

Estudi de les implicacions funcionals de quatre antigens de membrana dels limfòcits T definits per anticossos monoclonals

J.Martorell, R.Vilella, L.Borche, O.Viñas, I.Rojo., J.Vives
Servei d'Immunologia. Hospital Clinic.

Villarroel 170, 08036 Barcelona

Abstrat

Functional study of four antigens of T lymphocytes membrane recognized by monoclonal antibodies

We have studied the changes produced by the presence of four Mo.Ab. that identifies membrane antigens in different T cell functional tests; namely mitogenesis by: MLC, PHA, ConA, PWM, Tetanus toxoid and sepharose bound T3; and cytotoxicity by: NK, and CTL (MLC pre-stimulated cells).

The Mo.Ab. 68-5A5 and 33-1D2 precipitate a similar molecule 90 and 160-170 Kd. (LFA-1 like). All test are inhibited by 68-5A5 with the exception of Sepharose-T3 induced mitogenesis, in contrast any test was inhibited by 33-1D2.

The 72-5D3 Mo.Ab recognize one molecule of T200 family. NK function was inhibited by this Mo.Ab., and Sepharose-T3 induced mitogenesis was increased.

The last one 42-1B5 recognize a HLA class I antigen and show similar functional effects to 68-5A5 but did not inhibit NK.

In conclusion we propose: 1) The existence of a functional heterogeneity of antigens (or epitopes) in LFA-1 like family. 2) That some T200 molecules are able to receive a positive signal to increase mitogenesis induced by Sepharose-T3. 3) And the participation of HLA Class I antigens in mitogenesis induction.

Introducció

La producció d'anticossos monoclonals (Ac.Mo.) ens ha permés disposar d'eines d'una alta especificitat per reconeixer estructures de membrana de les quals desconeixiem en molts casos fins i tot la seva existència.

En el Sistema Immunològic aquesta tecnologia s'ha mostrat molt util per tal de diferenciar les etapes maduratives de la cèl.lula o identificar diverses subpoblacions celulars.

En el treball que aquí presentem, hem estudiat el paper que juguen alguns dels antigens que reconeixen aquets Ac.Mo. en la resposta immunològica de les cèl.lules T.

Com a model d'aproximació hem utilitzat l'estudi de la capacitat d'alguns Ac.Mo. de modificar la resposta immunològica "in vitro" a diferents estímuls (Townsend 1985).

L'any passat presentavem l'estudi realitzat en una serie de Ac.Mo. diferents. Un d'ells dirigit contra l'antigen T3 que es troba associat en el receptor de la cèl.lula T, i que provoca "in vitro" tot un seguit d'alteracions funcionals d'entre les quals destaca la seva capacitat d'induir mitogènesis si l'anticòs és troba unit en algun suport físic sigui el Monòcit per la regió Fc o sigui a boletes de Sepharosa, aquest tipus d'estimulació té la ventaja de ésser possiblement la mes "fisiològica" de les estimulacions policlonals i per tant és util per estudiar els seus mecanismes (Townsend 1985). Un altre Ac.Mo. funcionalment important era el dirigit contra l'antigen T4 marcador de la denominada població T col·laboradora i que segons alguns autors intervindria en el reconeixement de determinants monomòrfics dels antigens de Classe II (Sayre et al 1985).

Aquest any presentem una selecció de quatre Ac.Mo., de un total de 25 estudiats inicialment. Els dos primers 68-5A5 i 33-1D2 precipiten molècules molt semblants de dos cadenas una de 90 Kd. i l'altre entre 160 i 170 kd., cal doncs agrupar-los amb els antigens LFA-1 "like" per similitud amb altres antigens descrits (Mentzer et al. 1985).

Un tercer Ac. Mo. el 72-5D3 precipita una molècula de 200 Kd. i hauria d'englobar-se dintre el que s'ha vingut denominant com a família del T200 que agruparia un seguit de molècules entre 180 i 240 kd (Targan et Newman 1983).

El quart anticòs 42-1B5 precipita dos bandes de 45 i 12 Kd que corresponen a antigens HLA de classe I si bé la seva falta de reactivitat amb algunes línies celulars ens indiquen que podria ésser específic per a determinants del locus B.

Material i Mètodes

Estudis de Mitogènesi:

La població responedora l'han constituit en totes les ocasions 50 microlitres d'una suspensió de cèl.lules mononuclears separades per gradient de densitat sobre ficoll i resuspenses a una concentració de 2 milions cel./ml. en mitjà de cultiu RPMI 1640 amb un 10% de sèrum AB. Tots els cultius s'han realitzat en placas de 96 pous de fons en "U" i les incubacions a 37.C en una estufa humida amb 5% de CO₂. La timidina tritiada s'ha afegit als cultius a les 48 h., excepte per les estimulacions alogèniques o amb toxoide tetanic en les que s'ha afegit a les 144 h. la recollida s'ha efectuat sobre filtres de nitrocelulosa 24 h. després d'afegir la timidina, la incorporació de isotop al nucli s'ha quantificat en un contador Beta.

Els estímuls utilitzats han sigut: -Estímul alogènic (MLC) 50 microlitres d'una suspensió de cel. mononuclears ajustades a 2 milions cel./ml. irradiades a 2000 Rads; - PHA 40-5 microg./ml.; -ConA 20-2.5 microg./ml.; -PWM 10-1.2 microg./ml - Toxoide Tetànic 20-2.5 microg./ml. dilucions finals ; -Sepharosa unida a anti-T3 50 microl. d'una suspensió 100000 esferes/ml. equivalent aproximadament 20 microg./ml d' anti-T3.

Estudis de citotoxicitat:

La població efectora l'han constituït 50 microl. d'una suspensió mononuclear ajustada entre 20 i 5 milions cel./ml., com a població diana s'ha utilitzat 50 microl. d'una suspensió de 1 milió cel./ml de cèl.lules marcades en Cr51, obtenint proporcions Efectoras/Diana entre 20/1 i 5/1. Activitat NK :-cel. efectoras =cel. Mononuclears se sang perifèrica; -cel. diana = línia K562.

Activitat CTL:-cel. efectores = cel. matingudes en cultiu alogènic durant 6 dies; - cel. diana = cel de la mateixa procedència que les estimuladores del cultiu alogènic estimulades durant 48h. en PHA. Efectores i Diana s'han cultivat 4 h. a 37. C 5 % CO2 i s'ha recollit 75 microl. de sobrenadant determinant la quantitat de Cr51 lliberat amb un contador gamma.

Els Ac. Mo. s'han utilitzat en forma d'ascitis a dilucions finals 1/300 que corresponen a concentracions d'Ac. Mo. entre 7 i 50 microgr/ml. Totes les determinacions s'han realitzat per triplicat, no s'han considerat els experiments amb una desviació standart superior al 15 %.

En tots els experiments s'ha utilitzat com a control una ascitis produïda per cel. NS1 a dilució final 1/300.

La quantificació del receptor per IL-2 s'ha realitzat per immunofluorescència indirecta quantificada amb FACS Analyzer.

Resultats

LFA-1 "like":

l'Ac.Mo. 68-5A5 inhibeix la resposta a estímuls alogènics, PHA, ConA i PWM, però no la mitogènesi induïda per la sepharosa anti-T3. Inhibeix també les activitats citotòxiques NK i CTL. Pel contrari l'Ac.Mo. 33-1D2 no altera significativament cap de les respostes asenyalades.

Taula 1

	<u>Asc.Contr.</u>	<u>Ac.68-5A5</u>	<u>%</u>	<u>Ac.33-1D2</u>	<u>%</u>
MLC	16.6 ± 2.2	4.5 ± 1.1	-79	14.5 ± 2.6	-14
PHA	24.8 ± 2.3	3.7 ± 0.8	-90	29.8 ± 0.7	+19
ConA	27.0 ± 3.5	6.0 ± 2.7	-81	32.4 ± 3.0	+20
PWM	15.5 ± 0.9	5.1 ± 0.8	-68	12.6 ± 0.8	- 8
Sef-T3	50.8 ± 2.2	51.1 ± 1.1	0	nt	
Tox.Tet.	4.4 ± 0.8	1.6 ± 0.4	-94	3.8 ± 0.4	-21
NK	1.7 ± 0.1	1.0 ± 0.1	-37	1.7 ± 0.2	+ 3
CTL	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.1	-37	nt	

cpm x 1000

Aquesta inhibició de la proliferació en el que respecta a la PHA és realitzada inhibint l'aparició del receptor d'IL-2. A les 72 h. d'estimulació en PHA en presència de 68-5A5 sols un 7% de les cèl.lules presenten aquest receptor mentre que l'expressen el 34 % de les cel. control.

L' inhibició de la activitat NK és realitzada sobre la cèl.lula efectora però no sobre la diana.

T200:

L'Ac.Mo. 72-5D3 inhibeix l'activitat NK i CTL, actuen sobre la cel. efectora i mostra un augment de la mitogènesis induïda per Sepharosa-T3.

Taula 2

	<u>Asc. Contr.</u>	<u>Ac. 72-5D3</u>	<u>%</u>
MLC	30.0 ± 2.8	27.6 ± 2.2	- 8
PHA	82.4 ± 1.2	76.6 ± 1.7	- 7
ConA	32.8 ± 3.0	30.4 ± 4.4	- 7
PWM	39.7 ± 0.9	43.2 ± 0.5	+ 9
Sef-T3	27.6 ± 3.0	61.7 ± 4.1	127
Tox.Tet.	5.5 ± 1.3	6.1 ± 1.0	+11
NK	2.1 ± 0.1	1.2 ± 0.0	-40
CTL	0.8 ± 0.0	0.5 ± 0.1	-31

cpm x 1000

HLA classe I:

L'Ac. Mo. 42-1B5 inhibeix casi be les mateixes funcions que els LFA1 like a excepcio de la funcio NK.

Taula 3

	<u>Asc. Control</u>	<u>Ac. 42-1B5</u>	<u>%</u>
MLC	27.4 ± 1.2	7.8 ± 0.2	-77
PHA	27.1 ± 4.0	10.1 ± 1.0	-64
ConA	30.2 ± 0.6	18.8 ± 0.7	-39
PWM	10.7 ± 0.8	6.1 ± 0.2	-46
Sef-T3	50.8 ± 2.2	46.5 ± 6.1	- 8
Tox.Tet.	10.7 ± 0.0	4.0 ± 0.6	-72
NK	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	- 3

cpm x 1000

L'inhibició de l'esimulació per PHA és realitza inhibint l'aparició dels receptors d'IL-2.

Discussió

L'Ac.Mo. 68-5A5 (LFA-1 "like"), ha inhibit totes aquelles respostes que requereixen un contacte entre cèl.lules, MLC, toxoide tetanic, funció NK i CTL, però no aquelles de les que tenim evidència de que l'únic necessari són substàncies solubles procedents del Macrofecs com és la mitogènesi per Sepharosa-T3 (Schwab et al 1985). Els nostres resultats corroboren les troballes d'altres autors (Mentzer et al. 1985) que els han fet postular una important funció dels antigens LFA-1 "like" en l'adhesivitat entre les cèl.lules. Les inhibicions observades en las mitogènesis induïdes per lectines, tal vegada també és podrien explicar per el mateix mecanisme, si be caldria acceptar que la cooperació intercelular és important en aquest tipus de mitogènesi, cosa provable almenys per la PHA i el PWM.

L'Ac.Mo. 33-1D2 precipita una molècula molt semblant si bé no absolutament idèntica al anterior, aquest Ac.Mo. no afecta cap de les respostes estudiades i per tant sens planteixa que, o bé està reconeixent un epitop no important per la funció de la mateixa molècula, o bé ens trobem front a dos molècules semblants en el seu P.M. però funcionalment diferents.

L'Ac.Mo. 72-5D3 (T200) reconeix en la cèl.lula efectora alguna molècula que intervé en els processos de citolisis tal y com ja han descrit Targan y Newman (1983) utilitzant altres Ac.Mo. que reconeixen molècules del mateix P.M..

Les nostres dades indiquen que aquesta molècula intervindria a més a més donant a la cèl.lula algun tipus de senyal positiva, que no seria per sí sola capaç de produir mitogènesi però sí d'augmentar la produïda per la Sepharosa-T3.

L'Ac.Mo. 42-1B5 reconeix antigens HLA de Classe I de característiques molt definides i molecularment allunyats dels antigens LFA-1 "like", tot i que en les proves funcionals estudiades es comporten d'una manera semblant, amb la diferència de que en les nostres mans 42-1B5 no inhibeix la funció NK i el 68-5A5 sí.

Resultats en el mateix sentit dels que aquí presentem han sigut obtinguts també per Turco i cols.(1985) utilitzant altres Ac. front a antigens HLA Classe I, el qual ens porta a la necessitat de replantejar el paper dels Antigens de Classe I en la comunicació intercelular, especialment aquella capaç d'induir mitogènesi, ja que les dades actuals indiquen de que podrien tindre una funció més important de la que se'ls havia assignat fins ara.

En conclusió podriem dir que l'estudi iniciat ens porta a proposar: 1) una heterogeneïtat funcional dintre dels antigens (o dels epitops) dels antigens LFA1 "like"; 2) La participació de un dels antigens T200 com a possible receptor d'una senyal positiva potenciadora de la mitogènesi induïda a través del T3 o del receptor per l'antigen; 3) La participació dels antigens HLA de Classe I en les cooperacions intercelulars necessàries per la mitogènesi.

Bibliografia

- MENTZER, S.J., GROMKOWCKI, S.H., KRENSKY, A.M., BURAKOFF, S.J., MARTZ, E. (1985). LFA-1 Membrane molecule in the regulation of homotypic adhesions of human B lymphocytes. *J. Immunol.* 135:9-11
- SAYRE, P.H., REINHERZ, E.L.. (1985) Structural invariance of T4 molecules from T cell clones of different antigen and major histocompatibility complex specificities. *Eur. J. Immunol.* 15:291-295.
- SCHWAB, R., CROW, M.K., RUSSO, C., WEKSLER, E. (1985) Requirements for T cell activation by OKT 3 molecules and interleukin 1. *J. Immunol.* 135:1714-1718.
- TARGAN, S.R., NEWMAN, W. (1983) Definition of a "trigger" stage in the NK cytotoxic reaction sequence by a monoclonal antibody to the glycoprotein T-200. *J. Immunol.* 131:1149-1153.
- TOWNSEND, A. (1985) Molecules at work on the T-cell surface. *Immunol. Today* 6:68-70.
- TURCO, M.C., FELICE, M.D., CORBO, L., MORRONE, G., MERTELSMAN, R., FERRONE, S., VENUTA, S. (1985) Regulatory role of a monomorphic determinant of HLA class I antigens in T cell proliferation. *J. Immunol.* 135:2268-2273.

Regulation of homotypic adhesions of human T lymphocytes.
 S.J. MARTZ, E. (1982). LFA-1 Membrane molecule in the
 regulation of homotypic adhesions of human T lymphocytes.
 J. Immunol. 132:9-11.

SAHRE, P.H., REINHART, E.L. (1983). Structural involvement of
 the cytoplasmic tail of LFA-1 in cell-cell adhesion and
 regulation of homotypic adhesion of human T lymphocytes.
 J. Immunol. 132:291-297.

SCHWAB, R., CROW, M.K., RUSSELL, C., WEISLER, S. (1983).
 Requirement for T cell activation by OKT 3 molecules and
 LFA-1. J. Immunol. 132:1718-1724.

TARGAN, S.R., NEWMAN, W. (1983). Definition of a trigger
 for the NR specific reaction sequence by a monoclonal
 antibody to the T-100. J. Immunol. 132:1725-1732.

TURCO, M.C., FELICE, M.D., CORNO, L., MORONE, G.,
 MERTZMAN, R., FARKAS, S., VENTURA, S. (1983). Regulation
 of the adhesion molecule LFA-1 by a monoclonal antibody
 to the cytoplasmic tail of the molecule. J. Immunol. 132:1733-1739.

TURCO, M.C., FELICE, M.D., CORNO, L., MORONE, G.,
 MERTZMAN, R., FARKAS, S., VENTURA, S. (1983). Regulation
 of the adhesion molecule LFA-1 by a monoclonal antibody
 to the cytoplasmic tail of the molecule. J. Immunol. 132:1733-1739.

TURCO, M.C., FELICE, M.D., CORNO, L., MORONE, G.,
 MERTZMAN, R., FARKAS, S., VENTURA, S. (1983). Regulation
 of the adhesion molecule LFA-1 by a monoclonal antibody
 to the cytoplasmic tail of the molecule. J. Immunol. 132:1733-1739.

TURCO, M.C., FELICE, M.D., CORNO, L., MORONE, G.,
 MERTZMAN, R., FARKAS, S., VENTURA, S. (1983). Regulation
 of the adhesion molecule LFA-1 by a monoclonal antibody
 to the cytoplasmic tail of the molecule. J. Immunol. 132:1733-1739.