

ESTUDI FUNCIONAL D'ANTIGENS DE LA MEMBRANA LIMFOCITARIA  
UTILITZANT 11 ANTICOSSOS MONOCLONALS

J. Martorell, R. Vilella, J. Mila, J. Vives.

Servei d'Immunologia. Hospital Clínic  
Villarroel, 170. 08036 Barcelona

ABSTRACT

FUNCTIONAL STUDY OF LYMPHOCYTE MEMBRANE ANTIGENS USING 11  
MONOCLONAL ANTIBODIES

We have studied the following characteristics of 11 MoAb  
1) Their mitogenicity 2) Their capacity to modify  
mitogenesis produced by MLC 3) Their capacity to alterate  
response to PHA 4) Their hability to stimulate in  
pre-incubated cells some función of supresion or activation  
on MLC.

We have found 3 MoAb Cris 5(XIII), Edu 2(CD4) Cris 7(CD3)  
that inhibited MLC and another Cris 8(XIII) inhibited MLC of  
some responders. One Cris 7(CD3) inhibited response to PHA  
and is mitogenic. Edu 2(CD4) but not Cris 7(CD3) in  
precultured cells induced the capacity to suppress MLC even  
when irradiated and this inhibition was not alogenically  
restricted.

## INTRODUCCIO

L'aparició de la tecnologia d'anticossos monoclonals (Mo.Ab.) ha permès d'iniciar l'estudi de tot un seguit de molècules de la superfície limfocitària, que fins a les hores ens eren desconegudes. Algunes d'elles ja sabem que intervenen en estructures de reconeixement, tal com les T1 o les T3 (CD3)(C.S.C.Meuer et al,1983) i possiblement les T4 (CD4) i T8 (CD8),(E.L.Reinberz et al,1984) altres intervenen segurament en la activació, com el T11 (CD2),(S.C.Meuer et al,1984). N'hi ha que apareixen tan sols a les cel. T activades tals com el receptor per la IL-2 (Tac) (CD XI) (W.J.Leonard et al,1982) i el antigen Ta1 (D.A.Foix et al,1984)(CD XI). De la majoria (més del 70%) no coneixem encara la seva funció i possiblement n'existeixen encara d'altres dels quals ni tan sols coneixem la seva existència. Aci presentem les dades preliminars d'una línia de treball orientada a determinar quines molècules de la membrana limfocitària són importants tant per l'estimulació de les cel. T, com per la posterior "comunicació" d'aquestes cèl.lules amb el reste de cèl.lules del sistema immunològic. Fent especial esment de les que actuen en la resposta a antigens alogènics.

S'han seleccionat 11 dels Mo Ab produïts en el nostre laboratori (Cris 5, 84-4C4, Cris 1,100-1A5, 93-1D5, 109-2D4, Edu 2, Cris 7, Cris 4, Cris 3, Cris 8) per la seva característica de reaccionar amb totes o amb part de les cel. T, i hem estudiat la seva capacitat de:

- 1) Induir mitogènesi.
- 2) Modificar la mitogènesi produïda per un cultiu mixte alogènic (MLC).
- 3) Modificar la resposta mitogènica a PHA.
- 4) Estimular alguna funció celular de supressió o activació de la mitogènesi en MLC tal com ha estat suggerit per alguns autors.

## MATERIAL I METODES

La població responedora dels cultius ha estat constituïda per 50 de una suspensió de cèl.lules mononuclears de sang perifèrica de  $2 \times 10^6$  cel./ml en RPMI 1640 més 10% AB cultivades a 37 C i 5% CO<sub>2</sub> en pouets de 300 durant 144 h. l'estimul alogènic ha estat contituit per una suspensió de cel. alogèniques irradiades a 2000 Rads. L'estudi funcional de cel. tractades amb MoAb s'ha realitzat incubant-les amb el Mo Ab durant 48 h. i després de tres rentats s'han ajustat a  $2 \times 10^6$  cel./ml incorporant 50 d'aquesta suspensió a cultius de 48 h.

Els cultius en que s'ha estudiat l'efecte mitogènic i la modificació de la mitogènesi induïda per diferents concentracions de PHA s'han recollit a les 48 h.

La mitogènesi s'ha valorat per captació de Timidina Tritisada incorporada als cultius 24 h. abans de la seva recollida sobre filtres de nitrocelulosa .

Els Mo Ab s'han utilitzat en forma d'ascitis a dilucions de 1/100 el que equival a concentracions de Mo Ab entre 20 y 160 micrograms/ml.

Els resultats s'expressen amb percentatge de variació respecte de les cpm obtingudes amb una ascitis NS1, excepte els de la mitogènesi que s'expressen en forma d'Index d'Estimulació (I.E.).

RESULTATS

Dels 11 monoclonals estudiats en MLC només tres han mostrat una clara activitat inhibidora, veure taula I, Cris 5(XIII), Edu 2 (CD4), Cris 7 (CD3). Un altre el Cris 8 (XIII) sembla inhibir només alguns dels cultius.

TAULA I.- INHIBICIO DE LA RESPOSTA EN CULTIU MIXTE  
PRODUIDA PER DIFERENTS ANTICOSSOS MONOCLONALS

| Experiment   | 1     | 2     | 3     | 4      | 5      |
|--------------|-------|-------|-------|--------|--------|
| Cris 5(XIII) | - 56% | - 85% | - 73% | - 66%  | - 31%  |
| cpm          | 35211 | 14280 | 21328 | 38354  | 73476  |
| EDU 2(CD4)   | - 55% | - 62% | - 53% | - 55%  | - 57%  |
| cpm          | 35883 | 32668 | 36487 | 49547  | 45905  |
| Cris 7(CD3)  | - 70% | - 85% | - 93% | - 95%  | - 97%  |
| cpm          | 25013 | 14389 | 6276  | 9539   | 22380  |
| Cris 8(XIII) | 32%   | 1%    | - 27% | - 47%  | - 44%  |
| cpm          | 98215 | 81693 | 55769 | 78867  | 58223  |
| Control NS1  |       |       |       |        |        |
| cpm          | 75069 | 80381 | 75341 | 103052 | 104487 |

Dels Mo Ab que inhibien el cultiu mixte només un inhibia de forma clara la resposta a PHA, el Cris 7 (CD3), mentre que el Cris 5 (CDXIII) produïa una inhibició menys important i tan sols significativa a dosis baixes de mitogen Taule II.

TAULE II.- INHIBICIO DE LA RESPOSTA A PHA PRODUIDA  
PER ALGUNS MONOCLONALS

| Concentr. PHA | 15 g/ml | 30 g/ml | 60 g/ml |
|---------------|---------|---------|---------|
| Cris 5(XIII)  | - 26%   | - 17%   | - 7%    |
| cpm           | 34983   | 50218   | 50153   |
| Cris 7(CD3)   | - 55%   | - 63%   | - 58%   |
| cpm           | 21273   | 22297   | 23341   |
| Control NS1   |         |         |         |
| cpm           | 46316   | 59858   | 53926   |

Tan sols un dels 11 Mo Ab estudiats ha mostrat activitat mitogènica espontània, especialment quan la mitogènesi és valora a les 72 hores, decreixent de forma molt significativa a les 144 h. Taule III.

TAULA III.- CAPACITAT MITOGENICA DEL CRIS 7 (CD3)

|                   | 48 horas | 72 horas | 144 horas |
|-------------------|----------|----------|-----------|
| Cris 7 (CD3) cpm  | 11380    | 50047    | 14047     |
| Index Estimulació | 27       | 35       | 3         |
| Control NS1 cpm   | 415      | 1433     | 4853      |

L'efecte de les cel. cultivades amb els Mo Ab tan sols ha estat estudiat amb tres monoclonals, les cel. tractades amb Edu2 (CD 4) han mostrat un efecte inhibidor de la mitogènesi, aquest efecte és radioresistent i no està restringit per els antigens d'histocompatibilitat Taule IV, si bé podria no ésser constant per a totes le cèl.lules.

TAULA IV EFECTE DE LES CEL.LULES TRACTADES EN MO AB

SODRE MLC

| Mo Ab      | T = R | T = R | T = R | T = R |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| Edu 2      | - 77% | - 75% | - 62% | - 75% |
| cpm        | 17363 | 14340 | 31085 | 17174 |
| Cris 7     | 2%    | 26%   | - 7%  | - 6%  |
| cpm        | 78469 | 72095 | 75040 | 62625 |
| Cris 4     | - 5%  | 1%    | - 1%  | - 6%  |
| cpm        | 73123 | 58073 | 79249 | 62457 |
| Acitis NS1 |       |       |       |       |
| cpm        | 76871 | 56974 | 79966 | 66074 |

DISCUSIO

L'activitat inhibidora del MLC per el Cris 7 (CD3) confirma el resultats obtinguts per altres autors amb Mo Ab diferents del mateix grup (E.L.Reinsherz et al 1980) i es coherent amb la hipòtesi de que aquest anticòs produeix un bloqueig o agrupació del complex format per el T3 i el Ti que és el receptor antígen específic de la cel. T, fent-la incapaç de reconèixer els antigens alogènics en resposta a 144 h., si bé aquesta mateixa activitat de bloqueig o agrupació probablement és la que activa la mitogènesi de la cèl.lula detectable a les 48 h (J.P.van Wauwe et al 1980).

La inhibició de la resposta a la PHA ha estat també descrita amb altres monoclonals i implica que el complex T3-Ti intervé en la estimulació per PHA.

L'efecte inhibitor del Edu 2 (CD4) favoreix la hipòtesi d'altres autors (E.L.Reinherz et al 1984) de que existeix un cert reconeixement entre l'antígen de CD4 i alguns determinants monomòrfics dels antígens d'histocompatibilitat, reconeixement que no seria suficient per a l'activació cel.lular però que feria més estable el contacte intercel.lular fent possible l'estímul alogènic propiament dit.

La inhibició produïda per el Cris 5 i Cris 8 els dos del grup XIII, tindria probablement un caràcter més inespecífic ja que aquests antígens es troben a tots els leucòcits. Aquests anticossos donç podrien afectar algun determinant essencial per el creixement cel.lular tal com alguns altres del mateix grup (P.G.Beatly et al, 1983).

La diferent afectació dels cultius per el Cris 8 podria ésser deguda a que aquest és un anticòs de la classe Ig G1, i existeix un polimorfisme poblacional de receptors per aquests tipus d'anticòs (W.J.M.Tax et al 1984).

Alguns autors havien descrit que les cel. tractades amb alguns Mo Ab del grup CD3 tenien un efecte supresor sobre el MLC (J.E.Kunicka et al 1984). Amb el Cris 7 no hem aconseguit evidenciar aquesta activitat. En canvi si que hem pogut evidenciar-la en les cel. tractades amb Edu 2 (CD4) que fins ara no havia estat descrita. Tenim encara poques dades per fer hipòtesis de com es produeix l'activació d'aquesta funció supresora, però el fet de que sigui radioresistent i no restringida alogenicament orientaria a que el mecanisme sigui a través d'algun factor de caracter inespecífic.

BIBLIOGRAFIA

- P.G.Beatty, J.A.Ledbetter, P.J.Martin, T.H.Price, J.A.Hansen. Definition of a Common Leukocyte cell-surface antigen (Lp95-150) associated with diverse cell-mediated immune functions. The J.of Immunology. vol.131, 6, 1983
  
- D.A.Foix, R.E.Hussey, K.A.Fitzgerald, O.Acuto, C.Poole, L.Palley, J.F.Daley, S.F.Schlossman, E.L.Reinherz. Ta1, A Novel 105 KD Human T cell activation antigen defined by a Monoclonal Antibody. J.of.Immunology. vol.133, 3, 1250:1256, 1984
  
- J.E.Kunicka, C.D.Platsoucas. Abstracts "II International Workshop on HUMAN Differentiation Antigens" Boston 1984
  
- W.J.Leonard, J.M.Depper, T.Uchiyama, K.A.Smith, Thomas A.Waldmann, W.C.Greene. A Monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor. Nature. vol.300, 1982.
  
- S.C.Meuer, K.A.Fitzgerald, R.E.Hussey, J.C.Hodgdon, S.F.Schlossman and E.L.Reinherz. Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. J.Exp.Med. vol.157, 705-719, 1983.



ESTUDI D'ANTIGENS DE SUPERFÍCIE DELS LEUCOCITS HUMANS

- S.C.Meuer, R.E.Hussey, M.Fabbi, D.Fox, O.Acuto, K.A.Fitzgerald, J.C.Hodgdon, J.P.Protentis, S.F.Schlossman and E.L.Reinherz. An Alternative Pathway of T-Cell Activation: A Functional Role for the 50 kd T11 Sheep Erythrocyte Receptor Protein. Cell. vol.36, 897:906, 1984
  
- E.L.Reinherz, O.Acuto, M.Fabbi, A.Bensussan, C.Milanese, H.D.Royer, S.C.Meuer, S.F.Schlossman. Clonotypic Surface Structure on Human T Lymphocytes: Functional and Biochemical Analysis of the Antigen Receptor Complex. Immunological Review. 81, 95, 1984
  
- E.L.Reinherz, R.E.Hussey, S.F.Schlossman. A Monoclonal antibody blocking human T cell function. Eur.J.Immunol. vol.10, 758:762, 1980
  
- W.J.M.Tax, F.F.M.Hermes, R.W.Willems, P.J.A.Capel, R.A.P.Koene. Fc Receptors for Mouse IgG1 on Human Monocytes: Polymorphism and Role in Antibody-Induced T cell proliferation. The J.of Immunology. vol.133, n.3, 1185-1189, 1984
  
- J.P.van Wauwe, J.R.de May, J.G.Goossens. OKT3: A Monoclonal anti-Human T Lymphocyte Antibody with Potent mitogenic properties. J.of Immunology. 124, 6, 2708:2713, 1980.