

Desarrollo de un ensayo funcional *in vitro* para detectar anticuerpos con actividad agonista

Marta Martínez López¹

Graduada en Biotecnología. mmartl22@estudiantes.unileon.es

Resumen

Los bioensayos funcionales *in vitro* son fundamentales para la correcta caracterización de medicamentos biológicos como los inhibidores de los puntos de control inmunitarios (ICI). Estos ICI pueden bloquearse mediante anticuerpos que impiden la transmisión de señales co-inhedoras, permitiendo, de esta manera, una respuesta inmunitaria más efectiva contra las células cancerígenas. En este trabajo, se ha puesto a punto un bioensayo *in vitro* para activar los linfocitos T, a través del correceptor del TcR (CD3), sin la necesidad de antígeno, y evaluar el impacto de la interacción entre HVEM (mediador de entrada del virus del herpes) y BTLA (atenuador de linfocitos B y T) en esta activación. El bioensayo consiste en la realización de un cocultivo entre unas células estimuladoras (línea celular CHO modificada genéticamente para la expresión del gen que codifica para scFv anti-CD3) y como células respondedoras, la línea celular Jurkat TPR, que expresa tres factores de transcripción unidos a tres fluorocromos diferentes (mCherry, CFP y eGFP: unidos a AP-1, NF-kB y NFAT respectivamente), con el objetivo de estudiar su activación mediante citometría de flujo. Durante el trabajo se ha realizado el clonaje de la proteína BTLA y la posterior transducción en las células Jurkat TPR. A continuación, se realizaron los bioensayos en los que se demostró que funcionaban activando los linfocitos T, sin necesidad de presentar antígeno y detectando los fluorocromos mediante citometría de flujo. Mediante este ensayo, comprobamos que la interacción BTLA-HVEM disminuye la activación de las células T y, el bloqueo de este ICI mediante anticuerpos anti-HVEM, aumentaba la respuesta de las células Jurkat TPR respondedoras. En conclusión, hemos desarrollado un sistema experimental *in vitro* que permite estudiar interacciones ligando/receptor en el contexto de la activación de las células T, para aumentar o reprimir la función de las mismas.

Palabras clave

Bioensayo (*in vitro*), BTLA, HVEM, inmunoterapia, linfocito T y receptor co-inhibidor

Introducción

Los linfocitos T

Los linfocitos T forman parte de la respuesta inmunitaria adaptativa. Cuentan con los receptores de antígenos de los linfocitos T (TCRs) que se encuentran asociados al complejo CD3 (Alcover *et al.*, 2018).

La activación de los linfocitos T (**Figura 1**) requiere de múltiples señales y comienza cuando el TCR reconoce un péptido asociado al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de una APC (célula presentadora de antígenos). Esto va a resultar en que el complejo CD3 transduzca la señal al interior del linfocito desencadenando una cascada de señalización celular (Alcover *et al.*, 2018). A continuación, va a tener lugar una segunda señal de coestimulación, necesaria para que continúe la activación del linfocito. Se produce gracias a la interacción entre CD28-CD80/86 que, junto a la primera señal, va a resultar en la entrada de Ca^{2+} en el citoplasma, dando lugar a la activación del factor nuclear de las células T activadas (NFAT). Además, se va a activar la proteína quinasa C que resulta en la activación del factor nuclear κB (NF- κB), y la generación de la proteína activadora 1 (AP-1). Estos factores de transcripción se translocan al núcleo y su acción coordinada resulta en la transcripción de la citoquina interleucina 2 (IL-2). IL-2 se une al receptor de alta afinidad dando lugar a la tercera señal que resulta en la proliferación y diferenciación de las células T (Esensten *et al.*, 2016).

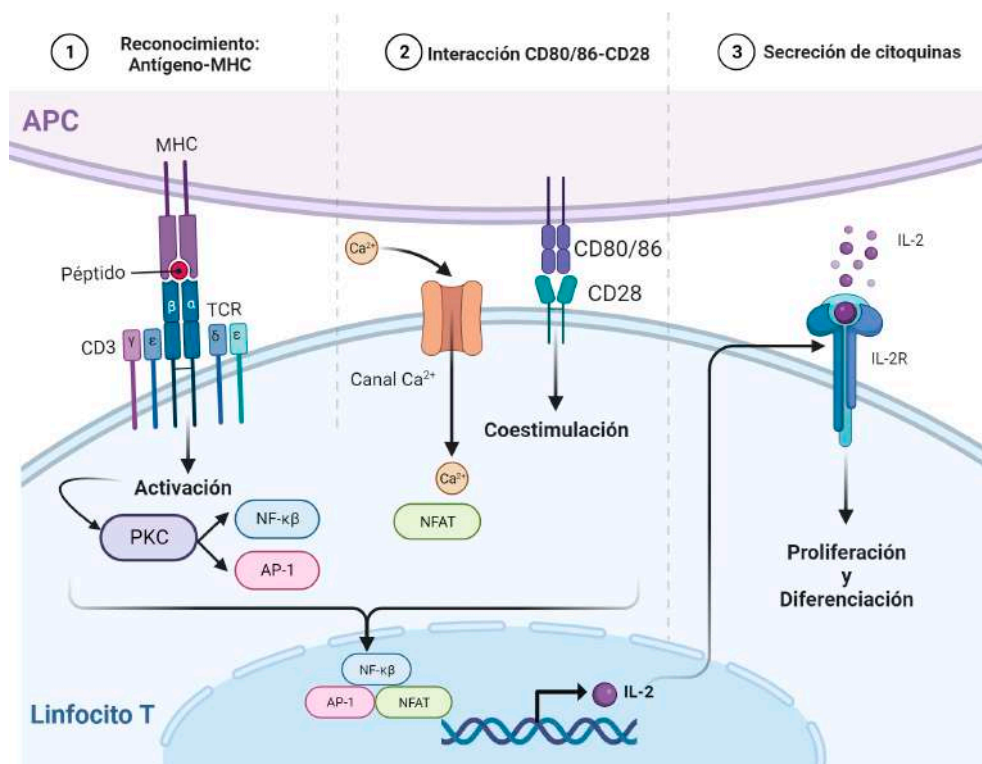


Figura 1. Representación del proceso de activación de un linfocito T. Creado con BioRender.com

Inhibidores de los puntos de control inmunitarios

La segunda señal comentada anteriormente puede que, en lugar de coestimulación, sea de cohibición, lo que también se conoce como punto de control inmunitario. Un ejemplo, y en el que se va a centrar este trabajo, es el formado por HVEM-BTLA. Los inhibidores de los puntos de control inmunitarios (ICI) son moléculas, como anticuerpos, que bloquean estos puntos de control. Su importancia radica en que pueden ser empleados en inmunoterapia contra el cáncer (De Sousa Linares *et al.*, 2018).

El atenuador de linfocitos B y T (BTLA) es un receptor transmembrana de tipo I perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Su dominio citoplasmático presenta dos motivos inhibidores clásicos: ITIM e ITSM. El ligando de BTLA es HVEM (mediador de entrada del virus del herpes); es miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (Pasero y Olive, 2013).

Hipótesis y objetivos del trabajo

Las señales coinhibidoras y coestimuladoras regulan el curso de la expansión clonal y de diferenciación de las células T naïve hacia las células T efectoras (Bonilla y Oettgen, 2010). En este trabajo, se plantea el desarrollo de una plataforma experimental para evaluar el papel de la interacción HVEM-BTLA en el curso de la activación de los linfocitos T mediada por anticuerpos anti-CD3 utilizando un bioensayo reportero basado en células estimuladoras (CHO) y células respondedoras (Jurkat TPR).

Material y métodos

En primer lugar, se llevó a cabo el clonaje de BTLA partiendo de ARNm de ratón BL6 que había sido extraído previamente, este se transformó en ADN complementario de BTLA, y a continuación, se ligó con el vector intermediario pJET, con el objetivo de obtener un mayor número de copias del plásmido. Tras esto, se realizó la digestión de pJET con BTLA y la del vector final retroviral pMSCV con las mismas enzimas *XhoI* y *HindIII*. Se secuenció el inserto para comprobar que no hubiese sufrido mutaciones a lo largo de los pasos.

La segunda parte del trabajo se basó en la transducción de las células Jurkat TPR con BTLA. Se realizó la transfección de la línea celular HEK293T con tres plásmidos para generar las partículas retrovirales: dos de empaquetamiento y pMSCV con el inserto de interés. Seguidamente, se realizó la transducción de linfocitos Jurkat TPR de tal forma que se expresase de forma estable la proteína BTLA. Para asegurarse de que todos los linfocitos Jurkat TPR estaban expresando BTLA se llevó a cabo su cultivo y selección utilizando la técnica de clonaje de célula única mediante dilución límite. Una vez se confirmó que toda la población expresaba BTLA, se procedió a realizar las pruebas para comprobar la funcionalidad del bioensayo.

El bioensayo se basa en el cocultivo de dos poblaciones celulares, una población estimuladora y otra la respondedora. Como células estimuladoras se empleó la línea celular CHO (ovario de hámster chino) que habían sido modificadas previamente en el laboratorio para expresar de forma estable OKT3, que es un fragmento de cadena única anti-CD3 humano. De esta forma pueden activar células T humanas en cocultivo sin necesidad de que una APC presente un antígeno al linfocito T, ya que se recrea la primera señal de activación de los linfocitos T.

Como células respondedoras se empleó la línea celular Jurkat TPR. Son unos linfocitos T de leucemia humana en los que se ha generado un “Triple Parameter Reporter” (TPR), sistema reportero de tres parámetros como el diseñado por los investigadores Sabrina Jutz *et al.* (2016). Los factores de transcripción NF- κ B, NFAT y AP-1 han sido fusionados con las proteínas fluorescentes CFP, eGFP y mCherry, respectivamente (Jutz *et al.*, 2016). De esta forma, los espectros de emisión de estas proteínas permiten evaluar simultáneamente la actividad de NF- κ B, NFAT y AP-1 en respuesta a la estimulación. Así, si se modifican genéticamente las células con las moléculas deseadas se puede ver su interacción y efecto en la activación de los linfocitos T. En este caso se modificará la población CHO con HVEM y la Jurkat TRP con BTLA.

Resultados

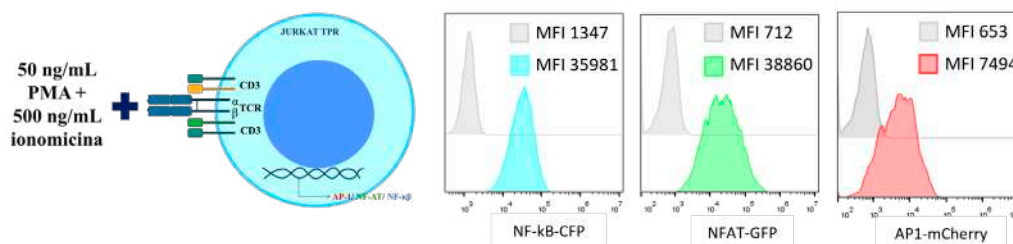
Comprobación de inducción CHO-scFv anti-hu CD3 y Jurkat TPR

En la **Figura 2** se representan los resultados de citometría del primer ensayo. El objetivo de este ensayo era comprobar que el anticuerpo OKT3 es capaz de inducir la activación del linfocito T; para ello se realizaron tres cocultivos durante 24 horas de tres condiciones distintas (estímulo policlonal, ausencia de estímulo y activación anti-CD3) y se mantuvo también en cultivo a las células Jurkat TPR sin inducir para usarlas como control negativo.

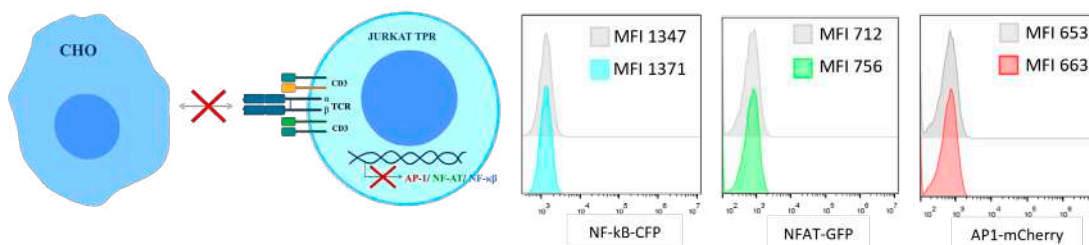
En primer lugar, se cultivaron las células Jurkat TPR con PMA e ionomicina (estímulo policlonal) como control positivo (**Figura 2A**). Gracias a este control se confirmó que era posible detectar mediante citometría de flujo los fluorocromos asociados a los factores de transcripción. En la segunda condición, las células Jurkat TPR en cocultivo con la línea celular CHO sin modificar (ausencia de estímulo), no se han expresado los factores de transcripción (**Figura 2B**). La intensidad media de fluorescencia (MFI) de los fluorocromos de interés es prácticamente la misma que la de las células TPR sin inducir, lo que confirma que las células CHO sin modificar no activan los linfocitos T. En último lugar, se realizó el cocultivo de la línea celular CHO-scFv anti-hu CD3 con Jurkat TPR (**Figura 2C**) y se comprobó que las células CHO con OKT3 (scFv anti-hu CD3) son capaces de inducir la activación de las células Jurkat sin antígeno, ya que se produce un aumento de la MFI respecto a las células TPR sin inducir.

Sin embargo, la transcripción del factor AP-1 resultó ser muy débil. Esto se puede deber a que el factor AP-1 es el de activación más rápida de los tres y su pico de expresión máxima ocurre según la bibliografía a las 8 horas, disminuyendo la expresión rápidamente (Jutz *et al.*, 2016).

A) JURKAT TPR + 50 ng/mL PMA + 500 ng/mL ionomicina (CONTROL POSITIVO): Estímulo Policlonal



B) JURKAT TPR cocultivadas con CHO (CONTROL NEGATIVO): Ausencia de estímulo



C) JURKAT TPR cocultivadas con CHO-scFv anti-hu CD3: Activación Anti-CD3

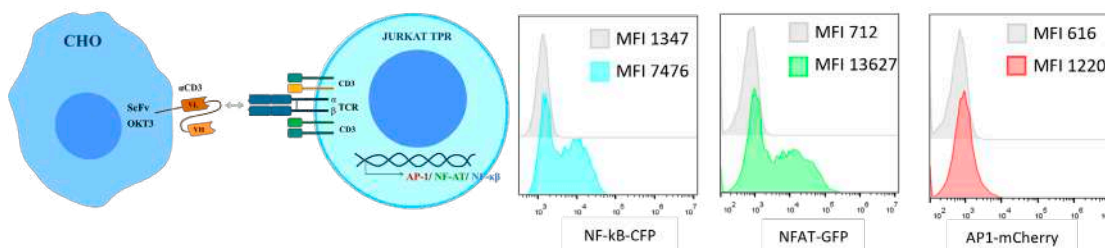


Figura 2. Resultados del bioensayo del cocultivo entre CHO-scFv anti-hu CD3 y Jurkat TPR. En la primera columna, se observa un esquema representativo de cada condición. En las tres columnas siguientes, se observan los histogramas normalizados del resultado de la citometría: en gris, el control negativo (TPR sin inducir), el sombreado en color representa los factores de transcripción (NF-κB: azul, NFAT: verde y mCherry: rojo). MFI hace referencia a la intensidad de fluorescencia media. Histogramas creados con el software *FlowJo* (Becton, Dickinson & Co., 2002).

Bioensayo CHO-scFv anti-hu CD3 mHVEM y Jurkat TPR mBTLA

Tras haber confirmado que la activación de los linfocitos T mediante la inducción de CHO-OKT3 es posible, se procedió a estudiar el efecto de la interacción HVEM-BTLA. Se realizó el ensayo para evaluar la interacción entre HVEM de expresión estable en las células CHO, y BTLA de expresión estable en las células Jurkat (**Figura 3B**). Se comprueba al comparar las **Figuras 3A y 3B**, que la MFI en el caso de CFP fusionado al factor NF-κB pasa de 9947 en el caso A, a 7028 en el caso B, lo que supone una disminución del 29,34 % $[(9947 - 7028) / 9947] \times 100$). En cuanto, al eGFP fusionado NFAT la MFI pasa de 19939 a 12021,

lo que supone una reducción de casi un 39,71 % en la tasa de transcripción del NFAT. Se observa que, de los dos factores de transcripción, el que ve su expresión más reducida es el factor NFAT.

Esta disminución de MFI indica que la interacción entre HVEM-BTLA inhibe parte de la respuesta de activación del linfocito T. Se confirma por tanto que HVEM y BTLA forman un punto de control inmunitario y que esta plataforma experimental permite evaluar dicha interacción molecular.

Bioensayo CHO-scFv anti-hu CD3 mHVEM y Jurkat TPR mBTLA con anticuerpos

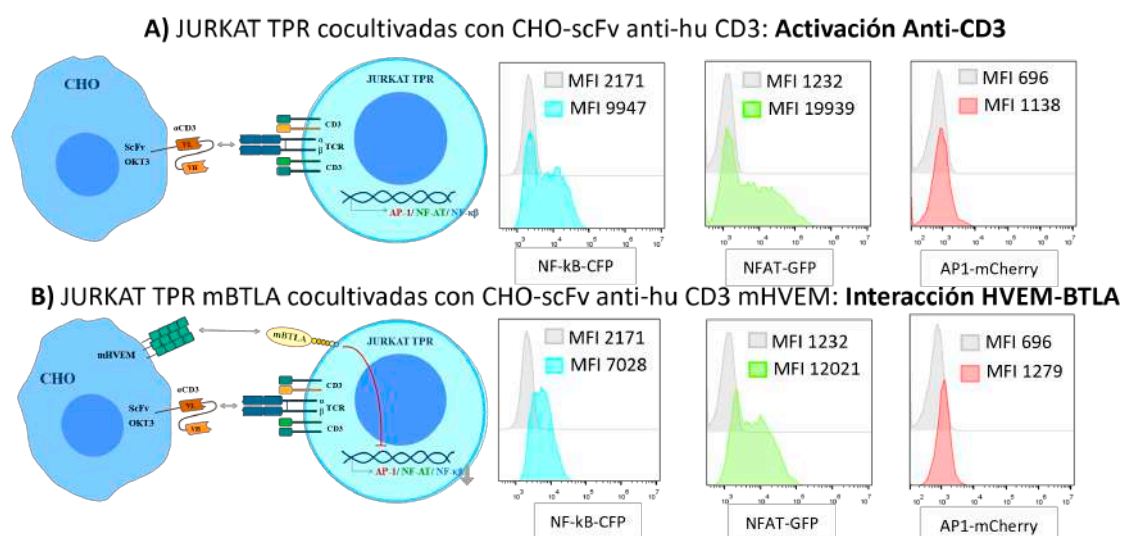


Figura 3. Resultados del bioensayo del cocultivo entre CHO-scFv anti-hu CD3 mHVEM y Jurkat TPR mBTLA. En la primera columna se observa un esquema representativo de cada condición. En las tres columnas siguientes se observan los histogramas normalizados del resultado de la citometría: en gris el control negativo (TPR sin inducir) el sombreado en color representa los factores de transcripción (NF-κB: azul, NFAT: verde y mCherry: rojo). MFI hace referencia a la intensidad de fluorescencia media. Histogramas creados con el software *FlowJo* (Becton, Dickinson & Co., 2002).

Tras confirmar la inhibición de la activación de los linfocitos T, en el tercer ensayo se trató de modular esta respuesta empleando anticuerpos anti-HVEM y anti-BTLA. Se realizó el ensayo con seis anticuerpos generados en el laboratorio de Inmunología (del Rio *et al.*, 2011; del Rio *et al.*, 2012): cuatro anti-HVEM (6C9, 10F3, 5B7 y 1H7) y dos anti-BTLA (4G12b y 6A6). De estos anticuerpos, 6C9 y 10F3 son anticuerpos bloqueantes, es decir, se unen al sitio de HVEM donde interacciona BTLA.

En la **Figura 4** se recogen los resultados de intensidad de fluorescencia de la citometría para CFP unido a NF-κB y eGFP unido a NFAT. No se recogen los resultados de mCherry unido a AP-1, ya que su señal era demasiado débil. Se resumen los resultados de la MFI en los **Gráficos 4.1** para CFP unido a NF-κB y en los **Gráficos 4.2** para eGFP unido a NFAT.

Considerando los resultados de los gráficos, se demuestra que dos de los anticuerpos anti-HVEM (los bloqueantes): 6C9 y 10F3, son funcionales y pueden revertir la inhibición de los linfocitos T, aumentando la producción de los factores de transcripción. En cuanto al anticuerpo, anti-HVEM 6C9 es el más efectivo, y se observa que la población de células Jurkat TPR transducidas experimenta un incremento del 34,23 % en la tasa de transcripción del factor NFAT con respecto al control y 26,67 % en la tasa de NF- κ B. Respecto al anticuerpo anti-HVEM 10F3, se da un incremento del 30,16 % en la tasa de transcripción del factor NFAT con respecto al control y del 11,81 % en la tasa de NF- κ B. El anticuerpo anti-BTLA 6A6 al unirse a BTLA podría revertir la inhibición de la interacción HVEM-BTLA, aunque en menor medida que los anticuerpos anti-HVEM bloqueantes.

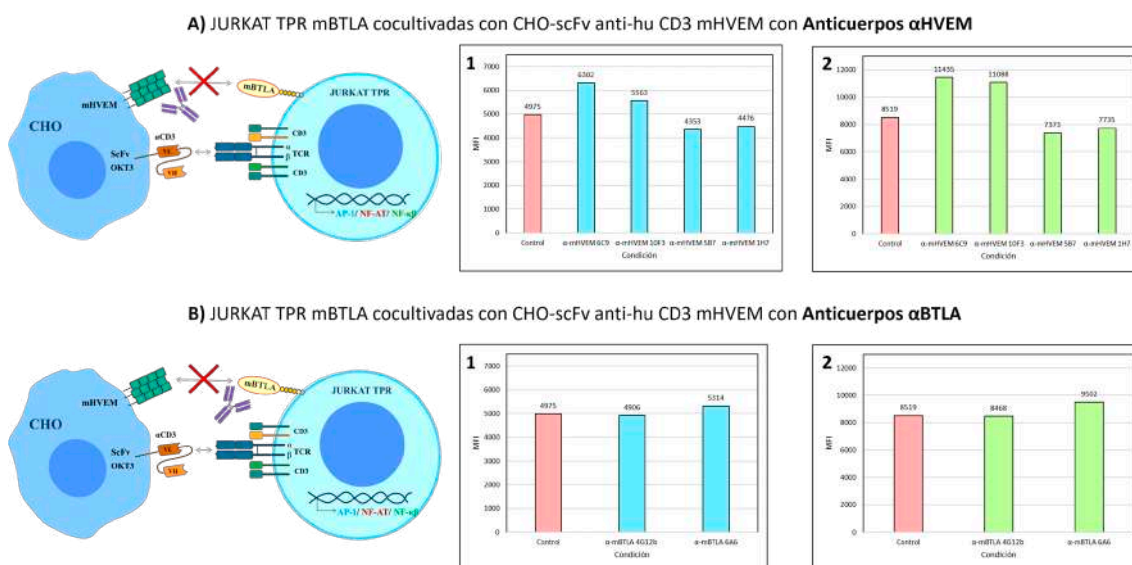


Figura 4. Resultados del bioensayo del cocultivo entre CHO-scFv anti-hu CD3 mHVEM y Jurkat TPR mBTLA con anticuerpos. En la primera columna, se observa un esquema representativo. En las columnas 2 y 3 se observan gráficos de barras que representan los resultados de la media de intensidad de fluorescencia de (1) CFP fusionado al factor nuclear NF- κ B y (2) eGFP fusionado al factor nuclear NFAT. Como control se recoge la MFI de las Jurkat TPR mBTLA cocultivadas con CHO-scFv anti-hu CD3 mHVEM (barras rojas). Las barras azules y verdes representan las células Jurkat TPR mBTLA cocultivadas con CHO-scFv anti-hu CD3 mHVEM en presencia de cada anticuerpo: (A) Anti-HVEM y (B) Anti-BTLA.

Discusión y conclusiones

Como se puede observar en los resultados, se consiguió la activación de las células TPR con las células CHO-OKT3 y se demostró que se podían detectar mediante citometría de flujo los factores de transcripción, sobre todo NFAT y NF- κ B y, en menor medida, AP-1.

En cuanto a la interacción entre BTLA-HVEM, se vio que tenía un efecto inhibitorio sobre la activación de las células T, especialmente a nivel de NFAT y NF- κ B. Es necesario recalcar que, como se ha mencionado anteriormente, la

interacción entre HVEM-BTLA es muy compleja, con la presencia de señales inmunopotenciadoras e inmunosupresoras al mismo tiempo (Battin *et al.*, 2022). Sin embargo, al comprobar el efecto inhibitorio de la interacción HVEM-BTLA, se demuestra que es un punto de control inmunitario y su potencial para ser modulado como posible inmunoterapia. El resultado coincide con lo que se ha realizado en otros trabajos utilizando las moléculas HVEM-BTLA humanas (Battin *et al.*, 2022). Cabe destacar, que la reducción en la expresión de los factores de transcripción es parcial (~30 % (NF- κ B) y ~40 % (NFAT); es posible que sean necesarias más interacciones para su inhibición completa, ya que lo que se pone a punto en este trabajo es un modelo experimental simplificado y diseñado especialmente para estudiar unos aspectos muy concretos.

Es por este potencial para modular la interacción entre HVEM y BTLA por lo que se trató de encontrar anticuerpos que la inhibiesen, con el fin de regular al alza la respuesta de los linfocitos T. De los anticuerpos probados se comprobó que dos de los anticuerpos anti-HVEM (los bloqueantes) eran funcionales y podían revertir la inhibición de los linfocitos T, aumentando la producción de dos factores de transcripción (NFAT y NF- κ B), demostrando su capacidad de actuar como ICI. Es posible que la expresión de otros factores de transcripción también incrementa al emplear dichos anticuerpos, pero en este trabajo solo se analizaron los factores de transcripción: AP1, NF- κ B y NFAT.

La importancia de este trabajo se basa en haber puesto a punto un sistema *in vitro* que permite estudiar la activación de las células T de forma sencilla y de cómo distintas moléculas influyen en este proceso. Asimismo, es un sistema muy versátil y económico que permite el estudio de tres factores de transcripción de manera simultánea, evitando además el uso de animales de experimentación.

En futuros experimentos en el laboratorio se podría continuar estudiando la interacción de HVEM y BTLA, repitiendo el ensayo más veces y probando otros anticuerpos para tratar de encontrar anticuerpos más efectivos. Además, en un futuro también se podrían probar otras moléculas y estudiar el potencial de otros anticuerpos sobre ellas, cuyo porcentaje de reactivación de los factores de transcripción sea superior a los nuestros.

En resumen, esta plataforma molecular/celular ha permitido el desarrollo de un bioensayo reportero que está ayudando a caracterizar nuevos anticuerpo anti-HVEM y anti-BTLA con nuevas propiedades inmunoterapéuticas.

Referencias

- Alcover, A., Alarcón, B. y Di Bartolo, V. 2018. Cell biology of T cell receptor expression and regulation. *Annual Review of Immunology*, 36: 103–125.
- Battin, C., Leitner, J., Waidhofer-Söllner, P., Grabmeier-Pfistershammer, K. *et al.* 2022. BTLA inhibition has a dominant role in the cis-complex of BTLA and HVEM. *Frontiers in Immunology*, 13: 956694.

- Becton, Dickinson & Co. 2002. *FlowJo™ Software* (Versión 10.0.7) [Programa de ordenador] Disponible en: <https://www.flowjo.com/solutions/flowjo/downloads> (Accedido: 10 de abril de 2023).
- BioRender. 2023. *BioRender*. Disponible en: <https://www.biorender.com> (Accedido: 21 de junio de 2023).
- Bonilla, F.A. y Oettgen, H.C. 2010. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2): S33–S40.
- De Sousa Linhares, A., Leitner, J., Grabmeier-Pfistershammer, K. y Steinberger, P. 2018. Not all immune checkpoints are created equal. *Frontiers in Immunology*, 9: 1909.
- del Rio, M.L., Kurtz, J., Perez-Martinez, C., Ghosh, A. *et al.* 2011. B- and T-lymphocyte attenuator targeting protects against the acute phase of graft versus host reaction by inhibiting donor anti-host cytotoxicity. *Transplantation*, 92(10): 1085–1093.
- del Rio, M.-L., Jones, N.D., Buhler, L., Norris, P. *et al.* 2012. Selective blockade of herpesvirus entry mediator–B and T lymphocyte attenuator pathway ameliorates acute graft-versus-host reaction. *The Journal of Immunology*, 188(10): 4885–4896.
- Esensten, J.H., Helou, Y.A., Chopra, G., Weiss, A. *et al.* 2016. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*, 44(5): 973–988.
- Jutz, S., Leitner, J., Schmetterer, K., Doel-Perez, I. *et al.* 2016. Assessment of costimulation and coinhibition in a triple parameter T cell reporter line: simultaneous measurement of NF- κ B, NFAT and AP-1. *Journal of Immunological Methods*, 430: 10–20.
- Pasero, C. y Olive, D. 2013. Interfering with coinhibitory molecules: BTLA/HVEM as new targets to enhance anti-tumor immunity. *Immunology Letters*, 151(1-2): 71–75.