradores<sup>(136)</sup> demostraron que anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas del MHC-I podían inducir activación en poblaciones de células T humanas *in vitro*. La unión de los anticuerpos a las moléculas del MHC-I aumentó la capacidad de proliferación de las células cuando estas se incubaron, al mismo tiempo, con anticuerpos anti-CD3 u otros mitógenos, o cuando se incubaron sólo con los anti-MHC-I pero entrelazándolos luego con un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón. Entre los eventos bioquímicos que se inducen a partir de la agregación de las moléculas de MHC-I en la membrana de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> está la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracitoplasmático. Este constituyó uno de los primeros reportes acerca del papel de las moléculas del MHC-I como receptores relacionados con la transducción de señales



activadoras en los linfocitos T. El mismo grupo demostró luego que este efecto ocurría también en la línea celular Jurkat y en clones de linfocitos T humanos. El efecto coestimulador de MHC-I depende de que se mantenga intacta la función del CD3, pues células Jurkat con baja expresión de CD3 no respondieron a la coestimulación mediada por MHC-I<sup>(137)</sup>.

La capacidad de coestimulación a través de MHC-I es dependiente de la especificidad del anticuerpo, siendo los máximos estimuladores aquellos dirigidos contra determinantes menos polimórficos en la cadena alfa. De gran interés, por su posible aplicación práctica, es el hallazgo de que las moléculas del MHC-I presentes en las membranas de células endoteliales y musculares de los vasos sanguíneos pueden transmitir señales que induzcan proliferación y este fenómeno pudiera estar relacionado con el desarrollo de la arteriosclerosis que ocurre en el rechazo crónico al injerto<sup>(138)</sup>.

También se han estudiado las vías de señales intracelulares que se desencadenan una vez que se han agregado, con anticuerpos, las moléculas del MHC-I. Ha sido posible demostrar, utilizando como modelo a la línea Jurkat, que para que ocurra la liberación intracitoplasmática de calcio es necesario que se activen las quinasas de tirosinas. Esto ocurre unos 5 segundos después de la unión del anticuerpo a las moléculas de MHC-I en la membrana y siempre antes de la liberación intracitoplasmática de calcio, que puede ocurrir unos 30 segundos después<sup>(139)</sup>. Entre las tirosinas que se fosforilan están las de la fosfolipasa c gamma-1<sup>(139)</sup>. También se corroboró que para que ocurra

este fenómeno es necesario que la célula T, en este caso la línea Jurkat, exprese además el CD3 y el CD45 en su membrana<sup>(140)</sup>. Para la transmisión de señales a través de moléculas del MHC-I parece que no es necesaria la porción intracitoplasmática de la cadena alfa pero sí la porción transmembránica y la extracelular<sup>(135,141-143)</sup>,

Las señales que se transmiten luego de la agregación de las moléculas del MHC-I no siempre inducen la proliferación de las células T sino que pueden inducir apoptosis o inhibición de la función<sup>(140,144)</sup>. Hay anticuerpos, ya sean solubles o en la membrana de otras células, que al unirse a moléculas de MHC-I en los linfocitos T, pueden inducir apoptosis o anergia en estas células<sup>(140)</sup>.

En el sistema inmunitario existe un mecanismo para garantizar la homeostasia de los linfocitos activados que consiste en inducir la apoptosis por medio de receptores como el Fas (CD95) o el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R). Sin embargo, parece que las vías por la que se induce la apoptosis a través de las moléculas del MHC-I pueden ser ligeramente diferentes a las que se activan por la interacción Fas-FasL. Anticuerpos monoclonales que se unen al dominio alfa 1 de la cadena pesada de MHC-I inducen apoptosis en células T activadas pero no en las que están en "reposo". Otros anticuerpos dirigidos contra los dominios alfa 2 ó 3 son capaces de inhibir la proliferación pero no inducen apoptosis en los linfocitos T<sup>(144)</sup>.

En un modelo de ratón se ha demostrado que puede ocurrir apoptosis en los linfocitos T maduros si estos son estimulados, simultáneamente, a través de CD3 y por el dominio alfa 3 del MHC-I, ya sea con un anticuerpo

que reconozca un epítopo del dominio alfa 3 o por el CD8<sup>(145,146)</sup>. Este puede ser un mecanismo de regulación de la activación de los linfocitos T. La inducción de apoptosis en linfocitos a través de las moléculas de MHC-I no se limita al linaje de los linfocitos T sino que también se ha demostrado en las células B y en líneas promielocíticas<sup>(145)</sup> lo cual sugiere un mecanismo más general y una mayor capacidad de aplicaciones prácticas para los anticuerpos anti-MHC-I con función inhibitoria. Una de estas aplicaciones pudiera ser el tratamiento de las leucemias sensibles a la apoptosis inducida por el anticuerpo anti-MHC-I<sup>(146)</sup>.

Un grupo del Japón ha presentado interesantes resultados con un anticuerpo monoclonal anti-MHC-I en ratón<sup>(147)</sup>. El anticuerpo, que tiene especificidad por el dominio alfa 2, es capaz de inducir una muerte rápida en linfocitos T activados. Esta muerte es independiente del complemento. Demostraron que el entrecruzamiento de MHC-I con el anticuerpo también provoca agregación de moléculas de integrinas y de actina, lo que causa un desarreglo del citoesqueleto que lleva a la muerte celular. Lo interesante de este fenómeno radica en que al necesitar una alta expresión de MHC-I y de integrinas como LFA-1, el fenómeno sólo ocurre en linfocitos activados y han demostrado que con este anticuerpo pueden impedir el desarrollo de la hepatitis fulminante mediada por CTL que se produce en un modelo de ratones estimulados con ConA<sup>(147)</sup>. De confirmarse un fenómeno similar en seres humanos, los anticuerpos dirigidos contra este epítopo de MHC-I pueden ser útiles en el tratamiento de rechazos a injertos o de enfermedades autoinmunitarias.

#### **2.2.2.6. El papel coestimulador de CD70**

La molécula CD70 es un miembro de la familia del factor de Necrosis Tumoral (TNF) y está considerado el ligando natural de CD27<sup>(148-154)</sup>. El CD70 humano es una proteína transmembránica tipo II cuyo gen se localiza en 19p13. Se expresa, fundamentalmente, en linfocitos T y B activados, células NK y en algunas células tumorales<sup>(13)</sup>. En lisados de células de Burkitt su patrón de inmunoprecipitación es complejo, mostrando bandas predominantes de 29, 55, y 122-127 KD<sup>(148,149)</sup>. El CD70 de ratón fue clonado en 1997<sup>(151)</sup> y es una proteína de 195 aminoácidos que muestra una homología de un 65% con el CD70 humano.

La mayor parte de los estudios tratan a CD70 como ligando de CD27 y, por tanto, le asignan un papel pasivo en la transmisión de señales que regulan las funciones de los linfocitos<sup>(13,148-154)</sup>.

Aunque al CD70 no se le ha asignado un papel activo como proteína capaz de transmitir señales al interior de los linfocitos T citotóxicos sí se ha comprobado que puede expresarse en la membrana de células tumorales y funcionar como receptor<sup>(13,155)</sup>. También hay evidencias que indican que otros miembros de la familia del TNF pueden funcionar como correceptores capaces de transducir señales intracelulares. La agregación de CD40L en la membrana promueve la fosforilación de tirosinas en proteínas, entre las que se encuentra la fosfolipasa C- $\gamma$  y provoca liberación intracitoplasmática de Ca<sup>2+</sup><sup>(156)</sup>. Otro miembro de la familia de TNF considerado hasta hace poco como un ligando y al que se le atribuye capacidad de transmitir señales es CD30L. Wiley SR y colaboradores encontraron que al promover la agregación de CD30L con un anticuerpo

monoclonal o con una proteína quimérica CD30-Ig en neutrófilos recién extraídos, estos incrementaban la secreción de IL-8 y la explosión oxidativa. También, células T de sangre periférica respondían a la agregación de CD30L con proliferación y aumento en la secreción de IL-6. Los autores llamaron “señalización reversa” a la capacidad de este ligando para actuar como receptor, aunque como hemos visto, parece ser este un fenómeno bastante generalizado en las familias de TNF y TNFR<sup>(157)</sup>.

En cuanto a la capacidad de CD70, el otro miembro de la familia de TNF, para actuar como receptor en linfocitos T y no sólo como ligando de CD27, está el estudio realizado por Orengo y colaboradores<sup>(158)</sup> donde muestran que en ensayos de lisis redirigida, CD70 puede funcionar como receptor coestimulador, capaz de incrementar la magnitud de la citotoxicidad en clones de células NK y de linfocitos T humanos  $\gamma\delta^+$  si estos son estimulados, al mismo tiempo, a través de CD3 y de CD70, pero nunca por CD70 solamente. Sin embargo, esta investigación no incluye un análisis del papel de CD70 como molécula receptora, como pudiera ser el estudio de las vías de transmisión de señales que se activan luego de la agregación de CD70. Tampoco muestra que la lisis redirigida a través de CD70 puede ocurrir en clones  $CD8^+\alpha\beta^+$  que es el fenotipo de los CTL clásicos.

Por todo lo expuesto, parece evidente que los miembros de la familia de TNF no sólo pueden funcionar como ligandos sino también como receptores que regulan las funciones de los linfocitos T. Esta función no ha sido suficientemente estudiada para CD70.

### **2.3. Citotoxicidad inespecífica (independiente de TCR) de los CTL**

Como hemos comentado anteriormente, los clásicos CTL expresan en su membrana un receptor de antígeno  $\alpha\beta$  producto de un reordenamiento de genes, que reconoce, de forma específica, a péptidos unidos a las moléculas del MHC-I. Tradicionalmente, se ha planteado que la actividad citolítica de estas células es restringida por MHC-I. Esto implica que para que el CTL efector pueda desencadenar los mecanismos de la citotoxicidad debe ser activado a través de su receptor de antígenos, el complejo TCR-CD3. Otros receptores activadores expresados por estas células sólo tendrían un papel coestimulador y podrían modular la señal que transduce el TCR-CD3, pero nunca activar al linfocito de forma independiente a su receptor de antígeno específico. Sin embargo, hay varios reportes que indican que, en determinadas circunstancias, los CTL pueden desencadenar la citotoxicidad sin necesidad de recibir una señal generada a partir de su TCR. Esta activación inespecífica es especialmente relevante en algunas de las enfermedades autoinmunitarias y en el infarto del miocardio, lo que la convierte en un atractivo blanco para intervenciones terapéuticas.

Hace años se conoce que si los linfocitos T  $CD8^+\alpha\beta^+$  se cultivan en presencia de altas concentraciones de IL-2 o IL-15, pueden convertirse en las llamadas células citotóxicas activadas por linfoquinas o células LAK, del inglés Linfokines-Activated-Killer cells, con capacidad para presentar una actividad parecida a las NK ya que pueden matar células tumorales independientes de TCR<sup>(159,160)</sup>. Estas observaciones entraban en conflicto con el dogma de que la activación específica era la señal que

desencadenaba el mecanismo de lisis por los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, el hecho de contemplar a las células LAK como un artefacto del cultivo *in vitro* en presencia de altas concentraciones de linfoquinas, le restó atractivo al estudio de estas células por considerar poco probable su existencia en condiciones fisiológicas.

La capacidad citolítica de las células NK humanas y de ratón puede ser activada a través de su receptor NKG2D. Algunos linfocitos T CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> también expresan este receptor. Los CTL efectores que expresan NKG2D pueden ser capacitados para que realicen una citotoxicidad a través de esta molécula si se cultivan en presencia de IL-15<sup>(19-22)</sup>. Datos recientes han mostrado que los linfocitos intraepiteliales (IEL) aislados de pacientes con enfermedad celiaca se someten a la influencia de “un exceso” de IL-15 *in vivo* y, una vez en cultivo, son capaces de desencadenar la citotoxicidad a través de NKG2D, independiente de TCR. Esta activación ocurre tanto en un ensayo de lisis redirigida con la línea P815 como cuando se enfrentan con células que expresan los ligandos de NKG2D<sup>(27)</sup>. Estos hallazgos pudieran explicar, no sólo el mecanismo de generación de células LAK cuando se cultivan con IL-2 (posible sustituto de IL-15), sino que pueden tener implicaciones para la comprensión y el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias<sup>(21)</sup>.

Uno de los ligandos descritos para NKG2D en ratones, Rae-1, se expresa en los islotes pancreáticos de ratones NOD prediabéticos y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que infiltran el páncreas expresan NKG2D. El tratamiento de estos animales prediabéticos con un anticuerpo monoclonal bloqueador anti-NKG2D, previene el desarrollo de la diabetes al inhibir la proliferación y la

función de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup><sup>(161)</sup> lo que indica que la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a través de NKG2D, e independiente de TCR, puede estar jugando un papel importante en la fase efectora del desarrollo de la diabetes tipo 1. En esta enfermedad, la infiltración del páncreas por células T CD4<sup>+</sup> y la presencia de autoanticuerpos sólo causan un estado de prediabetes. Es necesaria la presencia de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> para provocar el daño definitivo a las células beta de los islotes pancreáticos<sup>(5)</sup>. En el caso de la enfermedad celíaca, la presencia de autoanticuerpos y de células T CD4<sup>+</sup>, en ausencia de activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, no es suficiente para causar el daño a la mucosa intestinal. También en este trastorno, la fase efectora parece estar mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>(162,163)</sup>. Los anticuerpos anti-gluten y anti-transglutaminasa pueden estar presente sin que existan alteraciones de la mucosa intestinal, estado conocido como enfermedad celíaca latente<sup>(163)</sup>. Los pacientes con enfermedad celíaca no tratada, se caracterizan por presentar una gran densidad de linfocitos T  $\alpha\beta^+$ CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup> infiltrando el epitelio de las vellosidades intestinales. El número de estas células disminuye notablemente luego de someter a los pacientes a una dieta libre de gluten<sup>(164)</sup>. Esto indica que pueden estar directamente relacionados con el daño a la mucosa intestinal. El aumento de la expresión de NKG2D en estos linfocitos puede favorecer la eliminación, antígeno independiente, de células epiteliales intestinales “estresadas” que expresan ligandos de NKG2D como MIC<sup>(164)</sup>.

El aumento en la expresión de NKG2D parece estar mediado por la IL-15 que se expresa en las células intestinales epiteliales de los pacientes con



enfermedad celíaca<sup>(27)</sup>. La IL-15 juega un importante papel en la expansión de los IEL y en la inducción de moléculas MIC en los enterocitos<sup>(26,165)</sup> El mecanismo que conduce a la expresión de IL-5 por los enterocitos no es bien comprendido pero hay datos que muestran que, en ausencia de una activación de las células T, el péptido p31-43 de la  $\alpha$ -gliadina induce activación de las MAP quinasas en los enterocitos y aumentan la expresión de IL-15<sup>(165)</sup>.

En la artritis reumatoide (RA), existe una correlación entre la gravedad de la inflamación articular y la presencia de una subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> que apenas existen en los individuos normales pero que se encuentran con relativa frecuencia en la sangre y en las articulaciones de los pacientes con RA<sup>(24)</sup>. Estas células expresan el receptor activador NKG2D y presentan gránulos con perforinas y granzimas en su citoplasma que le confieren capacidad citotóxica. La expresión de NKG2D se produce luego de la estimulación con IL-15 y TNF- $\alpha$ , citoquinas que abundan en las articulaciones inflamadas y en el suero de los pacientes con RA. Las células sinoviales expresan, de forma aberrante, la proteína MIC, ligando de NKG2D. La unión entre esta subpoblación de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> y las células sinoviales MIC<sup>+</sup> provoca proliferación, secreción de citoquinas y posiblemente respuesta citotóxica por las células T<sup>(25)</sup>.

NKG2D no es el único receptor activador de células NK que se expresa en linfocitos T. Receptores de la familia de los KIR también se expresan en la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. El infiltrado inflamatorio de la placa de ateroma presenta, entre otros tipos de células, macrófagos y linfocitos T. Entre estos últimos están los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> con

capacidad citolítica que expresan un KIR activador, el CD158j. Estas células T, a diferencia de la de individuos normales, también expresan la molécula DAP12, que las capacita para realizar función citotóxica a través de CD158j. Hay varios trabajos que muestran la posibilidad de que estas células maten a las células endoteliales por un mecanismo independiente de TCR y que este evento pueda ser un factor que contribuya a provocar la rotura de la placa de ateroma que conduce al infarto del miocardio<sup>(28-30,166)</sup>.

Otro grupo de receptores activadores de células NK que pueden expresarse en linfocitos T CD8<sup>+</sup> es el de la familia con similitud a las lectinas, CD94/NKG2, cuyo ligando es la molécula no clásica del MHC, HLA-E. En individuos normales, menos del 5% de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> expresan este receptor<sup>(18)</sup>. Cuando se cultivan células 721.221, transfectadas con HLA-E, en presencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD94/NKG2C<sup>+</sup>, se induce la expresión en estas últimas de CD25 y se produce su proliferación. La misma respuesta proliferativa ocurre cuando se estimulan los linfocitos T CD8<sup>+</sup>CD94/NKG2C<sup>+</sup> con un anticuerpo anti-CD94<sup>(23)</sup>. Los clones de CTL CD94/NKG2C<sup>+</sup> expresan la molécula KARA/DAP12, que es quien conecta al receptor con los sistemas de transducción de señales. El anticuerpo anti-CD94 co-precipita a este receptor con la molécula KARA/DAP12 en estos clones de células T. La agregación de CD94/NKG2C en la membrana de estas células provoca respuesta citotóxica, secreción de citoquinas y proliferación, de una forma independiente al TCR<sup>(23)</sup>.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Identificación de receptores que desencadenen la citotoxicidad inespecífica en un clon de linfocitos T citotóxicos humanos**

##### **3.1.1. Reactivos, citoquinas y anticuerpos monoclonales**

El medio de cultivo utilizado fue el RPMI 1640 (Life Technologies Laboratories, Grand Island, NY, USA), con L-glutamina 2 mM (Gibco, Life Technologies Laboratories, Grand Island, NY USA), 10% v/v de suero fetal bovino (Gibco, Life Technologies, Grad Island, NY, USA) y penicilina estreptomycin al 1%. La IL-2 (donación de Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ, USA) se usó en un rango entre 10 y 50 U/mL. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: Anti-CD25 de Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA); anti-CD16, KD1, gentilmente proporcionado por el Dr. Alessandro Moretta (Universidad de Génova, Italia); anti-CD29 y anti-CD3 SpVT3b (T3b), gentilmente donados por el Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, España) y el anti-CD70 (QA32) y anti-CD26 (QA839), se obtuvieron en nuestro laboratorio como se describe en esta Tesis. Los anticuerpos anti-quinasa extracelular fosforilada (anti-P-ERK) fueron suministrados por Promega (Madison, WI, USA) y el anticuerpo anti-pan-ERK por Zymed (San Francisco, CA, USA). Los anti-pam-Akt y anti-fosfo-Akt fueron de Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Los anti-IgG de ratón y conejo conjugados con peroxidasa de

Pierce (Rockford, IL, USA) y los F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG de ratón en cabra de Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA ).

### **3.1.2 Cultivo de líneas celulares y obtención y cultivo de clones de linfocitos T humanos**

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: Jurkat, que es una línea celular leucémica de linfocitos T, las células COS-7, que es una línea renal de monos verdes africanos, el mastocitoma de ratón P815 que expresa receptores Fc- $\gamma$  en su membrana, la línea linfoblastoidea humana LG2 que son células B transformadas con el EBV. Todas se cultivaron en medio RPMI 1640 con 10% v/v de suero fetal bovino, glutamina a 2 mM y penicilina/estreptomicina al 1%. Las células Jurkat transfectadas se cultivaron en presencia de G418 a 1 mg/mL (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron a partir de sangre humana fresca, procedente de donantes sanos, que fue sometida a un gradiente de centrifugación por densidad con Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia). El cultivo mixto de linfocitos y la obtención de los clones de células T se realizó conforme a métodos descritos previamente<sup>(43,167)</sup>. Se mezclaron 10<sup>6</sup> células mononucleares de sangre periférica con 5 x 10<sup>4</sup> células linfoblastoideas LG2 irradiadas (6000 rads) y 10<sup>6</sup> células de bazo humano irradiadas (4000 rads) como células estimuladoras. Diez días después, las células que respondieron a la estimulación fueron clonadas por dilución límite y sembradas a concentraciones de 5; 2,5; 1,2; 0,6 y 0,3 células por pocillo en placas Terasaki de fondo redondo que contenían 2 x 10<sup>5</sup> células linfoblastoideas irradiadas y 2 x 10<sup>5</sup> células de bazo irradiadas en

presencia de IL-2 50 U/mL. Estos cultivos se dejaron crecer por 7 días. Luego se seleccionaron aquellos clones que crecieron en placas donde había menos de un 63% de pozos con células en crecimiento. Estos clones se expandieron a una concentración de  $10^5$  células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo que contenían células de bazo y LG2 irradiadas como se indica arriba e IL-2 a una concentración de 50 UI/mL. En todos los experimentos, los clones fueron utilizados dos o tres semanas después de la última restimulación. El clon K14B06 se obtuvo a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano. Este clon tiene un fenotipo  $CD3^+\alpha\beta^+CD94^+$  y sus características han sido descritas en otros trabajos<sup>(43,168)</sup>. El clon K14B06 reconoce, a través de su TCR, a la molécula HLA-E<sup>(168)</sup>.

### **3.1.3. Obtención de anticuerpos monoclonales contra moléculas que inducen la citotoxicidad independiente de TCR en linfocitos T citotóxicos humanos**

Se inmunizaron ratones hembras BALB/c con  $10^7$  células del clon K14B06 por vía intraperitoneal en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y en un volumen de 0,5 mL. Se administraron 3 dosis con un intervalo de 20 días entre cada dosis. Veinte días después de la última dosis, a cada ratón se le administró una inyección intravenosa en la vena de la cola con  $5 \times 10^6$  células del mismo inmunógeno en PBS en un volumen de 0,2 mL. En todos los casos las células se lavaron tres veces con PBS antes de ser administradas. Los ratones se sacrificaron tres o cuatro días después de la inyección intravenosa y se les extrajo el bazo en condiciones estériles. Los esplenocitos se mezclaron con el mieloma P3X63 y polietilenglicol

según el método clásico para obtención de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos de interés se seleccionaron con el ensayo de lisis redirigida que se describe a continuación.

**Ensayo de lisis redirigida:** Es un típico ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  como se ha descrito anteriormente<sup>(168)</sup>. Se incubaron  $5 \times 10^5$  células P815 marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ , por 15 minutos, con el sobrenadante del cultivo de los hibridomas o los anticuerpos controles como el anti-CD3, como control positivo y varios controles negativos, entre ellos IgG de ratón. A continuación, las células P815, con los AcM en su membrana, se incubaron con células efectoras (clon K14B06) a una proporción efector:diana de 2:1 por 4 h a  $37^\circ\text{C}$  en un volumen total de  $150 \mu\text{L}$  en placas de 96 pocillos de fondo en "V" (Costar, NY, USA). Luego se centrifugaron las placas a 120 g por 5 minutos, se colectó el sobrenadante y se midió la radiactividad en un contador gamma Packard Cobra II (Downers Grove, IL, USA). El porcentaje de lisis específica (LE) se calculó de la siguiente forma:  $LE = 100 \times (E - C / T - C)$  donde E son las cuentas por minutos (c.p.m.) donde están las células diana y las efectoras con los anticuerpos, C son las cuentas de pocillos con células diana pero con medio solamente, T es la liberación de  $^{51}\text{Cr}$  en los pocillos con células diana y  $100 \mu\text{l}$  de HCL 0,1 M que corresponde a la liberación máxima de  $^{51}\text{Cr}$ . El valor de C nunca fue superior al 33% del de T.

Se seleccionaron los hibridomas que producían anticuerpos capaces de provocar una lisis específica superior al 20%, estos fueron clonados y reclonados por dilución límite para estabilizar su capacidad de secretar y garantizar la monoclonalidad.

Para determinar la identidad de la molécula a la que estos anticuerpos se unían se utilizaron diferentes aproximaciones. Primeramente, se hizo un análisis de la expresión del antígeno mediante la inmunofluorescencia utilizando varias líneas celulares y clones de células T. De esta forma, podíamos tener una sospecha de la molécula que reconocían los AcMs. Luego se realizó la confirmación de la especificidad del AcM a través de ensayos de fluorescencia e inmunoprecipitación y western blot con células transfectadas con el gen del probable antígeno.

#### **3.1.4. Estimulación de las células, inmunoprecipitación y ensayo de Western blot**

Las células COS-7, transfectadas de forma transitoria con el gen de CD70 humano, se lisaron en un tampón de lisis que contenía polioxietileno-10-oleil éter (Brij-96) al 1% e inhibidores de fosfatasa y proteasas (Brij-96 1%, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, Na-vanadato 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y yodoacetamida 5 mM). El extracto celular se incubó con el anticuerpo anti-CD70 (QA32) 10 µg/mL por 2 h a 4°C, los inmunocomplejos formados se separaron con perlas de proteína G-Sepharose (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Para la estimulación de las células con anticuerpos,  $1 \times 10^6$  células por muestra se incubaron a 37°C por diferentes intervalos de tiempo con los anticuerpos QA32, T3b o IgG de ratón (todos a una concentración de 1 µg/mL) y luego se añadió el anti-IgG de ratón 5 µg/mL para favorecer la agregación, en cada caso se ensayó además, como control, el anti-IgG de ratón sin el primer anticuerpo. El forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) se usó a 100 ng/mL. Luego de diferentes intervalos de tiempo, las células se trataron con

tampón de lisis que contenía Nonidet P-40 1% en presencia de inhibidores de proteasas y de fosfatasas (Tris-HCl a 50 mM, pH 7.4, Nonidet P-40 al 1%, NaVI a 137.5 mM, glycerol al 1%, 1 mM ortovanadato de sodio 1mM y 0,5 mM de EDTA, pH 8) Tanto los lisados celulares de las células estimuladas con anticuerpos como los inmunoprecipitados con anti-CD70 se analizaron en una electroforesis con un gel de poliacrilamida en duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10 % y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Bedford, MA).Las membranas se bloquearon con leche desgrasada 5% en tampón Tris/Tween 20 (TBST: Tris 10 mM, pH 7,8 NaCl 150 mM con Tween 20 0,05%) y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo indicado en TBST con leche 5%. El revelado se realizó con un anticuerpo anti-IgG de ratón en cabra conjugado con peroxidasa (Pierce, Rockford, IL, USA) y visualizado con el kit de quimioluminiscencia (Pierce, Rockford, IL, USA).

### **3.1.5. Detección de la movilización intracitoplasmática de Ca<sup>2+</sup>**

La medición de Ca<sup>2+</sup> se realizó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) y se utilizó el Fluo-3 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) como sonda fluorescente sensible al calcio como se ha descrito en otra publicación<sup>(43)</sup>. Las células se resuspendieron en una solución salina balanceada de Hank (HBSS) a una concentración de 3 x 10<sup>6</sup> células/mL que contenía HEPES a 10 mM y entonces se añadieron 25 µL de Fluo-3/AM 250 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y se incubaron por 20 minutos a 37°C. Luego se lavaron las células con HBSS Las células marcadas, 5 x 10<sup>6</sup>, se estimularon en un volumen final de 1,5 mL con F(ab')<sub>2</sub> de QA32 (40 µg/mL), T3b(10 µg/mL) o el control de IgG (10 µg/mL). En algunos



casos se añadió anti-IgG de ratón como segundo anticuerpo. La concentración intracelular de calcio se midió con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) y el programa CellQuest.

### **3.1.6. Inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo**

Las células se incubaron a 4°C en medio de cultivo, con concentraciones saturantes de los diferentes anticuerpos monoclonales o sobrenadantes de cultivo, luego de lavarlas con PBS a 4°C se incubaron durante 20 minutos a 4°C con un anti-IgG-ratón en cabra conjugado con isotiocinato de fluoresceína, FITC (Dako-patts, Glostrup, Dinamarca). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Mountain View, CA, USA) con el programa Cell Quest.

### **3.1.7. Detección de la secreción de TNF- $\alpha$**

Se cultivaron  $2,5 \times 10^5$  células por pozo del clon K14B06 con  $10^5$  células P815 por 18 horas en una placa de 96 pocillos en presencia o ausencia de anti-CD3, anti-CD70, anti-CD29 o IgG1 como control a una concentración final de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Luego se recolectaron los sobrenadantes y se midió la concentración de TNF- $\alpha$  humano con un inmunoensayo tipo EISA utilizando el kit OptEIA (PharMingen, San Diego, CA, USA).

### **3.1.8. Plasmidios y transfecciones**

La secuencia del gen de CD70 humano con un epítopo FLAG en el extremo C-terminal fue subclonada en el plasmidio pCDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El plasmidio pCDM8-CD27 fue donado por el Dr. Brian Seed (Massachusetts General Hospital y Harvard Medical School, Boston, MA, USA). La generación del plasmidio pJFEE14-CD94 ha sido

descrita anteriormente<sup>(169)</sup>. El vector PCDM8 fue adquirido de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). La línea COS-7 fue transfectada de forma transitoria por electroporación. Se le administró un pulso de 975  $\mu$ F y 200 V en un electroporador Bio-rad a  $3 \times 10^6$  células en 0,2 mL de medio completo. Luego de la electroporación, las células se sacaron y resuspendieron en 10 mL y se cultivaron con medio completo. La transfección de la línea Jurkat con el vector pCDA3-CD70/FLAG o con un vector sin la secuencia de CD70 (pCDA3) también se realizó por electroporación. Se administró un pulso de 1200  $\mu$ F y 280 V en presencia de 15  $\mu$ g de ADN plasmídico. Las células transfectadas de forma estable fueron seleccionadas en medio con 1 mg/mL de G418 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Los clones CD70/FLAG se obtuvieron haciendo cultivos en dilución límite y luego se seleccionaron por inmunofluorescencia y citometría de flujo.

### **3.1.9. Ensayos con genes reporteros**

Las células Jurkat y Jurkat-CD70FLAG se electroporaron (950  $\mu$  F, 260 V) con un plasmidio reportero de la luciferasa (Luc) (0.5  $\mu$ g/ $10^6$  células) que contenían tres copias consecutivas del sitio del promotor de IL-2, Factor Nuclear de Células T Activadas (3X NFTA-Luc) o el promotor del TNF- $\alpha$  humano<sup>(170)</sup> y con el plasmidio de expresión de la Renilla luciferasa para la normalización de la eficiencia de transfección<sup>(171)</sup>. Veinticuatro horas más tarde se estimularon las células con diferentes anticuerpos monoclonales en presencia de la línea P815 o de células COS-7 transfectadas de forma transitoria con el plasmidio pCDM8-CD27. Luego de 8 horas de estimulación, las células se lisaron en un tampón de lisis 5X (Promega) y se ensayaron utilizando el kit dual reportero de luciferasa.

(Promega). La actividad de luciferasa se leyó en un luminómetro y es expresada como unidades de luz relativa por segundo (RLU/s).

### **3.2. Identificación de receptores que inhiben la citotoxicidad inespecífica en el clon de linfocitos T citotóxicos humanos K14B06**

Como el clon K14B06 es capaz de desencadenar la citotoxicidad a través de CD94 y CD70, independiente de TCR, decidimos buscar moléculas en su membrana capaces de generar señales que inhibieran esta citotoxicidad inespecífica. Con este propósito, se ensayaron varios anticuerpos monoclonales que se unían a moléculas de membrana de linfocitos T humanos expresadas por el clon K14B06. El objetivo era comprobar si al añadir uno de estos anticuerpos en el ensayo de lisis redirigida, conjuntamente con un anticuerpo estimulador anti-CD94, se producía una inhibición de la lisis generada por este último. Los anticuerpos ensayados, conjuntamente con el anti-CD94, fueron los siguientes: anti-CD2 (TS2/18) anti-CD7 (3A1) obtenidos de la American Type Culture Collection, ATCC, (Manassas, VA, USA); el anti-CD28 (9.3) fue gentilmente donado por Bristol-Myers (Seattle, WA, USA); anti-CD43 (TP 1/36), anti-CD44 (4HP2/9), anti-CD45 (D3/9), anti-CD50 (HP2/19), anti-CD54 (D3/9), anti-CD11a (TP1/40) anti-MHC-I (HP-1F1, IgG1) y anti-CD69 (TP 55.3), donación del Dr. F. Sanchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid, España); anti-CD48 (IOL48) y anti-CD54 (IOL54) fueron de Immunotech (Luminy, Francia). Todos se utilizaron a una concentración final de 1,7 µg/mL conjuntamente con el anti-CD94, a la misma concentración en un ensayo de lisis redirigida similar al que se describe en la sección 3.1.1 y se seleccionaron, para una posterior

caracterización, aquellos que inhibían en más de un 80% la lisis desencadenada por anti-CD94.

Otros anticuerpos utilizados fueron el W6732 (IgG2a anti-MHC-I), que reconoce un determinante monomórfico de las moléculas del MHC-I y ME-1 (anti-HLA-B27) de ATCC; el anti-H2D<sup>d</sup> (anti-MHC-I de ratón) de BD (San Diego, CA, USA), Los anti-CD16 y anti-Ig de ratón conjugado con FITC y PE de Caltag (Burlingame, CA, USA); el 3B1 (IgG2a anti-CD94), descrito anteriormente<sup>(172)</sup>, y el Hp1F7 (IgG1 anti-MHC-I), fueron donados por el Dr. Miguel López-Botet (Unidad de Inmunología Molecular, DCEXS, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España). Los controles de isotipo de inmunoglobulinas fueron de Sigma-Aldrich (St Louis, USA).

### **3.2.1. Inhibición de la citotoxicidad inespecífica por anticuerpos monoclonales**

Este ensayo es similar al de lisis redirigida descrito en la sección 3.1.3. con la excepción que las células diana, marcadas con <sup>51</sup>Cr, fueron incubadas con el anticuerpo anti-CD94 y los diferentes anticuerpos monoclonales mencionados en la sección anterior (a una concentración final de 1,7µg/mL) por 30 minutos, antes de añadir el clon K14B06 a una relación efector:diana de 2:1.

### **3.2.2. Estimulación de las células con anticuerpos**

Para inmovilizar los anticuerpos estimuladores se recubrieron placas de fondo plano con un anti-Ig de ratón en oveja (7,5 µg/mL en Tris-HCL 0,1 M, pH 8,2; Sigma. St. Louis, MO, USA), 40 µL/pocillo y se incubaron durante toda la noche a 4°C. La placa se lavó con PBS y luego se añadieron 50 µL del anticuerpo en forma de sobrenadante de cultivo o

anticuerpos purificados, a 5 µg/mL. Estos anticuerpos se incubaron por una hora a temperatura ambiente y después la placa se lavó tres veces con PBS. Una vez que la placa estaba revestida del anticuerpo estimulador se añadieron  $10^7$  células del clon K14B06 en cada pozo con medio que contenía IL-2 (10 U/mL).

### **3.2.3. Ensayo de inhibición con dianas “frías”**

La inhibición con “dianas frías” (células P815 sin marcar con  $^{51}\text{Cr}$ ) se llevó a cabo de forma similar al ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  descrito en la sección 3.1.2, excepto que se incubaron diferentes cantidades de células (línea P815) no marcadas, con células efectoras (K14B06) durante cuatro horas en presencia de diferentes anticuerpos monoclonales. Luego se añadieron las células diana (LG2) marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  y a las cuatro horas se midió la radiactividad en el contador gamma. El objetivo de este experimento es evaluar si la unión previa del clon K14B06 con las células P815 y el anticuerpo anti-MHC-I provoca apoptosis en el K14B06 de modo que el clon de células T no pueda luego lisar a las células de la línea LG2 marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ .

### **3.2.4. Ensayo de reordenamiento del centro organizador de microtúbulos (MTOC)**

El objetivo de este experimento es comprobar si la agregación, con un anticuerpo monoclonal, de las moléculas de MHC-I en la membrana del clon K14B06 inhibe el reordenamiento del MTOC. Este ensayo fue realizado por el Dr. David Sancho en el Laboratorio del Dr. Francisco Sánchez-Madrid del Hospital de la Princesa de Madrid de forma similar a la descrita<sup>(174)</sup>. Se incubaron  $10^7$  perlas de poliestireno (Sigma), de un

diámetro de 6,4  $\mu\text{m}$ , a temperatura ambiente con los anticuerpos anti-CD3, anti-MHC-I o anti-CD94 (todos a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en rotación continua. Luego se saturaron las perlas con albúmina bovina al 1% en PBS, se lavaron y guardaron a 4°C hasta su uso. Para el ensayo de conjugación perlas-células se mezclaron las perlas recubiertas de anticuerpos y el clon K14B06 en una proporción 1:1 en medio de cultivo y se dejaron interactuar por 15 minutos. Luego, los conjugados perlas-células se resuspendieron suavemente y se colocaron sobre un portaobjetos recubierto con poli-L-lisina, donde se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Para fijar las células y hacerlas permeables, estas se incubaron durante 5 minutos en una mezcla de formaldehído al 2% -Triton X-100 al 0,5 % en PBS y luego se tiñeron con un anticuerpo anti-alfa-tubulina (Sigma, dilución 1:3000) para su observación en el microscopio de fluorescencia. Se consideró que el centro organizador de los microtúbulos estaba reorientado cuando se localizó en la proximidad de la perla entre el núcleo y la membrana del clon de células T. Se contaron, al menos, 200 conjugados en cada experimento.

### **3.3. Análisis estadístico**

El análisis estadístico utilizado para examinar las diferencias en la inhibición de la citotoxicidad representados en las Figuras 11 y 14 fue el test de rangos con signos de Wilcoxon para muestras pareadas. El examen de las diferencias de las medias de porcentajes de lisis específica y secreción de TNF representados en las Figuras 3 y 4 fue realizado con un análisis de varianza (ANOVA) completamente aleatorio y se compararon las medias mediante el test de Student-Newman-Keuls.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Identificación de receptores que desencadenen la citotoxicidad independiente de TCR en un clon de linfocitos T citotóxicos humanos**

#### **4.1.1. Obtención de anticuerpos monoclonales contra receptores que desencadenen la citotoxicidad independiente de TCR en un clon de linfocitos T citotóxicos humanos**

Se inmunizaron 15 ratones con el clon K14B06. Se extrajeron los bazos y los esplenocitos fueron inmortalizados mediante la fusión con la línea de mieloma P3X63. Cada bazo tenía, aproximadamente,  $10^7$  esplenocitos, por lo que se sembraron en total unos 15 000 pocillos. Los pocillos con crecimiento de hibridomas fueron ensayados para determinar si contenían anticuerpos capaces de inducir lisis redirigida con la línea P815 y el clon K14B06. En nueve de los 13 500 pozos ensayados se encontraron anticuerpos capaces de inducir una lisis específica superior al 20%. En la Tabla 1 se muestran algunas de las características de los anticuerpos obtenidos.

Luego de clonar los hibridomas por dilución límite para estabilizar su capacidad de secreción, procedimos a determinar la identidad de la molécula que reconocían los anticuerpos.

Los ensayos de inmunofluorescencia con diferentes líneas y clones celulares nos permitieron comprobar que tres de los anticuerpos estaban dirigidos contra

determinantes de TCR específicos del clon K14B06, pues sólo teñían a este clon y no a otros clones de linfocitos T humanos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> ni a células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos.

**Tabla 1. Características de los anticuerpos monoclonales obtenidos**

Anticuerpo	Isotipo	% de lisis específica*	Antígeno
QA106	IgG1	95	TCR
QA790	IgG1	98	TCR
QA219	IgG2a	97	TCR
QA839	IgG1	33	CD26
7-A9	ND	30	CD26
QA32	IgG1	61	CD70
QA371	IgG1	52	CD70
8B10	ND**	36	CD94
2H7	ND	40	CD94

\* El porcentaje de lisis específica que se muestra proviene de un experimento de 7 con resultados similares. La relación efector:diana fue 2:1.

\*\* ND significa que no se determinó el isotipo del anticuerpo.

Además, como se observa en la Tabla 1, la citotoxicidad que desencadenaron estos anticuerpos en el ensayo de lisis redirigida fue superior al 90% de lisis específica, similar a la que se obtiene con los anticuerpos controles anti-CD3. Estos anticuerpos fueron caracterizados con mayor profundidad por otros miembros del grupo<sup>(168)</sup>.

Dos anticuerpos fueron específicos para CD94, otros dos para CD26 y los dos restantes se unían a CD70. Los anticuerpos anti-CD94 pueden reconocer al heterodímero CD94/NKG2C o a un heterodímero activador CD94/NKG2H expresado por el clon K14B06 y descrito previamente por otros miembros del grupo<sup>(43)</sup>. Para determinar la especificidad de los anticuerpos anti-CD26 se realizó una inmunofluorescencia con células Jurkat transfectadas con un vector que contenía el gen de CD26 humano y otras transfectadas con el vector vacío.



Los anticuerpos 838 y 7-A9 sólo reconocieron a las células Jurkat transfectadas con CD26.

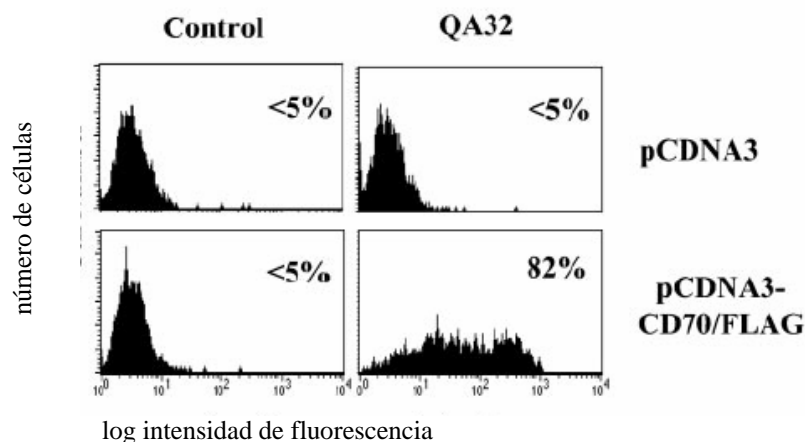
Debido a que el papel de TCR y CD26 como receptores activadores y coestimuladoras, respectivamente, ha sido ampliamente estudiado, y la capacidad de CD94 para desencadenar la lisis independiente de TCR en el clon K14B06 fue reportada recientemente<sup>(43)</sup>, los anticuerpos dirigidos contra estas moléculas no fueron sometidos a una posterior caracterización. Sin embargo, el hecho que dos de los anticuerpos obtenidos se unieran a CD70 nos hizo sospechar en una posible función de esta molécula como receptor activador. La principal función asignada a CD70 ha sido como ligando de CD27, por tal motivo, nuestro estudio se dirigió hacia una caracterización más profunda del papel de CD70 como molécula de membrana capaz de transmitir señales al interior de los linfocitos T citotóxicos. Para este fin utilizamos uno de los dos anticuerpos obtenidos: el QA32.

#### **4.1.2. El anticuerpo QA32 es específico para CD70 humano**

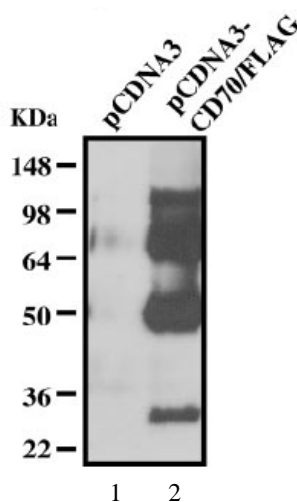
Los ensayos de inmunofluorescencia con la línea celular COS-7 transfectada con un plasmidio que codificaba para CD70 humano mostraron que el anticuerpo QA32 teñía, específicamente, a estas células y no a su contraparte sin transfectar o a las transfectadas con el vector vacío (Figura 1).

La especificidad de QA32 para CD70 humano también se comprobó con los resultados del experimento de inmunoprecipitación donde se observa (Figura. 2) que este anticuerpo es capaz de inmunoprecipitar al CD70 a partir de un lisado de células COS-7 transfectadas con el gen que codifica para esta

molécula. El patrón de bandas que se obtiene se corresponde con lo previamente descrito<sup>(148-150)</sup>. Se observa una banda de unos 29 KD en lo que corresponde a monómeros de CD70 y otras bandas adicionales de mayor peso molecular, posiblemente producto de la formación de dímeros o trímeros.



**Figura 1. El anticuerpo monoclonal QA32 reconoce específicamente a CD70 humano.** Las células COS-7 fueron transfectadas con el vector vacío pCDNA3 o con el vector pCDND3-CD70/FLAG. La inmunofluorescencia indirecta se realizó 48 horas después con al anticuerpo QA32 o el sobrenadante del mieloma P3X63 (Control) como control negativo. Se muestran los resultados de un experimento de 5 con resultados similares.

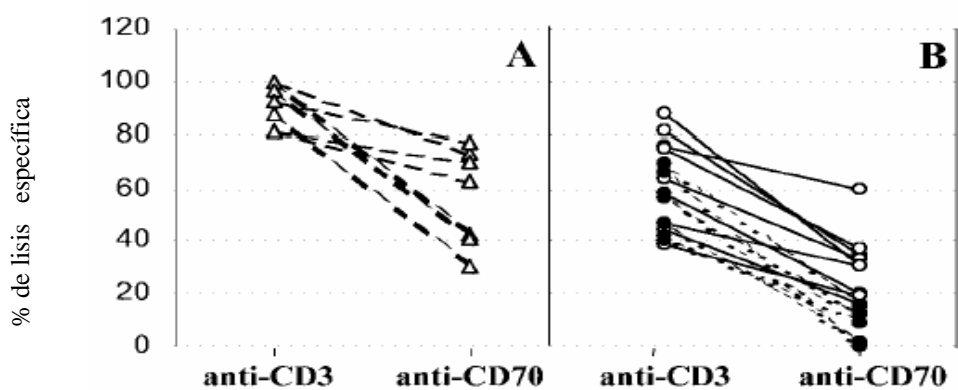


**Figura 2. El anticuerpo QA32 precipita a la molécula CD70 expresada transitoriamente en la línea COS-7.** Un lisado de las células transfectadas de forma transitoria con el vector vacío (Columna 1) o con el vector pCDNA-CD70/FLAG (Columna 2) fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo QA32, después sometidos a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones de no reducción y transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La detección de CD70 en la membrana se realizó con un anticuerpo anti-FLAG M2. Se muestra un experimento de dos con resultados similares.

#### **4.1.3. El anticuerpo anti-CD70 (QA32) desencadena la lisis redirigida en varios clones de células T humanas**

Debido a las características especiales del clon K14B06, pudiera pensarse que la lisis inespecífica que se produce luego de la agregación del CD70 en su membrana es un fenómeno exclusivo de este clon. Por tal motivo, decidimos evaluar si la activación de la citotoxicidad a partir de la agregación de CD70 podía ocurrir en otros clones de linfocitos T. Para ello seleccionamos varios clones, obtenidos en el laboratorio de acuerdo a lo indicado en Materiales y Métodos, con la premisa de que expresaran CD70 en su membrana. Esto último se determinó por inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo QA32. Unos clones tenían fenotipo  $CD3^+ \gamma\delta^+$ , otros  $CD3^+ \alpha\beta^+ CD4^+$  y otros  $CD3^+ \alpha\beta^+ CD8^+$ . Con cada uno de ellos se realizó el ensayo de lisis redirigida similar al que se hizo con el clon K14B06.

Tanto los clones T  $CD3^+ CD8^+ \alpha\beta^+$  como los  $CD3^+ \gamma\delta^+$  desencadenaron una lisis específica superior al 20% con el anticuerpo anti-CD70. La magnitud de la lisis, aunque variable en los distintos clones de células T, fue menor que la que provocó el anti-CD3 ( $p=0.01$ ) pero superior al control negativo de anti-IgG de ratón ( $p=0.01$ ) que nunca sobrepasó el 4% (Figura. 3). Sin embargo, los clones T  $CD3^+ CD4^+ \alpha\beta^+$ , apenas respondieron al anti-CD70 mientras continuaban produciendo lisis cuando eran activados con un anti-CD3. (Figura. 3). La media del porcentaje de lisis específica en los diferentes clones  $CD3^+ CD4^+ \alpha\beta^+$ , estimulados con anti-CD70, no fue diferente al control negativo de IgG de ratón pero sí fue superior ( $p=0.01$ ) cuando se estimularon con el anti-CD3.

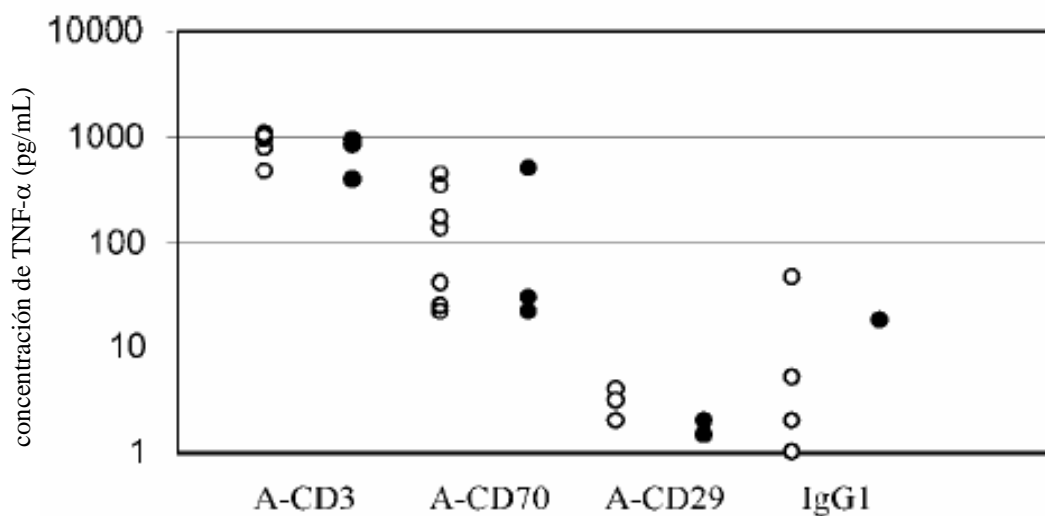


**Figura 3. El anticuerpo anti-CD70 (QA32) desencadena la lisis redirigida en varios clones de células T humanas.** Se mezclaron diferentes clones de linfocitos T humanos (A- Clones CD70<sup>+</sup>γδ<sup>+</sup> (Δ) y B- Clones CD70<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> (○) ó CD70<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> (●) ) con la línea celular P815 marcada con <sup>51</sup>Cr en presencia del anticuerpo anti-CD70 (QA32), anti-CD3 (T3b) o IgG de ratón a una concentración final de 1.8 μg/mL y se incubaron por cuatro horas a 37°C. Luego se extrajo el sobrenadante, se midió la radiactividad y se calculó la lisis específica. La relación efector:diana fue 2:1. La lisis específica en presencia de IgG de ratón fue siempre menor que 4%. Las líneas que unen los símbolos se usan para parrear los resultados de cada clon con el anti-CD70 o el anti-CD3. Se muestran los resultados de un experimento de cinco con similares resultados.

#### 4.1.4. La activación de clones de linfocitos T mediante la agregación de CD70 con QA32 es capaz de provocar secreción de citoquinas como el TNF-α y aumentar la expresión de CD25

Una vez demostrado que la agregación de CD70 con el anticuerpo QA32 puede activar los mecanismos de lisis inespecífica en clones de linfocitos T citotóxicos pasamos a comprobar si esta señal era capaz de generar otros procesos relacionados con la activación celular como la secreción de TNF-α y el aumento en la expresión de CD25. Cuando el anticuerpo anti-CD70 se inmovilizó en la superficie del plástico en una placa de 96 pocillos, y luego se añadieron los clones de linfocitos T, no se observó ni aumento en la secreción de TNF-α ni en la expresión de CD25, contrariamente a lo que ocurrió con otros receptores

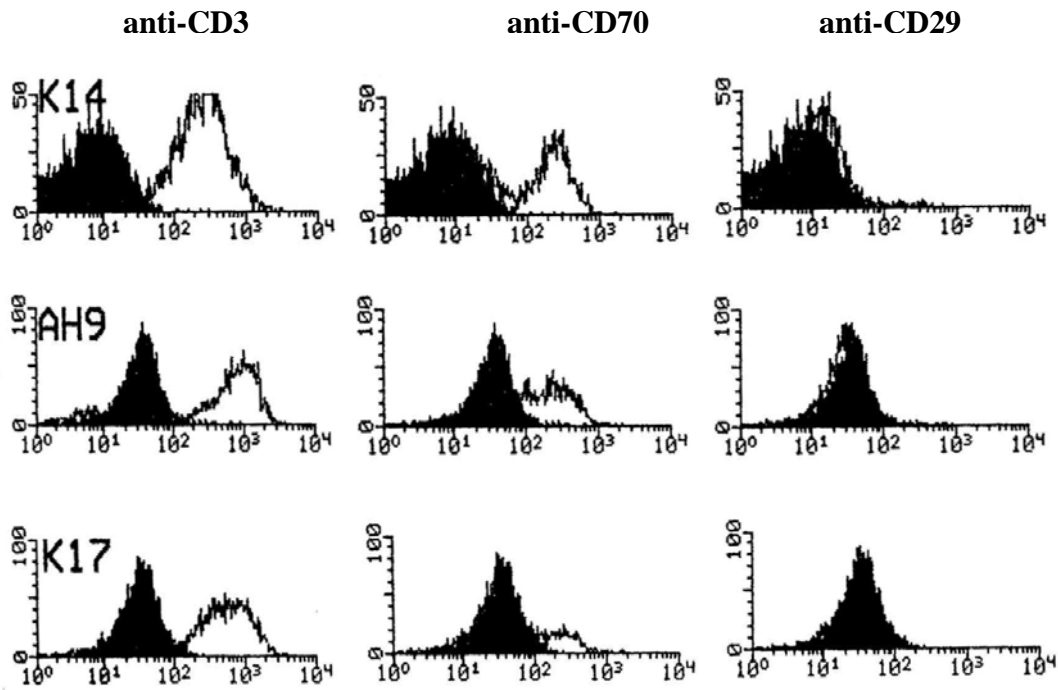
activadores como CD3 o CD16. Sin embargo, cuando la estimulación de los clones de células T se realizó con el anti-CD70 unido a la membrana de las células P815, de forma similar al experimento de citotoxicidad reversa, sí se observó un aumento en la secreción de TNF- $\alpha$ .(Figura 4) y en la expresión de CD25 (Figura 5).



**Figura 4. La unión del anticuerpo anti-CD70 (QA32) a clones de linfocitos T humanos induce la secreción de TNF- $\alpha$ .** Se incubaron diferentes clones de células T, CD70<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>(○) ó CD70<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>(●) a una concentración final de 250 000 células/pocillo con células P815 (100 000 células/pocillo) por 18 horas a 37°C en presencia de anti-CD3 (T3b), anti-CD70 (QA32), anti-CD29 (TS1/16) ó IgG de ratón a una concentración final de 2  $\mu$ g/mL. Luego se recolectó el sobrenadante y se midió la concentración de TNF- $\alpha$  mediante un inmunoensayo tipo ELISA con el Kit OptEIA de PharMingen. Se muestran los resultados de un experimento de tres con resultados similares.

La secreción de TNF- $\alpha$  en clones de linfocitos T, luego de la estimulación a través de CD70, fue significativamente menor ( $p=0.01$ ) que la que se produjo después de la estimulación a partir de CD3 pero mayor que el control negativo ( $p=0.01$ ) representado por un anticuerpo no relacionado contra otra molécula de membrana (anti-CD29). Bajo estas mismas condiciones de experimentación, también aumentó la expresión de CD25 luego de la estimulación de algunos

clones de linfocitos T, incluyendo al K14B06, con el anticuerpo anti-CD70 (Figura 5).

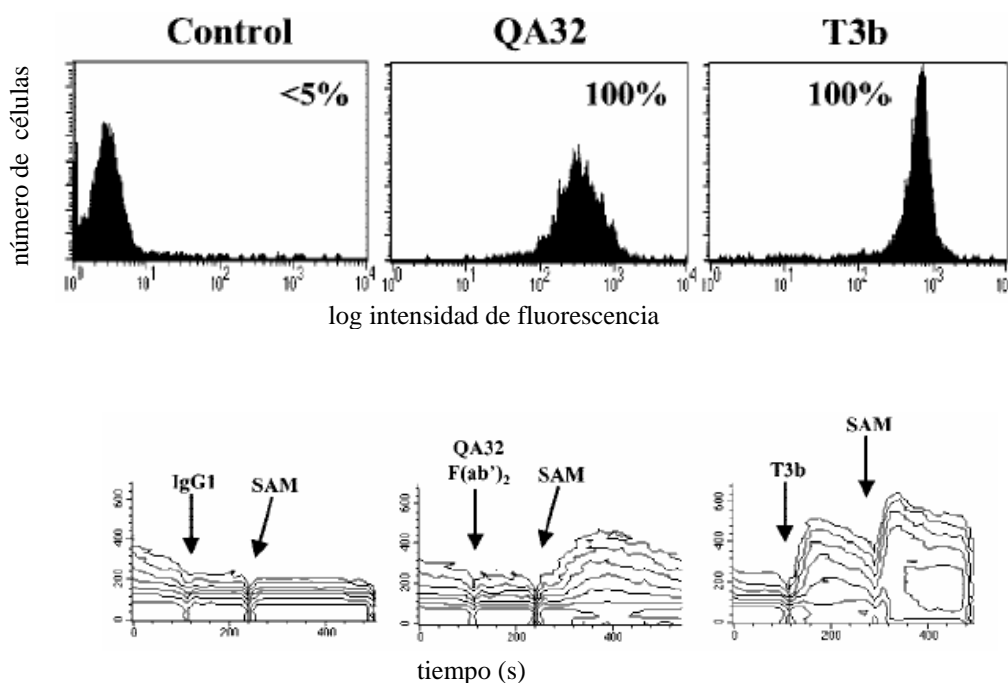


**Figura 5.** La estimulación de clones de linfocitos T con el anticuerpo anti-CD70 (QA32) provoca un aumento en la expresión de CD25. Se mezclaron 250 000 células de cada clon de linfocitos T (K14, AH9 o K17) con 100 000 células de la línea P815 en placas de 96 pocillos en medio de cultivo y se incubaron a 37°C por 24 h en presencia de los anticuerpos que se indican (anti-CD3, anti-CD70 o anti-CD29 como control negativo). Luego se lavaron las células y se tiñeron por inmunodeficiencia indirecta con un anti-CD25. Se muestran resultados de un experimento de cinco con datos similares.

#### 4.1.5. La agregación de CD70 provoca movilización de $Ca^{2+}$ intracitoplasmático

Entre los eventos tempranos que ocurren luego de la estimulación de los linfocitos a través de receptores activadores como TCR-CD3 están la movilización de  $Ca^{2+}$  intracitoplasmático. Pudimos comprobar que la agregación de las moléculas de CD70 con el anticuerpo monoclonal QA32 provocó la

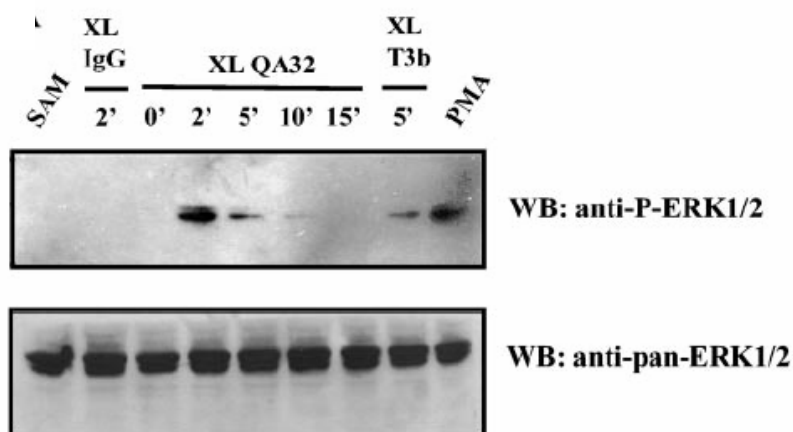
liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el clon T K14B06 (Figura 6). Sin embargo, para que el anticuerpo QA32 indujera la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  fue necesario aumentar la agregación añadiendo un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón mientras que el anticuerpo anti-CD3 (T3b) no necesitó del segundo anticuerpo para producir el mismo efecto.



**Figura 6. La agregación de CD70 en la superficie del clon K14B06 con el anticuerpo QA32 provoca movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmático.** En el panel superior se muestra la expresión de CD70 y CD3 en el clon K14B06 tal como se determinó por inmunofluorescencia indirecta con los anticuerpos anti-CD3 (T3b), anti-CD70 (QA32) o el sobrenadante del mieloma P3X63 como control negativo. El segundo anticuerpo fue anti-Ig de ratón-FITC. En el panel inferior mostramos la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmático del clon K14B06 luego que estas células fueron marcadas con Fluo-3AM y estimuladas con los anticuerpos anti-CD70 (QA32), anti-CD3 (T3b) o IgG de ratón. Luego se añadió un segundo anticuerpo anti-IgG de ratón (SAM) para aumentar el entrelace. Las flechas indican el momento en que se añadió el anticuerpo. El eje de las “Y” representa la intensidad relativa de la fluorescencia. Se muestra un experimento de cuatro con resultados similares.

#### 4.1.6. La señalización a través de CD70 involucra activación de las quinasas MAP

Se ha propuesto que la vía de las quinasas MAP está involucrada en el mecanismo de la citotoxicidad. Con el objetivo de evaluar si esta vía se activa luego de la agregación de CD70 realizamos un experimento con el clon K14B06. Al añadir el anticuerpo anti-CD70 y un segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón) para aumentar la capacidad de agregación, observamos una fosforilación temprana de ERK, en concordancia con la activación de la vía de las quinasas MAP (Figura 7).



**Figura 7. Las señales que se transmiten a partir de la agregación de CD70 involucran activación de las quinasas MAP.** El clon K14B06 fue estimulado con el anticuerpo anti-CD70 (QA32) como se describe en Materiales y Métodos y luego de lisar las células se añadió un lisado de  $10^6$  células por carril en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones de no-reducción; se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se realizó el inmunoblot con anticuerpos que reconocen, específicamente, a la ERK fosforilada en tirosinas (anti-P-ERK1/2). Como control se reveló, en el panel inferior, con una anticuerpo anti-pan-ERK para comprobar que se añadieron cantidades similares en cada columna. XL significa que se añadió un segundo anticuerpo anti-Ig de ratón para aumentar la agregación; PMA que se estimularon las células con forbol 12-miristato 13-acetato y SAM es el control negativo en el que se estimularon las células con anti-IgG de ratón sin añadir previamente un primer anticuerpo. Las células fueron lisadas en diferentes momentos después de la estimulación como se muestra encima de cada carril (' minutos). El tiempo para SAM y PMA fue de 10 minutos. Se muestra un experimento de tres con resultados semejantes.

#### 4.1.7. La transducción de señales a través de CD70 también se observa en células Jurkat transfectadas con CD70 humano



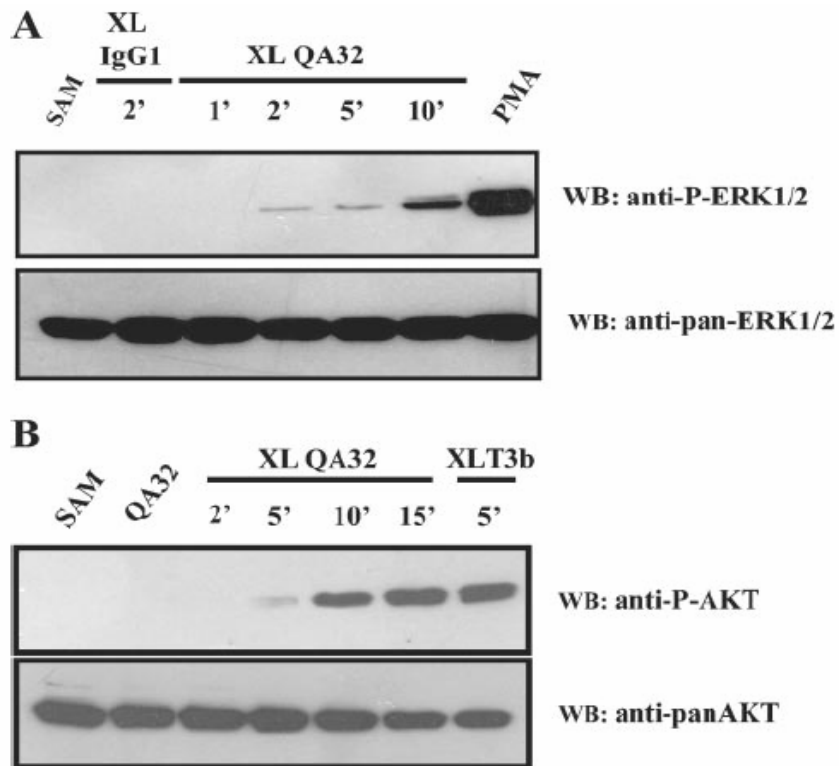
Para precisar el papel de CD70 como receptor capaz de transmitir señales activadoras al interior de las células T, utilizamos células Jurkat CD70<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> y las transfectamos de forma estable con un vector que contenía el gen de CD70 humano. De esta forma, nos aseguramos que estas células no expresaran CD27 o CD70 endógeno y entonces podíamos comprobar que la expresión del CD70 transferido, era la condición necesaria para desarrollar cualquier función luego de agregar el CD70 en su membrana con un anticuerpo. El clon de células Jurkat-CD70 que seleccionamos y clonamos era uno que tenía un nivel de expresión de CD70 comparable al clon K14B06. Con estas células Jurkat transfectadas, se observó que el anti-CD70 inducía fosforilación de ERK (Figura 8).

También detectamos fosforilación de Akt (Figura 8), lo que sugiere que la enzima PI-3K puede estar involucrada en las señales mediadas por CD70. En este modelo celular la estimulación a través de CD70 también provocó liberación intracitoplasmática de Ca<sup>2+</sup> (Figura 9).

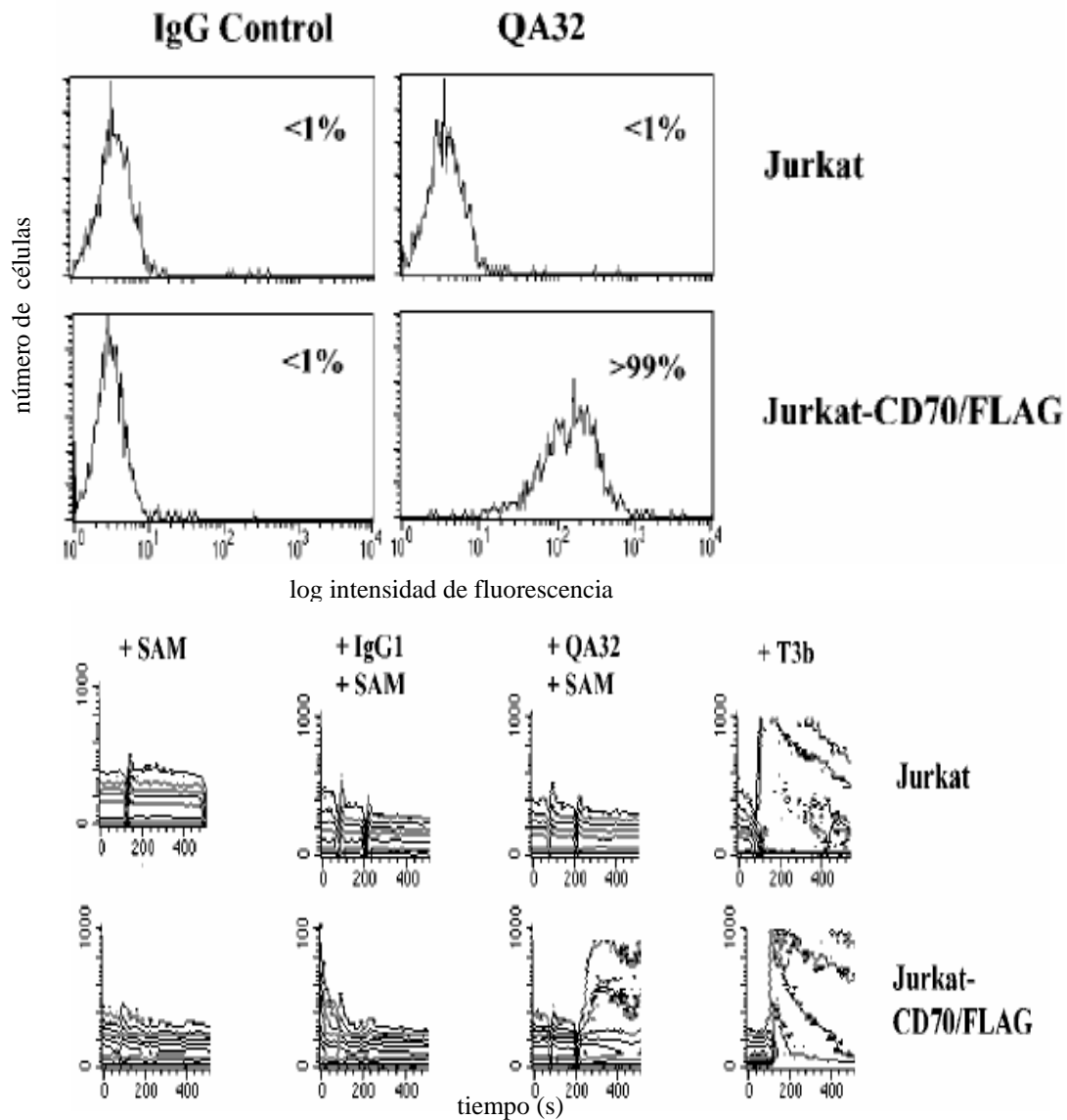
#### **4.1.8. La agregación del CD70 por su ligando natural, CD27, provoca una inducción de la transcripción en células CD70<sup>+</sup>**

Los anticuerpos monoclonales contra receptores activadores que se conectan a las vías de proteínas quinasas de tirosinas, como el TCR-CD3, pueden funcionar como “sustitutos” del ligando natural. Sin embargo, la agregación de un receptor provocada por un anticuerpo puede ser diferente a la que produce su ligando fisiológico. Con la intención de comprobar si CD70 era capaz de transducir señales cuando se une a su ligando natural y no sólo cuando es

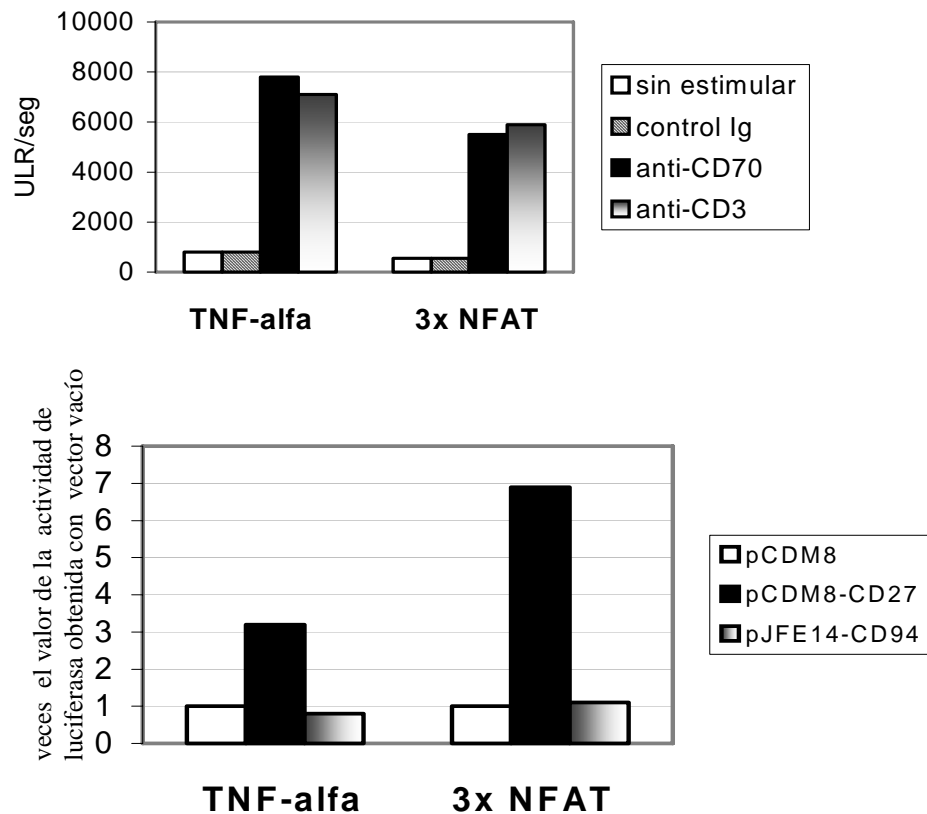
agregado por un anticuerpo monoclonal, realizamos un experimento en el que mezclamos células CD27<sup>+</sup> con células CD70<sup>+</sup> para comprobar si en estas últimas se producía una inducción de la transcripción de genes reporteros.



**Figura 8. La agregación de CD70 con el anticuerpo QA32 induce fosforilación de las quinasas MAP (ERK) y Akt en las células Jurkat transfectadas con CD70/FLAG.** Las células Jurkat-CD70/FLAG fueron estimuladas igual que en el experimento representado en la Figura 7. El lisado de células se analizó en una electroforesis con gel de poliacrilamida y SDS al 10% bajo condiciones de no reducción. En el Western blot se reveló con A) un anticuerpo específico para fosfo-p42/44 ERK (anti-P-ERK1/2) y B) un anticuerpo anti-fosfo-Akt (anti-p-Akt) serina 473. Las membranas también fueron reveladas con un anticuerpo anti-pan ERK o anti-pan Akt para comprobar que se aplicaron cantidades comparables en el gel. XL QA32 significa que se añadió un segundo anticuerpo anti-Ig de ratón para aumentar la agregación de CD70; PMA que se estimularon las células con forbol 12-miristato 13-acetato, QA32 que se estimularon las células con el anticuerpo QA32 sin añadir el anti-IgG de ratón, XL IgG que se añadió el control negativo de IgG de ratón y el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón; y SAM es el control negativo en el que se estimularon las células con anti-IgG de ratón sin añadir previamente un primer anticuerpo. Tanto SAM como QA32 y PMA se añadieron a los 10 minutos. Se muestra un experimento de tres con similares resultados.



**Figura 9. El anticuerpo anti-CD70 (QA32) induce la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmático en células Jurkat transfectadas con CD70/FLAG.** En el panel de arriba se muestra el resultado de la tinción por inmunofluorescencia indirecta para determinar la expresión de CD70 en las células Jurkat antes y después de ser transfectadas con el vector que codifica para CD70 humano. Debajo se muestra la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células, marcadas con Fluo/3AM, luego de ser estimuladas con los anticuerpos anti-CD70 (QA32) y anti-CD3 (T3b). Las células se analizaron con el citómetro de flujo y se representa las unidades de fluorescencia relativa (eje "Y") contra el tiempo (eje "X"). El procedimiento es similar al que se muestra en la Figura 6. Este es un experimento representativo de tres con similares resultados.



**Figura 10. La agregación de CD70 por un anticuerpo monoclonal o por su ligando, CD27, induce la activación de la transcripción en células Jurkat CD70<sup>+</sup>.** **Panel superior:** Las células Jurkat-CD70/FLAG transfectadas temporalmente con dos plasmidios diferentes que contienen el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de TNF-alfa humano o de la secuencia que se une a NFAT, se mezclaron con células P815 y uno de los siguientes anticuerpos: anti-CD70, anti-CD3 o IgG. de ratón como control. A las 8 h se midió la actividad de luciferasa que se expresa, en el eje de las “Y”, en unidades de luz relativa por segundo. **Panel inferior:** Las mismas células representadas en el panel superior se mezclaron con células COS-7 transfectadas de forma temporal con un vector que contiene el gen de CD27 (pCDM8-CD27), con el vector vacío (pCDM8) o un vector que contiene el gen de CD94 (pJFE1-CD94) como control. Se presentan los resultados de un experimento de tres con datos similares.

Las células Jurkat y Jurkat-CD70/FLAG fueron electroporadas con un plasmidio que contenía el gen reportero de la luciferasa bajo promotores de IL2 y de TNF según se explica en los Materiales y Métodos. Estas células se mezclaron con otras transfectadas de forma transitoria con el gen del CD27. En la Figura 10 se muestra que el gen de la luciferasa se expresó tanto cuando las células fueron estimuladas con el anticuerpo monoclonal como cuando se estimularon con las

células CD27<sup>+</sup>. El fenómeno no ocurrió en las células Jurkat CD70<sup>-</sup>. Por tanto, la transducción de señales que ocurre cuando el CD70 es agregado tanto por anticuerpos como por su ligando natural, CD27, conduce la expresión de nuevos genes en las células CD70<sup>+</sup>.

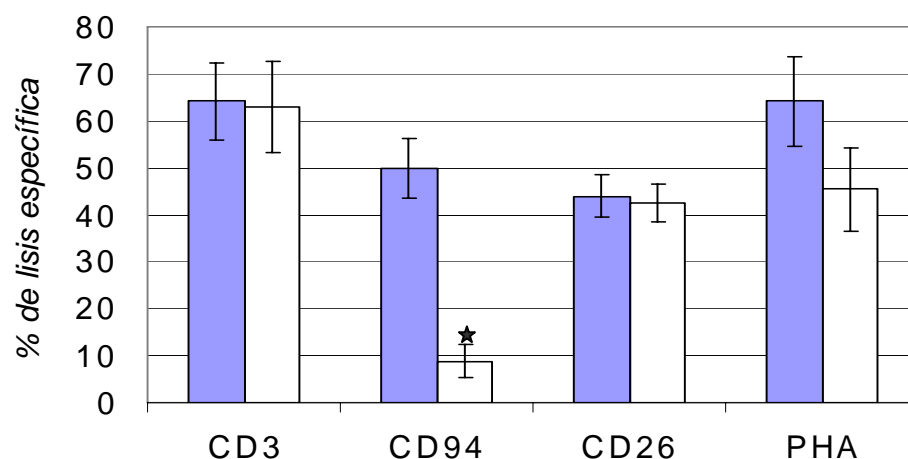
#### **4.2. Identificación de moléculas que inhiben la citotoxicidad inespecífica generada a partir de receptores no clonotípicos en linfocitos T humanos**

Si la citotoxicidad puede ser inducida independiente de TCR por receptores con distribución no clonotípica como CD94 y CD70 en determinados clones de linfocitos T, es probable que estas células expresen moléculas en su membrana encargadas de generar señales inhibitorias para evitar fenómenos de autoinmunidad. Por tanto, otro objetivo de nuestro trabajo fue identificar moléculas de membrana en linfocitos T capaces de desencadenar señales intracelulares que inhibieran la citotoxicidad inespecífica (independiente del TCR).

El clon K14B06 desencadena una lisis específica superior al 60% cuando es activado con un anticuerpo anti-CD94 en los ensayos de lisis redirigida con la línea P815<sup>(43)</sup>. Para buscar moléculas de membrana capaces de inhibir la citotoxicidad inespecífica realizamos un experimento típico de lisis redirigida con el clon K14B06 y la línea P815 (marcada con <sup>51</sup>Cr), en presencia de anti-CD94. A esta mezcla se le añadió anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas de membrana expresadas por el clon K14B06 con el fin de comprobar si inhibían la lisis mediada por anti-CD94.

De los anticuerpos ensayados, sólo aquellos dirigidos contra moléculas del MHC-I provocaron una inhibición superior al 70%. Como esta capacidad de inhibir la citotoxicidad inespecífica no ha sido descrita para las moléculas del MHC-I, nuestro trabajo se dirigió a caracterizar la inhibición que provocan los anticuerpos anti-MHC-I en la lisis independiente de TCR mediada por anti-CD94.

#### 4.2.1. La lisis redirigida a través del CD94 es inhibida por los anticuerpos anti-MHC-I



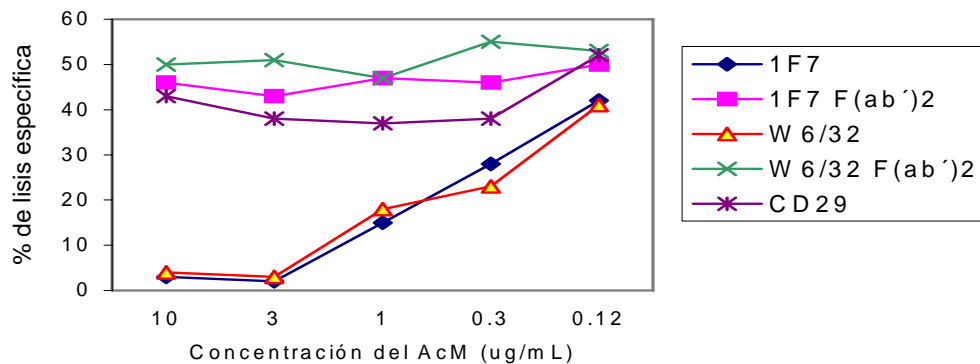
**Figura 11. La lisis redirigida inducida a través de CD94 es inhibida por un anticuerpo anti-MHC-I.** La línea P815 marcada con  $^{51}\text{Cr}$  se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (T3b, IgG2a), anti-CD94 (3B1, IgG2a) o anti-CD26 (QA839, IgG1) por 30 minutos en ausencia (barras oscuras) o presencia (barras claras) del anti-MHC-I (Hp-1F7, IgG1). Cada anticuerpo se utilizó a una concentración final de 1,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Luego se añadió el clon T K14B06 a una relación efector:diana de 2:1 y a las 4 h se extrajo el sobrenadante para determinar el porcentaje de lisis específica. La PHA (fitohemaglutinina) se utilizó a una concentración de 1/500 v/v. Los datos representan la media de 22 experimentos (anti-CD94), 6 experimentos (anti-CD3) o cinco experimentos (anti-CD26 y PHA). El procedimiento estadístico utilizado para examinar la diferencia en muestras pareadas fue la prueba no paramétrica de Wilcoxon. ★  $p < 0.001$ .

Como se muestra en la Figura 11, la adición de un anticuerpo anti-MHC-I (1F7), inhibe la lisis redirigida mediada por CD94 pero no afecta la lisis que se induce a través de CD3 ni de CD26. La citotoxicidad inducida por lectinas en este tipo

de ensayos mostró una disminución cuando se agregaron simultáneamente las moléculas de MHC-I, pero esta inhibición no fue significativa estadísticamente (Figura 11).

#### 4.2.2. Se requiere una amplia agregación de las moléculas del MHC-I en la membrana del clon K14B06 para provocar el efecto de inhibición de la citotoxicidad inespecífica inducida por CD94

Obtuvimos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> a partir de los dos anticuerpos anti-MHC-I (1F7 y W6/32) con la intención de comprobar si para que se produjera la inhibición era necesario una amplia agregación de las moléculas de MHC-I en la membrana del clon K14B06 o, por el contrario, bastaba con la simple unión bivalente de una molécula de anticuerpo.



**Figura 12. Se necesita una amplia agregación de las moléculas de MHC-I para que ocurra la inhibición de la lisis redirigida a través de CD94.** Las células P815 marcadas con <sup>51</sup>Cr se incubaron con anti-CD94 (3B1, IgG2a) a 1,7 µg/mL por 30 minutos en presencia de diferentes concentraciones de los anticuerpos anti-CD29 (CD29), anti-MHC-I (1F7), anti-MHC-I (W6/32) o los respectivos fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de estos anticuerpos anti-MHC-I como se muestra en la leyenda. Luego se añadió el clon K14B06 a una relación efector:diana 2:1 y se midió la lisis a las 4 h. Este experimento representa uno de cuatro con resultados similares.

Como se muestra en la Figura 12, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> fueron incapaces de provocar la inhibición, sólo las moléculas completas de anticuerpos, que se

unen a la membrana de la línea P815 por su fragmento Fc, lo podían hacer y de una forma dependiente de la dosis. Este resultado sugiere que para producir la inhibición es necesaria una amplia agregación de las moléculas de MHC-I y que no basta con que se entrecrucen dos moléculas a partir de un anticuerpo bivalente.

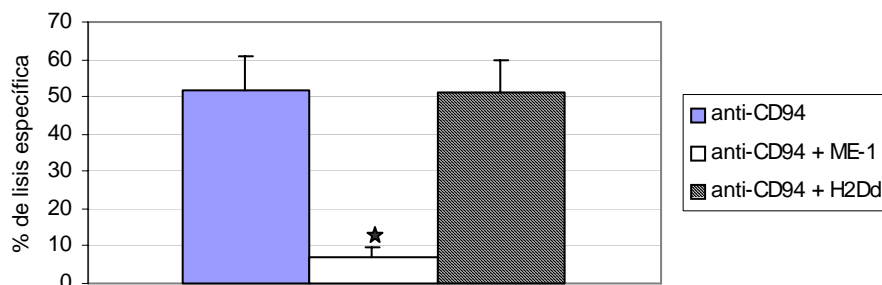
#### **4.2.3. La inhibición de la lisis redirigida del anti-CD94 es producto de la agregación de las moléculas de MHC-I en la membrana del clon K14B06 y no depende de receptores para Fc presentes en la membrana del clon de linfocitos T**

Los anticuerpos anti-MHC-I (1F7 y W6/32) se unen también a las moléculas de MHC-I presentes en la membrana de la línea P815 pues muestran cierta reactivada cruzada con las moléculas del MHC-I de ratón. Por tanto, se podría pensar que el efecto inhibitorio está relacionado con la presencia de receptores Fc en la superficie del clon K14B06. Para descartar esta posibilidad aprovechamos la circunstancia de que el clon K14B06 expresa en su membrana HLA-B7<sup>(43,168)</sup>, molécula que no expresa la línea P815. Como se muestra en la Figura 13, la inhibición también se produjo cuando utilizamos un anticuerpo anti-MHC-I específico para HLA-B7 (ME-1) que no se une a la superficie de P815.

Para mayor confirmación de este fenómeno encontramos que un anticuerpo anti-H2D<sup>d</sup> (anticuerpo contra las moléculas del MHC-I que expresa la línea P815) no tiene ningún efecto sobre la lisis redirigida a través de CD94. De esta forma, se excluye la posibilidad de que las moléculas receptoras de Fc



presentes en la superficie del clon T K14B06 jueguen algún papel en esta inhibición.

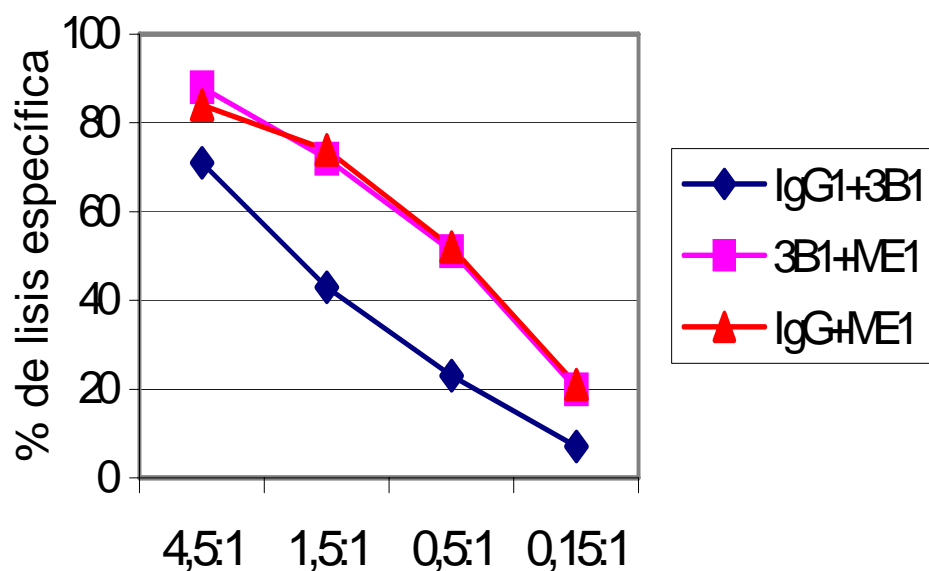


**Figura 13. La inhibición de la lisis es consecuencia de la agregación de las moléculas de MHC-I en la membrana del clon K14B06 y no de la unión de los anticuerpos a los receptores Fc en la membrana de este clon.** Las células de la línea P815 se incubaron por 30 minutos con anti-CD94 (3B1, IgG2a) en ausencia o presencia de un anti-HLA B7/B27 (ME1, IgG2a) o un anti-H-2D<sup>d</sup> (H2Dd). Luego se añadió el clon K14B06 a una relación efector:diana 2:1 y se midió la lisis específica a las 4 horas. Cada anticuerpo se utilizó a una concentración final de 1,7 µg/mL. Los datos representan la media de 18 experimentos para anti-CD94 + ME1 y cinco experimentos para anti-CD94 + anti-H2D<sup>d</sup>. El procedimiento estadístico utilizado para examinar la diferencia en muestras pareadas fue la prueba no paramétrica de Wilcoxon. ★ p<0.001.

#### 4.2.4. La inhibición de la lisis redirigida que causa MHC-I no es debido a la inducción de apoptosis a parálisis en el clon K14B06

Se ha descrito que la agregación, con anticuerpos monoclonales, de las moléculas del MHC-I presentes en la membrana de los linfocitos induce apoptosis en las células T<sup>(140)</sup>. Para comprobar si la apoptosis es el mecanismo a través del cual ocurre esta inhibición de la lisis redirigida inducida por MHC-I, aprovechamos el hecho de que el clon K14B06 mata, a través de su TCR, a la línea linfoblástica LG2<sup>(168)</sup>. Se diseñó un experimento encaminado a evaluar si el contacto del clon K14B06 con células P815 cargadas con un anticuerpo anti-MHC-I provocaba una disminución de la lisis de las células LG2. Esto sería una expresión de que el contacto previo con el anti-MHC-I provoca apoptosis o parálisis en el clon K14B06.

El clon K14B06 se mezcló con P815 “frías” en presencia de diferentes anticuerpos monoclonales (anticuerpo control, anti-CD94 y anti-HLA-B7). Cuatro horas después, se añadieron células de la línea LG2 marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  y a las cuatro horas se analizó la lisis específica (Figura 14).

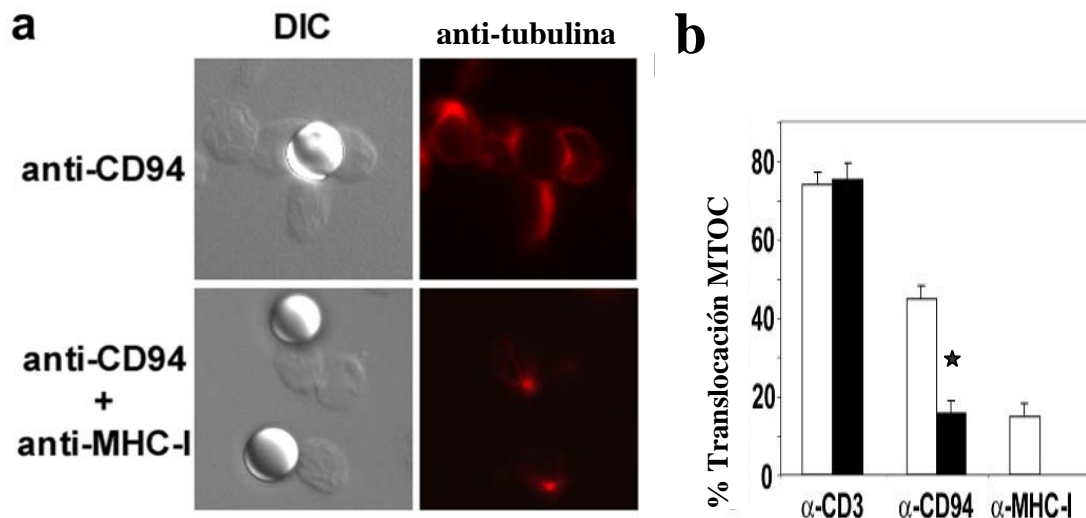


**Figura 14. La inhibición, mediada por MHC-I, de la lisis redirigida inducida por anti-CD94 no es debido a la inducción de apoptosis en el clon de células T.** Las células P815 “frías” (sin marcar con  $^{51}\text{Cr}$ ) se incubaron con un anticuerpo anti-CD94 (3B1) en presencia o ausencia del anticuerpo anti-HLA B7/B27 (ME1) por 30 minutos. Se añadió IgG1 de ratón (IgG1) como control en los casos que se indica en la leyenda. Cada anticuerpo se utilizó a una concentración final de 1,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como control del experimento se incubó la línea P815 con el anticuerpo anti-MHC-I (ME1) pero en ausencia del anti-CD94. Luego se añadió el clon K14B06 y se incubaron por 4 h. Pasado este tiempo se añadieron las células de la línea LG2 marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ . La lisis específica se midió 4 horas más tarde. El eje “X” indica la relación efector:diana. Se muestran los datos de un experimento de tres con resultados similares.

La pre-incubación de las células de la línea P815, cargadas con un anti-MHC-I, con el clon K14B06 no provocó una disminución de la lisis de las células LG2 marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ . Esto concuerda con el hecho de que el contacto entre anti-MHC-I y K14B06 no provocó apoptosis o parálisis en este clon. Por otra parte,

esta pre-incubación inhibió parcialmente la lisis de *LG2* en presencia de anti-CD94.

#### 4.2.5. La agregación de MHC-I con anticuerpos monoclonales inhibe la movilización del centro organizador de los microtúbulos (MTOC) que causa el anti-CD94 en el clon K14B06



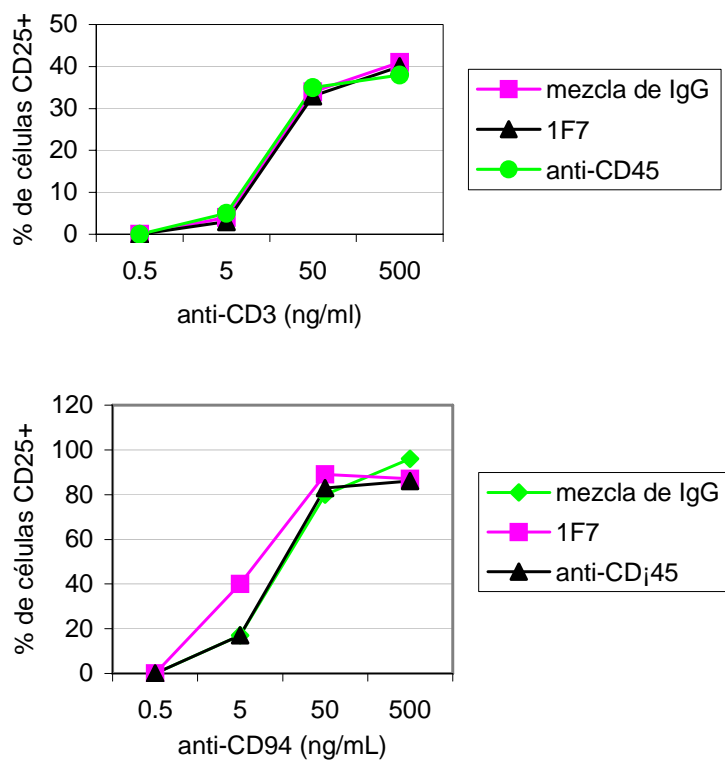
**Figura 15. Los anticuerpos anti-MHC-I inhiben el reordenamiento del MTOC inducido por las perlas recubiertas con anti-CD94.** a) Se formaron conjugados entre el clon K14B06 y perlas de poliestireno recubiertas con anti-CD94 (3B1) o anti-CD94 + anti-MHC-I (1F7). En la imagen de la izquierda (DIC, differential interference contrast) se muestran conjugados representativos y en la de la derecha la inmunofluorescencia luego de una tinción con un anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina. La imagen de fluorescencia en forma de “medias lunas” indica reorientación del MTOC en la zona de contacto célula:perla. b) Análisis estadístico de la reorientación del MTOC que mostraron los conjugados formados entre el clon K14B06 y las perlas recubiertas con los anticuerpos. Los anticuerpos que contenían las perlas se indican en el eje “X”; las barras oscuras indican presencia y las claras ausencia del anticuerpo anti-MHC-I (10  $\mu$ g/mL). Se contaron 200 conjugados por experimento.  $\star$   $p < 0.005$  con respecto al mismo anticuerpo en ausencia del anti-MHC-I

Una de las consecuencias de la activación celular a partir de TCR-CD3 es la modificación del citoesqueleto que se manifiesta por una reorientación del MTOC del linfocito hacia la vecindad del contacto célula:célula. Lo mismo ocurre con las células NK cuando son activadas a través de sus receptores activadores. Por tal motivo, tratamos de comprobar si la inhibición inducida por

anti-MHC-I se acompañaba de una disminución en el reordenamiento del MTOC en el clon K14B06. Para evaluar este fenómeno, se mezclaron perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD3, anti-CD94, y anti-MHC-I, con el clon K14B06, se permitió la formación de conjugados células:perlas y luego se analizaron con el microscopio confocal. Cuando el clon K14B06 se mezcló con perlas recubiertas con anti-CD94, anti-CD3, o anti-CD3+anti-MHC-I, ocurrió una reorientación del MTOC hacia la zona de contacto célula-perla. Por el contrario, en los conjugados formados entre K14B06 y las perlas recubiertas con anti-CD94+anti-MHC-I, donde tanto el CD94 como MHC-I son simultáneamente agregadas, se observó una significativa reducción del reordenamiento del MTOC (Figura 15).

#### **4.2.6. Los anticuerpos anti-MHC-I no inhiben el aumento en la expresión de CD25 causada por el anti-CD94**

La inhibición causada por los anticuerpos anti-MHC-I a la citotoxicidad inducida a través de CD94 pudiera ser sólo un componente de una modulación más amplia a las funciones del clon de CTL. Otros cambios que ocurren en la célula producto de la activación también pudieran estar siendo inhibidos. Por tal motivo, quisimos evaluar si el aumento en la expresión de CD25 que induce el anti-CD94 en este clon de células T es inhibida por los anti-MHC-I. Con este propósito, recubrimos placas de 96 pocillos con anticuerpos monoclonales anti-CD94 y anti-MHC-I. Como se muestra en la Figura 16, la agregación simultánea de MHC-I y CD94 no modifica la expresión de CD25 inducida por anti-CD94 bajo estas condiciones.



**Figura 15. El aumento de la expresión de CD25 inducido por anti-CD94 no es inhibido por un anti-MHC-I.** Se recubrieron placas con diferentes concentraciones de anti-CD3 (panel superior) y anti-CD94 (panel inferior) y 2 ng/ml de anti-MHC-I (1F7) o anti-CD45. Como control una mezcla de IgG1 e IgG2a de ratón (mezcla de IgG). Luego se añadieron las células K14B06 e IL2r (5 U/mL). A las 48 h se determinó la expresión de CD25 por inmunofluorescencia y citometría de flujo. Cada punto representa la media de tres pocillos. Se muestra un experimento de tres con resultados similares.

## 5. DISCUSIÓN

La tecnología de los anticuerpos monoclonales y el ensayo de lisis redirigida como método de selección han sido utilizados con éxito para identificar receptores activadores en células NK<sup>(45-49,174)</sup>. Siguiendo una estrategia similar, hemos tratado de identificar moléculas de membrana capaces de desencadenar la citotoxicidad independiente de TCR en CTL humanos, así como receptores inhibidores que puedan regular esta función.

Para la inmunización de los ratones utilizamos un clon de células T humanas (K14B06) con fenotipo CD3<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup> en el que se había reportado la capacidad para desencadenar la lisis inespecífica a través de CD94<sup>(43)</sup>. La alta capacidad proliferativa de este clon nos permitió inmunizar 15 ratones y ensayar 13 500 hibridomas en busca de aquellos productores de anticuerpos que se unían a receptores activadores. Del total de hibridomas ensayados, sólo nueve secretaban anticuerpos capaces de inducir una lisis específica superior al 20%. Estos nueve anticuerpos estaban dirigidos contra cuatro antígenos diferentes: TCR, CD26, CD94 y CD70. Tanto TCR como CD26 son moléculas cuyo papel como receptor estimulador y coestimulador, respectivamente, está bien establecido. Otro de los antígenos contra el que obtuvimos anticuerpos fue CD94. El clon K14B06 expresa un heterodímero activador CD94/NKG2H descrito recientemente<sup>(43)</sup> por otros miembros del

grupo. Por otra parte, CD70, a pesar de ser una molécula previamente conocida, no ha sido contemplada como receptor capaz de transducir señales en los CTL CD8<sup>+</sup>αβ<sup>+</sup> sino que es considerado el ligando natural de CD27.

Teniendo en cuenta estos resultados, consideramos que el empleo de la tecnología de los anticuerpos monoclonales y el ensayo de lisis redirigida como método de selección, resultan adecuados para identificar receptores activadores en CTL humanos pero es un abordaje que presenta limitaciones importantes.

Con nuestra estrategia no fuimos capaces de detectar ninguna “nueva” molécula activadora en CTL. Los cuatro antígenos contra los que obtuvimos anticuerpos eran ya conocidos. No obstante, con esta metodología se pueden detectar funciones “nuevas” en moléculas previamente conocidas, como fueron los casos de CD70 y MHC-I reportados en este trabajo.

Hay otro aspecto que debemos tener en cuenta cuando se adopta una estrategia similar a la empleada por nosotros para identificar receptores que modulen las funciones de los CTL. Utilizamos anticuerpos monoclonales para agregar el supuesto receptor en la membrana, asumiendo que esta agregación es similar a la que provoca la unión con el ligando fisiológico de ese receptor. Sin embargo, la agregación provocada por el anticuerpo puede ser cuantitativa o cualitativamente diferente a la que realiza el ligando natural. Esto implica que este abordaje sólo pretenda “llamar la atención” sobre una molécula con capacidad potencial para transducir señales pero que es

imprescindible que se realicen estudios con ligandos naturales y otros que contemplen una situación más fisiológica para poder establecer la relevancia biológica de la nueva función asignada a la molécula en cuestión.

Una alternativa para encontrar “nuevos receptores” en CTL podría consistir en inmunizar otras especies, diferentes al ratón, para generar los hibridomas, pues es probable que la mayoría de las moléculas de membranas en linfocitos T humanos, con alta inmunogenicidad para ratones, ya hayan sido descritas. El uso de otras especies tendría el inconveniente de no contar con buenos parentales de fusión y de no funcionar con la misma eficacia que lo hace la tecnología de los anticuerpos monoclonales en ratones

El hecho que dos de los anticuerpos obtenidos reconocieran al CD70 sugiere que esta molécula puede tener un importante papel como receptor activador en linfocitos T citotóxicos. El CD70 es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) que ha sido identificado en roedores y en seres humanos y se considero el ligando natural de CD27<sup>(148-154)</sup>. Hasta donde sabemos, existe un antecedente que reporta la función de CD70 como receptor agonista de linfocitos T citotóxicos<sup>(158)</sup>, pero en el citado estudio sólo se reporta que clones de células T  $\gamma\delta^+$  desencadenan la citotoxicidad cuando se añade un anticuerpo anti-CD70 en el ensayo de lisis redirigida con la línea P815 y no se encuentra este efecto en clones T  $\alpha\beta^+CD8^+$  (fenotipo de los clásicos CTL) ni se analizan los eventos intracelulares que pueden ocurrir tras la agregación del CD70 en la membrana del linfocito T. Con nuestro trabajo ampliamos la información concerniente al papel de CD70 como



receptor en linfocitos T pues se realiza una caracterización de los eventos bioquímicos que ocurren luego de la agregación de CD70 en la membrana celular.

Los datos que presentamos muestran que la agregación de CD70, con anticuerpos monoclonales, en el clon K14B06, provoca los siguientes efectos: inducción de la citotoxicidad, secreción de TNF- $\alpha$ , liberación de Ca<sup>2+</sup>, aumento en la expresión de CD25 y fosforilación de proteínas de las vías de las quinasas MAP. Todos estos eventos también ocurren luego de la activación de los CTL a través del receptor de antígeno específico TCR-CD3. Como el clon K14B06 tiene algunas características especiales<sup>(43,168)</sup>, decidimos evaluar la capacidad de CD70 para funcionar como receptor en otros modelos celulares. En este sentido, comprobamos que funciones tales como la inducción de la citotoxicidad, el aumento en la expresión de CD25 y la secreción de TNF- $\alpha$ , ocurrían en otros clones de células T. Además, la transfección del CD70 humano en células de la línea Jurkat CD70<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>, le confirió a estas células la capacidad para desarrollar varios de los eventos intracelulares observados en el clon K14B06 luego de la agregación de CD70. Todo esto nos induce a suponer que la capacidad de CD70 para transducir señales, luego de ser agregado con un anticuerpo monoclonal, no es exclusiva del clon K14B06 sino que es un fenómeno que puede ocurrir en otras células T y tal vez en todos los CTL que expresen esta molécula en su membrana.

La capacidad para mediar efectos agonistas luego de la agregación con anticuerpos monoclonales es compartida por muchos receptores que se acoplan a las vías controladas por proteínas quinasas de tirosinas (PTK). El ejemplo más notable es el TCR. Estos receptores, generalmente, tienen una porción intracitoplasmática o transmembránica que les permite asociarse con otras proteínas que lo conectan a las cascadas enzimáticas intracelulares. Sin embargo, CD70, al igual que otras moléculas de esta familia del TNF, es una proteína transmembránica de tipo II que carece de dominios o aminoácidos cargados capaces de asociarse a dichas moléculas. Por tanto, no está claro cómo esta familia de moléculas puede transmitir las señales. Algunos han sugerido que un motivo caseína cinasa I puede estar involucrado en esta función<sup>(175)</sup>. Las predicciones de motivos en la molécula CD70 realizadas con el programa scansie (<http://scansite.mit.edu/>), demuestran que la serina 9 puede ser forforilada por diferentes serina treonina quinasas (caseína quinasa 1, quinasa cdk5 y PKC). La valina 18, las leucinas 19 y 26 y la isoleucina 32 son sitios de unión a ERK, lo que abre un campo de investigación para los mecanismos de transmisión de señales a través de CD70.

Otros estudios indican que la agregación de las moléculas de la familia del TNF, como CD40L y CD30L, puede contribuir a la activación de quinasas de tirosinas tipo Src y así promover eventos bioquímicos posteriores reguladores de la citotoxicidad y la secreción de citocinas. En uno de estos trabajos se reportó una activación de p56lck a través de CD40L<sup>(176)</sup>.

Puede que existan importantes diferencias en la forma que transduce la señal un receptor como TCR-CD3 y otro como CD70. En nuestros experimentos, el anticuerpo anti-CD70 no fue capaz de desencadenar ninguna función cuando se utilizó unido al plástico en las placas de 96 pocillos mientras que el anti-CD3 sí lo hacía. En los experimentos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmático fue necesario añadir un segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón) para aumentar la agregación con anti-CD70 mientras el anti-CD3 provocó el mismo efecto sin necesidad del segundo anticuerpo. Esto sugiere que un requisito imprescindible para que se produzca la transducción de señales podría ser la amplia movilidad lateral de CD70 en la membrana, tal vez posibilitando su oligomerización y la activación de PTK. De todas formas, el mecanismo de transducción de señales a través de CD70 no queda definido en nuestro trabajo y será necesario un detallado estudio estructura-función del par CD70-CD27 para ganar en claridad al respecto.

Cuando mezclamos el clon K14B06 con células Daudi  $\text{CD27}^+$  marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ , no fuimos capaces de detectar lisis (datos no mostrados), esto nos hace suponer que la agregación provocada por el anticuerpo puede ser diferente a la que realiza su ligando natural, CD27. Por tanto, es poco probable que en condiciones fisiológicas la unión de linfocitos T  $\text{CD70}^+$  con otros linfocitos  $\text{CD27}^+$  provoque la muerte de estos últimos y sea este un mecanismo importante de control de la respuesta inmunitaria a través de la “muerte fratricida” de linfocitos T activados. Más bien pudiera ser que ambas células

se induzcan señales relacionadas con la supervivencia y regulación de otras funciones como la secreción de citoquinas y respuestas a estímulos que podrían ser subóptimos sin la señal de CD70. La fosforilación de enzimas como ERK y Akt sugiere que la señal que genera CD70 puede tener relación con la supervivencia de la célula<sup>(177)</sup>. Esto no excluye la posibilidad que, bajo ciertas condiciones, como un desbalance de citoquinas, los linfocitos CD70<sup>+</sup> puedan provocar la lisis de células CD27<sup>+</sup> o de que exista otro ligando para CD70 aún no descrito.

Los anticuerpos monoclonales han sido ampliamente usados como sustitutos de los ligandos naturales para estimular células a través de sus receptores de membrana y, en muchos casos, los efectos que provoca el anticuerpo son similares a los que produce el ligando natural. Sin embargo, como hemos apuntado, la interacción del anticuerpo puede ser diferente a la que ocurre cuando un receptor es agregado por su ligando natural. Por tal motivo, el hecho de que un anticuerpo contra CD70 sea capaz de activar al linfocito no nos permite concluir que, en condiciones fisiológicas, este receptor pueda transmitir señales de activación cuando se une a su ligando natural, CD27.

Para profundizar en este aspecto realizamos un experimento encaminado a comprobar si las células CD27<sup>+</sup> eran capaces de unirse a células CD70<sup>+</sup> y modular las funciones de estas últimas a través de CD70. Se transfectaron células Jurkat CD70<sup>+</sup> de forma alternativa con dos vectores que codificaban para el gen reportero de la luciferasa bajo el control del promotor de TNF o de NFAT-AP. Estas células se incubaron con células COS-7 transfectadas de

forma transitoria con CD27. Como se observa en la Figura 10 B, la interacción entre estos dos tipos de células provocó la expresión del gen de la luciferasa en las células CD70<sup>+</sup>, lo cual indica que la unión de CD70 con su ligando natural, CD27, desencadena la transducción de señales a partir de CD70 que culminan con la inducción de la expresión de genes. Estos datos sugieren que, en condiciones fisiológicas, CD70 puede ser capaz de transmitir señales cuando se une a su ligando natural aunque, de manera aislada, no sea capaz de generar citotoxicidad.

La capacidad de CD70 para funcionar como receptor, además de cómo ligando para CD27, no es un hallazgo sorprendente pues ya se había observado que otros miembros de la familia del TNF, como CD40L y CD30L<sup>(175,176)</sup>, pueden transmitir señales al interior de la célula. Sin embargo, esta función no había sido estudiada para CD70 en clones de CTL. La capacidad de CD70 para transducir señales también ha sido observada, recientemente, en células B tumorales<sup>(155)</sup>.

La importancia de las interacciones entre los miembros del par CD27/CD70 en el sistema inmunitario está avalada por varias observaciones. En los linfocitos aislados de pacientes que sufren inmunodeficiencia variable común se han detectado defectos en la expresión o función de CD27<sup>(178)</sup> o CD70<sup>(179)</sup>, y se ha propuesto que estas alteraciones pueden contribuir notablemente a la patogenia de la enfermedad. Recientemente, se ha observado que la interacción entre CD70 y CD27 juega un papel importante en el rechazo a trasplante independiente de la estimulación por CD28<sup>(180)</sup>. Es difícil

determinar si estos fenómenos se deben a la falta de señal a partir de CD27 porque falta su ligando, CD70, o que la ausencia de CD70 priva a las células de una señal importante que podría transducir esta molécula.

La importancia biológica del CD70 como receptor coestimulador en linfocitos T puede ser difícil de precisar ya que hay otros receptores, pertenecientes a esta misma familia del TNF, que tienen función similar. Esta redundancia de funciones, por demás frecuente en el sistema inmunitario, podría provocar que la ausencia de CD70 no manifieste grandes cambios en un animal CD70<sup>-</sup> pues su carencia sería suplida por otras moléculas con similar función. No obstante, en condiciones patológicas, en determinadas etapas de la respuesta inmunitaria o en subpoblaciones celulares específicas, puede que un mal funcionamiento de CD70 como receptor activador cause daños apreciables. Por tal motivo y a pesar de lo planteado anteriormente, la obtención de animales con el gen de CD70 inactivado podría brindar información útil para aclarar el papel de CD70 en la biología del sistema inmunitario y brindar un modelo adecuado para profundizar en el papel de esta molécula como receptor.

También resulta de interés evaluar si hay polimorfismo genético o diferencias de expresión de esta molécula en los seres humanos y si esto tiene relación con el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias o con una particular sensibilidad a las infecciones. Esta relación se ha encontrado en las disfunciones de otras moléculas coestimuladoras (activadoras o inhibidoras) de linfocitos<sup>(32,34)</sup>.

La manipulación terapéutica de la interacción entre receptores coestimuladores y sus ligandos ha demostrado ser una estrategia viable en varios modelos de enfermedades autoinmunitarias e infecciosas<sup>(15,16,39-42)</sup>, rechazo a trasplantes, inmunoterapia de tumores y otros campos como el desarrollo de nuevas vacunas<sup>(36-38)</sup>.

Si moléculas como CD70 o CD94 transmiten señales que pueden desencadenar el mecanismo de la citotoxicidad en los linfocitos T efectores que se encuentran en los tejidos periféricos, sin necesidad de un reconocimiento de antígenos heterólogos por parte de TCR-CD3, podemos pensar que deben existir receptores que inhiban estos estímulos “inespecíficos” y eviten fenómenos de autoinmunidad en un determinado contexto como sería la inflamación crónica. Ello es más importante si consideramos que los ligandos de estos receptores son moléculas propias (CD27 y HLA-E) expresadas por varios tejidos. De aquí nuestro interés en buscar receptores que inhiban los mecanismos de citotoxicidad inespecífica en clones de linfocitos T. Para este fin resultó de gran utilidad el hecho de que el clon K14B06 expresa el CD94, receptor capaz de desencadenar la citotoxicidad independiente de TCR cuando se une a un anticuerpo monoclonal como se ha demostrado en esta Tesis y en otro trabajo<sup>(43)</sup>. Ensayamos varios anticuerpos monoclonales, previamente reportados, contra moléculas que se expresaran en la membrana del clon K14B06 para determinar si eran capaces de inhibir la citotoxicidad que se genera a partir de CD94. De todos los anticuerpos ensayados, sólo aquellos dirigidos contra

moléculas del MHC-I produjeron una amplia (80%) inhibición de la citotoxicidad independiente de TCR. Como esta función no ha sido reportada para las moléculas del MHC-I, decidimos estudiar más a fondo este fenómeno.

Nuestros datos muestran que la agregación de las moléculas del MHC-I en la membrana del clon K14B06 puede modular la capacidad citolítica de estas células cuando las mismas son activadas a través de un receptor no clonotípico como es CD94. Por tanto, existe la posibilidad que las moléculas del MHC-I no funcionen solamente como ligandos de los linfocitos T sino también, como un receptor capaz de inhibir la citotoxicidad inespecífica bajo ciertas condiciones.

La transducción de señales en los linfocitos T a partir de la agregación de las moléculas del MHC-I en su membrana es un hecho previamente conocido y ha sido observado tanto en cultivos primarios como en clones de células T o en la línea Jurkat<sup>(139-143)</sup>. Sin embargo, su papel en la modulación de la citotoxicidad inespecífica no había sido estudiado.

Los estudios encaminados a determinar los mecanismos por los cuales las moléculas del MHC-I pueden participar en la transducción de señales indican que la porción intracitoplasmática de la molécula no es imprescindible para tal fin pero sí las regiones extracelulares y transmembránicas<sup>(141-143,181)</sup>. Es posible que la capacidad de las moléculas del MHC-I para involucrarse en la transmisión de señales esté dada por su asociación a otras proteínas que sí estén dotadas para esta actividad<sup>(182)</sup>.



En nuestro estudio se detectó una inhibición específica de las señales transmitidas a través de CD94 y no de las generadas por otras moléculas estimuladoras como CD3 ó CD26. (Figura 11).

La inhibición de la citotoxicidad que encontramos en nuestros experimentos sólo se produce si se garantiza una amplia agregación de las moléculas del MHC-I en la membrana del clon K14B06 pues los anticuerpos anti-MHC-I solubles, como son los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, privados de la facultad de unirse por su porción Fc a la membrana de la célula diana, son incapaces de generar la inhibición (Figura 12).

El mecanismo por el cual ocurre esta inhibición lo desconocemos. Se ha descrito que la agregación, por medio de anticuerpos, de moléculas del MHC-I, además de activación puede inducir apoptosis o muerte en las células T<sup>(144)</sup>. Nuestros datos indican que no debe ser este el mecanismo involucrado en la inhibición de la lisis. En el experimento donde utilizamos a la línea P815 como “diana fría” cargada con anti-MHC-I en su membrana, la unión del clon K14B06 a la superficie de las células P815 no inhibió la lisis posterior de la línea linfoblástica LG2 (Figura 13), lo cual indica que esa unión previa a través del MHC-I no provocó apoptosis o parálisis en la célula efectora. En este mismo experimento, la unión simultánea del clon K14B06 a la P815 a través de CD94, y a LG2 a través de su receptor de antígeno (TCR-CD3), mostró una ligera disminución de la lisis de LG2 (Figura 13). A manera de explicación para esta observación experimental puede argumentarse que el clon de linfocitos T está también matando a las células

P815 por medio de CD94, ocurriendo a su vez una menor relación efector:diana pero esta lisis no es cuantificable por no estar las células P815 marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ . En células NK se ha observado que una célula citotóxica puede unirse simultáneamente a dos dianas y, mientras recibe una señal inhibitoria de una diana puede, por otra parte de la célula, matar a la diana que no le brinde señales inhibitorias<sup>(183)</sup>. De igual forma, la inhibición que se produce a través de las moléculas del MHC-I, pudiera tener un carácter local y circunscribirse solo al sitio de la sinapsis inmunológica donde se orientan el CD94 y las moléculas del MHC-I. Esto concuerda con el hecho de que, cualquiera que sea la señal que se trasmite tras la agregación de MHC-I, impide la correcta reorganización del citoesqueleto hacia la zona de contacto con la célula diana pero sólo en la región donde estaría interactuando CD94 con su ligando ya que no sucede cuando la activación es a través de CD3. Nuestros experimentos con las perlas recubiertas de anticuerpos apoyan esta hipótesis (Figura 14). Sin embargo, somos conscientes que dicho estudio no reproduce fielmente lo que ocurre en una sinapsis inmunológica con contacto célula-célula por lo que un experimento que contemple esta situación puede brindar datos más confiables.

La inhibición que detectamos a través de MHC-I es específica por varias razones. Primero, solo se inhibe la citotoxicidad que es inducida a través de CD94 y no la que desencadenan otros receptores activadores como CD3 y CD26 y; segundo, no se inhiben otros fenómenos que indican activación del linfocito, como el aumento en la expresión de CD25. Generalmente, una

señal de activación puede despertar varios mecanismos efectores como secreción de citoquinas o inducción de la citotoxicidad pero reportes recientes han revelado que una determinada señal de activación en células NK y linfocitos T, puede generar una respuesta exclusivamente citotóxica o de secreción de citocinas y no ambas a la vez y que esta dicotomía no está relacionada con la intensidad de la señal<sup>(184, 185)</sup>.

Desconocemos si este fenómeno de inhibición de la citotoxicidad inespecífica por medio de MHC-I, encontrado en nuestros experimentos, puede ocurrir en condiciones fisiológicas o si tiene un papel biológico importante. La caracterización que hemos hecho de este mecanismo es muy preliminar pues no sabemos si el evento ocurre con ligandos naturales ni conocemos otros detalles relacionados con la forma en que moléculas del MHC-I puede inhibir la citotoxicidad. A pesar de esta limitación, podemos ganar claridad sobre el significado biológico de nuestros hallazgos confrontándolos con los resultados obtenidos por otros autores. Miembros de nuestro laboratorio en la Universidad de Murcia han realizado estudios similares en células NK y sus resultados pudieran complementar los nuestros. Ellos han encontrado que las moléculas del MHC-I presentan un alto grado de localización en los “rafts” de lípidos en la membrana<sup>(186)</sup>. La localización constitutiva de las proteínas del MHC-I en los rafts sugiere un importante papel de estas moléculas en las funciones de las células NK, donde podrían interactuar con otras proteínas involucradas en la transducción de señales. En estos microdominios de la membrana, las moléculas del MHC-I pudieran ejercer un efecto estabilizador

al interactuar con proteínas del citoesqueleto<sup>(187)</sup> y con otros receptores. Varias moléculas han sido encontradas asociadas a MHC-I como IL2R $\alpha$ , CD48 e ICAM-1(CD51)<sup>(188,189)</sup>

Estudios con microscopio confocal de los conjugados que se forman entre una línea de células NK como la NKL y su diana, la K562, han mostrado que cuando se agregan las proteínas del MHC-I con anticuerpos monoclonales estas se excluyen de los rafts en la sinapsis inmunológica<sup>(186)</sup> lo que pudiera privar a la célula NK de señales activadoras a partir de moléculas involucradas en la transducción y que estén ligadas a las del MHC-I. Otra alternativa sería que las moléculas del MHC-I puedan producir señales inhibitoras de la citotoxicidad independientemente del lugar donde se encuentren (fuera o dentro de los rafts). En el modelo de la línea NKL se observó fosforilación de tirosinas luego de la agregación de las moléculas de MHC-I con un anticuerpo monoclonal<sup>(186)</sup>.

Las células NK secretan citoquinas o matan a las células “estresadas” y lo hacen cuando sus receptores activadores interactúan con ligandos, que son proteínas propias expresadas por las células sometidas a condiciones de estrés. Supuestamente, en el caso de los CTL, las moléculas coestimuladoras serían incapaces de activar, por sí solas, a los linfocitos T y sólo servirían para amplificar una señal originada a partir del TCR-CD3. Sin embargo, puede que bajo ciertas condiciones, como un desbalance de citoquinas, los CTL efectores que están en la periferia pudieran ser activados sin necesidad que el TCR-CD3 reconozca péptidos extraños unidos a MHC-

I<sup>(20-24,190,191)</sup>). En otras palabras, que el término coestimulador, sería, tal vez, más adecuado para la interacción de los linfocitos vírgenes con las células presentadoras de antígeno pero que a medida que el linfocito se transforma en célula efectora o de memoria, esta división de receptor y coestimulador se torna más borrosa. Esto nos conduce a especular que el papel biológico de la inhibición a partir de MHC-I sea evitar fenómenos de autoinmunidad contrarrestando las señales que se originan en receptores coestimuladores como CD94 o CD70. A continuación analizaremos en qué contextos esto pudiera tener lugar.

Las proteínas codificadas por el MHC-I que se expresan en la membrana de los CTL y las células NK, podrían modular la lisis inespecífica de células hematopoyéticas propias como las dendríticas (DC). Las DC pueden activarse por señales de estrés a través de sus receptores TLR que la inducen a expresar moléculas coestimuladoras que pudieran despertar los mecanismos de citotoxicidad inespecífica en CTL y NK. De esta forma, las DC se tornarían susceptibles a la muerte por NK y CTL. Aunque la destrucción de DC es un fenómeno que puede servir para amortiguar la respuesta inmunitaria frente a determinados antígenos<sup>(192)</sup> estas células también tienen que presentar antígenos a las células T vírgenes y de memoria y deben desarrollar estrategias para sobrevivir en un ambiente de estrés<sup>(192)</sup> Por tanto, estas DC pueden expresar ligandos para MHC-I como LIR1(CD85j) y LIR2 (CD85d) que tendrían una nueva función: proteger a las

DC de la lisis independiente de TCR por los CTL o por células NK en situaciones de estrés o inflamación.

En trastornos como la enfermedad celiaca<sup>(26,27,162-165)</sup>, la artritis reumatoide<sup>(24,25)</sup>, la diabetes tipo 1<sup>(5)</sup> y el síndrome coronario agudo<sup>(28-30,166)</sup>, se han observado subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos que pueden desencadenar la citotoxicidad a través de receptores diferentes de TCR y es posible que este fenómeno tenga relevancia en la patogenia de las enfermedades mencionadas. Estas subpoblaciones se activan, principalmente, a través de receptores no clonotípicos de células NK, presentes en sus membranas como NKG2D y KIR activadores. Todo indica que la citotoxicidad independiente de TCR no es un fenómeno tan raro y que puede constituir un blanco atractivo para intervenciones terapéuticas.

En varios trastornos autoinmunitarios se ha observado un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras como son los ICOS en la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>(193)</sup> o una baja expresión de moléculas inhibitorias como CTLA-4<sup>(194)</sup>, esto indica que en el desarrollo de estas enfermedades puede estar jugando un importante papel el inadecuado balance de las señales coestimuladoras o inhibitorias.

No sabemos qué lugar ocupan en este necesario balance de señales la inhibición mediada por MHC-I o la activación desencadenada a partir de CD70 encontradas en nuestro trabajo y pensamos que puede ser objeto de futuros estudios. En el caso de CD70, es posible que los linfocitos T CD27<sup>+</sup> interactúen con otros linfocitos T CD27<sup>+</sup> y se transmitan señales en ambas

direcciones que estén relacionadas con la supervivencia celular o regulación de funciones efectoras. Para confirmar la posible función de las moléculas del MHC-I como receptor capaz de inhibir la citotoxicidad inespecífica sería necesario realizar varios estudios pues sólo hemos demostrado este efecto en el clon K14B06 y con anticuerpos monoclonales como sustitutos de ligandos fisiológicos. Algunos experimentos podrían estar encaminados a determinar cómo se modifica la expresión de genes luego de la agregación de moléculas del MHC-I o CD70, utilizando la potente e informativa tecnología de los microarrays<sup>(195)</sup> o a evaluar cuales son las vías de señales que se activan o frenan tras la agregación de moléculas del MHC-I en la superficie de los linfocitos T. También sería de gran interés conocer la naturaleza de los posibles ligandos fisiológicos que interactúan con las moléculas del MHC-I de los CTL en los tejidos periféricos. Pudieran estudiarse moléculas con conocida capacidad de unirse a MHC-I y que se expresan en células dendríticas como los ILTs<sup>(196)</sup> y así ganar información sobre el posible papel biológico de la inhibición de la citotoxicidad a través de MHC-I reportada en este trabajo.

## 6. CONCLUSIONES

- 1- La tecnología de los anticuerpos monoclonales y el ensayo de lisis redirigida con la línea P815 nos permitió detectar nuevas funciones para las moléculas del MHC-I y el CD70 presentes en la membrana de un clon de linfocitos T citotóxicos humanos.
- 2- La agregación del CD70 en la membrana de clones de linfocitos T provocó eventos característicos de la activación celular, tales como movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracitoplasmático, secreción de  $\text{TNF-}\alpha$ , incremento en la expresión de CD25, inducción de la citotoxicidad y fosforilación de proteínas.
- 3- La interacción entre células  $\text{CD27}^+$  y células  $\text{CD70}^+$  indujo, en estas últimas, la expresión de nuevos genes, lo cual demuestra que CD70 es capaz de transducir señales cuando es agregado por su ligando natural.
- 4- La agregación, con anticuerpos monoclonales, de las moléculas del MHC-I en la membrana de un clon de linfocitos T humanos,  $\alpha\beta^+\text{CD8}^+\text{CD94}^+$ , provocó una inhibición de la lisis redirigida inducida por CD94. Por tanto, las proteínas del MHC-I podrían ser contempladas como moléculas capaces de transmitir señales que inhiben la citotoxicidad inespecífica en determinados contextos.



5- La agregación de las moléculas del MHC-I en la membrana de un clon de linfocitos T citotóxicos humanos inhibió la reorientación del citoesqueleto en la zona de la sinapsis inmunológica. Este fenómeno puede estar involucrado en la inhibición de la citotoxicidad inespecífica que ocurre luego de la agregación de las moléculas de MHC-I en la membrana del CTL.

## **7. RECOMENDACIONES**

- 1- Obtener ratones que tengan inactivado el gen de CD70 y estudiar su fenotipo para profundizar en la importancia de CD70 en el funcionamiento del sistema inmunitario.
- 2- Estudiar el poliformismo del gen de CD70 en los seres humanos y comprobar si las diferentes variantes tienen relación con el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias o sensibilidad a infecciones.
- 3- Profundizar en el estudio de las señales que se activan tras la agregación de las moléculas del MHC-I en los linfocitos T citotóxicos humanos y en los mecanismos por los cuales estas moléculas pueden ejercer su efecto inhibitorio.
- 4- Comprobar si la inhibición de la citotoxicidad inespecífica, luego de la agregación de moléculas del MHC-I, ocurre en condiciones más fisiológicas y con ligandos naturales.
- 5- Mutar la región intracelular de CD70 y estudiar los efectos de estas mutaciones en la transmisión de señales tras la agregación de CD70 en células Jurkat transfectadas con CD70 humano.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 126:32-41, 2006.
- 2- Prado-Garcia H, Avila-Moreno F, Lopez-Gonzalez JS. Cytotoxic T lymphocytes in cancer and autoimmunity. *Rev Invest Clin* 56:629-39, 2004.
- 3- Yewdell JW, Haeryfar SM. Understanding presentation of viral antigens: The key to rational vaccine design. *Annu Rev Immunol* 23:651-682, 2005.
- 4- Henkart PA, Catalfamo M. CD8(+) effector cells. *Adv Immunol* 83:233-252, 2004.
- 5- Walter U, Santamaria P. CD8+ T cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 17:624-631, 2005.
- 6- Vallejo AN, Davila E, Weyand CM, Goronzy JJ. Biology of T lymphocytes. *Rheum Dis Clin North Am* 30:135-157, 2004.
- 7- Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370:650-652, 1994.
- 8- Bottino C, Moretta L, Moretta A NK cell activating receptors and tumor recognition in humans. *Curr Top Microbiol Immunol* 298:175-182, 2006.
- 9- Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24:133-139, 2006.
- 10- Kroccek RA, Mages HW, Hutloff A. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol* 16:321-327, 2004.
- 11- June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, Thompson CB. Role of CD28 receptor in T-cell activation. *Immunology Today* 11:211-216, 1990.
- 12- So T, Lee SW, Croft M. Tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor family members that positively regulate immunity *Int J Hematol* 83:1-11, 2006.
- 13- Watts TH. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23:23-68, 2005.
- 14- Wang S, Chen L. T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol* 1:37-42, 2004.
- 15- Salama AD, Chitnis T, Imitola J., Ansari MJI, Akiba H, Tushima F, Azuma M, Yagita H, Sayegh MH, Houry SJ. Critical Role of the Programmed Death-1 (PD-1) Pathway in Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis *J Exp Med* 198:71-78, 2003.

- 16- Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2:116-126, 2002.
- 17- Villette A, Latour S. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol* 15:277-285, 2003.
- 18- McMahon CW, Raulet DH. Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol* 13:465-470, 2001.
- 19- Roberts, A.I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C. and Jabri, B. NKG2D receptors induced by IL15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J. Immunol* 167:5527-5530, 2001.
- 20- Verneris, M.R., Karami, M., Baker, J., Jayaswal, A. and Negrin, R.S. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 103:3065-3072, 2003.
- 21- Jabri B, Meresse B. NKG2 receptor-mediated regulation of effector CTL functions in the human tissue microenvironment. *Curr Top Microbiol Immunol* 298:139-156, 2006.
- 22- Vivier, E., Tomasello, E. and Paul, P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition?. *Curr. Opin. Immunol* 14:306-331, 2002.
- 23- Guma M, Busch LK, Salazar-Fontana LI, Bellosillo B, Morte C, Garcia P, Lopez-Botet M. The CD94/NKG2C killer lectin-like receptor constitutes an alternative activation pathway for a subset of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 35:2071-2080, 2005.
- 24- Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM, Goronzy JJ. Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 165:1138-1145, 2000.
- 25- Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9452-9457, 2003.
- 26- Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quarantino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 362:30-37, 2003.
- 27- Meresse B, Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, Caillat-Zucman S. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21:367-377, 2004.
- 28- Raines, EW. Antigen-Independent Targeting of Long-Lived CD4+ Cytolytic T Effector Cells to Lesions of Atherosclerosis. *Circ. Res* 98:434-436, 2006.
- 29- Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation* 105:570-575, 2002.

- 30- Nakajima T, Goek O, Zhang X, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ Res* 93:106-113, 2003.
- 31- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151, 1999.
- 32- Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R, Eibel H, Fischer B, Schaffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 4:261-268, 2003.
- 33- Khoury SJ, Sayegh MH. The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity* 20:529-238, 2004.
- 34- Najafian N, Khoury SJ. T cell costimulatory pathways: blockade for autoimmunity. *Expert Opin Biol Ther* 3:227-236, 2003.
- 35- Tsai MK, Ho HN, Chien HF, Ou-Yang P, Lee CJ, Lee PH. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis. *Transplantation* 77:48-54., 2004.
- 36- Martins GA, Tadokoro CE, Silva RB, Silva JS, Rizzo LV CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 172:4893-4901, 2004.
- 37- Zubairi S, Sanos SL, Hill S, Kaye PM. Immunotherapy with OX40L-Fc or anti-CTLA-4 enhances local tissue responses and killing of *Leishmania donovani*. *Eur J Immunol* 34:1433-1440, 2004.
- 38- Gregor PD, Wolchok JD, Ferrone CR, Buchinshky H, Guevara-Patino JA, Perales MA, Mortazavi F, Bacich D, Heston W, Latouche JB, Sadelain M, Allison JP, Scher HI, Houghton AN. CTLA-4 blockade in combination with xenogeneic DNA vaccines enhances T-cell responses, tumor immunity and autoimmunity to self antigens in animal and cellular model systems. *Vaccine* 22:1700-1708, 2004.
- 39- Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C, Martins B, Andreia R, Viana JF, Crespo F, Vasconcelos C, Ferreira C, Vicente AM. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 12:620-662, 2004.
- 40- Vaidya B, Pearce S. The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. *Eur J Endocrinol* 150:619-626, 2004.
- 41- Monne M, Piras G, Palmas A, Arru L, Murineddu M, Latte G, Noli A, Gabbas A. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and susceptibility to non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol* 76:14-18, 2004.
- 42- Vijayakrishnan L, Slavik JM, Illes Z, Greenwald RJ, Rainbow D, Greve B, Peterson LB, Hafler DA, Freeman GJ, Sharpe AH, Wicker LS, Kuchroo VK. An autoimmune disease-associated *ctla-4* splice variant

- lacking the b7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity* 20:563-575, 2004.
- 43- Bellon T, Heredia AB, Llano M, Minguela A, Rodriguez A, Lopez-Botet M, Aparicio P. Triggering of effector functions on a CD8+ T cell clone upon the aggregation of an activatory CD94/kp39 heterodimer. *J Immunol* 162:3996-4002, 1999.
- 44- Lee JW, Lee SK.. Mammalian two-hybrid assay for detecting protein-protein interactions in vivo. *Methods Mol Biol* 261:327-336, 2004.
- 45- Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human Natural Killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189:787-796, 1999.
- 46- Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 21:228-234, 2000.
- 47- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19:197-223, 2001.
- 48- Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190:1505-1516 1999.
- 49- Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells is involved in non-MHC restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187:2065-207, 1998.
- 50- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18:275-308, 2000.
- 51- Kagi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 14:207-232,1996.
- 52- Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Ann Rev Immunol* 20:323-370, 2002.
- 53- Doherty PC, Christensen JP. Accessing complexity: the dynamics of virus-specific T cell responses. *Annu Rev Immunol* 18:561-592, 2000.
- 54- Wong P, Eric G. Pamer EG. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Ann Rev Immunol* 21: 29-70, 2002.
- 55- Griffiths GM. Protein sorting and secretion during CTL killing. *Semin Immunol* 9:109-115, 1997.
- 56- Kagi D, Seiler P, Pavlovic J, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, - Hengartner H. The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in

- protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur J Immunol* 25:3256-3262, 1995.
- 57- Janeway CA, Jr, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76:275–285, 1994.
- 58- Bluestone JA. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 2:555–559, 1995.
- 59- Thompson CB. Distinct roles for the costimulatory ligands B7–1 and B7–2 in T helper cell differentiation. *Cell* 81:979–982, 1995.
- 60- Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 338:1813–1821, 1998.
- 61- Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541–547, 1995.
- 62- Lin H, Bolling SF, Linsley PS, Wei RQ, Gordon D, Thompson CB, Turka LA. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J Exp Med* 178:1801–1806, 1993.
- 63- Pearson TC, Alexander DZ, Winn KJ, Linsley PS, Lowry RP, Larsen CP. Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig. *Transplantation* 57:1701–1706, 1994.
- 64- Szot GL, Zhou P, Sharpe AH, He G, Kim O, Newell KA, Bluestone JA, Thistlethwaite JR, Jr. Absence of host B7 expression is sufficient for long-term murine vascularized heart allograft survival. *Transplantation* 69:904–909, 2000.
- 65- Mandelbrot DA, Furukawa Y, McAdam AJ, Alexander SI, Libby P, Mitchell RN, Sharpe AH. Expression of B7 molecules in recipient, not donor, mice determines the survival of cardiac allografts. *J Immunol* 163:3753–3757, 1999.
- 66- Reynolds J, Tam FW, Chandraker A, Smith J, Karkar AM, Cross J, Peach R, Sayegh MH, Pusey CD. CD28-B7 blockade prevents the development of experimental autoimmune glomerulonephritis. *J Clin Invest* 105:643–651, 2000.
- 67- Gallon L, Chandraker A, Issazadeh S, Peach R, Linsley PS, Turka LA, Sayegh MH, Khoury SJ. Differential effects of B7–1 blockade in the rat experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Immunol* 159:4212–4216, 1997.
- 68- Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, Rhee L, Gray G, Nabavi N, Herold KC, Bluestone J. Differential effects of anti-B7–1 and anti-B7–2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 181:1145–1155, 1995.
- 69- Tada Y, Nagasawa K, Ho A, Morito F, Ushiyama O, Suzuki N, Ohta H, Mak TW. CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 162:203–208, 1999.

- 70- Peterson KE, Sharp GC, Tang H, Braley-Mullen H. B7.2 has opposing roles during the activation versus effector stages of experimental autoimmune thyroiditis. *J Immunol* 162:1859–1867, 1999.
- 71- Shi FD, He B, Li H, Matusevicius D, Link H, Ljunggren HG. Differential requirements for CD28 and CD40 ligand in the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol* 28:3587–3593, 1998.
- 72- Shao H, Woon MD, Nakamura S, Sohn JH, Morton PA, Bora NS, Kaplan HJ. Requirement of B7-mediated costimulation in the induction of experimental autoimmune anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2016–2021, 2001.
- 73- Abrams JR, Kelley SL, Hayes E, Kikuchi T, Brown MJ, Kang S, Lebwohl MG, Guzzo CA, Jegasothy BV, Linsley PS, Krueger JG. Blockade of T lymphocyte costimulation with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-immunoglobulin (CTLA4Ig) reverses the cellular pathology of psoriatic plaques, including the activation of keratinocytes, dendritic cells, and endothelial cells. *J Exp Med* 192:681–694, 2000.
- 74- Larsen CP, Alexander DZ, Hollenbaugh D, Elwood ET, Ritchie SC, Aruffo A, Hendrix R, Pearson TC. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation* 61:4–9, 1996.
- 75- Wekerle T, Kurtz J, Ito H, Ronquillo JV, Dong V, Zhao G, Shaffer J, Sayegh MH, Sykes M. Allogeneic bone marrow transplantation with costimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment. *Nat Med* 6:464–469, 2000.
- 76- Daikh DI, Finck BK, Linsley PS, Hollenbaugh D, Wofsy D. Long-term inhibition of murine lupus by brief simultaneous blockade of the B7/CD28 and CD40/gp39 costimulation pathways. *J Immunol* 159:3104–3108, 1997
- 77- Shi FD, He B, Li H, Matusevicius D, Link H, Ljunggren HG. Differential requirements for CD28 and CD40 ligand in the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol* 28:3587–3593, 1998.
- 78- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell costimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263–266, 1999.
- 79- Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Buchner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW, Kroczeck RA. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 30:3707–3717, 2000.
- 80- Ozkaynak E, Gao W, Shemmeri N, Wang C, Gutierrez-Ramos JC, Amaral J, Qin S, Rottman JB, Coyle AJ, Hancock WW. Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat Immunol* 2:591–596, 2001.



- 81- Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE, Gutierrez-Ramos JC. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13:95-105, 2000.
- 82- Kopf M, Coyle AJ, Schmitz N, Barner M, Oxenius A, Gallimore A, Gutierrez-Ramos JC, Bachmann MF. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med* 192:53-61, 2000.
- 83- Tesciuba AG, Subudhi S, Rother RP, Faas SJ, Frantz AM, Elliot D, Weinstock J, Matis LA, Bluestone JA, Sperling AI. ICOS costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. *J Immunol* 167:1996-2003, 2001.
- 84- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027-1034, 2000.
- 85- Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 3:261-268, 2001.
- 86- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151, 1999.
- 87- Pollok KE, Kim YJ, Zhou Z, Hurtado J, Kim KK, Pickard RT, Kwon BS: Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* 150:771-781, 1993.
- 88- Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, Maliszewski CR, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Farrah T, Armitage RJ, Fanslow WC, Smith CA: Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 23:2631-2641, 1993.
- 89- Melero I, Johnston JV, Shufford WW, Mittler RS, Chen L: NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 190:167-172, 1998.
- 90- DeBenedette MA, Shahinian A, Mak TW, Watts TH: Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* 158:551-559, 1997.

- 91- Hurtado JC, Kim YJ, Kwon BS: Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* 158:2600–2609, 1996.
- 92- Takahashi T, Mittler RS, Vella AT: Cutting Edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* 162:5037–5040, 1999.
- 93- DeBenedette MA, Wen T, Bachmann MF, Ohashi PS, Barber BH, Stocking KL, Peschon JJ, Watts TH: Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus. *J Immunol* 163:4833–4841, 1999.
- 94- Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, Watts TH: 4-1Bb ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of cd4 and cd8 t cells with similar efficacy. *J Immunol* 167:1313–1324, 2001.
- 95- Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, Brown TJ, Emswiler J, Raecho H, Larsen CP, Pearson TC, Ledbetter JA, Aruffo A, Mittler RS: 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 186:47–55, 1997.
- 96- Guinn BA, DeBenedette MA, Watts TH, Berinstein NL: 4-1BBL cooperates with B7-1 and B7-2 in converting a B cell lymphoma cell line into a long-lasting antitumor vaccine. *J Immunol* 162:5003–5010, 1999.
- 97- Guinn BA, Bertram EM, DeBenedette MA, Berinstein NL, Watts TH: 4-1BBL enhances anti-tumor responses in the presence or absence of CD28 but CD28 is required for protective immunity against parental tumors. *Cell Immuno.* 210:56–65, 2001.
- 98- Hurtado JC, Kim SH, Pollok KE, Lee ZH, Kwon BS: Potential role of 4-1BB in T cell activation. *J Immunol* 155:3360–3367, 1995.
- 99- DeBenedette MA, Chu NR, Pollok KE, Hurtado J, Wade WF, Kwon BS, Watts TH: Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by cAMP. *J Exp Med* 181:985–992, 1995.
- 100- Gilfillan MC, Noel PJ, Podack ER, Reiner SL, Thompson CB. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 160:2180–2187, 1998.
- 101- Gruss HJ, Boiani N, Williams DE, Armitage RJ, Smith CA, Goodwin RG. Pleiotropic effects of the CD30 ligand on CD30-expressing cells and lymphoma cell lines. *Blood* 83:2045–2056, 1994.
- 102- Bowen MA, Lee RK, Miragliotta G, Nam SY, Podack ER. Structure and expression of murine CD30 and its role in cytokine production. *J Immunol* 156:442-449, 1996.
- 103- Lee SY, Park CG, Choi Y. T cell receptor-dependent cell death of T cell hybridomas mediated by the CD30 cytoplasmic domain in

- association with tumor necrosis factor receptor-associated factors. *J Exp Med* 183:669-674, 1996.
- 104- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Daniel CK, D'Elis MM, Zancuoghi G, Vinante F, Pizzolo G, Romagnani S. Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cells producing Th2-type cytokines. *FASEB J* 9:81-86, 1995.
- 105- Kurts C, Carbone FR, Krummel MF, Koch KM, Miller JF, Heath WR. Signalling through CD30 protects against autoimmune diseases mediated by CD8+ T cells. *Nature* 398:341-344, 1999.
- 106- Beckmann J, Kurts C, Klebba I, Bayer B, Klempnauer J, Hoffmann MW. The role of CD30 in skin and heart allograft rejection in the mouse. *Transplant Proc* 33:140-141, 2001.
- 107- Latza U, Durkop H, Schnittger S, Rongelin J, Eitelbach F, Hummel M, Fonatsch C, Stein H. The human OX40 homolog:cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the ACT35 antigen. *Eur. J Immunol* 24:677-683, 1994
- 108- Baum PR, Gayle RB, 3<sup>rd</sup>, Ramsdell F, Srinivasan S, Sorensen RA, Watson ML, Seldin MF, Clifford KN, Grabstein K, Alderson MR, Goodwin RG, Fanslow WC. Identification of OX40 ligand and preliminary characterization of its activities on OX40 receptor. *Circ Shock* 44:30-34, 1994.
- 109- Weinberg AD. Antibodies to OX40 (CD134) can identify and eliminate autoractive T cells: implications for human autoimmune disease. *Mol Med Today* 4:76-83, 1998.
- 110- Durkop H, Latza U, Himmelreich P, Stein H. Expression of the human OX40 (hOX40) antigen in normal and neoplastic tissues. *Br. J Haematol* 91:927-931, 1995.
- 111- Ahshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahasi Y, Maliszewski C, Delepsesse G. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159:3838-3848, 1997.
- 112- Imura A, Hori T, Imada K, Ishikawa T, Tanaka Y, Maeda M, Inamura S, Uchiyama T. The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells. *J Exp Med* 183:2185-2195, 1996.
- 113- Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, Croft M. Ox-40 ligand: A potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cells responses. *J Immunol* 161:6510-6517, 1998.
- 114- Gramaglia I, Jember A, Pippig SD, Weinberg AD, Killen N, Croft M. The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J Immunol* 165:3043-3050, 2000.
- 115- Pippig SD, Pena-Rosi C, Long J, Godfrey WR, Fowell DJ, Reiner SL, Birkeland ML, Locksley RM, Barclay AN, Killen N. Robust B cell immunity but impaired T cell proliferation in the absence of CD134 (OX40). *J Immunol* 163:6520-6529, 1999.

- 116- Bansal-Pakala P, Jember AG, Croft M. Signalling through OX40 (CD134) breaks peripheral T-cell tolerance. *Nat Med* 7:907-912, 2001.
- 117- Higgins LM, McDonald SA, Whittle N, Crockett N, Shields JG, MacDonald TT. Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with OX40I-IgG fusion protein, but not with OX40 ligand-IgG fusion protein. *J Immunol* 162:486-493, 1999.
- 118- Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koch CS, Oshima H, Yagita H, Mizuno Y, Okumura K. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: A critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. *J Immunol* 166:2180-2115, 2001.
- 119- Scmitter D, Bolliger U, Hallek M, Pichert G. Involvement of the CD27-CD70 co-stimulatory pathway in allogenic T-cell responses to follicular lymphoma cells. *Br J Haematol* 106:64-70, 1999.
- 120- Akiba H, Oshima H, Takeda K, Nakano H, Nakajima A, Nohara C, Yagita H, Okumura K. CD28-independent co-stimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J Immunol* 162:7058-7066, 1999.
- 121- Jacquot S. CD27/CD70 interactions regulate T dependent B cell differentiation. *Immunol Res* 21:23-30, 2000.
- 122- Nakajima A, Oshima H, Nohara C, Morimoto S, Yoshino S, Kobata T, Yagita H, Okumura K. Involvement of CD70-CD27 interactions in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 109:188-196, 2000.
- 123- McNerney ME, Lee KM, Kumar V. 2B4 (CD244) is a non-MHC binding receptor with multiple functions on natural killer cells and CD8+ T cells. *Mol Immunol* 42:489-494, 2005.
- 124- Veillette A, Latour S. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol* 15:277-285, 2003.
- 125- Moretta A, Botino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Ann Rev Immunol* 19:197-223, 2001.
- 126- Coles MC, McMahon CW, Takizawa H, Raulet DH. Memory CD8 T lymphocytes express inhibitory MHC-I-specific Ly49 receptors. *Ur J Immunol* 30:236-244, 2000.
- 127- Lopez-Botet M, Bellon T. Natural killer cells activation and inhibition by receptors for MHC-I. *Curr Opin Immunol* 11:301-307, 1999.
- 128- Yokohama WM. Now you see it, now you don't. *Nat Immunol* 1:95-97, 2000.
- 129- Wu L, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-732, 1999.
- 130- Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalapny NJ. ULLBPs, novel MHC class I-related

- molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14:123-133, 2001.
- 131- Groh V, Rhinehart R, Randolph.Habecker J, Topps MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol.* 2:255-260, 2001.
  - 132- Zinkernagel RM, Doherty PC. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 1:14-17, 1997.
  - 133- Huseby E, Kappler J, Marrack P. Commentary: TCR-MHC/peptide interactions: kissing-cousins or a shotgun wedding?. *Eur J Immunol* 34:1243-1250. 2004.
  - 134- Biassoni R, Cantoni C, Marras D, Giron-Michel J, Falco M, Moretta L, Dimasi N. Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure *J Cell Mol Med* 7:376-387, 2003.
  - 135- Pedersen AE, Skov S, Bregenholt S, Ruhwald M, Claesson MH. Signal transduction by the major histocompatibility complex class I molecule. *APMIS* 107:887-895, 1999.
  - 136- Geppert TD, Wacholtz MC, Davis LS, Lipsky PE: Activation of human T4 cells by crosslinking class I MHC molecules. *J Immunol* 140:2155-2164, 1988.
  - 137- Geppert TD, Wacholtz MC, Patel SS, Lightfoot E, Lipsky PE: Activation of human T cell clones and Jurkat cells by cross-linking class I MHC molecules. *J Immunol* 142:3763-3772, 1989.
  - 138- Haruhito A, Tilney NL. Chronic graft rejection. *Curr. Opin. Immunol* 6:770-776, 1994.
  - 139- Skov S, Odum N, Claesson MH. MHC class I signaling in T cells leads to tyrosine kinase activity and PLC-gamma 1 phosphorylation *J. Immunol* 154: 1167–1176, 1995.
  - 140- Skov S, Klausen P, Claesson MH. Ligation of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules on human T cells induces cell death through PI-3 kinase-induced c-Jun NH2-terminal kinase activity: a novel apoptotic pathway distinct from Fas-induced apoptosis. *J Cell Biol* 139:1523-1531, 1997.
  - 141- Gur H, Geppert TD, Wacholtz MC, Lipsky PE. The cytoplasmic and the transmembrane domains are not sufficient for class I MHC signal transduction. *Cell Immunol* 191:105-116, 1999.
  - 142- Gur H, Geppert TD, Lipsky PE. Structural analysis of class I MHC molecules: the cytoplasmic domain is not required for cytoskeletal association, aggregation and internalizationcontrario. *Mol Immunol* 34:125-132, 1997.
  - 143- Wacholtz MC, Patel SS, Lipsky PE. Patterns of costimulation of T cell clones by cross-linking CD3, CD4/CD8, and class I MHC molecules. *J Immunol* 142:4201-4212, 1989.
  - 144- Sambhara SR, Miller RG: Programmed cell death of T cells signaled by the T cell receptor and the alpha 3 domain of HLA class I. *Science* 252:1424-1427, 1991.

- 145- Wallen-Ohman M, Larrick JW, Carlsson R, Borrebaeck CA.: Ligation of MHC class I induces apoptosis in human pre-B cell lines, in promyelocytic cell lines and in CD40-stimulated mature B cells. *Int Immunol* 9:599-606, 1997.
- 146- Matsuoka S, Asano Y, Sano K, Kishimoto H, Yamashita I, Yorifuji H, Utsuyama M, Hirokawa K, Tada T. A novel type of cell death of lymphocytes induced by a monoclonal antibody without participation of complement. *J. Exp. Med* 181:2007-2015, 1995.
- 147- Matsuoka S, Tsurui H, Abe M, Terashima K, Nakamura K, Hamano Y, Ohtsuji M, Honma N, Serizawa I, Ishii Y, Takiguchi M, Hirose S, Shirai T. A monoclonal antibody to the alpha2 domain of murine major histocompatibility complex class I that specifically kills activated lymphocytes and blocks liver damage in the concanavalin A hepatitis model. *J Exp Med* 198:497-503, 2003.
- 148- Goodwin RG, Alderson MR, Smith CA, Armitage RJ, VandenBos T, Jerzy R, Tough TW, Schoenborn MA, Davis-Smith T, Hennen K, et al. Molecular and biological characterization of a ligand for CD27 defines a new family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *Cell* 73:447-456, 1993.
- 149- Hintzen RQ, Lens SM, Beckmann MP, Goodwin RG, Lynch D, van Lier RA. Characterization of the human CD27 ligand, a novel member of the TNF gene family. *J Immunol* 152:1762-1773, 1994.
- 150- Bowman RQ, Crimmins MA, Yetz-Aldape J, Kriz R, Kelleher K, Hermann S. The cloning of CD70 and its identification as ligand of for CD27. *J Immunol* 152:1756-1761, 1994.
- 151- Tesselaar K, Gravestien LA, van Schijndel GM, Borst J, van Lier RA. Characterization of murine CD70, the ligand of the TNF receptor family member CD27. *J Immunol* 159:4959-4965, 1997.
- 152- Lens SM, Tesselaar K, van Oers MH, van Lier RA. Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Semin Immunol* 10:491-499, 1998.
- 153- Brown GR, Meek K, Nishioka Y, Thiele DL. CD27-CD27 ligand/CD70 interactions enhance alloantigen-induced proliferation and cytolytic activity in CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 154:3686-3695, 1995.
- 154- Hintzen RQ, Lens SM, Lammers K, Kuiper H, Beckmann MP, van Lier RA. Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J Immunol* 154:2612-2623, 1995.
- 155- Arens R, Nolte MA, Tesselaar K, Heemskerk B, Reedquist KA, van Lier RA, van Oers MH. Signaling through CD70 regulates B cell activation and IgG production. *J Immunol* 173:3901-3908, 2004.
- 156- Brenner B, Koppenhoefer U, Leppl-Wienhues A, Grassme H, Muller C, Speer CP, Lang F, Gulbins E. The CD40 ligand directly activates T-lymphocytes via tyrosine phosphorylation dependent PKC activation. *Biochem Biophys Res Commun* 239:11-17, 1997.
- 157- Wiley SR, Goodwin RG, Smith CA. Reverse signaling via CD30 ligand. *J Immunol* 157:3635-3639, 1996.

- 158- Orengo AM, Cantoni C, Neglia F, Biassoni R, Ferrini S. Reciprocal expression of CD70 and of its receptor, CD27, in human long term-activated T and natural killer (NK) cells: inverse regulation by cytokines and role in induction of cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 107:608-613, 1997.
- 159- Gamero, A.M., Ussery, D., Reintgen, D.S., Puleo, C.A. and Djeu, J.Y., Interleukin 15 induction of lymphokine-activated killer cell function against autologous tumor cells in melanoma patient lymphocytes by a CD18-dependent, perforin-related mechanism. *Cancer Res* 55:4988-4994, 1995.
- 160- Brooks, C.G., Reversible induction of natural killer cell activity in cloned murine cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 305:155-158, 1983.
- 161- Ogasawara K, Hamerman JA, Ehrlich LR, Bour-Jordan H, Santamaria P, Bluestone JA, Lanier LL. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* 20:757-767, 2004.
- 162- Sollid LM, Jabri B. Is celiac disease an autoimmune disorder? *Curr Opin Immunol* 17:595-600, 2005.
- 163- Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 362:383-391, 2003.
- 164- Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 3:357-366, 2004.
- 165- Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N.. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 125:730-745, 2003.
- 166- De Palma R, Del Galdo F, Abbate G, Chiariello M, Calabro R, Forte L, Cimmino G, Papa MF, Russo MG, Ambrosio G, Giombolini C, Tritto I, Notaristefano S, Berrino L, Rossi F, Golino P. Patients with acute coronary syndrome show oligoclonal T-Cell recruitment within unstable plaque: Evidence for a local, intracoronary immunologic mechanism. *Circulation* 113: 640-646, 2006.
- 167- Hernández-Caselles T. M, Martínez-Esparza, A. I. Lazarovitz, and P. Aparicio. Specific regulation of VLA-4 and 4 $\beta$ 7 integrin expression on human activated T lymphocytes. *J. Immunol* 156:3668-3675, 1996.
- 168- Garcia P, Llano M, de Heredia AB, Willberg CB, Caparros E, Aparicio P, Braud VM, Lopez-Botet M. Human T cell receptor-mediated recognition of HLA-E. *Eur J Immunol* 32:936-944, 2002.
- 169- Chang C, Rodriguez A, Carretero M, Lopez-Botet M, Phillips JH, Lanier LL. Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur J Immunol* 25:2433-2437, 1995.
- 170- Hedin KE, Bell MP, Kalli KR, Huntoon CJ, Sharp BM, McKean DJ. Delta-opioid receptors expressed by Jurkat T cells enhance IL-2

- secretion by increasing AP-1 complexes and activity of the NF-AT/AP-1-binding promoter element. *J Immunol* 159:5431-5440, 1997.
- 171- Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285:2129-2133, 1999.
- 172- Aramburu, J., M. A. Balboa, A. Ramirez, A Silva, A. Acevedo, F. Sánchez-Madrid, M. O. de Landázuri, M. López-Botet. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer and T cell receptor  $\gamma\delta$  T lymphocytes. *J. Immunol* 144:3238-3242, 1990.
- 173- Sancho D, Montoya MC, Monjas A, Gordon-Alonso M, Katagiri T, Gil D, Tejedor R, Alarcon B, Sanchez-Madrid F. TCR engagement induces proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) translocation to the T cell-APC interface independently of Pyk2 activity and in an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-mediated fashion. *J Immunol* 169:292-300, 2002.
- 174- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 23:225-274, 2005
- 175- Watts AD, Hunt NH, Wanigasekara Y, Bloomfield G, Wallach D, Roufogalis BD, Chaudhri G. A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO J* 180:2119-2126, 1999.
- 176- Brenner B, Koppenhoefer U, Grassme H, Kun J, Lang F, Gulbins E. Evidence for a novel function of the CD40 ligand as a signalling molecule in T-lymphocytes *FEBS Lett* 417:301-306, 1997.
- 177- Koyasu S. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol* 4:313-319, 2003.
- 178- Jacquot S, Macon-Lemaitre L, Paris E, Kobata T, Tanaka Y, Morimoto C, Schlossman SF, Tron F. B cell co-receptors regulating T cell-dependent antibody production in common variable immunodeficiency: CD27 pathway defects identify subsets of severely immunocompromised patients. *Int Immunol* 7:871-876, 2001.
- 179- Groth C, Drager R, Warnatz K, Wolff-Vorbeck G, Schmidt S, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27-) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* 129:133-139, 2002.
- 180- Yamada A, Salama AD, Sho M, Najafian N, Ito T, Forman JP, Kewalramani R, Sandner S, Harada H, Clarkson MR, Mandelbrot DA, Sharpe AH, Oshima H, Yagita H, Chalasani G, Lakkis FG, Auchincloss H Jr, Sayegh MH. CD70 Signaling Is Critical for CD28-Independent CD8+ T Cell-Mediated Alloimmune Responses In Vivo. *J Immunol* 174:1357-1364, 2005.
- 181- Gur H, el-Zaatari F, Geppert TD, Wacholtz MC, Taurog JD, Lipsky PE. Analysis of T cell signaling by class I MHC molecules: the cytoplasmic domain is not required for signal transduction. *J Exp Med* 172:1267-1270, 1990.



- 182- Wagner N, Engel P, Vega M, Tedder TF. Ligation of MHC class I and class II molecules can lead to heterologous desensitization of signal transduction pathways that regulate homotypic adhesion in human lymphocytes. *J Immunol* 152:5275-5287, 1994.
- 183- Vyas YM, Mehta KM, Morgan M, Maniar H, Butros L, Jung S, Burkhardt JK, Dupont B. Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J Immunol* 167:4358-4367, 2001.
- 184- Rajagopalan S, Fu J, Long EO. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 167:1877-1881, 2001.
- 185- Leishman AJ, Naidenko OV, Attinger A, Koning F, Lena CJ, Xiong Y, Chang HC, Reinherz E, Kronenberg M, Cheroutre H. T cell responses modulated through interaction between CD8alpha and the nonclassical MHC class I molecule, TL. *Science* 294:1936-1939, 2001.
- 186- Rubio G, Ferez X, Sánchez-Campillo M, Galvez J, Martí S, Verdú R, García-Peñarrubia P. Cross-linking of MHC-I molecules on human NK cells inhibits NK cells function, segregates MHC-I from the NK cells synapse, and induce intracellular phospho tyrosines. *J Leukoc Biol* 76:116-124, 2004.
- 187- Geppert TD, Lipsky PE. Associations of various T cell-surface molecules with the cytoskeleton. Effect of cross-linking and activation. *J Immunol* 146:3298-3305, 1991.
- 188- Vereb G, Matko J, Vamosi G, Ibrahim SM, Magyar E, Varga S, Szollosi J, Jenei A, Gaspar R Jr, Waldmann TA, Damjanovich S. Cholesterol-dependent clustering of IL-2R alpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipids rafts. *Proc Nat Acad Sci USA* 97:6013-6018, 2000.
- 189- Damjanovich S, Matyus L, Damjanovich L, Bene L, Jenei A, Matko J, Gaspar R, Szollosi J. Does mosaicism of the plasma membrane at molecular and higher hierarchical levels in human lymphocytes carry information on the immediate history of cells? *Immunol Lett* 82:93-96, 2002.
- 190- McMahon CW, Zajac AJ, Jamieson AM, Corral L, Hammer GE, Ahmed R, Raulet DH. Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell receptors in responding CD8(+) T cells. *J Immunol* 169:1444-1452, 2002.
- 191- Freitas AA, Rocha B. Population biology of lymphocytes: the fight for survival. *Annu Rev Immunol* 18:83-111, 2000.
- 192- Copper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colona M, Caligiuri MA. NK and DC interactions. *Trends Immunol* 25:47-52, 2004.
- 193- Sato T, Kanai T, Watanabe M, Sakuraba A, Okamoto S, Nakai T, Okazawa A, Inoue N, Totsuka T, Yamazaki M, Kroczeck RA, Fukushima T, Ishii H, Hibi T. Hyperexpression of inducible costimulator and its

- contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 126:829-839, 2004.
- 194- Vijayakrishnan L, Slavik JM, Illes Z, Greenwald RJ, Rainbow D, Greve B, Peterson LB, Hafler DA, Freeman GJ, Sharpe AH, Wicker LS, Kuchroo VK. An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity* 20:563-575, 2004.
- 195- Weeraratna AT, Nagel JE, Mello-Coelho Vd V, Taub DD. Gene expression profiling: from microarrays to medicine. *J Clin Immunol* 24:213-224, 2004.
- 196- Ju XS, Hacker C, Scherer B, Redecke V, Berger T, Schuler G, Wagner H, Lipford GB, Zenke M. Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation. *Gene* 331:159-164, 2004.

## 9. AUTOBIBLIOGRAFÍA

1. Garcia P, De Heredia AB, Bellon T, **Carpio E**, Llano M, Caparros E, Aparicio P, Lopez-Botet M. Signalling via CD70, a member of the TNF family, regulates T cell functions. *J Leukoc Biol.*;76:263-70, 2004.
2. Caparros E, de Heredia AB, **Carpio E**, Sancho D, Aguado E, Aparicio P. Aggregation of MHC class I molecules on a CD8+ alphabeta T cell clone specifically inhibits non-antigen-specific lysis of target cells. *Eur J Immunol.* 34:47-55, 2004.
3. P. Aparicio Alonso, G. Rubio Pedraza, E. Caparrós Cayuela, X. Pérez, A. Beltrán de Heredia, T. Hernández Caselles, **E. Carpio Muñoz**, S. Martí Pères, E. Aguado Vidal, P. García-Peñarrubia. Inhibición de la actividad citotóxica no restringida por MHC de células NK y de clones T CD8+alfa-beta por la agregación de moléculas MHC de clase I Inhibition of non MHC-restricted cytotoxicity of human NK cells and a CD8+alpha-beta T cell clone by MHC class I cross-linking. *Inmunologia*, 23: 284- 291, 2004.
3. **Carpio E**. Identificación de receptores que modulan las funciones de los linfocitos T citotóxicos humanos. Presentación en “Forum de Ciencia y Técnica”. Facultad de Ciencias Médicas.Sancti Spiritus. 2005.
4. **Carpio E**. La agregación de las moléculas del MHC-I en la superficie de un clon de células T CD8+alfa-beta+ inhibe la lisis antígeno-inespecífica de las células diana. Presentación en el “Concurso Premio Anual de la salud”, Provincia de Sancti Spiritus.