

Estudi d'un antígen d'activació limfocitària amb l'anticòs monoclonal
Cris4

O. Viñas, M. Romero, J. Martorell, R. Vilella, J. Vives
Servei d'Immunologia, Hospital Clínic i Provincial de Barcelona,
Villarroel 170, Barcelona 08036.

Abstract

A lymphocyte activation antigen identified by the monoclonal
antibody Cris4

The study of the lymphocyte cell surface antigens has contributed to the better knowledge of the molecules that regulate the cellular physiology. In particular the activation antigens Tac and T9 allowed a great improvement in the study of lymphocyte growth factors as transferrin and IL-2.

A monoclonal antibody developed in our laboratory named Cris4 identify a lymphocyte membrane determinant that display an increase of expression in PHA activated lymphocytes. This membrane determinant can be detected on almost all the human T, B and null lymphocytes in the peripheral blood of human normal individuals as well as in lymph nodes and spleen, and in contrast this structure is not detected on other blood cell types. Cytofluorometrically we detect it in a small degree or not at all in the T cell lines tested, and significantly more in the human B cell lines tested.

In human thymus cells suspensions this determinant is detected in a significantly smaller extent than in peripheral blood T lymphocytes. Positive thymocytes are mostly T3+ and negatives are T3- T6+.

Thus the monoclonal antibody Cris4 detects a lymphocyte membrane determinant present on the lymphocytes and on mature thymocytes and absent on other blood cell types. And the expression

of this antigen raises in the initial phase of the PHA activation of peripheral blood mononuclear cells. Thus, we can conclude that Cris4 recognize an activation antigen constitutionally present on resting lymphocytes in a lower degree.

Introducció

Una premisa bàsica per explicar la selecció clonal en el sistema immunitari es que l'antigen indueix els limfòcits que porten els receptors adequats a convertir-se en limfoblastes i a proliferar. Els canvis posteriors de diferenciació condueixen aleshores a l'obtenció de cél.lules efectores i/o de cél.lules memòria. Per tant l'estudi de l'activació i de la proliferació cel.lular poden facilitar la comprensió del sistema immunològic.

Els limfòcits en repòs son exemples ben coneguts de cél.lules que no proliferen, i que poden ser activats fisiològicament per el reconeixement específic de l'antigen o be d'una manera no fisiològica utilitzant mitògens com ara la fitohemaglutinina (PHA) o altres. El primer procés d'activació es difícil d'analitzar perquè les cél.lules en repòs específiques per un antígen estan en presencia d'un gran excés de cél.lules d'especificitat irrelevant. En canvi, quan els limfòcits de sang perifèrica son estimulats amb PHA, practicament tots els limfòcits T augmenten de mida, sintetitzen DNA i eventualment proliferen (Kaczmarek et al. 1985). Com que es presuposa que l'activació per mitògens simula l'activació antigènica serveixen de model experimental per estudiar els aspectes no antígen específics de l'activació limfocitària.

Paralelament a l'activació i als canvis morfològics i funcionals de les cél.lules es produeix un canvi en l'expressió de les mol.lècules de la superfície cel.lular. A les mol.lècules que es detecten, "de novo" o més, amb l'activació se les anomena

genèricament "antígens d'activació". Dins d'aquest grup hi ha una gran heterogeneïtat i s'hi inclouen el receptor de transferrina (T9, 5E9), el receptor d'insulina, el receptor de l'interleuquina-2 (IL2-R, Tac), els productes dels gens del complex major d'histocompatibilitat de classe II (HLA-II), i els marcadors reconeguts per els anticossos monoclonals (Ac Mo) anti T10, anti GP26, 4f2, T305, A1A5 i Tal entre altres (Fox i al 1984, Leukocyte Typing II 1986). La funció de la majoria d'aquestes molècules es desconeix, però es molt possible que moltes d'elles siguin receptors de factors importants per el creixement i desenvolupament cel·lular. Algunes augmenten en un període inicial de l'activació dels limfòcits, concretament abans de la duplicació de DNA, com ara, per ordre d'aparició, el 4f2, el receptor de transferrina i el IL2R (T. Cotner i al. 1983) i se suposa que son necessaris per que les cèl·lules proliferin posteriorment. Altres molècules tenen una aparició tardana, després de la duplicació de DNA, com ara HLA-II, 19.2 i T10 (T. Cotner i al 1983). L'antigen d'activació restringit al linatge limfocitari i millor estudiat actualment es el IL2R. Es va descriure com a estructura restringida al linatge T, exclusivament present en limfòcits activats, i reconeguda per un Ac Mo anomenat anti Tac (Uchiyama i al 1981) el qual es va demostrar posteriorment que bloquejava la unió d'IL2 a les cèl·lules activades inhibint la proliferació de les cèl·lules T en front dels estímuls habituals (Miyawaki i al 1982) (Leonard i al 1982). Recentment s'ha descrit també la seva aparició en els limfòcits B activats (Leonard i al 1984).

Donat el gran repertori funcional dels limfòcits T es més que probable que amb l'activació expressin varies estructures importants addicionals encara desconeixudes que estan poc o gens presents en l'estat de repòs o G0. No cal dir que l'utilització dels Ac Mo ha

permés un gran avanç en aquest camp. Dels Ac Mo produïts en el nostre laboratori (R Vilella i al 1982)(Leukocyte typing II 1986) el Cris4 reconeix un determinant de membrana limfocitària que presenta un augment d'intensitat d'expressió en limfòcits activats amb PHA, en una fase inicial de l'activació cel.lular, seguint una corba d'intensitat d'expressió semblant a la del IL2R . A diferència de l'IL2R aquesta estructura es detecta en limfòcits humans T,B i nuls de sang perifèrica, però no es detecta a la resta de cél.lules sanguïnees. En suspensions cel.lulars obtingudes de timus humans es detecta significativament menys que a sang perifèrica essent preferentment positius els timòcits T3+. Per tant creiem que es pot incloure l'estructura que reconeix el Cris4 en els antigens d'activació que ja estan presents en repòs, i que augmenten en una fase inicial de l'activació.

Material i mètodes

Anticossos monoclonals

En aquest treball hem utilitzat els Ac Mo següents produïts en el nostre laboratori per R Vilella : Cris4, Cris7 (T3), Cris1 (T1), Edu2 (T4), 109-2D4 (T8), 109-3c2 (BC1), Cris6 (Mo2), Edu(HLA II), i 108-2c5 (HLA I) (Vilella i al 1982). Han estat inclosos en el Leukocyte Typing Workshop II. Hem utilitzat també els Ac Mo comercials següents: T9,T10, T11 i T6 (Ortho Diagnostic Systems Inc. Raritan, New Jersey) i Leu11, Leu7, i anti IL2R (Becton Dickinson, Cultek, S.L., Barcelona)

El Cris4 es una IgM i fixa be el complement.

Preparació de les poblacions limfocitàries

Les cél.lules mononuclears es van obtenir de sang heparinitzada de donants voluntaris centrifugant sobre gradient de Ficoll. Per separar els limfòcits T incubavem aquesta població amb

eritròcits de xai al 2% i centrifugavem posteriorment sobre gradient de Ficoll. De la interfase recuperavem les cèl.lules no formadores de rosetes (E-) o noT, i les cèl.lules E+ o T eren recuperades del Ficoll. Els eritròcits foren eliminats per lisi hipotònica. Les noT eren tractades amb els Ac Mo Cris6+Cris7 i C' o Cris7+109-3C2 i C' per obtenir poblacions respectivament enriquides en limfòcits B i en macròfags.

També vem obtenir poblacions depleccionades de les cèl.lules Cris4+ tractant amb Cris4 i C'. Com a control negatiu trantàvem paralelamente una part de les cèl.lules amb una ascitis irrelevant produïda amb cèl.lules NS1 i C'. La font de complement utilitzada va ser sempre sèrum fresc de conill congelat.

Amb els limfòcits obtinguts de melsa, gangli limfàtic i timus vem seguir procediments similars.

Cultius cel.lulars

Les cèl.lules eren resuspeses en RPMI 1640 amb 1% de glutamina i 10% de serum fetal de vadella (FCS) a una concentració de 0,5 a 1 mil.lions de cèl.lules per ml. Mantenïem cultius paralels amb PHA (wellcome) a 45 microg / ml, i mitjà de cultiu sol en flascons mantinguts a 37.C. Periòdicament en treïem alícotes per estudiar la seva capacitat proliferativa i l'expressió de molècules de superfície per immunofluorescència indirecte (IFI).

La proliferació la determinavem incubant 18 hores limfòcits per triplicat amb timidina tritiada en plaques de cultiu de 96 pouets medint posteriorment les c.p.m. en contador betta.

Immunofluorescència

Alícotes de 0,2 a 0,5 mil.lions de limfòcits eren incubades en PBS+2% FCS a 4.C amb els Ac Mo corresponents durant 30 minuts, es rentaven i s'incubaven posteriorment amb RAM/Ig/FITC (Nordic Immunology, Tilburg, The Netherlands) 30 minuts a 4.C, i es rentaven

novament per ser posteriorment examinades al microscop de fluorescència o bé per citofluorimetria en un FACS Analyser.

Prèviament a la tècnica de IFI aquestes poblacions cel·lulars eren depleccionades de les mortes i dels detritus centrifugant sobre gradient de FCS.

Resultats

Reactivitat del Cris4 per immunofluorescència

A la taula I es poden veure els nivells d'expressió detectats pel Cris4 en diferents poblacions cel·lulars. En aquest cas la citofluorimetria ens aporta reproductibilitat encara que perdem

REACTIVITAT

LÍMFÒCITS T i B

Sang 2-3+

Melsa 2-3+

Gangli 3+

TÍMOCITS 1+

LÍNIES CEL·LULARS

T: 8402 -

HSB-2 -

JURKAT -

J.M. ±

HPB-ALL ±

MOLT-4 +

CEM +

B: RAJÍ 3+

R.M. 3+

NAMALWA 3+

MACRÒFAGS -

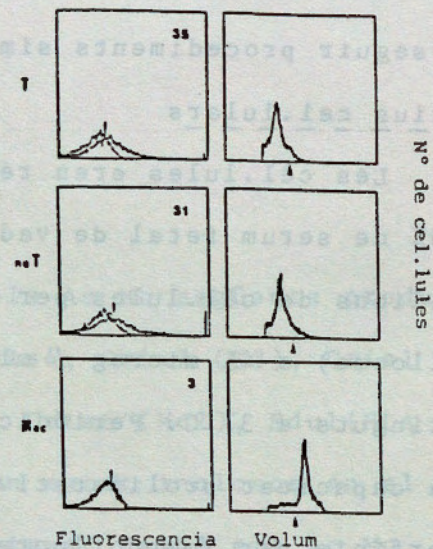


Figura 1: Lectures gràfiques del citofluorímetre. Els números representen el % de cel·lules positives detectades en cada cas i la fletxa indica el volum que distingiria limfòcits de macròfags segons les corbes obtingudes.

Taula I: Reactivitat estudiada per citofluorimetria en diverses poblacions cel·lulars. L'intensitat d'expressió es representa per el % de cell positives segons: + inf a 10%, + 10-25%, 2+ 26-50%, 3+ 51-75%.

sensibilitat per les cel·lules dèbilment positives ja que les lectures efectuades al microscop de fluorescència son més elevades. Per citofluorimetria la mitjana de les determinacions fetes en cel·lules mononuclears de sang perifèrica (CMSP) de 8 adults es de

50 \pm 15 % de cèl.lules positives, i els resultats oscil·len entre 35 i 74 %. En melsa i gangli limfàtic obtenim resultats similars, en canvi en timòcits l'expressió detectada per citofluorimetria es significativament menor, i la mitjana dels resultats obtinguts en 4 timus humans infantils es de 8 \pm 2. En macròfags es detecte en menys del 10%, i aquesta petita reactivitat es segurament deguda a la petita proporció de limfòcits acompanyants (figura 1).

A les línies limfocitàries estudiades es detecte poc o gens a les de llinatge T i significativament més a les B (taula I)

A sang perifèrica l'expressió en T, B i nules es similar com es pot veure a la fig. 1.

Estudi de l'expressió per citotoxicitat

Encara que per immunofluorescència no es detecti en més del 75% de la població limfocitària de sang perifèrica, l'expressió d'aquesta molècula es més general ja que tractant mononuclears de sang perifèrica amb Cris4 i C' es produeix la mort de la gran majoria dels limfòcits T, B i nuls (el 90% o més), i en canvi sobreviuen practicament tots els macròfags, quan en els controls negatius la mortalitat dels limfòcits es insignificant.

En canvi, aplicant la mateixa tècnica a suspensions de cèl.lules tímiques, sobreviuen selectivament cèl.lules amb uns marcadors de superfície cel.lular determinats. Es moren proporcionalment més els timòcits que expresen el T3, i la proporció de T6+ es superior en les cèl.lules que sobreviuen al tractament amb Cris4 que les tractades amb ascitis NS1 (taula II).

Per tant podem dir que aquesta mol.lècula està constitucionalment present a la gran majoria dels limfòcits de sang perifèrica i en els timòcits madurs.

	Timus 2			Timus 1		
	Fresc	NS1	Cris4	Fresc	NS1	Cris4
anti T11	79	84	64	77	48	NT
anti T3	56	45	17	37	72	2
anti T4	71	63	65	52	32	55
anti T8	52	55	42	45	NT	NT
anti T6	69	57	72	70	48	89
anti T10	70	71	70	71	62	31
Cris4	8	21	0	6	9	0

Taula II: Estudis citofluorimètrics realitzats en timòcits

frescos, i tractats amb ascitis NS1 i complement (NS1), i tractats amb Cris4 i complement (Cris4), expressats en % de cèl.lules positives detectades.

Expressió en cèl.lules activades

Per als estudis d'activació de cèl.lules de sang perifèrica hem utilitzat una concentració de PHA que produeix un pic de màxima incorporació de Timidina als 3-4 dies de cultiu permetent conservar, però, una bona viabilitat cel.lular fins els 7-8 dies de cultiu que es de 45 micrograms/ml.

A la figura 2 podem veure l'expressió d'algunes de les mol.lècules de superfície estudiades periòdicament per citofluorimetria en un experiment representatiu. Es pot veure com l'expressió de les cèl.lules mantingudes amb mitjà de cultiu sol es manté o baixa lleugerament amb el temps, en canvi l'expressió de les cèl.lules estimulades varia amb el temps. En quant als antigens de diferenciació dels limfòcits T veiem com l'expressió del T3 primer disminueix i després del tercer dia recupera o supera els nivells normals. L'expressió del T4 i del T8 no presenten variacions tan intenses, i el que no fan es augmentar de manera significativa els 3 primers dies. L'expressió d'aquestes mol.lècules en l'activació ja ha estat estudiada prèviament (Matsui i al. 1986)(Leukocyte typing

II 1986). I pel que fa als antigens d'activació es pot veure com l'IL2-R apareix en una fase inicial de l'activació, especialment en les cèl.lules de volum superior al normal del limfòcits en repòs, i posteriorment disminueix. En canvi els HLA II augmenten més lentament i més tardanament mantenint però l'augment d'una manera constant fins el 7. dia de cultiu. I finalment, el determinant que

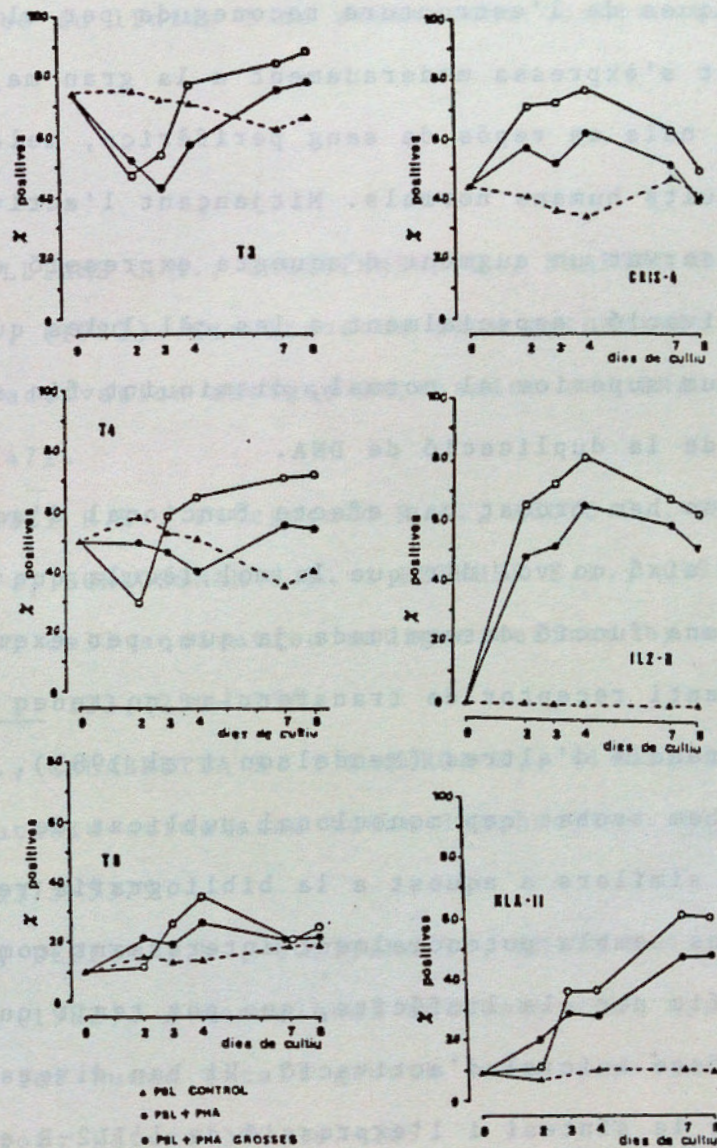


Figura 2

Resultats del seguiment citofluorimètric d'alguns dels marcadors d'cultiu de limfòcits estimulats amb PHA. A l'esquerra estan representats 3 antigens de diferenciació dels limfòcits T, i a la dreta 3 antigens d'activació.

reconeix el Cris4, encara que ja es troba prèviament present, segueix una corba d'expressió similar a la d'IL2-R. Tant pel que fa a l'IL2-R com al Cris4 els limfòcits de volum superior al normal són més positius que els de volum normal des del principi del cultiu.

Discussió

En aquest treball presentem l'estudi realitzat per esbrinar les característiques de l'estructura reconeguda per el Cris4. Tal com hem demostrat s'expressa moderadament a la gran majoria dels limfòcits T, B i nuls en repòs de sang perifèrica, melsa i gangli limfàtic dels adults humans normals. Mitjançant l'activació dels limfòcits hem observat un augment d'aquesta expressió en una fase inicial de l'activació, especialment a les cèl.lules que ja tenen aleshores un volum superior al normal, disminuint fins a nivells normals després de la duplicació de DNA.

De moment no hem trobat cap efecte funcional d'aquest monoclonal. Però això no vol dir que la mol.lècula que identifica el Cris4 no tingui una funció determinada ja que, per exemple, molts dels monoclonals anti receptor de transferrina no tenen cap efecte funcional a diferència d'altres (Mendelson i al 1983).

Ademés no hem trobat cap monoclonal publicat de característiques similars a aquest a la bibliografia revisada.

Per tant ens sembla potencialment interessant com a nou marcador, específic per els limfòcits, que pot tenir un paper funcional en la fase inicial d'activació. Hi han diversos estudis que demostren que la síntesi i l'expressió de l'IL2-R es anterior a la duplicació de DNA (Cotner i al 1983 i Matsui i al 1986). I donat el paralelisme de les corbes obtingudes amb el Cris4 i l'IL2-R, estém aprofundint l'estudi d'aquesta fase inicial de l'activació.

Per altra banda, l'estudi en timòcits indica que aquesta

estructura reconeguda per el Cris4 s'expressa a la superfície de les cèl·lules més "madures", i aquest es un altre aspecte interessant del Cris4 a estudiar més a fons.

Per tant, en quant al llinatge T es pot concloure que el Cris4 reconeix una mol·lècula present a la gran majoria dels limfòcits madurs, que augmenta la seva expressió en una fase inicial de l'activació i que en canvi no es troba en limfòcits immadurs, i es troba poc també en línies T de creixement continuat.

Bibliografia

- COTNER J., WILLIAMS J.M., CHRISTENSON L., SHAPIRO H.M., STROM T.B. i STROMINGER J., (1983). Simultaneous flow cytometric analysis of human T cell activation antigen expression and DNA content. J. Exp. Med. 157,461-472.
- FOX D.A., HUSSEY R.E., FITZGERALD K.A., ACUTO O., POOLE C., PALLEY L., DALEY J.F., SCHLOSSMAN S.F. i REINHER E.L., (1984). Tal, a novel 105 KD human T cell activation antigen defined by a monoclonal antibody. J. I. 133,1250-1256.
- KACZMARECK L., CALABRETTA B. i BASERGA R., (1985). In phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5375-5379.
- LEONARD W.J., DEPPER J.M., UCHIYAMA T., SMITH K.A., WALDMANN T.A. i GREENE W.C., (1982). A monoclonal antibody that appears to recognize the receptor for human T-cell growth factor; partial characterization of the receptor. Nature 300,267-269.
- LEONARD W.J., DEPPER J.M., CRABTREE G.R., RUDIKOFF S., PUMPHREY J., ROBB R.J., KRONKE M., SVTLIK P.B., PEPPER N.J., WALDMANN T.A. i GREENE W.C. (1984). Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. Nature 311,626-631.

- LEONARD W.J., KRONKE M., PEFFER N.J., DEPPER J.M. i GREENEW.C., (1986). Interleukin-2 receptor gene expression in normal human T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,6281-6285.
- MENDELSON J., TROWBRIDGE I. i CASTAGNOLA J., (1983). Inhibition of human lymphocyte proliferation by a monoclonal antibody to transferrin receptor. Blood 62,821-830.
- MATSUI Y., SHAPIRO H.M., SHEEHY M.J.,CHRISTENSON L.,STAUNTON D.E., EYNON E.E., i YUNIS E.J., (1986). Differential expression of T cell differentiation antigens and major histocompatibility antigens on activated T cells during the cell cycle. Eur. J. Immunol. 16,248-251.
- MIYAWAKI T., YACHIE A., UWADANA N., OHZEKI S., NAGAOKI T. iTANIGUCHI N., (1982) Functional significance of Tac antigen expressed on activated human T lymphocytes: Tac antigen interacts with T cell growth factor in cellular proliferation. J. I. 129,2474-2478.
- REINHERZ E.L., HAYNES B.F., NADLER L.M. i BERNSTEIN I.D. (1986) Leukocyte typing II Voll Human T lymphocytes pp 3-27, 417-425, 441-443, 453-461. Springer Verlag New-York Inc.
- SCHREURICH P., UCER U., WRANN M. i PFIZENMAIER K., (1985). Early events during primary activation of T cells: antigen receptor cross-linking and interleukin-1 initiate proliferative response of human T cells. Eur. J. Immunol. 15,1091-1095.
- UCHIYAMA T. BRODER S. i WALDMANN T.A., (1981). A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells . I: Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac(+) cells. J. I. 126,1393-1397.
- VILELLA R., YAGUE J., GALLART M.T. i VIVES J. (1982) Eficacia de la metodologia de hibridomas para el estudio de antigenos de superficie de linfocitos T y B humanos. Immunologia 1,58-64.