

## MADURACIO I ACTIVACIO DELS LIMFOCITS T

Jordi Vives. Servei d'Immunologia. Hospital Clínic. Barcelona

Les cèl.lules del sistema immune posseïxen unes característiques que les fan uns models idonis per estudiar els mecanismes que regulen la maduració i activació limfocitàries. Els limfòcits són cèl.lules que després de adquirir un cert estat maduratiu caracteritzat per l'obtenció de la competència immunològica passen a una fase de repòs. En aquest estat poden estar-hi un llarg període de temps. El contacte amb un estímul antigènic les farà proliferar i diferenciar a cèl.lules efectores. Es a dir, els limfòcits madurs estan en repòs i al ser activats es convertiran en formes més diferenciades.

La facilitat d'estudi que ens proporcionan els limfòcits bé amplificada per el gran nombre de eines instrumentals de que es disposa avui en dia. Entre aquestes eines cal esmentar els anticossos monoclonals que defineïxen els diversos antigens leucocitaris. En l'actualitat ja s'han descrit més de 45 antigens (Martorell et al.1987). Ara s'està treballant intensament en desbrinar la seva funció. Alguns d'ells són molècules de reconeixement i altres són receptors de factors de creixement. Malauradament de la majoria d'elles encara no es coneix la funció.

L'altre gran eina de que es disposa actualment són les interleucines i altres molècules solubles que tenen gran importància en el creixement cel.lular. Per altre banda hem de mencionar la identificació dels oncogens amb les proteïnes que codifiquen i les tècniques de Biologia Molecular que han ajudat en gran manera a la identificació de la estructura de les principals molècules de reconeixement en els limfòcits. Per últim cal esmentar els avanços que s'han fet en el desbrinament dels mecanismes intracel.lulars de transducció de senyals i la seva relació amb els receptors de membrana.

Tota aquesta metodologia s'està aplicant en el estudi dels mecanismes de maduració i activació dels limfòcits lo que ha permès començar a conèixer les vies intracel.lulars d'activació limfocitària.

En el nostre laboratori hem aplicat part d'aquestes tècniques per estudiar la maduració limfocitària i les estructures de reconeixement de les cèl.lules T i per identificació de les senyals necessàries per l'activació de les cèl.lules T. A continuació exposarem per separat cada un d'aquests aspectes.

## ONTOGENIA DE LES CEL·LULES T

Tan els limfòcits T com B es generen a partir de la cèl.lula hematopoyètica pluripotencial que es troba en el moll d'os. Durant el període embrionari d'aquesta cèl.lula surten els precursors que emigren al timus on adquireixen la competència immunològica. Posteriorment els timocits madurs migren cap als òrgans perifèrics. Es discuteix encara quines són les vies maduratives que segueixen els timocits en el interior del timus.

El concepte clàssic considera que els timocits en les fases més immadures es trobarien en la zona subcapsular del timus, des de on passarien a la zona cortical. Des de aquí passarien successivament a la escorça tímica i a la zona medul·lar, des de on migrarien a la perifèria. Actualment (Lanier et al. 1986) es posar en dubte que només existeixi una sola via madurativa i es postula la existència d'altres vies maduratives. Un dels models maduratiu preveu que entre altres vies hi hauria una que no passaria per la zona medul·lar. Alguns autors defensen també l'existència de timocits immadurs que haurien arribat a la medul·la sense passar per l'escorça (Penit C. 1986). Aquest es un tema, doncs que encara se esta debatent i que no entrarem a discutir-lo en aquesta ocasió. Més aviat ens centrarem en la relació entre l'estat maduratiu dels timocits i la seva capacitat funcional.

Per poder comprendre més clarament la relació entre madures i funció ens serà de gran ajut conèixer l'esquema actualment vigent sobre l'adquisició de marcadors de membrana per part dels timocits en el curs de la seva maduració. Tal como veiem a la Figura 1, les cèl.lules més immadures són negatives per als antigens CD3,4,8. A mesura que els timocits es diferencien adquireixen els marcadors CD3,4,8 (Reinherz et al. 1980). La característica més sobresalient d'aquesta població es que presenta els marcadors CD4+ i CD8+, es a dir és doble positiva. Sembla ser que el 90% d'aquesta població mor en el interior del timus (Matsuyama et al. 1965). El 10% restant madurarà perdent un dels dos antigens, per lo que quedaran dues poblacions, CD3+4+ y CD3+8+. Les cèl.lules madures que migraran a la perifèria seran només aquestes últimes (Acuto O. & Reinherz E.L. 1985). L'antigen CD3 es un complexa molecular que esta intimament relacionat amb el receptor específic de cèl.lules T. Queda per aclarir encara quins són els mecanismes que porten a terme la selecció de les cèl.lules que seguiran una diferenciació final i moriran en el interior del timus en relació a les que adquiriran competència immunològica i emigraran.

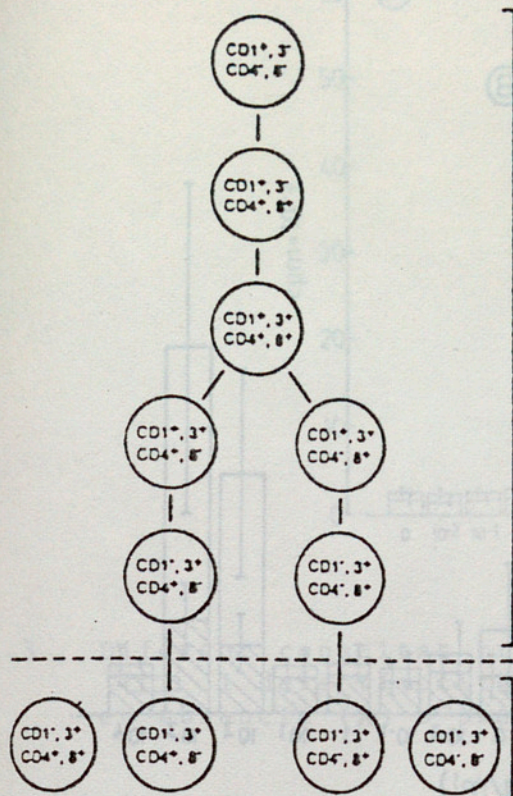


Fig.1 Presencia dels marcadors de superfície durant el desenvolupament ontogènic de les cèl·lules tímiques.

Contràriament a lo que era de esperar, experiments recents fets en el ratolí (Lugo et al. 1986) demostraran que les cèl·lules més immadures, dites doble negatives tenen una gran capacitat proliferativa i són capaces de secretar IL-2 i de expressar el receptor de IL-2. Com és ben conegut l'interacció entre el receptor de IL-2 i la interleucina IL-2 constitueix la principal via activadora dels limfòcits T. Nosaltres en un treball posterior hem confirmat en el home que els timocits immadurs (Vives et al. 1987), es a dir, els dobles negatius presentaven una gran capacitat proliferativa i també tenien la capacitat de secretar IL-2 i expressar el receptor de IL-2. Per a dur a terme aquest treball varem utilitzar el ester de forbol, TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) i el ionofor de calç, Ionomycine. Varem escollir aquestes substàncies perquè els timocits immadurs no posseïen el receptor específic per antigen, per lo que no ens era possible induir l'estimulació per aquesta via. Per altre banda podem dir que el TPA es un estimulador quasi universal, doncs actua activant la proteïnquinasa C (Cambier et al. 1987) (més endavant comentarem més àmpliament aquest punt). La Ionomycina, per altre banda, es també un activador inespecífic, doncs actua movilitzant els dipòsits intracel·lulars de calç.

Lo més sorprenent dels nostres resultats van ésser les dades obtingudes amb els timus no fraccionats, es a dir quan s'utilitzava la població tímica total. Varem observar que els timus no fraccionats presentaven una molt modesta capacitat proliferativa en relació amb els timus immadurs, quan s'estimulaven amb el ester de forbol TPA+IL-2, (Figura 2).

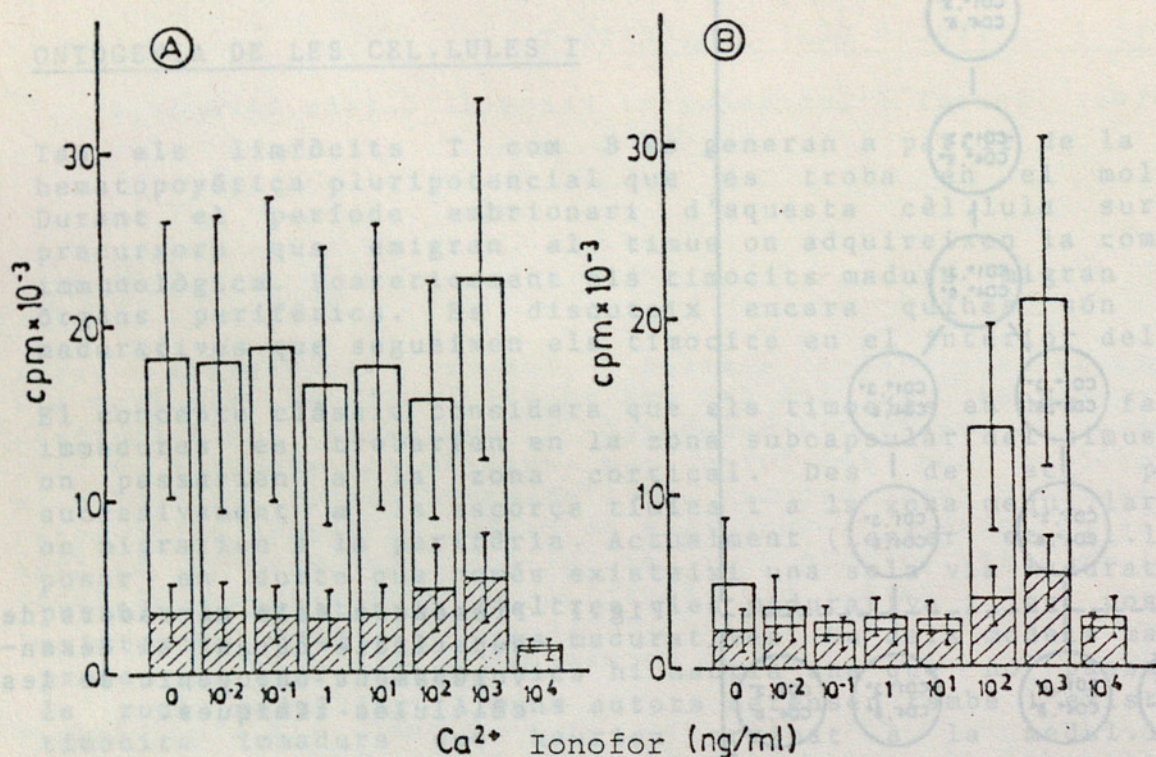




Fig.2 Diferent capacitat proliferativa dels timocits immadurs  i dels timocits total  quan són estimulats amb ionofor de calci en presència (A) o absència de IL-2 (B).

Tal com es veu en la figura 2 la diferencia en la capacitat proliferativa no es deguda a que ambdues poblacions responen a concentracions diferents, ja que els timocits no fraccionats no presenten una clara proliferació en cap de les concentracions assajades. Una dada interessant que també és despret de la Figura 2 es que el TPA no es capaç de induir la proliferació dels timocits immadurs, però sí que indueix l'expressió del receptor per IL-2. Això ve demostrat per el fet que la adició de IL-2 indueix una intensa resposta proliferativa en les cèl.lules tractades amb IL-2 lo que demostra que el TPA havia induit previament la expressió del receptor per IL-2. La diferencia proliferativa entre els timocits immadurs i els totals s'observa també amb la combinació de TPA+Ionofor de calç. En la figura 3 es pot observar que a qualsevol concentració de TPA dintre dels marges de 1 ng a 1 g, l'adició de Ionofor a dosi entre 100 i 1000 ng indueix una intensa resposta dels timocits immadurs, en tant els timocits totals apenas responen. Si s'utilitzant dosi de Ionofor més petites no s'obté resposta dels timocits immadurs, a no ser que s'ha afageixi IL-2. Es a dir, es reproduïx una situació en la que s'expressa el receptor de IL-2 sense que s'indueixi proliferació.

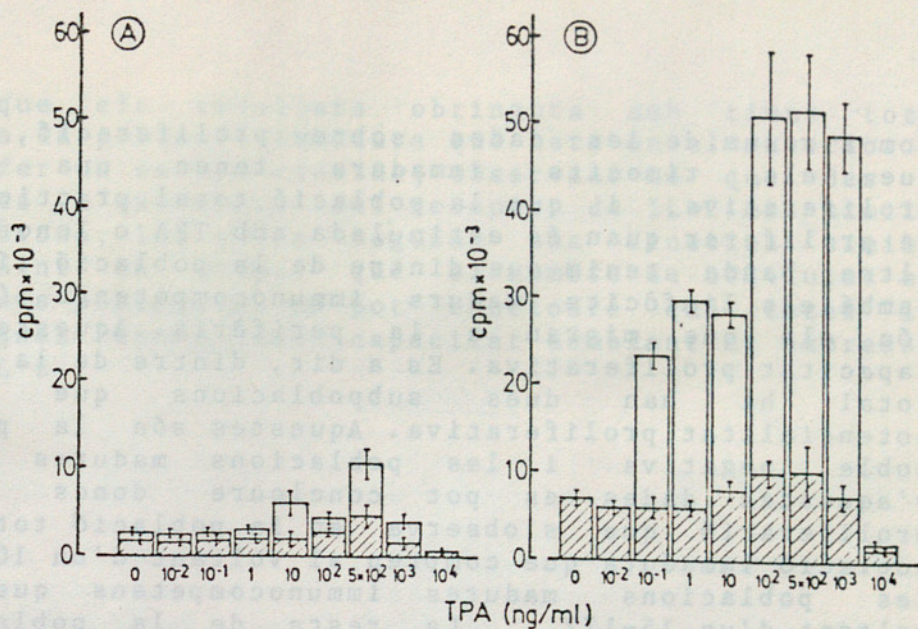




Fig.3 Diferent capacitat proliferativa dels timocits immadurs  i dels timocits totals  quan són estimulats amb TPA en absència (A) o presència de IL-2 (B).

La manca de proliferació dels timus totals no es deguda a una conèctica diferent, doncs tal com es pot veure en les gràfiques de la Figura 4, en cap moment dels dies estudiats els timocits totals presentaven una resposta proliferativa clara.

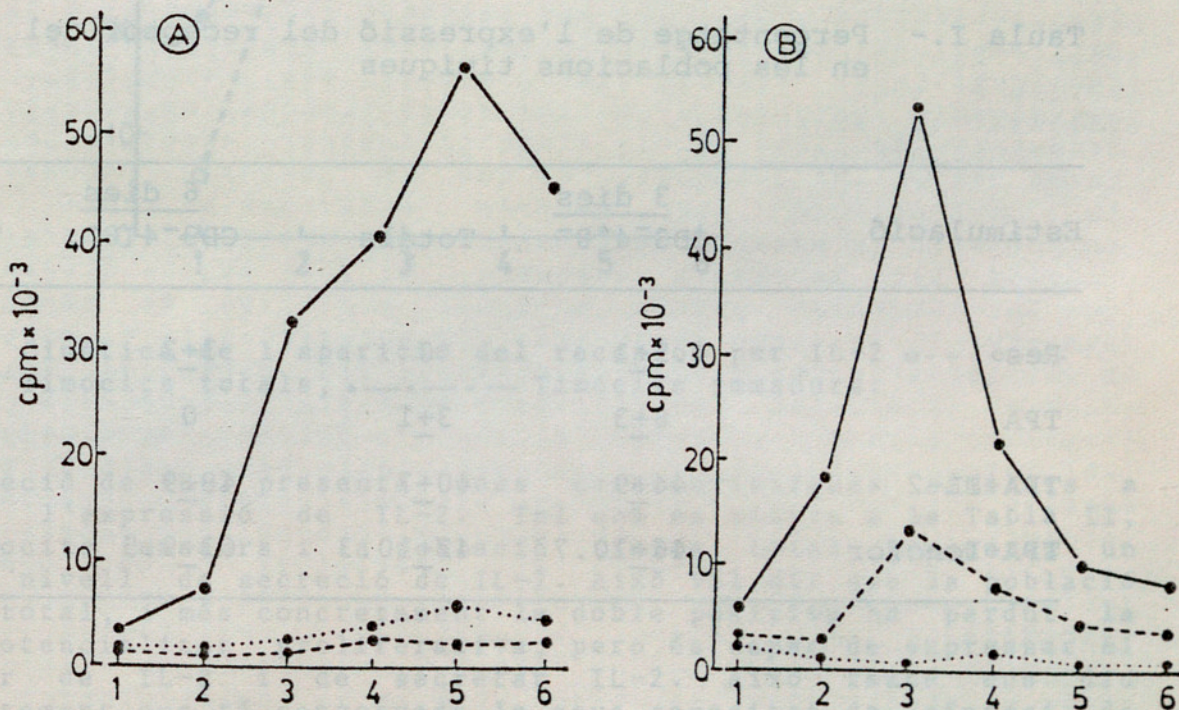


Fig.4 Cinètica de l'estimulació amb TPA+IL-2 (A) i TPA+Ionofor de calci (B). - - - - - Timocits totals, ●...●... Timocits totals tractats amb complement, —●— Timocits immadurs.

Com a resum de les dades sobre proliferació, podem concloure que els timocits immadurs tenen una forta capacitat proliferativa, i que la població total practicament no es capaç de proliferar quan és estimulada amb TPA o Ionofor de calç. Per altre banda tenim que dintre de la població tímica total hi han també els limfòcits madurs immunocompetents (CD3+4+8-) i que són els que migren a la perifèria. Aquestes cèl.lules tenen capacitat proliferativa. Es a dir, dintre de la població tímica total hi han dues subpoblacions que tenen una clara potencialitat proliferativa. Aquestes són la població immadura doble negativa i les poblacions madures immunocompetents. D'aquestes dades es pot concloure doncs que la petita proliferació que s'observa en la població total es deguda a la població immadura que compren al voltant d'un 10% del total i a les poblacions madures immunocompetents que representen al voltant d'un 15-17%. La resta de la població tímica esta composta de la població doble positiva (CD3+4+8+) la qual representa un 70-80% del total. Tenint en compte totes aquestes dades i els resultats sobre la proliferació es pot concloure que aquesta població doble positiva es la que hauria perdut la capacitat proliferativa.

En relació a l'expressió del receptor per IL-2, tan la població immadura com la total presentaven un mateix grau d'expressió quan eren estimulades per TPA+IL-2 o TPA+Ionofor. En la Taula I es poden veure els valors obtinguts en les dues poblacions en els dies 3 i 6 de l'activació.

Taula I.- Percentatge de l'expressió del receptor del IL-2 (CD25) en les poblacions tímiques

| Estimulació | 3 dies   |         | 6 dies   |         |
|-------------|--|---------|--|---------|
|             | CD3 <sup>-</sup> 4 <sup>-</sup> 8 <sup>-</sup> | Totals  | CD3 <sup>-</sup> 4 <sup>-</sup> 8 <sup>-</sup> | Totals  |
| Res         | 4.5+1  | 0       | 3+2  | 0       |
| TPA         | 6+3  | 3+1     | 0  | 0       |
| TPA+IL-2    | 44+9   | 40+7    | 48+9   | 45+1    |
| TPA+Ionofor | 46+10.7  | 42+10.3 | 63+9.5   | 61+18.0 |

Per descartar que els resultats obtinguts amb timus total fossin deguts a la població immadura que esta en el interior de la total, es va fer un estudi cinetic, observant-se que des de els primers dies l'expressió del receptor de IL-2 era similar en ambdues poblacions, les quals seguian una cinetica similar (Figura 5). Tenint en compte que el nombre de cèl.lules era similar en les dues poblacions es pot concloure que totes les poblacions tímiques tenen una capacitat semblant de expressar el receptor de IL-2.

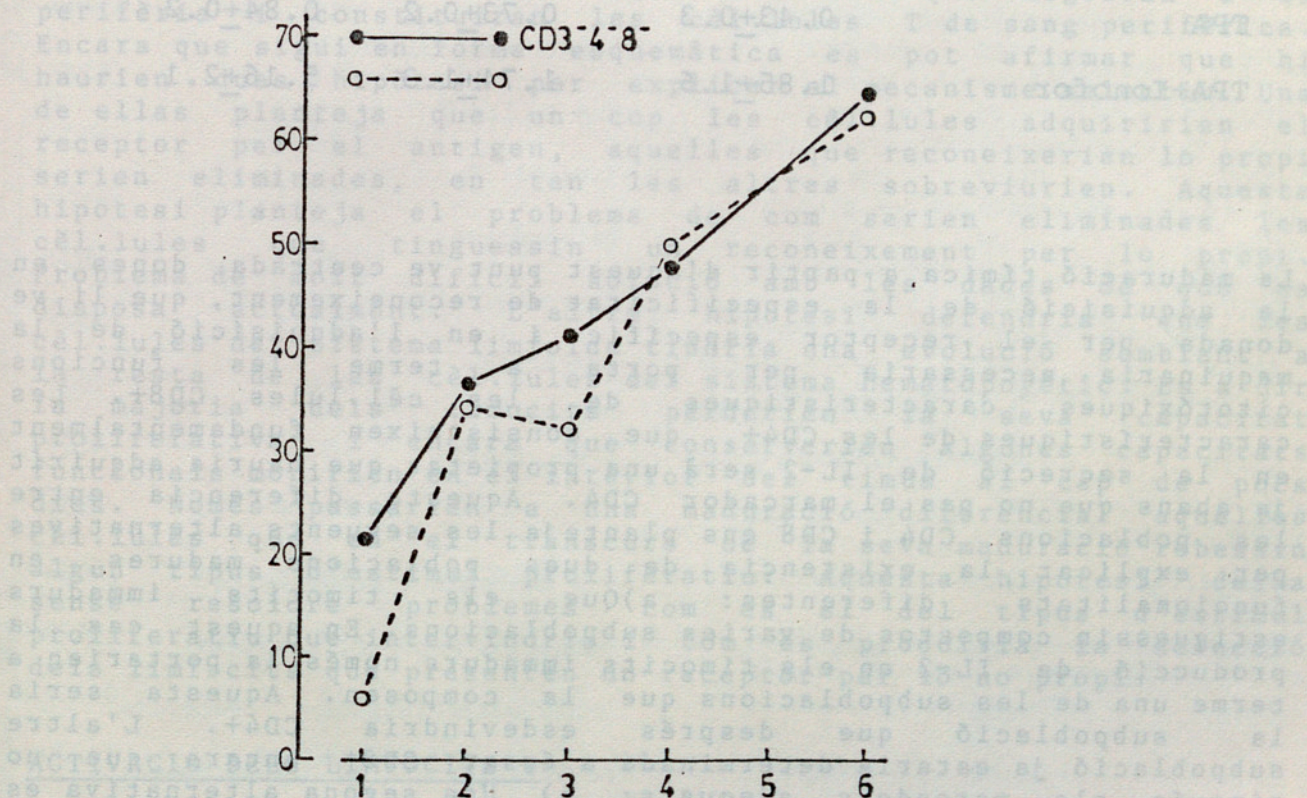


Fig.5 Cinètica de l'aparició del receptor per IL-2 o---o--- Timocits totals, ●—●— Timocits immadurs.

La secreció de IL-2 presenta unes característiques similars a les de l'expressió de IL-2. Tal com es mostra a la Tabla II, els timocits immadurs i la població tímica total presenten un mateix nivell de secreció de IL-2. Això vol dir que la població tímica total, i més concretament la doble positiva ha perdut la seva potencialitat proliferativa, però és capaç de expressar el receptor de IL-2 i de secretar IL-2. Això també ens diu indirectament que té conservada la seva capacitat de síntesi de RNA. Els resultats presentats ens diuen també que el timocit immadur a pesar de no tenir el receptor específic de cèl.lules T tenen ja totes les capacitats necessàries per proliferar via IL-2.

Taula II.- Producció IL-2, poblacions tímiques i perifèriques.

| Estimulació | Activitat IL-2, unitats/ml                     |          |          |
|-------------|--|----------|----------|
|             | Timocits                                       |          | PBMC     |
|             | CD3 <sup>-</sup> 4 <sup>-</sup> 8 <sup>-</sup> | Totals   |          |
| Ionofor     | <0.05  | <0.05    | <0.05    |
| TPA         | 0.43±0.3                                       | 0.73±0.2 | 0.84±0.2 |
| TPA+Ionofor | 1.85±1.6                                       | 1.74±1.3 | 5.16±2.1 |

La maduració tímica a partir d'aquest punt ve centrada doncs en la adquisició de la especificitat de reconeixement, que li ve donada per el receptor específic i en l'adquisició de la maquinaria necessària per porta a terme les funcions citotòxiques característiques de les cèl.lules CD8+. Les característiques de les CD4+, que consisteixen fonamentalment en la secreció de IL-2 serà una propietat que hauria adquirit ja abans que no pas el marcador CD4. Aquesta diferència entre les poblacions CD4 i CD8 ens planteja les següents alternatives per explicar la existència de dues poblacions madures en funcionalitats diferents: a) Que els timocits immadurs estiguessin compostos de varies subpoblacions. En aquest cas la producció de IL-2 en els timocits immadurs només la portarien a terme una de les subpoblacions que la componen. Aquesta seria la subpoblació que després esdevindria CD4+. L'altre subpoblació ja estaria determinada a ésser CD8+ encara que no tingués els marcadors adequats; b) Una segona alternativa es que les immadures passin a doble positives en capacitat de produir IL-2 i que d'aquestes algunes perdessin el marcador CD8 i altres perderien el marcador CD4 i la capacitat de produir IL-2; i c) Una tercera possibilitat es que els timocits immadurs passin directament a CD4+ o CD4+8+. Aquestes últimes cèl.lules moririen, en tan que les CD4+ podrien continuar essent CD4+ o bé passarien a CD8+ perdent la capacitat de produir IL-2. Tenint en compte que hi han moltes dades indicant que la població immadura és heterogènea i esta composta de varies subpoblacions, la primera hipotesi sembla la més factible.



Un altre problema que planteja aquest treball es la relació que hi ha entre fenotip i funció. Els timocits CD4 són les úniques cèl.lules madures que segregen IL-2. Per altre banda tenim que els timocits immadurs tenen la capacitat de produir IL-2 i no tenen l'antigen CD4. Aquest fet es pot explicar de dues maneres: a) El gen que codifica CD4 s'activa el mateix temps que el de IL-2, però s'expressa més tard; b) El gen que codifica IL-2 s'expressa a partir d'un cert nivell de maduració i es manté activat fins que l'activació de CD8 en absència de CD4 l'inactivi.

L'altre gran problema que plantejen els resultats observats fa referència a conèixer qui són els mecanismes que condueixen a que la major part dels timocits segueixin una diferenciació terminal, en tan que un petit percentatge continui la maduració a cèl.lules immunocompetents que són les que migraran a la perifèria i constituïran les cèl.lules T de sang perifèrica. Encara que sigui en forma esquemàtica es pot afirmar que hi haurien dues hipòtesis per explicar el mecanisme selectiu. Una de ellas planteja que un cop les cèl.lules adquiririen el receptor per el antigen, aquelles que reconeixerien lo propi serien eliminades, en tan les altres sobreviurien. Aquesta hipòtesi planteja el problema de com serien eliminades les cèl.lules que tinguessin un reconeixement per lo propi. Problema de molt difícil solució amb les dades de que es disposa actualment. L'altre hipòtesi defendria que les cèl.lules del sistema limfoide tindria una evolució semblant a la resta de les cèl.lules del sistema hematopoyètic. Es a dir la majoria dels timocits perderien la seva capacitat proliferativa i encara que conservarien algunes capacitats funcionals moririen en el interior del timus al cap de pocs dies. Només passarien a una maduració diferencial aquelles cèl.lules que en el transcurs de la seva maduració rebessin algun tipus d'estímul proliferatiu. Aquesta hipòtesi deixa sense resoldre problemes com es el del tipus d'estímul proliferatiu que intervindria i com es produiria la selecció dels limfocits que presenten un receptor per lo no propi.

#### ACTIVACIO DELS LIMFOCITS T

Teòricament els limfòcits T han d'ésser estimulats preferentment a través del receptor específic per l'antigen. No obstant, arrel de la identificació dels diferents antigens leucocitaris s'ha observat que es pot desencadenar l'activació a partir d'altres molècules de membrana. Per altre banda, tal com succeïx amb els timocits es possible també activar els limfòcits amb TPA i ionofor de calç.

Per poder seguir millor aquest apartat es important conèixer l'estat actual de coneixements sobre els antigens de diferenciació leucocitaria. Per això en la Tabla III s'exposen las característiques principals dels antigens descrits fins ara. Tan la nomenclatura com la homologació dels diversos monoclonals que defineixen els diferents antigens s'han establert en els tallers internacionals sobre antigens de diferenciació leucocitaria que s'han realitzat a Paris (1982) (Bernard et al. 1984), Boston (1984) (Reinherz et al. 1986) i Oxford (1986).

## CLUSTERS DE DIFERENCIACIO ESTABLERTS EN EL WORKSHOP D'OXFORD:

|   | CLUSTER                                   | PES MOL. | ANTIGEN           | ESPECIFICITAT  |                      |
|---|---|----------|-------------------|--|----------------------|
| T<br>A<br>N<br>T<br>I<br>G<br>E<br>N<br>S   | CD1a                                      | 49       |                   | timòcits corticals   |                      |
|   | CD1b                                      | 47       | NA1/34            | timòcits corticals   |                      |
|   | CD1c                                      | 43       | M-241             | timòcits corticals   |                      |
|   | CD2                                       | 50       | T11,Leu5          | recept. eritròcits de be   |                      |
|   | CD3                                       | 22/26/30 | Cris-7            | associat al receptor T   |                      |
|   | CD4                                       | 60       | Edu-2             | sub pobl. T  |                      |
|   | CD5                                       | 67       | Cris-1            | pan T+ BCLL  |                      |
|   | CD6                                       | 120      | T12,T17           | pan T+ sub població B  |                      |
| A<br>N<br>T<br>I<br>G<br>E<br>N<br>S<br>M<br>I<br>E<br>L<br>O<br>I<br>D<br>E<br>S | CD7                                       | 40       | 3A1,G3-7          | pan T+ LLA-T   |                      |
|   | CD8                                       | 30/32    | 109-2D4           | sub pobl. T  |                      |
|   | CD9                                       | 24       | BA-2              | B+ monòcits  |                      |
|   | CD10                                      | 100      | CALLA             | B+ granulòcits   |                      |
|   | CD11a                                     | 170      | LFA-1 (alfa)      | limfòcits  |                      |
|   | CD11b                                     | 160      | MAC-1 (alfa)      | monòcits   |                      |
|   | CD11c                                     | 150      | p-150 (alfa)      | granulòcits  |                      |
|   | CD12                                      |          |                   |  |                      |
|   | CD13                                      | 150      |                   | T + monòcits + granulòcits   |                      |
|   | CD14                                      | 55       | Cris-6            | monòcits, Kupffer, basòfils  |                      |
|   | CD15                                      | 180      |                   | granulòcits (alguns monòcits)  |                      |
|   | CD16                                      | 50-60    | GRM-1             | neutròfils, NK, K, alguns monòcits   |                      |
|   | CD17                                      | glucolip | lactosil ceramide | granulòcits, basòfils, platelets   |                      |
|   | CD18                                      | 95       | 68-5A5            | leucocitari comú(cadena beta de LFA-1,...)                                       |                      |
|   | A<br>N<br>T<br>I<br>G<br>E<br>N<br>S<br>B | CD19     | 95                | B4   | pan B, progenitors B |
|   |   | CD20     | 33+36             | BC-1, 93-1B3, B1   | pan B perifèric      |
| CD21  |   | 140      | B2                | cel. B, cèl.lules foliculars dendrítiques  |                      |
| CD22  |   | 130+140  |                   | pan B (citoplàsmic en els precursors)  |                      |
| CD23  |   | 45       |                   | cel. B, cèl.lules foliculars dendrítiques<br>i cèl.lules de là zona del mantell. |                      |
| CD24  |   | 45-55-65 | BA-1              | pan B, progenitors B i granulòcits.  |                      |

CLUSTERS DE DIFERENCIACIÓ ESTABLERS EN EL WORKSHOP D'OXFORD (continuació):

|                     | <u>CLUSTER</u> | <u>PES MOL.</u> | <u>ANTIGEN</u>   | <u>ESPECIFICITAT</u>  |
|---------------------|----------------|-----------------|------------------|---|
| D'A C T I V A C I O | CD25           | 55              | Tac              | receptor d'interleucina 2   |
|                     | CD26           |                 | AELIC7           | antigen d'activació T   |
|                     | CD27           | 55              | VIT-14,OKT-18    | T madures, T-PHA, T-CLL, Sezary   |
|                     | CD28           | 44              | 9.3              | separa les CD8 amb citotòx/supresores                                       |
|                     | CDw29          | 125             | 4B4              | CD4+,4B4+ inductores de col.laboració                                       |
|                     | CD30           | 130             |                  | antigen d'activació: blastes T i B, Reed Stenberg,blast.interf.             |
| NEW MIELOIDES       | CD31           | 130-140         |                  | monòc,granulòc,plaquetes,alg T i 40% BMC                                    |
|                     | CDw32          | 40              |                  | monòc,granulòc,plaquetes i B(¿recept. Fc?)                                  |
|                     | CD33           | 67              |                  | reacciona amb leuc. prolimfocítiques  |
|                     | CD34           | 115             |                  | reacciona amb algunes leuc. miel i limf.                                    |
|                     | CD35           | 220             |                  | B,granulòc,monòcits,eritròcits,..   |
|                     | CD36           | 85              |                  | monòcits,plaquetes,   |
|                     | CD37           | 40-45           |                  | pan B (madures): baixos nivells d'Ag en T, neutròf,monòc,Kupffer,           |
| NEW B               | CD38           | 45              | T-10             | cèl.lules plasmàtiques,prog.T,blastes T,...                                 |
|                     | CD39           | 80              | G-28-8,G-28-10   | monòcits,limfoblastoides no Burkitt, algunes línies T,algunes plasmàtiques. |
|                     | CDw40          | 50 (fosfor)     | G-28-5           | B,interdigitating cells   |
| PLAQUETES           | CDw41          | 90+140          | IIb/IIIa (9 Acm) | plaquetes   |
|                     | CDw42          |                 | Ib               | plaquetes   |
| LEUCOCITARIS        | CD43           | 95              | 84-3C1           | comú leucocitari  |
|                     | CDw44          | 65-85           | 106-4D5          | comú leucocitari  |
|                     | CD45           | 200             | 72-5D3           | comú leucocitari  |
|                     | CD45R          | 220             | 111-1C5          | alguns T, B i monòcits  |

COMUNS

A continuació veurem com algunes de les estructures de membrana intervenen en l'activació dels limfòcits. Per una millor claredat expositiva classificarem en tres grups els principals antigens de membrana que intervenen en l'activació cel.lular. Un grup està compost per els antigens que intervenen en el reconeixement antigenic. Un segon grup està format per aquelles molècules de membrana que desencadenen l'activació si les cèl.lules s'incuben amb els anticossos monoclonals que els identifiquen. El tercer grup està integrat per antigens que no són imprescindibles per l'activació però que coadjuvan en el procés proliferatiu. A continuació comentarem aquests tres grups per separat.

### Antigens de reconeixement

Aquest grup està format per el receptor per l'antigen que està englobat dintre del complexa molecular CD3 i per les molècules CD4 i CD8. Tal com es mostre en la figure 6, el receptor específic per antigen de les cèl.lules T consta de dues cadenes (  $\alpha$  i  $\beta$  ) (Acuto O., Hussey R.E. et al. 1983) d'un pes molecular aproximat de 45 kD cada una d'elles. Aquest receptor està integrat dintre del complexa molecular CD3, el qual per la seva part està format per tres cadenes polipeptides. El paper exacte d'aquestes molècules no es coneix del cert, si bé sembla ésser que intervindrien en l'estabilització del receptor a la membrana i podrien representar mecanismes transductors de las senyals d'activació.

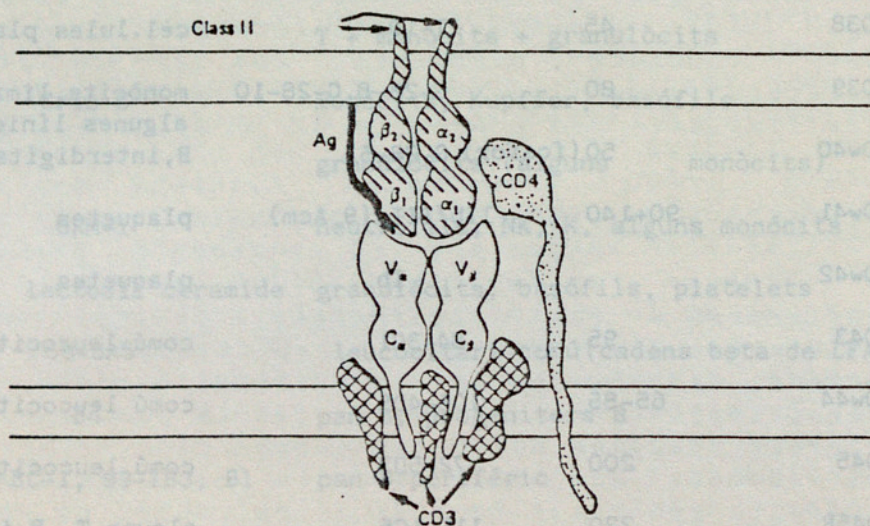


Fig.6 Estructura del complexa receptor CD3.

Una de les característiques peculiars del reconeixement antigènic de les cèl.lules T és que aquest només té lloc si els antigens es presenten associats amb els propis antigens d'histocompatibilitat (aquest fenomen es coneix com el de restricció del sistema principal d'histocompatibilitat). Aquesta forma de reconeixement es representa esquematitzat en la figura 7 (Marrack et al. 1986). El fet de que els antigens es reconeguin associats amb els propis antigens d'histocompatibilitat no vol dir que una de les cadenes del receptor reconegui l'antigen estrany i l'altre reconegui el d'histocompatibilitat, doncs s'ha demostrat que ambdues cadenes reconeixen el complexa format per les dues molècules (Yagüe et al. 1986)

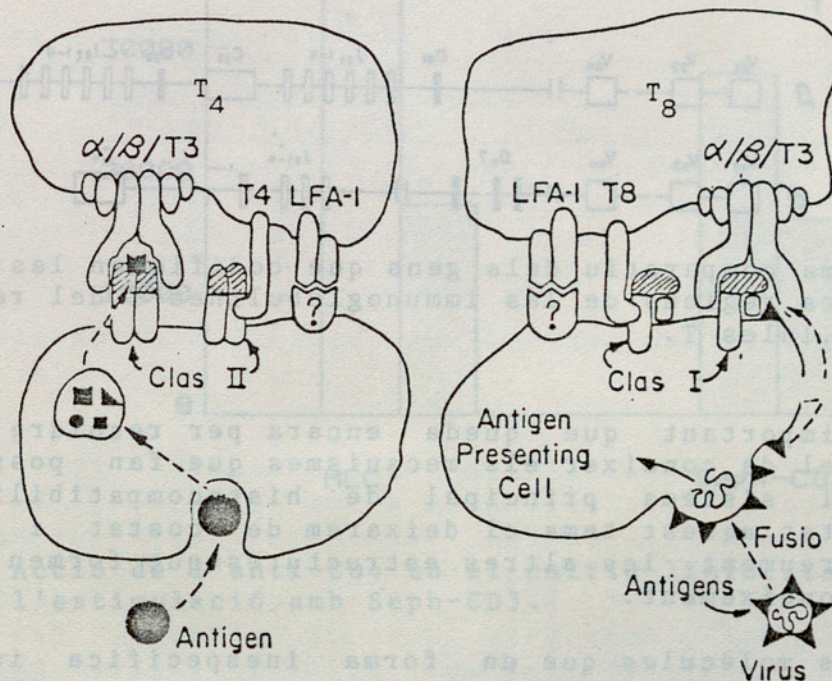


Fig.7. Esquema il.lustratiu de la restricció MHC i de les diverses molècules de reconeixement.

Al igual que passava amb les immunoglobulines, el receptor de les cèl.lules T planteja el problema de conèixer els mecanismes mitjançant els quals s'origina la diversitat del reconeixement. Estudis utilitzant tècniques pròpies de la Biologia Molecular han permès seqüenciar les dues cadenes que formen el receptor (Sim, Yagüe y cols, 1986) (Acuto O., Fabbi M., et al. 1984) i conèixer la organització gènica de la regió cromosòmica que codifica el receptor. Tal com es pot veure en la figura 8 existeixen varius gens que codifiquen a les parts constants i variables de les dues cadenes. De la mateixa manera existeixen els gens denominats D i J que col·laboren a la formació de la diversitat, tal com succeeix en les immunoglobulines. Es a dir, el repertori del reconeixement en les cèl.lules T es porta a terme mitjançant la reordenació dels gens de les diverses regions en forma semblant a lo que succeeix en les cèl.lules B.

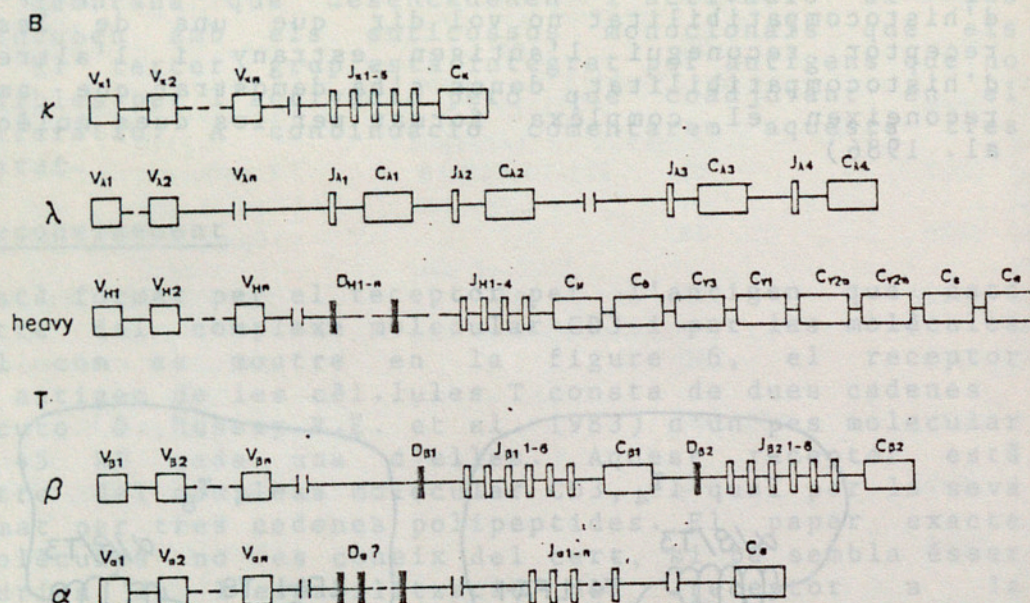


Fig.8 Diagrama comparatiu dels gens que codifiquen les diverses regions de les immunoglobulines i del receptor de cèl.lules T.

Un problema important que queda encara per resoldre en forma definitiva es el de coneixer els mecanismes que fan possible la restricció del sistema principal de histocompatibilitat. Per raons de brevetat aquest tema el deixarem de costat i passarem a comentar breument les altres estructures que formen part del sistema de reconeixement.

Al marge de les molècules que en forma inespecífica intervien en la adhesivitat intracel.lular hi han dues molècules que sembla que col.laboren en l'estabilitat del procés de reconeixement. Aquestes molècules són les CD4 i CD8. Les comentarem breument per separat.

La molècula CD4 és una glicoproteïna de membrana de un pes aproximat de 55-62 kD. Les cèl.lules que el presenten es caracteritzen en general per tenir una funció col.laboradora i secretar IL-2. Es desconeix amb exactitud quina es la funció d'aquesta molècula, si bé presenta una característica molt peculiar que consisteix en que s'uneix a les parts monomèrfiques dels antigens d'histocompatibilitat de classe II (Spits et al. 1982), tal com es representa en la figura 7. No obstant, es molt probable que intervingui en altres funcions cel.lulars, doncs tal com es veu en la figura 9 els anticossos dirigits contra aquesta molècula poden bloquejar la activitat proliferativa dels limfòcits.

## CD4 (Edu-2) en MLC y Seph-CD3

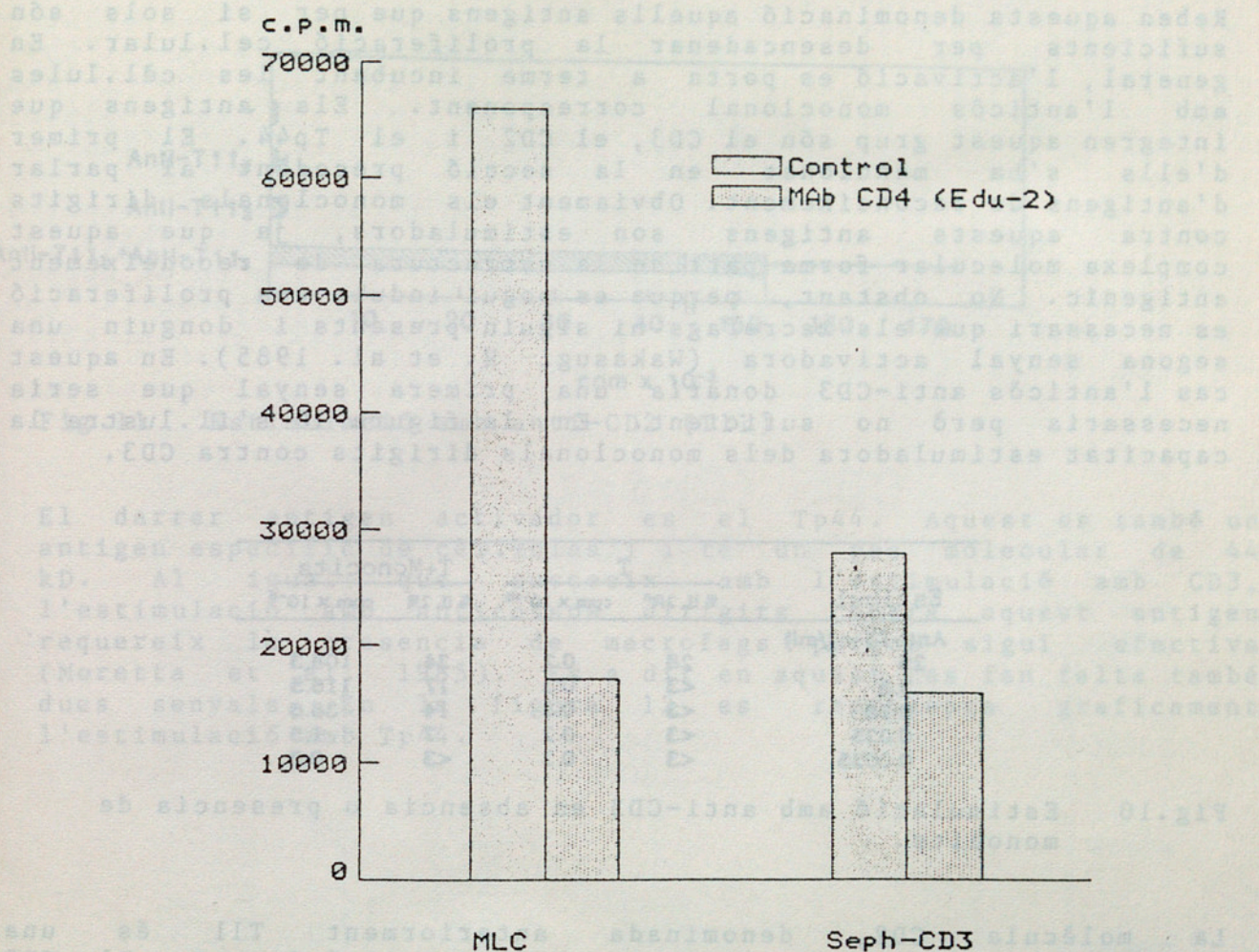


Fig.9 Acció de l'anti-CD4 en el cultiu limfocitari mixte i en l'estimulació amb Seph-CD3.

L'antigen CD8 és característic de les molècules citotòxiques. La molècula està formada per monomeres de cadenes polipeptides de 34 kD. En forma semblant a lo que passa amb el CD4 es desconeix també quina és la seva funció i quins són els lligams moleculars que relacionen l'antigen CD8 amb la funció citotòxica de la cèl.lula. L'únic que sembla ben establert es que durant la presentació del antigen estrany que té lloc en el curs de la cooperació cel.lular la molècula CD8 s'uneix a la part monomèrfica dels antigens d'histocompatibilitat de classe I (Meuer S.C., Schlossman S.F. et al. 1982).

### Antigens activadors

Reben aquesta denominació aquells antigens que per si sols són suficients per desencadenar la proliferació cel.lular. En general, l'activació es porta a terme incubant les cèl.lules amb l'anticòs monoclonal corresponent. Els antigens que integren aquest grup són el CD3, el CD2 i el Tp44. El primer d'ells s'ha mencionat en la secció precedent al parlar d'antigens de reconeixement. Obviament els monoclonals dirigits contra aquests antigens son estimuladors, ja que aquest complexa molecular forma part de la estructura de reconeixement antigenic. No obstant, perquè es pogui induir una proliferació es necessari que els macrofags hi siguin presents i donguin una segona senyal activadora (Wakasugi H. et al. 1985). En aquest cas l'anticòs anti-CD3 donaria una primera senyal que seria necessaria però no suficient. En la figura 10 s'il.lustra la capacitat estimuladora dels monoclonals dirigits contra CD3.

| Estimul         | T                    |                         | T+Monocits |                         |
|-----------------|----------------------|-------------------------|------------|-------------------------|
|                 | % IL 2R <sup>a</sup> | cpcm × 10 <sup>-4</sup> | % IL 2R    | cpcm × 10 <sup>-5</sup> |
| Anti-T3 (ng/ml) |                      |                         |            |                         |
| 25              | 28                   | 0.2                     | 34         | 108.3                   |
| 2.5             | <3                   | 0.3                     | 17         | 116.5                   |
| 0.25            | <3                   | 0.3                     | 14         | 38.6                    |
| 0.025           | <3                   | 0.2                     | 7          | 1.5                     |
| 0.0025          | <3                   | 0.2                     | <3         | 0.3                     |

Fig.10 Estimulació amb anti-CD3 en absència o presència de monocits.

La molècula CD2, denominada anteriorment T11 és una glicoproteïna present exclusivament a les cèl.lules T. El CD2 és la glicoproteïna específica de cèl.lules T que apareix en primer lloc en el curs de l'ontogenia dels limfòcits T. Té un pes molecular de 50 kD. No es coneix quina és la seva funció, si bé recentment se'l considera com el receptor del antigen LFA-3. En l'actualitat s'han descrit varios monoclonals dirigits contra aquest antigen. Aquests monoclonals es caracteritzen per reconèixer epitops diferents. Fins el moment s'han descrit tres: T11, T11 i T11. La combinació de T11 + T11 produeix una intensa estimulació (Meuer S.C., Hussey R.E. et al. 1984), tal com es representa en la figura 11. Segons els autors que van descriure aquest tipus d'estimulació, no es necessaria la presència de macrofags. Es podria interpretar doncs aquesta proliferació com que les dues senyals necessaries per estimular la cèl.lula vindrien donades per el contacte en cada un dels epitops diferents.



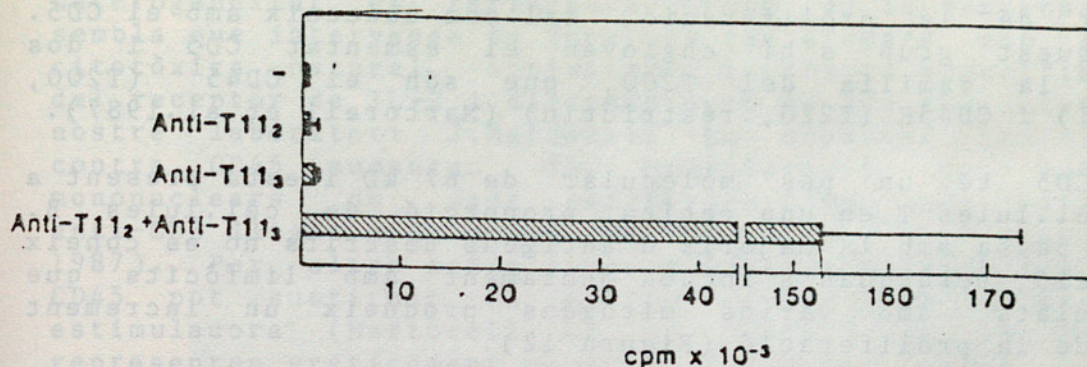


Fig.11 Estimulació amb anti-CD2 (T11)

El darrer antigen activador es el Tp44. Aquest es també un antigen específic de cèl.lules T i té un pes molecular de 44 kD. Al igual que succeeix amb l'estimulació amb CD3, l'estimulació amb anticossos dirigits contra aquest antigen requereix la presència de macrofags perquè sigui efectiva (Moretta et al. 1985). Es a dir en aquest cas fan falta també dues senyals. En la figura 12 es representa gràficament l'estimulació amb Tp44.

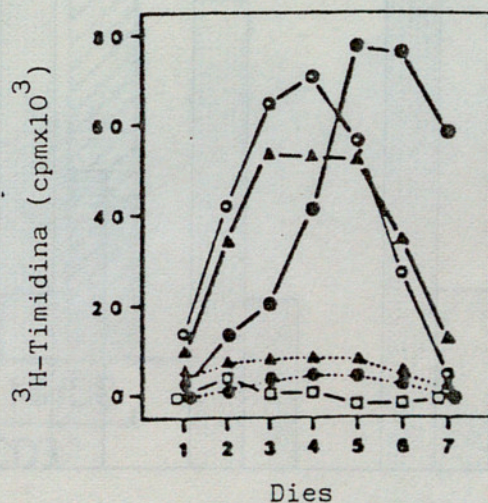


Fig.12 Estimulació amb anti-Tp44 (●), anti-CD3 (▲) i PHA (○) en presència o absència de macrofags.

## Antigenes agonistes de l'activació

Aquest grup el formen aquells antigenes caracteritzats perquè els monoclonals dirigits contra ells no activen la cèl.lula, però coadjuven a la estimulació una vegada s'ha donat una primera senyal, ja sigui a través d'un anticòs o altre mecanisme. En altres casos es limiten només a incrementar l'intensitat de la proliferació, tal com succeeix amb el CD5. Dintre d'aquest grup s'hi engloben el esmentat CD5 i dos membres de la família del T200, que són el CD45 (T200, convencional) i CD45R (T220, restrictiu) (Martorell et al.1987).

L'antigen CD5 té un pes molecular de 67 kD i està present a totes les cèl.lules T en una petita proporció de cèl.lules B. Igual que passa amb la majoria d'antigenes descrits no es coneix la seva funció, però quan s'incuba juntament amb limfòcits que són estimulats amb diversos mitogens produeix un increment substancial de la proliferació (Figura 12).

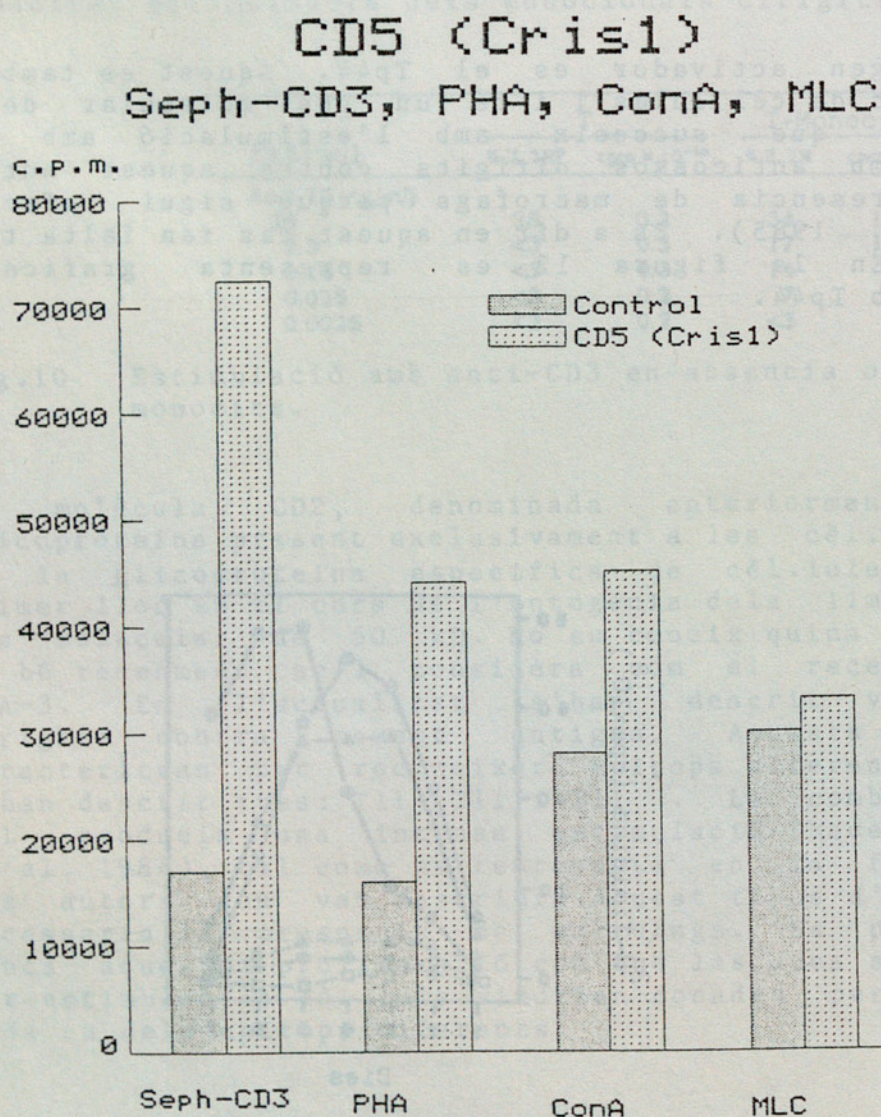


Fig.13 Efecte de l'anti-CD5 en l'estimulació amb Seph-CD3, PHA (Fitohemaglutinina), ConA (Concanavalina A) i MLC (Cultiu limfocitari mixte).

Els antigens de la família T200 es troben només en les cèl.lules dels òrgans hematopoïetics. Estan formats per varies cadenes polipeptides i són molt heterogenis. Aquesta heterogeneïtat es reflecteix també en la funcionalitat, doncs sembla que intervien en funcions tan dispars com la activitat citotòxica natural, activitat citotòxica específica, expressió del receptor de IL-2 i diferenciació de les cèl.lules B. En el nostre laboratori J.Martorell ha observat que els anticossos contra CD45 augmenten la proliferació de les cèl.lules mononuclears de sang perifèrica quan són estimulades amb anti-CD3 lligat a Sefarosa (Martorell et al. Leukocyte Typing 1987). Per altre banda també s'ha observat que l'anticòs contra CD45 pot substituir en els macròfags com a segona senyal estimuladora (Martorell et al. 1987). En la figura 14 es representen gràficament aquestes dues propietats.

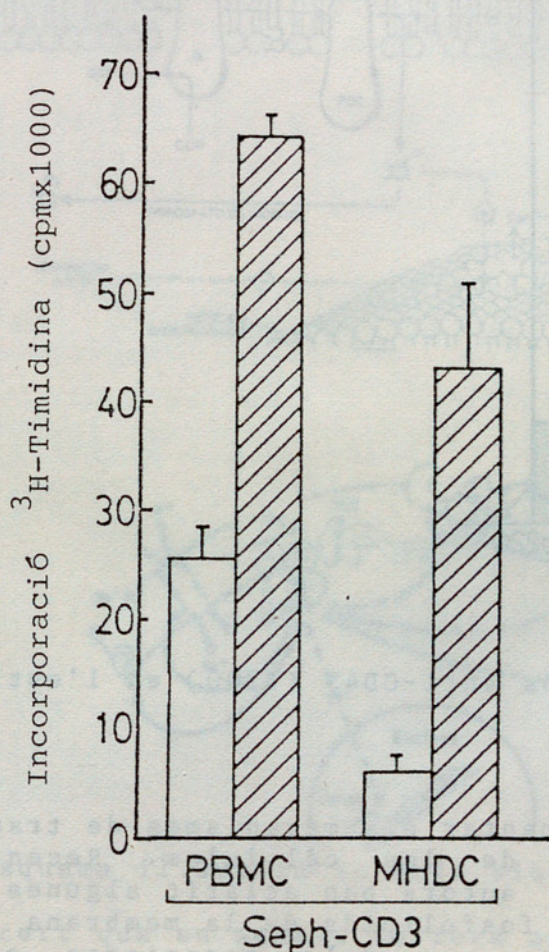


Fig.14 Efecte de l'adició de anti-CD45 (T200) en l'estimulació amb cèl.lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) i cèl.lules deplecionades de macròfags (MHDC).

En Ledbetter i cols (Ledbetter 1985) (Ledbetter et al. 1985) varen observar que el anticòs contra l'antigen CD45R induïa en condicions determinades un augment de l'expressió del receptor d'IL-2 (Figura 15). En aquest cas queda reflectit de forma evident com antigens amb una gran similitut estructural intervenen en funcions molt diverses i com les molècules de la família T 200 intervenen en la proliferació limfocitària.

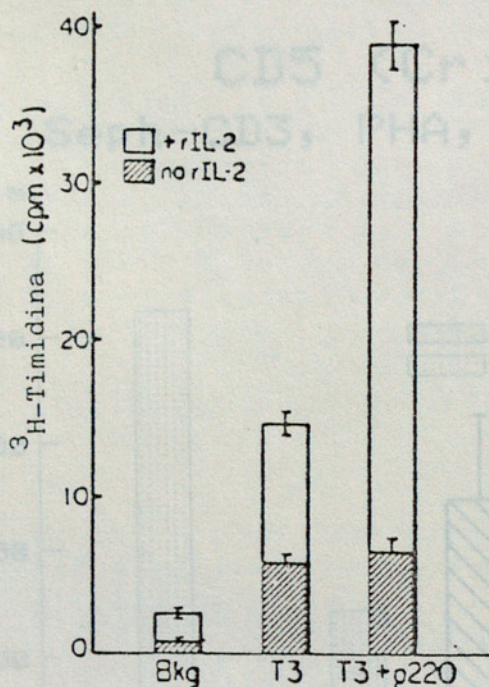


Fig.15 Efecte de l'anticòs anti-CD45 (T200) en l'estimulació amb CD3 (T3)

Per ultim queda per comentar els mecanismes de transducció de les senyals en el interior de les cèl.lules. Recents estudis d'en J.Cambier i altres autors han aclarit algunes d'aquestes vies. Sembla ésser que els fosfolípids de la membrana juguen un paper fonamental i que un dels mecanismes generals de transducció consistiria en que el complexa antigènic activaria una fosfolipasa, la qual, hidrolisaria el inositodifosfat en inositoltrifosfat i diacil-glicerol. La primera d'aquestes substancies actuaria a nivell dels dipòsits intracel.lulars de calç, en tan que el diacil-glicerol activaria la proteincinase C. L'activació d'aquest enzim desencadenaria una serie de fosforilacions proteiques que en el cas dels limfòcits i per vies encara no conegudes induiria la síntesi del receptor de IL-2 i la secreció de IL-2 (Isakov et al. 1987). En els

diagrames de la figura 16 es representen esquemàticament aquest processos. Com podem veure també en la figura 16, el TPA que te una estructura semblant en el diacil-glicerol activa directament la proteincinase C. També es pot veure en aquesta figura com el ionofor de calç (Ionomicina) actua directament sobre els dispositis intracel.lulars de calç.

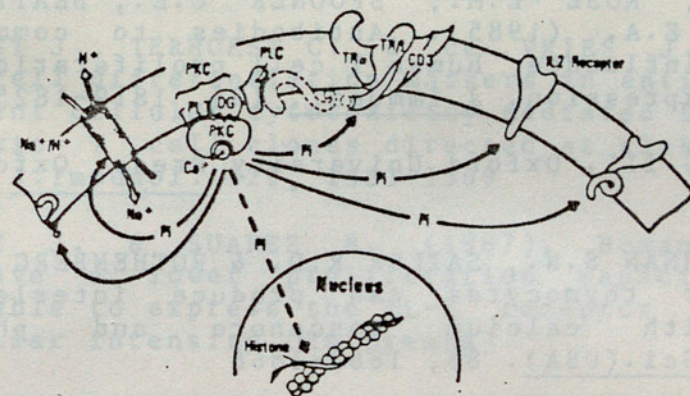
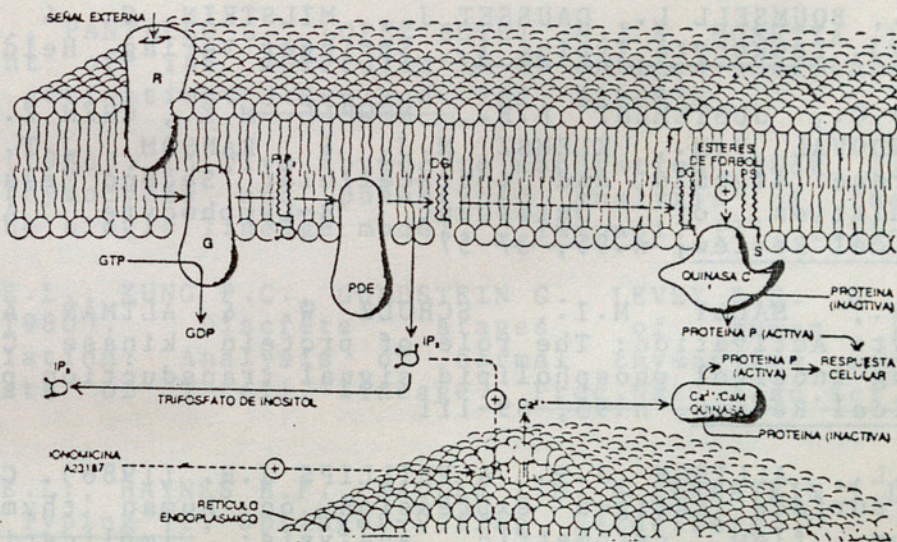


Fig.16 Esquema il.lustratiu dels sistemes de transducció.

Si bé es cert que en aquest darrers anys s'ha avançat molt en el coneixement del mecanismes transductors queden encara importants problemes per resoldre com és, per exemple, conèixer el nivell d'actuació del complexa IL-2/receptor d'IL-2. En l'actualitat s'està treballant intensament en aquest camp i creiem sens dubta que en poc tamps es coneixeran amb mes detall les senyals necessaries per l'activació cel.lular i els missatgers intracel.lulars de transmissió d'aquestes senyals.

BIBLIOGRAFIA

ACUTO O. & REINHERZ E.L. (1985). The human T-Cell receptor. N.Engl.J.Med. 312, n.17, 1100-1111

ACUTO O., HUSSEY R.E., FITZGERALD K.A., PROTENTIS J.P., MEUER S.C., SCHLOSSMAN S.F. & REINHERZ E.L. (1983). The human T cell receptor: Appearance in ontogeny and biochemical relationship of and subunits on IL-2 dependent clones and T cell tumors. Cell 34, 717-726

ACUTO O., FABBI M., SMART J., et al. (1984). Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of the <beta> subunit of a human T cell antigen receptor. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 81, 3851-3855

BERNARD A., BOUMSELL L., DAUSSET J., MILSTEIN C. & SCHLOSSMAN S.F. (1984). Leukocyte Typing I., Springer Verlag, Heidelberg.

CAMBIER J.C., JUSTEMENT L.B., NEWELL M.K., CHEN Z.Z., HARRIS L.K., SANDOVAL V.M., KLEMSZ M.J. & RANSOM J.T. (1987). Transmembrane signals and intracellular "Second Messengers" in the regulation of Quiescent B-Lymphocyte Activation. Immunological Review, n.95, 37-57

ISAKOV N., MALLY M.I., SCHOLZ W. & ALTMAN A. (1987). T-Lymphocyte Activation: The role of protein kinase C and the bifurcating inositol phospholipid signal transduction pathway. Immunological Review, n.95, 89-111

LANIER L.L., ALLISON J.P. & PHILLIPS J.H. (1986). Correlation of cell surface antigen expression on human thymocytes by multi-color flow cytometric analysis: implications for differentiation. J.Immunol. 137, 2501-2507

LEDBETTER J.A., ROSE L.M., SPOONER C.E., BEATTY P.G., MARTIN P.J. & CLARK E.A. (1985). Antibodies to common leukocyte antigen p220 influence human T cell proliferation by modifying IL-2 receptor expression. J.Immunol. 135, 1819-1825

LEUCOCYTE TYPING III. Oxford University Press. Oxford U.K. 1987, in press.

LUGO J.P., KRISHNAN S.N., SAILOR R.D. & ROTHENBERG E.V. (1986). Early precursor thymocytes can produce interleukin 2 upon stimulation with calcium ionophore and phorbol ester. Proc.Natl.Acad.Sci.(USA). 83, 1862-1866

MARTORELL J. VILELLA R., BORCHE L., ROJO I. & VIVES J. (1987) Leukocyte Typing III. Oxford University Press. Oxford U.K. pág.185 (En premsa)

MARTORELL J., VILELLA R., BORCHE L., ROJO I. & VIVES J. (1987). A second signal for T cell mitogenesis provided by monoclonal antibodies CD45 (T200). (Sotmés per publicar)

MARRACK P. & KAPPLER J. (1986). The antigen specific MHC-Restricted receptor on T cells. Inmunología. 5, 3-12

- MATSUYAMA M., WIADROWSKI N.M. & METCALF D. (1965). Autoradiographic analysis of lymphopoiesis and lymphocyte migration in mice bearing multiple thymus grafts. J.Exp.Med. 123, 559-577
- MEUER S.C., SCHLOSSMAN S.F. & REINHERZ E.L. (1982). Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 79, 4395-4399
- MEUER S.C., HUSSEY R.E., FABBI M., FOX D., ACUTO O., FITZGERALD K.A., HODGDON J.C., PROTENTIS J.P., STUART F., SCHLOSSMAN S.F. & REINHERZ E.L. (1984). An alternative pathway of T-cell activation a functional role for the 50 kD T11 sheep erythrocyte receptor protein. Cell 36, 897-906
- MORETTA A., PANTALEO G., LOPEZ BOTET M. & MORETTA L. (1985). Involvement of T44 molecules in an antigen independent pathway of T cell activation. J.Exp.Med. 162, 823-838
- PENIT C. (1986). In vivo thymocyte maturation. BUdR labeling of cycling thymocytes and phenotypic analysis of their progeny support the single lineage model. J.Immunol. 137, 2115-2121
- REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLDSTEIN G., LEVEY R.H. & SCHLOSSMAN S.F. (1980). Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 77, 1588-1592
- REINHERZ E.L., HAYNES B.F., NADLER L.M. & BERNSTEIN I.D. (1986) Leukocyte Typing II, Springer-Verlag, Heidelberg.
- SIM G.K., YAGUE J., NELSON J., et al. (1984). Primary structure of human T-cell receptor  $\alpha$ -chain. Nature 312, 771-774
- SPITS H., BORST J., TERHORST C. & de VRIES J.E. (1982). The role of T cell differentiation markers in antigen-specific and lectin-dependent cellular cytotoxicity mediated by T8+ and T4+ Human cytotoxic T cell clones directed at class I and class II MHC antigens. J.Immunol. 129, 1563-1569
- VIVES J., SOLE J. & SUAREZ B. (1987). Human unfractionated thymocytes have a lower proliferation capacity than immature ones but are able to express the IL-2 receptor and to produce IL-2 with similar intensity. (En premsa).
- WAKASUGI H., BERTOGLIO J., TURSZ T. & FRADELIZI D. (1985). IL-2 receptor induction on human T lymphocytes: Role for IL-2 and monocytes. J.Immunol. 135, 321-327
- YAGUE J., WHITE J., COLECLOUGH C., KAPPLER J., PALMER E. & MARRACK P. (1985). The T cell receptor: The  $\alpha$  and  $\beta$  chains define idiotype, and antigen and MHC specificity. Cell 42, 81-87