

Señales reguladoras de la activación de los linfocitos T

Jaume Martorell i Pons

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

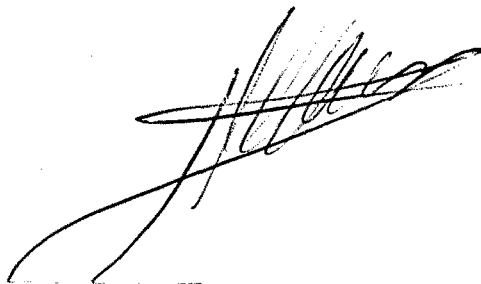
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

SEÑALES REGULADORAS DE LA ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T

Memoria presentada por
Jaime Martorell Pons para
optar al grado de Doctor
en Medicina.

Barcelona Abril 1988

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Jaime Martorell Pons', written in a cursive style with a long horizontal flourish at the end.

A mis Padres

HOSPITAL
CLÍNIC
I PROVINCIAL
DE BARCELONA

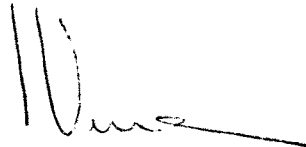
ILLARROEL, 170-08036 BARCELONA

En Jordi Vives, Cap del Servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

Certifica,

Que la Memòria titulada "Señales reguladoras de la Activación de los linfocitos T", presentada per en Jaime Martorell Pons per optar al grau de Doctor en Medicina y Cirugia, ha estat realitzada sota la meua direcció al Servei d'Immunologia d'aquest Hospital, considerant-la conclosa, autoritzem la seva presentació per ser jutjada pel Tribunal corresponent.

I perquè consti, signo la present a Barcelona, el tres de maig de mil nou cents vuitanta vuit.



Dr. Jordi Vives

AGRADECIMIENTOS

A todos mis compañeros del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico de Barcelona, por haber compartido los días de sol y los días de nubes. Muy especialmente al "equipo de trasplante", porque su colaboración responsable y entusiasta, me han permitido disponer del tiempo necesario para materializar este proyecto.

A Jordi Vives, por haberme enseñado a experimentar la emoción del hallazgo científico, y guiarme pacientemente en el desarrollo de este trabajo.

A Isabel Rojo, por su buen hacer, y por el entusiasmo con que ha colaborado en este proyecto.

A Ramon Vilella y Jordi Mila, por haber puesto a mi disposición, los Anticuerpos Monoclonales, que con tanto cariño han producido y caracterizado.

A Toni Gaya, Odette Viñas y Josep Font, por sus valiosos comentarios.

A Nieves por haber creado a mi entorno el clima de tranquilidad necesario, para el desarrollo intelectual de este proyecto.

SENALES REGULADORAS DE LA ACTIVACION DE LOS LINFOCITOS T.

0 INDICE GENERAL	I
0.1 Indice de Figuras	X
0.2 Abreviaturas Utilizadas	XII
1 INTRODUCCION	1
1.1 EL COMPONENTE CELULAR DE LA INMUNIDAD	1
1.1.1 Bases históricas	1
1.1.2 La activación y su regulación un problema central en la lucha contra lo extraño	4
1.1.3 El enigma de la restricción alogénica	5
1.2 LOS NUEVOS INSTRUMENTOS PARA ESTUDIAR EL LINFOCITO T	7
1.2.1 Nuevos instrumentos para abordar un viejo problema	7
1.2.2 Los anticuerpos monoclonales	8
1.2.3 La nomenclatura "CD"	10
1.3 ANTIGENOS ESPECIFICOS DE LA ESTIRPE LINFOCITARIA T	12
1.3.1 CD1	12
1.3.2 CD2	12
1.3.3 CD3	13
1.3.4 CD4	15

1.3.5 CD5	16
1.3.6 CD6	17
1.3.7 CD7	18
1.3.8 CD8	18
1.3.9 CD25	19
1.3.10 CD26	19
1.3.11 CD27	19
1.3.12 CD28	20
1.3.13 CDw29	20
1.4 ANTIGENOS ESPECIFICOS DE LA ESTIRPE LINFOCITARIA B	21
1.5 ANTIGENOS COMUNES DE LAS ESTIRPES LINFOCITARIA Y MIELO-MONOCITARIA	22
1.5.1 CD11	22
1.5.2 CD18	22
1.5.3 CD43	23
1.5.4 CD44	23
1.5.5 CD45	23
1.6 LAS LINFOQUINAS	26
1.6.1 Introduccion	26
1.6.2 IL-1	26
1.6.3 IL-2	28

1.7 EL LINFOCITO T	30
1.7.1 Matizaciones al concepto de linfocito T	30
1.7.2 Subpoblaciones de linfocitos T	31
1.7.3 El receptor antígeno específico de la célula T	32
1.8 LA ACTIVACION DEL LINFOCITO T	34
1.8.1 El concepto de Activación celular	34
1.8.2 Las vías de activación linfocitaria	36
1.8.3 Los monocitos y los estudios "in vitro"	37
1.8.4 Mecanismos intracelulares de la activación celular	38
1.9 APROXIMACION METODOLOGICA	40
1.9.1 Premisas lógicas de nuestro modelo	40
1.9.2 El modelo de estudio que hemos utilizado	41
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAL Y METODOS	44
3.1 Preparación de las células mononucleares	44
3.2 Medios utilizados	45
3.3 Anticuerpos Monoclonales que se han utilizado	46
3.4 Anticuerpos Monoclonales CD45 que se han utilizado	47
3.6 Unión del los Acm a esferas de sefarosa	48
3.6 Mitógenos utilizados	48

3.7 Unión del los Acm a esferas de sefarosa	49
3.8 Deplección de monocitos	50
3.9 Obtención de las subpoblaciones linfocitarias	51
3.10 Cuantificación de la mitogénesis	51
3.11 Síntesis de RNA	52
3.12 Cultivo mixto alogénico	52
3.13 Recogida de sobrenadantes para la cuantificación de IL-2	53
3.14 Cuantificación de la IL-2 de los sobrenadantes	53
3.15 Cuantificación de la citotoxicidad celular	54
4 RESULTADOS	56
4.1 CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL Acm Cris-7 (CD3)	56
4.1.1 Estudio sobre la capacidad modificadora de la mitogénesis	56
4.1.2 Estudios sobre la capacidad modificadora de la citotoxicidad	63
4.1.3 Conclusiones parciales	67
4.2 IDENTIFICACION DE LOS Acms QUE MODIFICAN LA MITOGENESIS INDUCIDA POR CD3	69
4.2.1 Efecto de los Acm sobre la mitogénesis inducida por Seph-CD3	69
4.2.2 Conclusiones parciales	76

4.3 PARTICIPACION DE Acm 72-5D3 (CD45) EN LA ACTIVACION DE PBMC	77
4.3.1 Participación del Acm 72-5D3 (CD45) en la estimulación de PBMC por diferentes mitógenos	77
4.3.2 Interacción de la rIL-2 con el efecto facilitador del Acm 72-5D3 (CD45) en mitogénesis inducida por Seph-CD3 en PBMC	79
4.3.3 Estudio de la concentración y cinética del efecto facilitador del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis de PBMC activadas por Seph-CD3	80
4.3.4 Efecto del Acm 72-5D3 (CD45) sobre síntesis de RNA en PBMC	83
4.3.5 Conclusiones parciales	84
4.4 LA "SEGUNDA SEÑAL" EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T Y EL Acm 72-5D3 (CD45)	87
4.4.1 Participación del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis de MHDC por diferentes mitógenos	87
4.4.2 Estudio comparativo entre el efecto del Acm 72-5D3 (CD45) y PMA en la mitogénesis de MHDC, participación de la IL2	91
4.4.3 Síntesis de RNA en MHDC participación de Acm 72-5D3 (CD45)	96
4.4.4 Estudio de las subpoblaciones celulares implicadas en el efecto mitogénico del Acm 72-5D3 (CD45) en MHDC activadas por Seph-CD3	96
4.4.5 Conclusiones parciales	100
4.5 CARACTERIZACION DEL EFECTO FACILITADOR DEL Acm 72-5D3 (CD45) COMO UN FENOMENO COMUN A TODOS LOS Acm DEL GRUPO CD45	101

4.5.1 Efecto facilitador de la mitogénesis de 11 Acm del grupo CD45	101
4.5.2 Conclusiones parciales	102
4.6 EFECTO DE LOS Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) EN LA SECRECIÓN DE IL-2 DE CELULAS ACTIVADAS POR Seph-CD3.	104
4.6.1 Cuantificación de la IL-2 en los sobrenadantes de PBMC y MHDC activadas por Seph-CD3 y el Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5)	104
4.6.2 Conclusiones parciales	105
4.7 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS EFECTOS DE LOS Acm 72-5D3 (CD45) Y Cris-1 (CD5)	106
4.7.1 Estudio comparativo entre Acm 72-5D3 (CD45) y Acm Cris-1 (CD5) en la mitogénesis inducida por diferentes mitógenos.	106
4.7.2 Estudio comparativo entre Acm 72-5D3 (CD45) y Acm Cris-1 (CD5) participación de IL-2, PMA y Ionomicina	108
4.7.3 Sinergia de Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) en la activación por Seph-CD3	110
4.7.4 Estudio comparativo de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) sobre diferentes subpoblaciones de linfocitos T	112
4.7.5 Estudio comparativo de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) en la síntesis de RNA	116
4.7.6 Conclusiones parciales	119

4.8 CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LOS Acm 68-5A5 (CD18) y Edu-2 (CD4)	120
4.8.1 Introducción	120
4.8.2 Caracterización funcional del Acm 68-5A5 (CD18)	121
4.8.3 Participación del Acm 72-5D3 (CD45) en la actividad "Natural Killer"	123
4.8.4 Caracterización funcional del Acm Edu-2 (CD4)	126
4.8.5 Conclusiones parciales	127
4.9 INTERFERENCIA DE ALGUNOS Acm INHIBIDORES DE LA MITOGENESIS EN EL EFECTO FACILITADOR DE LOS Acm 72-5D3 (CD45) Y Cris-1 (CD5).	129
4.9.1 Introducción	129
4.9.2 Capacidad inhibidora de Acm CD18 y CD4 en el efecto facilitador de CD45 y CD5 en mitogénesis por Seph-CD3	130
4.9.3 Capacidad inhibidora de Acm CD18 y CD4 en el efecto facilitador de CD45 y CD5 en mitogénesis por PHA	133
4.9.4 Conclusiones parciales	136
5 DISCUSION	137
5.1 LA ACTIVACION LINFOCITARIA POR ACM CD3	137
5.1.1 El Acm Cris-7 (CD3) y función del linfocito T	137
5.1.2 La importancia de algunos aspectos físicos en la activación por Acm CD3	138

5.1.3 Los diferentes pasos en la activación a traves de Acm CD3	139
5.2 Acm MODIFICADORES DE LA MITOGENESIS DE PBMC	140
5.2.1 La modificación por Acm de la proliferación inducida por Acm CD3;	140
5.2.2 Efecto del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis de PBMC	141
5.2.3 Participación del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis comparación con el Acm G1-15 (CD45R)	142
5.3 Acm COMO IMITADODRES DE LAS "SEGUNDAS SEÑALES" DE ACTIVACION LINFOCITARIA	143
5.3.1 El Acm 72-5D3 (CD45) como "segunda señal" en la activación de MHDC por Seph-CD3	143
5.3.2 Características de la "segunda señal"	144
5.3.3 El Acm 72-5D3 en la activación de MHDC por Seph-CD3 comparación con PMA y rIL-2	146
5.3.4 Los Acm CD5 como "segunda señal"	147
5.3.5 Estudio comparativo entre los Acm CD5 (Cris-1) y CD45 (72-5D3) sobre la mitogenesis	147
5.4 LAS "SEGUNDAS SEÑALES" PROPORCIONADAS POR Acm COMO INSTRUMENTOS	149
5.4.1 Sensibilidad de las Subpoblaciones CD4+ y CD8+ a las señales de CD5 y CD45	149

5.4.2 CD45 y CD5 y Seph-CD3, como modelo de activación independiente de los monocitos	149
5.4.3 Efectos de Acm CD4 sobre la mitogénesis monocito independiente	150
5.4.4 Efectos de Acm CD18 sobre la mitogénesis monocito independiente	152
5.5 LOS MECANISMOS UTILIZADOS POR LOS ACM CD45 y CD5 PARA ACTIVAR LA MITOGENESIS	153
5.5.1 Efecto de los Acm 72-5D3 (CD45) y Acm Cris-1 (CD5) en la secreción de Il-2 por MHDC activadas por Seph-CD3	153
5.5.2 Relación entre la señal proporcionada por el Acm 72-5D3 (CD45) y la proporcionada por los monocitos	154
5.6 LOS DATOS PRESENTADOS COMO BASE PARA UNA NUEVA HIPOTESIS	156
5.6.1 Propuesta de un modelo de participación de las glicoproteínas de membrana en la regulación de la activación de los linfocitos T	156
6 CONCLUSIONES FINALES	159
6.1 Principales	159
6.2 Secundarias	160
7 BIBLIOGRAFIA	163

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 - Mitogénesis inducida por diferentes Acm. en PBMC	57
Fig. 2 - Cinética de Mitogénesis inducida Acm. en PBMC	59
Fig. 3 - Inhibición de la mitogénesis inducida por PHA	60
Fig. 4 - Inhibición por Acm de mitogénesis por dosis de PHA	61
Fig. 5 - Inhibición por Acm del MLC	62
Fig. 6 - Inhibición por Acm en la actividad CTL	64
Fig. 7 - Inhibición de la actividad "Natural Killer" (NK)	65
Fig. 8 - Inhibición de la actividad "NK-like"	66
Fig. 9 - Estudio comparativo de CD3 y CD18 en CTL y NK-like	68
Fig. 10 - Mitogénesis de PBMC por Seph-CD3	70
Fig. 11 - Efecto Acm en mitogénesis por CD3 unido o soluble	72
Fig. 12 - Acm en mitogénesis por CD3, Seph-CD3, Seph-CD4	73
Fig. 13 - Acm CD45 CD5 y CD4 en mitogénesis PBMC por Seph-CD3	75
Fig. 14 - Efecto Acm CD45 en efecto de mitogénos sobre PBMC	78
Fig. 15 - Efecto Acm CD45 en mitogénesis PBMC por Seph-CD3 con y sin rIL-2	81
Fig. 16 - Concentraciones Acm CD45 en mitogénesis de PBMC por Seph-CD3	82
Fig. 17 - Cinética CD45 en mitogénesis de PBMC por Seph-CD3	85
Fig. 18 - Efecto de Acm CD45 en síntesis de RNA por Seph-CD3	86
Fig. 19 - Acm CD45 en mitogénesis de PBMC y MHDC por Seph-CD3	89
Fig. 20 - Acm CD45 en la mitogénesis de PBMC y de MHDC por PHA y ConA	90
Fig. 21 - Acm CD45 a diferentes concentraciones en mitogénesis de MHDC por Seph-CD3	92
Fig. 22 - Acm CD45 en mitogénesis de MHDC por PMA y rIL-2	93
Fig. 23 - Acm CD45 en mitogénesis de MHDC por Seph-CD3 en presencia de PMA y de rIL-2	95

Fig. 24 - Acm CD45 en síntesis de RNA de MHDC y de PBMC en presencia o ausencia de Seph-CD3.	97
Fig. 25 - Acm CD45 en mitogénesis por Seph-CD3 en diferentes subpoblaciones celulares	99
Fig. 26 - Estudio comparativo Acm CD45 y CD5 en mitogénesis de MHDC por Seph-CD3, PHA, y ConA	107
Fig. 27 - Estudio comparativo de Acm CD45, CD5 en mitogénesis de MHDC inducida por Seph-CD3 efecto PMA y de rIL-2	109
Fig. 28 - Comparación de Acm CD45 y CD5 en mitogénesis de MHDC por Ionomicina, PMA, rIL-2	111
Fig. 29 - Comparación de Acm CD45 y CD5, juntos o por separado, en mitogénesis de MHDC por Seph-CD3	113
Fig. 30 - Comparación de Acm CD45 y CD5 y de rIL-2 en la mitogénesis de subpoblaciones T MHDC por Seph-CD3	114
Fig. 31 - Comparación de Acm CD45, CD5 y CD45R, en síntesis de RNA por MHDC en presencia o ausencia de Seph-CD3	117
Fig. 32 - Comparación de los Acm CD45,CD5, CD45R, en síntesis de RNA por PBMC en presencia o ausencia de Seph-CD3	118
Fig. 33 - Acm CD18 y mitógenos en PBMC, ConA,PWM, PMA, PHA, Seph-CD3, Toxoide Tetanico	122
Fig. 34 - Acm CD18 en la actividad "Natural Killer" (NK)	124
Fig. 35 - Acm CD45 en la actividad "Natural Killer" (NK)	125
Fig. 36 - Acm CD4 en mitógenos sobre PBMC, ConA, PWM, PMA, PHA, Seph-CD3, Toxoide Tetanico	128
Fig. 37 - Acm CD18 y CD4 sobre la mitogenesis de MHDC por Seph-CD3 en presencia de Acm CD45, CD5, CD45R	131
Fig. 38 - Acm CD18 y CD4 sobre la mitogenesis de PBMC por Seph-CD3 en presencia de Acm CD45, CD5, CD45R,	132
Fig. 39 - Acm CD18 y CD4 sobre la mitogenesis de MHDC por PHA en presencia de Acm CD45, CD5, CD45R	134
Fig. 40 - Acm CD18 y CD4 sobre la mitogenesis de PBMC por PHA en presencia de Acm CD45, CD5, CD45R,	135
Tabla I - Diferentes Acm CD45 en mitogénesis por Seph-CD3	103
Tabla II- Acm CD45 en Secreción de IL-2 por Seph-CD3	105

TABLA DE ABREVIATURAS

Acm	Anticuerpo monoclonal
As	Ascitis
CD	Grupo de diferenciación, "Cluster of Differentiation"
ConA	Concanavalina A
Cr51	Cromo 51
CTL	Actividad Citotóxica Específica
c.p.m.	Centelleos por minuto
ELISA	Enzimoimmunoensayo en fase solida
Gp	Grupo provisional de diferenciación
HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
HLA	Antigenos Leucocitarios Humanos
3HdThd	Timidina Triteriada
IL-1	Interleukina-1
IL-2	Interleukina-2
IL-2R	Receptor para IL-2
IFN	Interferon
kD	kilo-Dalton
LAK	Actividad "Natural Killer" inducida por Interleukinas
MHDC	Celulas (PBMC) Altamente Depleccionadas de Monocitos
MLC	Cultivo Mixto Linfocitario Alogénico
NK	Actividad "Natural Killer"
NK-like	Actividad NK de celulas activadas
NS1	Linea Celular Mielomatosa NS1

TABLA DE ABREVIATURAS (Cont.)

PBMC	Celulas Mononucleares de Sangre Periferica
PHA	Fitoheماغلوتينina
PMA	"Phorbol Myristate Acetate"
PWM	"Pokeweed Mitogen"
rIL-2	Interleukina 2 recombinante
Seph-CD3	Acm CD3 unidos a esferas de sefarosa
SRBC	Hematies de carnero ("Sheep Red Blood Cells")
Ti	Determinate idiotipico del receptor de los linfocitos T

1 INTRODUCCION

1.1 EL COMPONENTE CELULAR DE LA INMUNIDAD

1.1.1 Bases históricas:

La especificidad de la respuesta constituye el elemento más característico del sistema inmunológico. Durante más de un siglo la tecnología disponible ha permitido el estudio de esta especificidad principalmente en su componente humoral.

Técnicas tales como el test de consumo de complemento, la aglutinación, el radioinmunoensayo, el enzimoimmunoensayo en fase sólida (ELISA), la inmunoprecipitación en gel, y la inmunofluorescencia por citar solo algunas, han permitido estudiar las características de la respuesta inmunológica en lo que supone de producción de anticuerpos.

Estas técnicas orientadas al estudio del producto final, los anticuerpos, han permitido realizar un análisis detallado de la especificidad de la respuesta humoral tanto en su vertiente de defensa frente a agentes externos como en sus aspectos de autoreactividad.

El estudio de la infraestructura celular necesaria para la producción finamente autorregulada de los anticuerpos ha mostrado ser algo más compleja que el estudio de estos. Más difícil aún, ha sido abordar el estudio de aquellos fenómenos que no eran explicables por la presencia de

anticuerpos y que se atribuían a una, en principio misteriosa, "inmunidad celular".

Karl Landsteiner y Merrill Chase en 1942 mostraron por vez primera, la posibilidad de transferir el fenómeno de la hipersensibilidad retardada, frente a antígenos de la tuberculosis, de un cobaya inmune a otro no inmune, mediante la transfusión de linfocitos (Landsteiner 1942). Establecían así los primeros pasos de lo que, más tarde, se conocería como "inmunidad celular". Dos años más tarde Peter Medawar (Medawar 1944) implicaba a la respuesta celular en el rechazo de tejidos alogénicos, abriendo uno de los campos más fascinantes de la inmunología, el de la respuesta alogénica. En 1961 Jacques Miller asoció los fenómenos, que hasta entonces se habían atribuido a la inmunidad celular, con una subpoblación de linfocitos cuyo proceso de maduración se desarrollaba en el timo y a los que con el tiempo hemos venido en denominar linfocitos T (Miller 1961). Fueron necesarios cuatro años más para que Henry Claman describiera la importancia de la cooperación de los linfocitos T en la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B (Claman 1965). Este hallazgo confería a los linfocitos T un papel mucho más importante del que hasta entonces se les había atribuido, y condujo a que algunos investigadores postularan la existencia de un receptor antígeno específico para las células T (Mitchinson 1971). La identificación de este receptor ha constituido uno de los problemas más difíciles de la inmunología moderna. Solo a principios de los años 80 ha sido posible identificarlo, y afrontar el estudio de su estructura y funcionamiento (Yagüe 1985).

Los trabajos descritos anteriormente, llevaron a la conclusión de que existía una población linfocitaria que maduraba en el timo. La cual participaba activamente en el rechazo de tejidos alogénicos y en el

fenómeno de la hipersensibilidad retardada. Se determinó además que esta población era incapaz de producir anticuerpos por sí misma pero participaba activamente en la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Esta población linfocitaria podía ser identificada gracias a su capacidad de unirse a los hematíes de carnero (SRBC) (Bentwitch 1973) (Greaves 1973). El estudio funcional "in vitro" de los linfocitos T, tradicionalmente se había realizado determinado la capacidad de estos linfocitos de proliferar como respuesta a la estimulación por lectinas tales como la PHA (Nowell 1960) y la ConA. También se ha utilizado la capacidad de respuesta frente a la activación por aloantígenos (Oppenheim 1980). La activación realizada por las lectinas es hasta cierto punto inespecífica y aun hoy no se conocen con detalle sus mecanismos.

La descripción del complejo formado por el receptor antígeno específico y las moléculas T3 (T3-Ti) ha abierto nuevas perspectivas en este campo, ya que permite activar a los linfocitos T a través de mecanismos, en principio, mucho más parecidos a los fisiológicos que los que se utilizaban hasta ahora.

Hoy se conoce la secuencia de bases que codifican a las cadenas del receptor antígeno específico de las células T, sin embargo se desconocen todavía aspectos esenciales del funcionamiento de estas células, de como se desarrolla el proceso de activación de los linfocitos T y, muy especialmente, de como es regulada esta activación.

1.1.2 La activación y su regulación un problema central en la lucha
contra lo extraño:

El control de la división celular es uno de los fenómenos más importantes en el desarrollo del individuo, tanto en su fase embrionaria para hacer frente a su propia construcción, como en su fase adulta para afrontar las continuas pérdidas celulares.

En el sistema inmunológico el control de la duplicación celular tiene además otro significado. Cada célula del sistema inmunológico es específica para la defensa frente a un determinado antígeno. La batalla entre unas pocas células específicas para hacer frente a una agresión exterior y esta misma agresión, estaría perdida sin la capacidad de las células del sistema inmunológico de proliferar, multiplicando la dotación celular de las clonas específicas para el antígeno contra el que hay que defenderse, y solo de estas.

La capacidad de respuesta específica del sistema inmunológico, reside en su capacidad de mantener un "número adecuado" de células, de aquellas clonas específicas para los antígenos por los que es agredido en un momento concreto, la clave de la producción de este "número adecuado" reside en la habilidad de las células para proliferar.

El sistema inmunológico es pues un sistema, en que la puesta en funcionamiento de los mecanismos de duplicación celular y la autorregulación posterior de esta proliferación, constituye uno de los elementos básicos de su funcionamiento.

Existen numerosas evidencias de que la activación de los linfocitos T no depende, exclusivamente de la señal proporcionada a través del complejo T3-Ti, sino que son necesarias otras señales que determinan o condicionan

el inicio de la respuesta o regulan su desarrollo (Meuer 1986) (Palacios 1982) (Clark 1986) (Isakov 1986).

Las señales necesarias para iniciar la activación en las células, que ya han recibido su primera señal a través del receptor antígeno específico, reciben el nombre de "segundas señales". Tanto los mecanismos receptores involucrados en estas "segundas señales" como el significado biológico de la mismas es aun desconocido. Es evidente que el conocimiento de las señales capaces de determinar la respuesta, o de modularla positiva o negativamente, son de vital importancia para conocer el imbrincado mecanismo de interacciones celulares que determina la respuesta inmunológica.

1.1.3 El enigma de la restricción alogénica:

Los linfocitos T dependen, para su activación, de la señal proporcionada a través de su receptor antígeno específico, pero solo reconocen los antígenos que le son presentados por células que posean unos antígenos de histocompatibilidad de clase II idénticos a los suyos propios, este fenómeno conocido con el nombre de "restricción alogénica" fue ya descrito por Doherty y Zinkernagel en 1975 (Doherty 1975). La señal a través del receptor antígeno específico tiene que ser recibida en el contexto de antígenos de histocompatibilidad propios, y por tanto solo puede recibirse cuando es "presentada" por otras células. Las llamadas células presentadoras de antígeno (APC de "Antigen Presenting Cells"). Por otra parte las células T citotóxicas reconocen a sus antígenos diana, solo en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad de clase I propios (Nabholz 1983)

(Lanzavecchia 1986) (Lainer 1986), a excepción de la respuesta alogénica que parece tener unas características especiales.

No se conoce con exactitud como el receptor para el antígeno, de las células colaboradoras, reconoce a los antígenos de histocompatibilidad clase II, y como este reconocimiento se realiza en el contexto de los antígenos HLA de clase I para los linfocitos citotóxicos. No entraremos en profundidad en este problema ya que se escapa a los objetivos de esta tesis, pero lo hemos planteado por que soporta una de las hipótesis planteadas: La posibilidad de que las señales necesarias para la activación en los linfocitos que reconocen al antígeno en el contexto de Clase II (linfocitos CD4+) sean distintas de las requeridas por aquellos que lo reconocen en el contexto de Clase I (linfocitos CD8+).

1.2 LOS NUEVOS INSTRUMENTOS PARA ESTUDIAR EL LINFOCITO T

1.2.1 Nuevos instrumentos para abordar un viejo problema:

Para enfrentarse al problema de como se regula la activación de los linfocitos T, ha sido de gran importancia el disponer de una serie de instrumentos de estudio, que tecnologías de reciente implantación han puesto en nuestras manos. Algunos de estos son:

- 1) Los anticuerpos monoclonales, dirigidos contra antígenos de la membrana linfocitaria, de especificidad bien estudiada y contrastada en talleres cooperativos a nivel internacional.
- 2) Las interleukinas recombinantes con funciones trascendentales en la activación linfocitaria.
- 3) Líneas celulares de características funcionales bien definidas.

Durante los últimos años estas nuevas tecnologías han permitido, también a otros autores, un rápido desarrollo de los conocimientos sobre el funcionamiento de las células T. Esta eclosión de conocimiento, nos han permitido avanzar en nuestro trabajo basándonos en publicaciones recientes muchas de las cuales han aparecido incluso después del inicio de esta tesis, hace ahora algo más de 3 años.

Los conocimientos de reciente adquisición que nos han ayudado en el desarrollo de nuestro trabajo han sido:

- 1) Los conocimientos sobre el antígeno T3 y su asociación al receptor antígeno específico.
- 2) Los conocimientos sobre el funcionamiento de las interleukinas y sus receptores en la activación.

3) Los estudios referentes a la participación de las llamadas "segundas señales".

4) Las investigaciones sobre los mecanismos intracelulares de transducción de las señales.

1.2.2 Los anticuerpos monoclonales:

En 1975 Kohler y Milstein consiguieron la producción de grandes cantidades de anticuerpo específico a partir de una sola clona de células B, gracias a la "inmortalización de células B productoras de anticuerpos, conseguida mediante la fusión entre linfocitos B activados y células de mieloma murino secretoras de anticuerpos. Estos anticuerpos llamados anticuerpos monoclonales (Acm) han representado uno de los avances tecnológicos más útiles de la inmunología moderna (Kohler 1975) (Kohler 1976).

Esta tecnología permite disponer de inmunoglobulinas que reconocen específicamente moléculas sin que sea necesaria una purificación previa de estas moléculas. Es pues especialmente adecuada para el estudio de estructuras que, por su escasa presencia en el organismo o por sus características, son muy difíciles de purificar por métodos tradicionales. Esta técnica, permite incluso, el disponer de reactivos, altamente específicos, capaces de reconocer y aislar moléculas de las que hasta el momento se desconocía su existencia.

Estas características hacen a los Acm especialmente indicados para el estudio de las proteínas de membrana de los linfocitos. Los Acm han permitido afrontar con éxito la indentificación del receptor específico para

el antígeno de los linfocitos T (T1, de T idiopático) así como de un conjunto de moléculas asociadas a las que conocemos como T3 (CD3). También han hecho posible la identificación de proteínas específicas de determinadas poblaciones celulares tales como los antígenos T4 (CD4) y T8 (CD8). Los Acm están permitiendo además identificar, purificar y estudiar un conjunto de estructuras de la membrana linfocitaria hasta hoy desconocidas, algunas son específicas de los linfocitos, otras comunes a células de la estirpe linfocitaria y mielomonocitaria.

Una de las tareas que tiene planteada la inmunología moderna es el determinar la función que realizan cada una de estas proteínas de membrana, que hemos podido identificar gracias a los Acm.

La investigación en inmunología generalmente se ha basado en: la descripción de un fenómeno determinado, la búsqueda de los elementos que daban lugar a este fenómeno, y la obtención de reactivos capaces de identificar estos elementos. Los Acm han producido una situación insólita, en la que disponemos de un reactivo específico contra elementos que no sabemos en que fenómeno intervienen ni cual es su función fisiológica.

La alta especificidad de los anticuerpos monoclonales permite incluso identificar los distintos epítopos de cada molécula, así ha podido describirse que el antígeno T11 (CD2), tiene diferentes epítopos con implicaciones funcionales distintas. Con los Acm, es posible abordar el estudio no solo de la función de cada proteína sino incluso la participación de las diferentes porciones de cada proteína en una función determinada (Olive 1986) (Brotier 1985).

1.2.3 La nomenclatura "CD":

Para unificar la nomenclatura de estas estructuras de reciente conocimiento, se celebran periódicamente los llamados, talleres internacionales de antígenos de diferenciación leucocitaria ("International Workshop on Human leucocyte Differentiation Antigens"). Su finalidad es la de agrupar a los Acm, obtenidos en diferentes laboratorios, en grupos de diferenciación (CD, de "Cluster of Differentiation"), en base a sus patrones de reacción con diferentes tipos celulares y a las características de las moléculas que reconocen. Muchos de los Acm que utilizaremos vienen expresados con el nombre de la clona que los produce, acompañados por el código "CD" seguido de un número, este código indica que estos Acm han sido incluidos en los trabajos de los talleres internacionales de antígenos de diferenciación leucocitaria y que han sido oficialmente adscritos a un determinado grupo o CD. Otros Acm han sido agrupados solo en grupos provisionales todavía no definitivamente establecidos estos Acm van acompañados de la identificación Gp (de "Group provisional") seguido de un código en números romanos.

La nomenclatura CD, hace referencia a un grupo de Acm con un patrón de reactividad similar, frente a un amplio panel de tipos celulares, de los que existen evidencias de que reconocen el mismo antígeno. El antígeno reconocido sin embargo recibe una nomenclatura distinta. Tal es el caso, por ejemplo, de los Acm del grupo CD5 que reconocen el antígeno T1, o los del grupo CD1 que reconocen el antígeno T6. En sentido estricto, tendríamos que referirnos a T1 cuando nos referimos al antígeno y a CD5 cuando nos hablamos de los anticuerpos que le reconocen, de la misma forma deberíamos utilizar T6 para referirnos al antígeno y CD1 cuando mencionamos a los

anticuerpos que lo reconocen. Esta nomenclatura disociada creemos que dificultaría excesivamente el seguimiento de los experimentos por parte del lector, por tanto hemos preferido acompañar a la denominación del antígeno con la nomenclatura oficial para el grupo de Acm que lo identifica. Así utilizaremos T6 (CD1) y T1 (CD5) etc. para referirnos a los antígenos, y CD1, CD5 etc. para identificar a los anticuerpos. En este mismo orden de cosas para aquellos antígenos para los cuales no existe aun una nomenclatura establecida, utilizaremos su peso molecular expresado en kD como elemento identificativo.

Los workshops internacionales de antígenos de diferenciación leucocitaria, están permitiendo agrupar a los diversos Acm por su distribución tisular. En base a este criterio, se han establecido 45 grupos o CDs cada uno de los cuales corresponde, probablemente, a como mínimo una proteína de membrana distinta. Estos CDs a su vez pueden, en un intento de simplificación, agruparse en cuatro grandes clases:

- 1) Los que reconocen antígenos específicos de la estirpe linfocitaria T.
- 2) Los que reconocen antígenos específicos de la estirpe linfocitaria B.
- 3) Los que reconocen antígenos comunes entre las estirpes linfocitaria T, B y mielo-monocitaria.
- 4) Los que reconocen antígenos específicos de la estirpe mielo-monocitaria.

1.3 ANTIGENOS ESPECIFICOS DE LA ESTIRPE LINFOCITARIA T

1.3.1 CD1

Los Acm CD1 reconocen un antígeno inicialmente descrito como T6 (reconocido por el Acm OKT6) presente solo en los Timocitos. Actualmente se acepta que existen tres subgrupos distintos CD1a, CD1b, y CD1c que reconocen tres cadenas de pesos moleculares de 49, 45 y 43 kD respectivamente (Knowles 1987).

1.3.2 CD2

Los Acm CD2 reconocen una molécula de 50 kD, presente en las células T, la cual tiene una gran afinidad para determinados antígenos de los hematies de carnero (Hüning 1985) (Hüning 1986). La capacidad de esta molécula de unirse a los hematies de carnero, haciendo que los linfocitos T formen con éstos unas estructuras similares a las rosetas, se ha utilizado como marcador de los linfocitos T durante muchos años.

Determinados Acm CD2 tienen la capacidad de, utilizados conjuntamente, activar la proliferación de los linfocitos T (Pantaleo 1987), activando la entrada intracelular de Ca^{++} (Alcover 1986). Esta vía de activación sería una de las utilizadas por la PHA para desarrollar su efecto activador (O'Flynn 1985).

La vía de activación a través de CD2 al parecer esta interrelacionada con la vía a través del complejo T3-T1 (Young 1986). Algunos autores han demostrado que la activación a través de CD2 inhibe la activación a través de CD3 (Moretta 1986) (Lamb 1987). Para algunos investigadores la vía de

activación a través de CD2, sería fundamental en las primeras fases del proceso intratímico de maduración linfocitaria. En esta fase en que los linfocitos aun no expresan el antígeno T3, la vía CD2 sería la única vía funcionante de activación del linfocito (Fox 1985).

Trabajos recientes apuntan la posibilidad que las moléculas reconocidas por el anticuerpo LFA-3 sean la diana fisiológica del antígeno reconocido por CD2 (Selvaraj 1987). Esta interacción sería importante por cuanto representa una posible nueva vía de activación a través de la adhesión intercelular con esta molécula (Selvaraj 1987).

El clonaje del gen que codifica para la molécula reconocida por los Acm CD2 revela una estructura típica de receptor (Sayre 1987).

1.3.3 CD3

El antígeno T3 (CD3) está constituido por un complejo formado por tres proteínas, expresadas únicamente en los linfocitos T maduros. Una de las cadenas, de 20 kD posee una porción hidrofóbica que le permite su anclaje en la membrana, las otras dos de 20 y 25-28 kD se hallan glicosidadas (Simonsen 1984).

Las propiedades activadoras de los Acm dirigidos contra T3 (CD3) (Reinherz 1980) sugirieron la idea que estas proteínas podrían estar relacionadas con el receptor antígeno específico de los linfocitos T (Reinherz 1980) (Van Wauwe 1980) (Wen Chang 1981). Esta asociación ha sido definitivamente establecida posteriormente (Simonsen 1984). La importancia funcional de esta asociación es debida a que las moléculas de T3 (CD3) tendrían la función de transmitir, al interior de la célula, mediante un proceso de fosforilación, la secuencia de señales iniciada por la unión entre el

receptor antígeno específico y su antígeno correspondiente (Cantrell 1987) (Nel 1987).

Los Acm CD3 permiten por tanto una activación policlonal de los linfocitos T no activados (Weber 1985), a través de un mecanismo muy similar al que utiliza el antígeno, constituyendo un excelente modelo para estudiar el proceso de la activación de los linfocitos T (Tsoukas 1984) (Alcover 1986). Puede ser útil puntualizar aquí que, aunque utilizando clonas específicas para un determinado antígeno, es posible imitar un proceso aparentemente más fisiológico, estas clonas son de hecho células ya preactivadas, y por tanto no son útiles para estudiar los primeros pasos de la activación, para lo cual es preciso utilizar células en estado de reposo.

Mediante Acm CD3 ha sido posible determinar la importancia que tiene la modulación del complejo T3-Ti en la activación de los linfocitos T (Schwab 1985) (Williams 1985). Este proceso de "capping" o modulación, cuando se utilizan células mononucleares de sangre periférica, se realiza gracias a los receptores Fc que poseen los monocitos para algunos de los isotipos de inmunoglobulinas de ratón (Rincooy 1984) (Looney 1984) (Tax 1984) (Wen Chang 1985). Estos receptores para Fc proporcionan el soporte físico al que se unen los Fc de los Acm CD3, esta unión por una parte facilita la modulación y agrupación (o "cross-linking") del antígeno T3 (CD3), y por otra evita su internalización (Smith 1986) (Van Wauwe 1984) (Walker 1987). El papel modulador de los monocitos puede ser imitado por el Acm CD3 unido a esferas de sefarosa (Williams 1985).

La modulación del complejo T3-Ti no es la única función que realizan los monocitos en la activación a través del antígeno T3 (Schwab 1985) (Palacios 1985) (Weiss 1984), si bien su presencia no es necesaria para la inducción

de receptores para la IL-2, si lo es para que se inicie la secreción de esta (Palacios 1985) (Ledbetter 1986).

1.3.4 CD4

El antígeno T4 (CD4) está constituido por una molécula de 55 kD expresada solo en una subpoblación de linfocitos T, los denominados T colaboradores (o "Helper"), dada su colaboración en la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B. La misma molécula T4 (CD4) participa activamente en la función colaboradora de las células T (Rogozinski 1984). La molécula de T4 (CD4) se une al parecer con los antígenos HLA de clase II (Fischer 1986). Esta unión se realizaría a través de los determinantes comunes a los diferentes antígenos de clase II, dado que la estructura T4 carece de polimorfismo (Sayre 1985). El significado de la interacción entre T4 y los determinantes no polimórficos de los antígenos HLA de clase II es desconocido (Doyle 1987) (Gay 1987). Las moléculas HLA de clase II tendrían según estos trabajos, dos tipos de reconocimiento, uno de sus zonas monomórficas por los antígenos T4 (CD4) y otro de sus determinantes polimórficos a través del complejo T3-Ti.

Este reconocimiento dual podría indicar la necesidad de algún tipo de equilibrio entre los dos tipos de complejo el HLA-II+T4 y el HLA-II+Antígeno+T3-Ti, la rotura del cual implicaría algún tipo de señal para la célula.

Los Acm CD4 se han implicado en la inhibición de la actividad proliferativa de los linfocitos, los mecanismos mediadores de esta inhibición no están claros, mientras para unos autores los Acm CD4 inhiben la llegada de señales positivas de activación celular (Inaba 1987) para otros, esta inhibición sería el resultado de una señal propiamente inhibitoria

proporcionada por los Acm CD4 a través de la molécula T4 (CD4) (Wassmer 1985) (Dalglish 1986).

En ocasiones los antígenos T4 (CD4) comodulan con los antígenos T3 (CD3) (Saizawa 1987) (Weyand 1987), ello obliga a interpretar con cautela los resultados experimentales obtenidos por interacciones entre Acm del grupo CD4 y los del CD3.

El estudio del antígeno T4 (CD4) tiene en la actualidad una gran trascendencia sanitaria, dado que la molécula de T4 (CD4) actúa como receptor del retrovirus HIV, responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), siendo necesaria la unión entre HIV y T4 (CD4) para que el virus pueda internalizarse e incorporarse al genoma linfocitario.

Los Acm CD4 han permitido incluso definir cuales son los determinantes antigénicos que se hallan involucrados en este reconocimiento (Santtentau 1986), y plantearse la neutralización del HIV mediante la administración de moléculas solubles de T4 (CD4).

1.3.5 CD5

La molécula T1 (CD5) tiene un peso de 67 kD y fue descrita inicialmente como específica de las células T (Haynes 1986). Posteriormente se ha descrito su presencia en una subpoblación de células B (Gadol 1986).

En las células T esta molécula fue implicada en la administración de la "segunda señal" necesaria para la activación de los linfocitos T a través del complejo T3-T1 (Ceuppens 1986) (Ledbetter 1986). La administración de esta "segunda señal", a través de Acm CD5, estaría mediada por la activación de la entrada intracelular de Ca^{++} , y un aumento en los niveles de cGMP (Ledbetter 1986) (June 1987). Tanto la activación de la entrada intracelular de Ca^{++} como el incremento de los niveles de cGMP serían dependientes de la

coexpresión simultánea del complejo T3-T1 por la misma célula (Gunter 1987), ello indica una cierta interrelación entre ambas moléculas.

La información suministrada por la reciente clonación del DNA complementario que codifica para la molécula T1 (CD5) (Jones 1986) (Huang 1987), ha permitido confirmar que la molécula T1 (CD5) tiene la típica estructura de un péptido receptor de señales. Tiene una porción extracitoplasmática de 347 aminoácidos, con abundantes residuos de cisteína, una transmembrana de 30 aminoácidos, y una intracitoplasmática de 93 aminoácidos. La homología de ciertas zonas de sus regiones, con las de las inmunoglobulinas, indican que este antígeno podría ser un miembro lejano de la familia de los genes de la inmunoglobulinas (Huang 1987).

La expresión del antígeno T1 (CD5) en la mayoría de la leucemias linfáticas crónicas de la estirpe B (LLC B), llevó a investigar la existencia de una posible subpoblación B CD5 positiva, esta subpoblación ha sido ya identificada (Hardy 1986) (Lydyard 1987). En la actualidad existen datos experimentales que apoyarían la participación de estos linfocitos B CD5+ en la producción de autoanticuerpos en los enfermos de artritis reumatoide (Casali 1987) (Hardy 1987).

1.3.6 CD6

Los Acm CD6 reconocen un antígeno de 120 kD (Skaw 1987) con una distribución tisular semejante a la del T3 (CD3). Difieren en que CD6 tiene una menor expresión en los timocitos, y una mayor expresión en las leucemias linfáticas crónicas de la estirpe B que T3 (CD3) (Haynes 1984) (McMichael 1987).

1.3.7 CD7

Los Acn CD7 reconocen un antígeno de 40 kD (Shaw 1987), presente en un alto porcentaje de células T, que aumenta su expresión cuando estas se activan (McMichael 1987). Su función parece consistir en actuar como receptor para el Fc de la IgM.

1.3.8 CD8

La molécula T8 (CD8) caracteriza una subpoblación de células T con funciones citotóxicas. La molécula T8 (CD8) se halla directamente implicada en la función citotóxica (Reinherz 1981). Acms dirigidos contra diferentes epítopes de la molécula T8 (CD8) inhiben la actividad citotóxica de estas células, especialmente los dirigidos contra los epítopes OKT8C y OKT8F (Biddinson 1984). La implicación de la molécula T8 (CD8) en la citotoxicidad supera a la inicialmente postulada facilitación de la adhesividad. Aparentemente la molécula T8 participa en el control de la propia actividad lítica (Fleischer 1986) (Blanchard 1987), tanto específica como inespecífica (Van Severter 1986). Estos datos han conducido a que algunos autores defiendan, que la molécula T8 (CD8) actúa como transductora de una señal negativa que prevendría el desencadenamiento de los mecanismos citotóxicos del linfocito T por interacciones no específicas (Van Severter 1986).

Tradicionalmente se ha venido aceptando que esta población ejerce además las funciones supresoras, si bien la existencia de fenómenos supresores parece demostrada, la existencia de células supresoras antígeno específicas distintas de las citotóxicas se encuentra en estos momentos carente de un modelo teórico que permita explicar sus mecanismos de actuación.

El entrar en la disquisición de si realmente existen o no estas células supresoras se escapa a los objetivos de esta tesis.

1.3.9 CD25

Los Acm CD25 reconocen una molécula de 55 kD clásicamente conocida como Tac, que corresponde a la cadena de baja afinidad del receptor para la IL-2. En un principio se describió su presencia exclusivamente en linfocitos T activados, más tarde se comprobó que los linfocitos B activados también podían expresar este antígeno. Recientemente se ha descrito que esta molécula puede hallarse asociada a otra de 70 kD, el conjunto de ambas formaría el receptor de alta afinidad para la IL-2 (Robb 1987). Sus características funcionales las describiremos más adelante al referirnos a la IL-2.

1.3.10 CD26

El antígeno reconocido por los Acm CD26 tiene un peso molecular aproximado de 130 kD, y se halla expresado solo en una pequeña proporción de los linfocitos T maduros circulantes. Sin embargo, puede identificarse en más del 90 % de las líneas T citotóxicas (McMichael 1987).

1.3.11 CD27

El antígeno de 120 kD reconocido por los Acm CD27, está presente en el 60 % de los linfocitos T circulantes y en las células plasmáticas, está ausente sin embargo en casi todas las líneas T estudiadas. En los geles realizados en condiciones reductoras el antígeno se expresa como una doble banda de 55 kD (McMichael 1987).

1.3.12 CD28

La molécula de 44 kD reconocida por los Acm CD28 esta presente solo en una subpoblación de linfocitos T (Yamada 1985). Esta molécula tambien puede expresarse como un dímero de 90 kD, unido por puentes disulfuro, el monomero y el dímero coexisten en la membrana linfocitaria y podrian hallarse en un equilibrio dinámico (Lesslauer 1986).

Inicialmente se describió que esta molécula podía actuar como transductora de una "segunda señal" en la activación de los linfocitos T mediante toxoide tetánico (Lesslauer 1986) o por lectinas (Martin 1986). Posteriormente se ha descrito que, por lo menos algunos, de los Acm de este grupo puede ser mitogénicos por si mismos (Carrel 1987) (Hara 1985), ello indicaría la existencia de una nueva vía de activación linfocitaria independiente del receptor antígeno específico, complejo T3-Ti, y del antígeno T11 (CD2).

1.3.13 CDw29

Los Acm CD29 (Acm 4B4) reconocen una proteína de 135 kD expresada solo en una subpoblación de linfocitos T CD4+ complementaria con la reconocida por los Acm CD45R (McMichael 1987) (Terry 1987) (Moore 1986) (Moore 1987). Segun los autores antes citados los linfocitos CD4+ CD29+ serian las autenticas células colaboradoras de los linfocitos B en la producción de inmunoglobulinas, mientras que los linfocitos T CD4+ CD29- serian los inductores de la actividad supresora de los linfocitos CD8+.

1.4 ANTIGENOS ESPECIFICOS DE LA ESTIRPE LINFOCITARIA B

Los antígenos que específicos de los linfocitos B escapan a los objetivos de esta tesis, a efectos de completar la descripción de los antígenos de membrana linfocitarios reconocidos por Acm, los citaremos esquemáticamente (Ling 1987) (Zola 1987):

<u>Cluster</u>	<u>Peso Mol.</u>	<u>Distribución</u>
CD10	100	Pre-B
CD19	95	B
CD20	35	B
CD21	140	B (Receptor de C3d)
CD22	135	B
CD23	45	B (Subpoblación)
CD24	45,55,65	B + Granulocitos
CD37	40-45	B
CD39	80	B + Macrófagos
CDw40	50	B + Carcinomas

1.5 ANTIGENOS COMUNES A LA ESTIRPE LINFOCITARIA Y MIELO-MONOCITARIA

1.5.1 CD11

Los Acm del cluster CD11 (antes denominado LFA-1 cadena β) han sido recientemente subdivididos en tres subgrupos CD11a, CD11b, CD11c, todos ellos reconocen moléculas que se hallan asociadas con una molécula de 95 kD reconocida por el CD18 (antes conocida por LFA-1 cadena α). El CD11a reconoce una cadena de 180 kD presente en todos los leucocitos y que es el único subgrupo propiamente pan-leucocitario (Shaw 1987) dado que CD11b y CD11c reconocen cadenas de 160 y 150 respectivamente expresadas solo en granulocitos y monocitos (Lanier 1985) (Hogg 1986).

1.5.2 CD18

Los Acm CD18 reconocen la molécula de 95 expresada en linfocitos granulocitos y monocitos. Se ha descrito que los Acm CD18 inhiben múltiples funciones, tales como la actividad NK, la actividad CTL (Krensky 1983), la mitogénesis inducida por lectinas o por un estímulo alogénico (Keizer 1985) (Dongworth 1985) etc.. La función primordial de esta molécula parece residir en su participación en los fenómenos de adhesión intercelular (Hamann 1986) (Mentzer 1985) (Haskard 1986) (Rothlein 1986), tanto en los contactos entre los linfocitos T y B (Matz 1987) como de los neutrofilos (Wallis 1986). El déficit congénito de expresión de este antígeno (Krensky 1985), da lugar a una inmunodeficiencia funcional que se manifiesta por el padecimiento de infecciones bacterianas recurrentes (Lisowska 1986) (Ross 1985).

1.5.3 CD43

Los Acm CD43 reconocen una molécula de 95-105 kD presente en células T monocitos y polimorfonucleares, conocida como sialoglicoproteína mayor (LSGP de Large sialoglicoprotein) (Borche 1987). Esta proteína se halla altamente glicosilada y posee un gran contenido de ácido siálico. A pesar de que algunos autores la han implicado en la activación de los linfocitos T (Mentzer 1987) su participación en este proceso está aún poco clara, y al parecer sólo algunos de los Acm dirigidos contra ciertos epitopos serían capaces de participar en la activación celular a través de esta glicoproteína.

1.5.4 CD44

Los Acm CD44 reconocen una molécula de peso molecular entre 65 y 95 kD, expresada en las células T, los granulocitos, algunas células del cerebro y en los hematíes (Cobbold 1987).

1.5.5 CD45

Los Acm del grupo CD45 precipitan un conjunto de 4 moléculas de 180, 190, 205 y 220 kD conocidas como, antígeno leucocitario común T200 (o LCA-T200). Esta familia de antígenos fue descrita inicialmente como una sola molécula de 200 kD común a todos los leucocitos (LC o LCA de "leucocyte common antigen") (Trowbridge 1978), exclusivamente expresada en células de la estirpe hematopoyética (Dalchau 1980) (Dalchau 1986). Su descripción inicial se realizó en el ratón (Trowbridge 1978) y posteriormente se descubrieron sus homólogos en la rata (Sunderland 1979) y en humanos (Omary 1980).

Desde el punto de vista bioquímico esta molécula se caracteriza por su gran porción intracitoplasmática, y el hecho de hallarse fosforilada (Newman 1984) (Dalchau 1986) (Thomas 1985).

Desde el punto de vista funcional, diferentes antígenos de esta familia se han implicado en diferentes funciones celulares, entre ellas la actividad "Natural Killer" (Newman 1983) (Targan 1983) (Burns 1984) (Starlin 1987), la actividad citotóxica (CTL) (Harp 1984) (Lefrançois 1985), la diferenciación de las células B (Yakura 1983) (Mittler 1987), y la expresión de receptores para la IL-2 (Ledbetter 1985).

En el "III workshop on leucocyte differentiation antigens" celebrado en Oxford en 1986, los Acm capaces de reconocer en el humano esta familia de antígenos fueron agrupados en dos grupos o CD distintos:

El primero de ellos CD45 incluía a todos los Acm que reconocían epítomos comunes a las 4 moléculas de 180, 190, 205 y 220 kD y que se hallaban expresados en todos los leucocitos, incluyendo la totalidad de las células T maduras.

Un segundo grupo de Acm, el CD45R (de CD45 "Restricted") estaba formado por Acm que reconocían epítomos presentes solo en las moléculas de 205 y 220 kD, su distribución celular era más restringida hallándose presente solo en un 50 % de los linfocitos T, y ausente en los granulocitos (Cobbald 1987). La subpoblación de linfocitos T positiva para los Acm CD45R tiene al parecer una función colaboradora de las células supresoras mientras que la subpoblación negativa para los Acm CD45R colaboraría con los linfocitos B en la secreción de inmunoglobulinas (Takeuchi 1987).

Un Acm del grupo CD45R el G1-15 está implicado en el incremento de la expresión de receptores para la IL-2, dado que facilita la mitogénesis de dosis subóptimas de PHA (Ledbetter 1985).

Las diferencias de peso molecular entre las distintas cadenas de la familia LCA-T200 es debida a diferencias en la región amino terminal de la propia cadena peptídica (Sheng 1984) (Barclay 1987). Después de los ocho primeros aminoácidos de la porción amino terminal de la molécula. La cadena mas larga posee insertada una cadena de 167 aminoácidos, y la más corta una de 47 aminoácidos ricos ambos en serina y treonina (Ralph 1987).

Los datos obtenidos de la secuencia de tres variantes distintas de cDNA sugieren que las diferentes variantes del antígeno leucocitario comun T200 proceden de un "splicing" alternativo dependiente del tipo celular (Ralph 1987).

La existencia de una homología superior al 90 % entre la porción intracitoplasmática (mas de 700 aminoácidos) del LCA humano y el LCA de la rata (Gonez 1987), sugieren que esta proteína podría tener una función importante, entre otras posiblemente la de interactuar con un elemento estructural, que podría ser la fodrina del citoesqueleto (Ralph 1987).

La identificación de que los Acm CD45 son capaces de proporcionar una "segunda señal", necesaria para que los linfocitos estimulados por Acm CD3 inicien la secreción de IL-2, constituye la principal aportación original de esta tesis.

1.6 LAS LINFOQUINAS

1.6.1 Introducción:

El conocimiento de los mediadores solubles con actividad sobre la actividad linfocitaria, ha experimentado grandes avances en los últimos años. Desde la primera descripción de la interleukina-1 (IL-1) en 1972 por Gery y Waksman (Gery 1972), se han descrito numerosos factores, de entre ellos cabe destacar la serie de las interleukinas IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 (Arai 1986) (Gearing 1985). Existen otros, a los que a menudo se ha descrito con diferentes nombres para una misma sustancia. Algunos de las interleukinas están caracterizadas, purificadas y en ocasiones los genes que las codifican han sido clonados, lo que permite la producción de estos factores en organismos recombinantes. Gracias a esta producción "in vitro" de grandes cantidades de estos factores es posible estudiar su función, mediante preparaciones con un grado de pureza difícilmente alcanzable con los métodos de purificación clásicos.

Por su relevancia en la activación linfocitaria y su implicación en este trabajo discutiremos brevemente la IL-1 y la IL-2.

1.6.2 IL-1:

La interleukina-1 (IL-1) es una molécula de 18 kD producida por los monocitos estimulados (Auron 1987) (Haeflener 1984) (Palacios 1985).

También puede ser secretada por determinadas clonas de células T (Acres 1987), e incluso, por células en principio tan lejanas del sistemas inmunológico como los trofoblastos (Main 1987).

La IL-1 constituye uno de los mediadores centrales de los procesos inflamatorios y juega un papel fundamental en la proliferación de las células T (Chu 1984) (Williams 1985) (Schwab 1985).

Mediante estudios del cDNA, que codifica la IL-1, ha sido posible determinar que existen dos subtipos de IL-1 humana la IL-1 α y la IL-1 β . Estos dos subtipos correlacionan con los dos puntos isoelectrónicos que ya se habían identificado para esta interleukina pI 7 y pI 5 (Dinarello 1986).

La IL-1 ha sido implicada en una multitud de procesos:

- 1) La estimulación del crecimiento de linfocitos B y fibroblastos (Dinarello 1984).
- 2) El desarrollo de procesos febriles (Dinarello 1984).
- 3) La resorción ósea (Gowen 1986).
- 4) La inducción de la producción de IL-2, GM-CSF, IFN- β , PGE2, colagenasa, moléculas de adhesión leucocitaria; liberación de histamina etc. (Dinarello 1986).

Parece obvio que la IL-1 es una molécula con múltiples funciones generalmente ligadas a los mecanismos de defensa tanto específicos como inespecíficos.

Sus efectos biológicos son mediados a través de su unión a receptores específicos (Kilian 1986) (Dower 1985) (Dower 1986). Esta unión al receptor facilita la internalización del complejo IL-1-Receptor, este complejo puede ser a continuación localizado en el núcleo. Este hallazgo ha hecho que se relacione al complejo IL-1-Receptor con la regulación de la transcripción de determinados genes (Dower 1987).

La cuantificación de la IL-1 es posible mediante la utilización de ensayos biológicos utilizando líneas celulares (Conlon 1983).

1.6.3 IL-2:

La interleukina-2 (IL-2) es una molécula de 15 kD producida por los linfocitos T activados (Alvarez 1979) (Palacios 1982) (Solbach 1982). Esta interleukina juega un papel fundamental en la activación de los linfocitos T (Robb 1984) (Ashwell 1986).

La IL-2 ha sido además implicada en otros procesos, entre los más importantes estarían:

- 1) El mantenimiento del crecimiento a largo plazo de los linfocitos T (Baker 1979).
- 2) La facilitación de la actividad citotóxica de los linfocitos T (Robb 1984).
- 3) La inducción de una actividad similar a la actividad NK denominada LAK (de "Lymphokine-Activated Killer") (Damle 1986) (Herberman 1987) (Tilden 1987).
- 4) La regulación de la expresión del propio receptor IL-2R (Grabstein 1986).
- 5) La facilitación de la secreción de otras linfocinas tales como el IFN γ (Grabstein 1982) y el MAF ("Macrophage-Activating Factor") (Kelso 1984).
- 6) La IL-2 además parece tener la capacidad de facilitar "in vivo" la eliminación de ciertos procesos tumorales (Donohue 1984).

La producción de IL-2, la expresión de su receptor y la afinidad del mismo son mecanismos finamente regulados (Cantrell 1984), de ellos depende, en la mayoría de los casos, la diferenciación y proliferación de los linfocitos T (Farrar 1986) (Lakanpal 1987).

La utilización de líneas celulares, cuyo crecimiento "in vitro" depende de la presencia de IL-2, representó un avance importante en el estudio de esta

proteína (Gillis 1978), al permitir la cuantificación de niveles del orden de 0.01 ng/ml difícilmente detectables por otros métodos (Baker 1979). La molécula de IL-2 está constituida por una cadena de 133 aminoácidos, codificada en el cromosoma 4 humano (Robb 1984). Esta cadena es marcadamente hidrofóbica (Robb 1984), y posee tres residuos de cisteína en su estructura, dos de estos residuos (los situados en las posiciones 58 y 105) son fundamentales para el desarrollo de su actividad (Wang 1984). El receptor para la IL-2 (IL-2R) está constituido por dos cadenas polipeptídicas. Una de ellas de 55 kd (CD25) (también llamada "Tac") constituye el receptor de baja afinidad (Leonard 1984). La otra de 75 kd de más reciente descubrimiento, se une a la molécula de 55 kd dando lugar al receptor de alta afinidad para la IL-2 (Dukovich 1987) (Robb 1987) (Trowbridge 1987) (Smith 1987).

La interacción entre la IL-2 y sus receptores desencadena una serie de procesos intracelulares que esquemáticamente serían:

- 1) En primer lugar la activación del "turnover" de fosfolípidos.
- 2) La redistribución intracelular de Protein kinasa C.
- 3) La alcalinización citoplasmática.
- 4) La estimulación de la hidrólisis de GTP.
- 5) La fosforilización de la proteína ribosomal S6.
- 6) La inducción de la transcripción de determinados genes como el del protooncogen c-myc (Farrar 1986), el del IFN γ y el de su propio receptor IL-2R (Grabstein 1986).

1.7 EL LINFOCITO T

1.7.1 Matizaciones al concepto de linfocito T:

Clásicamente se ha aceptado que la población linfocitaria T podía ser identificada e incluso se la podía separar de las demás células mononucleadas, gracias a su capacidad de unirse a los hematíes de carnero (SRBC) (Bentwitch 1973) (Greaves 1973) (Hoffman 1976). En base a este dato tradicionalmente se ha considerado que eran linfocitos T aquellos que poseían el receptor para SRBC. En la actualidad conocemos que este receptor es una molécula de 50 kD, a la que se denomina T11, que es reconocida por los AcM del grupo CD2.

Debemos precisar que el antígeno T11 (CD2) al que se ha tenido, tradicionalmente, como marcador de las células T puede estar expresado en algunas células que carecen de T3 (Fox 1985).

En el trabajo que presentamos hemos utilizado frecuentemente la activación de las células a través del complejo T3-Ti por considerarla la más representativa de la activación fisiológica. Parece obvio que no podemos extrapolar los conocimientos obtenidos por la activación a través de la vía T3-Ti, a la pequeñísima proporción de células positivas para T11 pero que carecen del antígeno T3 (CD3). Así pues cuando utilizamos el término linfocitos T a lo largo de esta tesis, nos estamos refiriendo exclusivamente a aquellos linfocitos poseedores del antígeno T3 (CD3) obtenidos de sangre periférica.

1.7.2 Subpoblaciones de linfocitos T:

La presencia de las proteínas T4 (CD4) y T8 (CD8) permite subdividir a los linfocitos T en dos subpoblaciones distintas y complementarias, la población T4 positiva a la que se le ha atribuido una función colaboradora (Thomas 1983), en la producción de anticuerpos por los linfocitos B, y otra la población T8 positiva que sería responsable de la citotoxicidad celular (Rehinerz 1980) (Ledbetter 1981), también según algunos autores de los fenómenos supresores (Thomas 1983), si bien este es un punto en discusión (Emmrich 1986).

Las diferencias fundamentales entre estas dos subpoblaciones no residen solo en su función sino también en los diferentes contextos en que son capaces de reconocer al antígeno (Ress 1983) (Marrack 1983) (Swain 1983). Así, mientras que los linfocitos CD4 reconocen al antígeno en el contexto de los antígenos de histocompatibilidad de Clase II (Rock 1983) (Braciale 1987), los linfocitos CD8 los reconocen en el contexto de antígenos de histocompatibilidad de clase I (Damle 1984) (Jacobson 1984) (Braciale 1987).

No está claro por el momento cuál es la función de este doble sistema de reconocimiento (Cowing 1985), pero podría representar un doble mecanismo de seguridad en el que unos antígenos, con mayor grado de procesamiento por el monocito, serían reconocidos en el contexto de clase II y otros, con menor grado de procesamiento, lo serían en el contexto de clase I (Braciale 1987), sin embargo no se puede descartar la posibilidad de que los dos sistemas reconozcan antígenos de naturaleza diferente.

La subpoblación T4 positiva al parecer puede a su vez subdividirse en dos subpoblaciones distintas, una positiva para la molécula T220 (CD45R) y otra

negativa. La primera sería la subpoblación colaboradora de las células supresoras y la segunda colaboraría con las células B en la producción de anticuerpos (Moore 1986) (Moore 1987) (Morimoto 1986).

Otros autores han postulado a su vez que la subpoblación T8 positiva podría ser subdividida en una subpoblación, propiamente citotóxica, la positiva para los Acm del grupo CD28 y otra, supuesta precursora de las células supresoras, positiva para los Acm del cluster CD11 (Yamada 1985), esta última subdivisión no parece aún bien definida.

1.7.3 El receptor antígeno específico de la célula T:

El receptor antígeno específico de las células T no ha podido ser identificado hasta el año 1983 (Acuto 1983) (Meuer 1983) (Kappler 1983). La utilización de anticuerpos monoclonales, ha permitido determinar que el receptor antígeno específico de los linfocitos T está formado por dos cadenas polipeptídicas α y β de aproximadamente 50 kD y 40 kD respectivamente, unidas por puentes disulfuro (Acuto 1985). Estas cadenas están formadas por una región constante y otra variable, y contribuirían a la formación de los receptores tanto de las células T colaboradoras como de las células T citotóxicas.

La forma en que estas cadenas reconocen, además del antígeno específico, los antígenos HLA clase II propios, está aun sometida a debate (Yagüe 1985) (Geffer 1986) (Norcross 1987).

La generación de diversidad, a nivel genético, de este receptor sigue a grandes rasgos, el mismo esquema que utilizan las inmunoglobulinas, con recombinación entre zonas variables (regiones V) y zonas constantes (regiones C) mediante regiones de unión (regiones J), aunque con ligeras variaciones (Robertson 1985) (Marx 1985).

Ultimamente se han descrito, que además de las cadenas citadas α y β , podrían existir otras cadenas con función de receptor antígeno específico, las denominadas cadenas γ de 55 kD y la δ de 40 kD (Finnegan 1986) (Gefer 1986) (Ferrini 1987). El papel biológico de estas no se ha podido aun clarificar.

1.8 LA ACTIVACION DEL LINFOCITO T

1.8.1 El concepto de activación celular:

En el sistema inmunológico la puesta en funcionamiento de los mecanismos de duplicación celular y la autorregulación posterior de esta proliferación constituye uno de los elementos esenciales para desarrollar su función defensiva.

La expresión "activación del linfocito T", frecuentemente utilizada, es hasta cierto punto imprecisa. Durante algun tiempo, la expresión "activación del linfocito T" se utilizó como sinónimo de duplicación celular con síntesis de DNA. A la luz de los conocimientos actuales podemos afirmar que existen toda una serie de fenómenos que implican activación celular y que ocurren previamente a la duplicación celular, entre ellos podemos citar:

- 1) El aumento del Ca^{++} intracelular, que ocurre a los pocos segundos de la estimulación a través del complejo T3-Ti (Imboden 1985).
- 2) La traslocación de la actividad PKC a la membrana (Pantaleo 1987).
- 3) La activación de la expresión de mRNA mensajero para los protooncogenes c-fos y c-myc, más tarde del mRNA que codifica para IL-2R y IL-2, y posteriormente el de los protooncogenes N-Ras y c-myb (Reed 1986) (Ship 1987) (Kazmarek 1985) (Crabtree 1986).
- 4) La expresión de determinados antígenos de activación tales como el IL-2R y el receptor para la transferrina.

Todos estos fenómenos ocurren previamente al inicio de la síntesis de DNA, y su correcto funcionamiento es necesario para que esta síntesis pueda realizarse.

De lo antedicho se deduce que la expresión "activación celular" puede tener diversos significados según la tecnología que se utilice para detectarla. En esta tesis hemos utilizado la síntesis de DNA o de RNA como medida de esta activación. Nuestro sistema detecta un fenómeno relativamente tardío de la activación, pero tiene la ventaja de evaluar el resultado final de todo un proceso. El desentrañar en cual de las fases de este proceso intervienen los fenómenos que aquí se describen es un tarea que nos planteamos para un futuro próximo.

Clasicamente la división celular ha sido dividida en cuatro fases:

"G1" fase previa a la síntesis de DNA.

"S" fase de síntesis de DNA.

"G2" periodo previo a la división celular.

"M" periodo de división celular propiamente dicho.

Previa a la fase G1 habría una fase "G0" que reflejaría una fase de reposo celular.

La señal necesaria para que la célula pase de la fase G0 a G1, viene dada por la interacción de diferentes receptores de crecimiento con su ligando correspondiente (Fantes 1986).

La medida de la captación de timidina tritiada cuantifica el paso de las células a la fase S. Así podríamos decir que el núcleo de esta tesis consiste en determinar cuales son los antígenos de la membrana leucocitaria capaces de transmitir las señales necesarias para que las diferentes subpoblaciones de linfocitos T entren en fase S.

1.8.2 Las vías de activación linfocitaria:

Como ya hemos señalado al examinar los diferentes antígenos de la membrana linfocitaria reconocidos por Acm, se han descrito por lo menos tres antígenos capaces de transmitir señales que conduzcan a los linfocitos T a entrar en la fase S: la vía del CD3; la vía del CD2; y la vía del CD28. El efecto de las "primeras señales" proporcionadas por estos Acm no serían suficientes por sí solas para inducir la proliferación. Todas ellas en determinadas condiciones precisan de una "segunda señal".

Esta necesidad ha sido observada por numerosos autores para el caso de la vía CD3 (Palacios 1982) (Wakasugi 1985) (Davis 1986) (Meuer 1986) (Roska 1985) (Clark 1986) (Ceupens 1986) (Malek 1985) (Bruszevski 1984) (Gallagher 1986).

Para el caso de la vía CD2 la necesidad de una "segunda señal" es evidente cuando se utiliza un solo Acm (Holter 1986) (Olive 1986). La utilización conjunta de dos Acm CD2 hace a la activación independiente de la "segunda señal" (Meuer 1984), si bien podría considerarse que la "segunda señal" es proporcionada por el segundo Acm.

La vía de activación a través de CD28 precisa también de una "segunda señal" (Hara 1985).

Esta "segunda señal" usualmente es proporcionada por los monocitos, y puede ser sustituida por la presencia de IL-1 (Davis 1986) (Williams 1985) (Schwab 1985) o de PMA (Rosentreich 1979) (Holter 1986), que actúa directamente sobre la activación de la proteína quinasa C (Mishizuka 1986) (Murray 1987) (Noonan 1987). Recientemente se ha postulado que las señales proporcionadas por los monocitos, la IL-1 y la PMA no serían exactamente idénticas (Davis 1986).

La "segunda señal" no es necesaria para la expresión de receptores para la IL-2 (Ledbetter 1986), por lo menos los de baja afinidad (Wakasugi 1985), pero sí lo es para que los linfocitos T inicien la secreción de IL-2 (Ledbetter 1986).

La interacción IL-2, receptor de IL-2, y la internalización de este complejo, es la señal que posibilita la entrada de los linfocitos en la fase de síntesis de DNA.

1.8.3 Los monocitos y los estudios "in vitro":

Los trabajos en que se postulaba la no necesidad de los monocitos, como fuente de "segunda señal", han sido habitualmente criticados en base a que la depleción de monocitos no había sido suficientemente exhaustiva. De aquí nacieron los conceptos de "células parcialmente depleccionadas de monocitos" y de "células altamente depleccionadas de monocitos". Si bien es cierto que algunos de los resultados publicados pueden ser atribuidos a la presencia de monocitos residuales, los conocimientos actuales nos permiten considerar además otra posibilidad:

Uno de los pasos habituales utilizados por muchos autores en la depleción de monocitos es la separación de los linfocitos T por la técnica de la formación de rosetas con hematíes de carnero (SRBC). Estos hematíes se unen a la molécula T11 (CD2). La molécula T11 (CD2) puede actuar como receptora por sí misma de señales activadoras de los linfocitos T por una vía independiente de T3-T1 (Fox 1985) (Holter 1986) (O'Flynn 1986) (Meuer 1984) (Olive 1986), es más, esta molécula ha sido descrita como una de las posibles vías de recepción de la "segunda señal" (Suthanthiran 1987).

Parece correcto pensar que las células separadas, utilizando la unión del antígeno T11 (CD2) con su diana en los hematíes de carnero, no pueden ser consideradas células "virgenes" en sentido estricto, y serían poco adecuadas para el estudio de los primeros pasos en los procesos de activación. Por ello nosotros hemos preferido unos métodos de depleción de monocitos que no implicaran la interacción de los linfocitos T con los hematíes de carnero.

1.8.4 Mecanismos intracelulares de la activación celular:

Los mecanismos intracelulares de transmisión de las señales activadoras, no forman parte del estudio de esta tesis, a pesar de ello se nos ha hecho difícil concluir esta introducción sin por lo menos citar alguno de los hechos más esenciales en este campo, con la intención de facilitar el seguimiento de los experimentos.

Los mecanismos que hasta ahora se conocen parecen comunes para casi todas las células del organismo y es posible que constituyan solo una pequeña parte de los mecanismos reales de transmisión de señales.

Uno de los primeros eventos detectables tras la unión del antígeno con su receptor o de la unión Acm-CD3 a la molécula T3 es un incremento del ión calcio libre (Ca^{++}) intracelular, este fenómeno se puede observar incluso con la utilización de Acm CD3 solubles (Imboden 1985) (Imboden 1985) (Gelfand 1986). Este incremento intracelular de Ca^{++} , se debe a una liberación de los depósitos intracelulares de Ca^{++} , y a un posible aumento de la permeabilidad de la membrana para la entrada del Ca^{++} extracelular. La unión Acm-CD3 molécula-T3 activaría la fosforilasa C, la cual hidroliza el fosfatidylinositol 4,5-bisfosfato, dando lugar por una parte al

diacilglicerol, y por otra al inositol 1,4,5-trisfosfato. Este libera el Ca^{++} de los reservorios intracelulares. El diacilglicerol aumenta la afinidad de la proteinkinasa C por el Ca^{++} (Isakov 1986), la activación de la proteinkinasa C es un elemento fundamental para la activación celular (Dröge 1986) (Nel 1987).

Los esteres de forbol (PMA, TPA) actúan activando directamente la proteinkinasa, mientras que los inoforos del calcio (ionomicina) imitan la señal del fosfatidylinositol 4,5-bisfosfato aumentando el Ca^{++} intracelular (Isakov 1986). La administración conjunta de estas dos señales es suficiente para desencadenar los procesos de proliferación celular.

1.9 APROXIMACION METODOLOGICA

1.9.1 Premisas lógicas de nuestro modelo

La introducción de los Acm ha permitido identificar un conjunto de moléculas de la membrana linfocitaria, cuya función por el momento en la mayoría de los casos se desconoce, parece lógico intentar determinar cual es la función de algunas de estas moléculas.

La regulación de la proliferación linfocitaria es uno de los elementos centrales de la respuesta inmunológica, es de esperar que algunas de estas moléculas de la membrana linfocitaria reconocidos por Acm, intervengan en la regulación de la actividad proliferativa.

Dado que los Acm CD3 que reconocen las moléculas T3 del complejo T3-Ti imitan la señal de activación a través de este receptor, es posible que Acm dirigidos contra otros antígenos sean también capaces de imitar otras señales reguladoras de la proliferación.

Asimismo es factible, que la unión de algunos de los Acm con sus antígenos diana, interfiera señales de intercomunicación celular reguladoras de la activación.

En base a estas premisas lógicas nos planteamos como hipótesis la posibilidad de aproximarnos a la determinación de los antígenos de la membrana linfocitaria, que participan en la regulación de la activación celular, mediante el estudio del efecto de los Acm que los reconocen en la activación de los linfocitos T por diferentes vías.

1.9.2 El modelo de estudio que hemos utilizado:

El modelo de estudio que hemos utilizado partía de la base de que si un Acm, al ser añadido durante el desarrollo "in vitro" de la actividad proliferativa de los linfocitos, modificaba positiva o negativamente esta actividad proliferativa, en principio cabía pensar que la molécula reconocida por este Acm podía participar, de alguna forma, en la activación linfocitaria.

Tras la identificación inicial se planteaba la caracterización más precisa de los efectos funcionales de este Acm y diseñar los experimentos dirigidos a definir su mecanismo de actuación.

Este modelo había sido planteado por otros autores, y había permitido hallazgos importantes (Meuer 1983) (Sanchez-Madrid 1985) (Wen Chang 1981). Nuestro trabajo empezó con una determinación sistemática de la influencia que la presencia de determinados Acm tenía en la activación celular inducida por diversos sistemas. En una primera fase hemos caracterizado funcionalmente algunos de los Acm producidos en nuestro laboratorio entre ellos: Cris-7 (CD3), Edu-2 (CD4), 68-5A5 (CD18) para cuyas moléculas diana, ya había sido descrita una actividad funcional utilizando otros Acm.

En una segunda fase utilizando la activación a través del complejo T3-Ti, hemos descrito la participación de las moléculas, reconocidas por los Acm CD45, en la transmisión de señales de activación, este fenómeno constituye la principal aportación original de esta tesis. Además hemos comparado la señal proporcionada por Acm CD45 con la proporcionada por Acm CD5, en diferentes subpoblaciones linfocitarias.

Una tercera y última fase se ha orientado a estudiar los mecanismos utilizados por ambos Acm para mediar este efecto facilitador de la mitogénesis, en esta fase hemos podido determinar que Acm CD45 y CD5 desarrollaban su efecto facilitador a través del incremento en la secreción de IL-2.

2 OBJETIVOS:

Definir cuales son las señales necesarias para inducir la proliferación de células, no previamente activadas, por la vía del complejo T3-Ti.

Esclarecer la función de los monocitos en la activación a través del complejo T3-Ti

Determinar cuales son los mecanismos que regulan la activación linfocitaria inducida por el complejo T3-Ti, y la posibilidad de imitar estas señales reguladoras mediante Acm.

Identificar las moléculas de membrana transductoras de señales reguladoras de la secreción de IL-2 o de la expresión del receptor para la IL-2.

Establecer las diferencias existentes entre las subpoblaciones linfocitarias CD4+ y las CD8+ en cuanto a señales necesarias para su activación.

3 MATERIAL Y METODOS

3.1 Preparación de las células mononucleares:

Las células mononucleares fueron aisladas a partir de sangre, fresca, heparinizada. Obtenida por punción venosa de individuos adultos sanos. La sangre fue posteriormente diluida en el doble de su volumen utilizando PBS (Phosphate Buffered Saline), un equivalente tamponado del suero fisiológico.

Posteriormente fue centrifugada sobre gradientes de ficoll-hypaque (Pharmacia, Upsala, Sweden) (de densidad 1.077) a 400 g., durante 25 minutos.

Se recuperó la interfase, y se recogieron las células por centrifugación, las células obtenidas fueron lavadas por centrifugación en medio de cultivo RPMI 1640 a 400 g. tres veces.

Las células mononucleares obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo RPMI con un 10 % volumen/volumen de suero humano AB. La población celular obtenida la denominamos como "células mononucleares de sangre periférica" (PBMC de "Peripheral Blood Mononuclear Cells").

Las PBMC así obtenidas se contaron en cámara de Neubauer, diluidas en azul tripan para determinar simultáneamente su viabilidad, en base a los contajes obtenidos se ajustaron las células a la concentración deseada, generalmente 2×10^6 células viables/ml.

3.2 Medios utilizados:

RPMI-AB: RPMI 1640 (Eurobio, Paris, France), suplementados con un 10 % v/v de pool de suero humano AB descomplementado por incubación 1 hora a 56° C, Hepes Buffer 25 mM (Flow, U.K.), 2 mM de glutamina (Flow, U.K.) y gentamicina (Normon, Madrid, Spain) a 200 µg/ml.

RPMI-FCS: RPMI 1640 suplementado con un 10 % de suero fetal de ternera, Hepes Buffer 25 mM (Flow, U.K.), 2 mM de glutamina (Flow, U.K.) y gentamicina (Normon, Madrid, Spain) a 200 µg/ml.

RPMI-FCS-ME: obtenido adicionando al medio RPMI-FCS Mercaptoetanol a una concentración final de 5×10^{-5} M.

3.3 Anticuerpos Monoclonales que se han utilizado:

(Producidos en nuestro laboratorio por el Dr. R. Vilella)

<u>Clona</u>	<u>Cluster</u>	<u>Isotipo</u>	<u>P.M.</u>	<u>Workshop</u>
Cris-7	CD3	IgG2a	19+29	Boston 1984
Edu-2	CD4	IgG2a	55	Boston 1984
109-2D4	CD8	IgM	33	Oxford 1986
Cris-1	CD5	IgG2a	45+12	Paris 1982
Cris-6	CD14	IgG2a	55	Boston 1984
68-5A5	CD18	IgG2a	95+170	Boston 1984
33-3B3	CDw44	IgG2a	80	Oxford 1986
72-5D3	CD45	IgG2a	180 a 220	Oxford 1986
111-1C5	CD45R	IgG1	205 + 220	Oxford 1986
Edu-1	HLA-II	IgG2b	29+34	-
108-2C5	HLA-I	IgG1	45+12	-
84-4C4	CDw44	IgG1	80	-
Cris-5	GpXIII	IgM	?	Boston 1984
100-1A5	GpV	IgM	?	Boston 1984
93-1D5	-	IgG2a	80	-
Cris-4	GpXXVI	IgM	?	Boston 1984
Cris-3	GpXV	IgG2b	110+170	Boston 1984
Cris-8	Gp13	IgG1	?	Boston 1984

3.4 Anticuerpos Monoclonales CD45 que se han utilizado:

(Recibidos de otros investigadores)

<u>Clona</u>	<u>Epitopo</u>	<u>Isotipo</u>	<u>Investigador</u>
B MAC1	P	IgG1	Dalchau
Anti-Hle-1	P	IgG1	Beverley
9.4	P	IgG2a	Martin
VIT 200	P	IgG2a	Knapp
YTH24.5	P	IgG2b (rata)	Waldman
YTH54.12	Q	IgG2b (rata)	Waldman
F10-89-4	R	IgG2a	Dalchau
S-80	S	-	Pesando
B MAC2	S	IgG1	Dalchau
B MAC2	S	IgG1	Dalchau
GRT2	T	IgG1	Garrido

3.5 Preparación de los Acm:

Los anticuerpos monoclonales fueron purificados mediante precipitación con sulfato amónico saturado al 45 %. Posteriormente dializados en PBS.

El porcentaje de anticuerpo monoclonal se cuantificó por una electroforésis convencional. La proteína total se cuantificó por espectrofotometría A^{280} nm. En base a estos dos datos se ha calculado el porcentaje de proteína monoclonal del preparado original. Se ha diluido ajustándolo a una concentración de 1 mg/ml y guardado congelado a -80° C.

Para su estudio en pruebas funcionales los Acm se han utilizado a una concentración final de 10 μ g/ml de proteína monoclonal, excepto para los estudios de concentración.

Los estudios iniciales de mitogénesis se realizaron utilizando ascitis no purificadas a concentraciones finales de 1/600.

Los monoclonales recibidos de otros investigadores se han dializado exhaustivamente en PBS, para eliminar las trazas de conservante, generalmente acida sodica. Se han ajustado a concentraciones finales equivalentes aproximadamente a 10 μ g/ml.

3.6 Mitógenos utilizados:

PHA: (Phytohemagglutinin, Wellcome Diagnostics, Darfort, U.K.) a concentraciones entre 2.5 y 20 μ g/ml.

ConA: (Concanavalin A, Flow laboratories, Irvine, Scotland) a concentraciones entre 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$.

PMA: (Phorbol Myristate Acetate, Sigma Chemie GmbH, W. Germany) a concentraciones entre 2 y 20 ng/ml .

Isonomicina: (Calbiochem) a concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$.

IL-2 recombinante (rIL-2) Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany) a concentraciones entre 0.01 ng/ml y 20 ng/ml .

3.7 Unión del los Acm a esferas de sefarosa:

Los Acm fueron precipitados por sulfato amónico saturado al 45 %, y posteriormente exhaustivamente dializados en PBS. Seguidamente se dializaron en Tampón Carbonato 0.1 M pH 9. Se incubaron en presencia de este tampon durante 2 horas a temperatura ambiente junto con esferas de Sefarosa (Sepharose-CNBr4B, Pharmacia, Upsala, Sweden). Previamente hinchada por HCl 1 mM.

La concentración de Acm en los sobrenadantes fue cuantificada por espectrofotometría A^{280} nm antes y después de la unión con la sefarosa obteniendo una unión de aproximadamente 2 mg de Acm/ml de sefarosa.

3.8 Deplección de monocitos:

La deplección de monocitos a partir de PBMC se realizó por un proceso en tres fases, como ya ha sido descrito (Palacios 1985), con mínimas modificaciones:

- 1) En primer lugar PBMC fueron incubadas durante 30 minutos a 37° C en placas de Petri preincubadas durante 30 minutos con RPMI-AB, recogándose las células no adheridas después de una ligera agitación.
- 2) Las células no adheridas a las placas de Petri fueron incubadas durante 30 minutos a 37° C en jeringas con fibra de nylon preincubada durante 30 minutos con medio RPMI-AB.
- 3) las células no adheridas a la columna de nylon fueron incubadas con el Acm Cris-6 (CD14), un anticuerpo anti-monocitos obtenido en nuestro laboratorio, durante 30 minutos a 4° C. A continuación las células fueron lavadas e incubadas con suero de conejo no tóxico, como fuente de complemento, durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Las células resultantes fueron sometidas a tres lavados y a continuación mantenidas a 4° C durante toda la noche.

Este procedimiento permitió la obtención de células con menos de 0.2 % de monocitos detectables por los métodos de inmunofluorescencia con un Acm CD14 o por ingestión de latex.

Esta población celular además no proliferaba o lo hacia en muy escasa medida frente a mitógenos como la PHA, ConA o la Seph-CD3. Esta población es designada como "células altamente deplecionadas de monocitos" (MHDC).

3.9 Obtención de las subpoblaciones linfocitarias:

Las subpoblaciones linfocitarias fueron obtenidas a partir de MHDC por selección negativa. Utilizando suero de conejo como fuente de complemento y los siguientes Acm:

Acm Edu-2 (CD4) y Acm BC-2 para obtener la subpoblación T8+.

Acm 109-2D4 (CD8) y Acm BC-2 para obtener la subpoblación T4+.

Acm 109-2D4 más Acm BC-2 más Acm 111-1C5 (CD45R) más anti inmunoglobulina de ratón obtenida en conejo para obtener la subpoblación T4+ T220-.

La pureza de estas subpoblaciones fue probada por inmunofluorescencia indirecta, utilizando un FACS-Analyzer de Becton and Dickinson, y fue siempre superior al 85 %.

3.10 Cuantificación de la mitogénesis:

La mitogénesis fue cuantificada por captación de timidina tritiada a las 48 horas, excepto en las curvas de cinética.

Las células fueron cultivadas en muestras por triplicado, en pocillos de fondo romo utilizando placas de 96 pocillos (Costar, Cambridge, UK) a una concentración de 10^5 células vivas por pocillo en 150 μ l de medio RPMI-AB.

Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera de 5 % CO₂, durante 48 horas, en presencia de los mitógenos correspondientes y de los Acm en estudio a una concentración de 10 μ g/ml. Después de este tiempo se añadieron a los cultivos 2 μ Ci/pocillo de Methyl-³H-Thymidine (2 Ci/mmol) (Amersham, U.K.) (3HdThd). Tras 18 horas de incubación con la

timidina tritiada se recogieron los cultivos sobre filtros de nitrocelulosa mediante un recogedor de cultivos (Skatron, Norway).

La medición de la timidina radiactiva captada fue medida en un contador de centelleo líquido (Beckman, U.S.A.).

3.11 Síntesis de RNA:

La medida de la síntesis de RNA fue realizada por captación de uridina tritiada de forma similar a como se realizó el estudio de la mitogénesis con las variaciones siguientes: Se utilizó (5-3H)-Uridine (Amersham, U.K.) en vez de timidina. Esta fue añadida a los cultivos a las 24 o 48 horas de cultivo. La recogida se realizo igualmente a las 18 horas y la cuantificación de la captación fue realizada de igual forma que para la mitogénesis.

3.12 Cultivo mixto alogénico:

La estimulación por antígenos alogénicos o Cultivo Mixto Linfocitario (MLC). Se realizo estimulando 10^5 PBMC, por pocillo, en 150 μ l de medio RPMI-AB, junto con 10^5 PBMC de un individuo alogénico, irradiadas con 2000 Rads. Las células fueron cultivadas en placas de fondo romo de 96 pocillos a 37 $^{\circ}$ C en una atmosfera de 5 % CO 2 . Después de 5 días de cultivo, se añadieron a los cultivos 2 μ Ci/pocillo de Methyl- 3 H-Thymidine (2 Ci/mmol) (Amersham, U.K.) (3 HdThd). Tras 18 horas de incubación con la timidina tritiada se

recogieron los cultivos sobre filtros de nitrocelulosa mediante un recogedor de cultivos (Skatron, Norway).

3.13 Recogida de sobrenadantes para la cuantificación de IL-2:

Las células PBMC o MHDC (1×10^6) fueron incubadas en RPMI-AB, en placas de 24 pocillos de fondo plano, junto con 10^5 esferas de sefarosa unidas a Acm CD3 y en presencia de concentraciones finales de $10 \mu\text{g/ml}$ de los Acm en estudio. A los cultivos se les añadió el Acm anti receptor de la IL-2 (anti-Tac), el Mar-108 (Lopez-Botet 1986) (a una dilución final 1/1000 de fluido ascítico). Este Acm se añadió para evitar el autoconsumo de la IL-2 y no afecta el bioensayo con CTLL (Baroja 1987).

Los sobrenadantes se recogieron a las 24 y 48 horas.

3.14 Cuantificación de la IL-2 de los sobrenadantes:

Se utilizaron 50λ de los sobrenadantes en diluciones progresivas de 1/2, las cuales fueron añadidas a 10^4 células de la línea murina CTLL, resuspendidas en 50λ de RPMI-FCS-ME, en pocillos de fondo plano, de placas de 96 pocillos. Después de 6 horas de cultivo se añadió a los cultivos $2 \mu\text{Ci/pocillo}$ de Methyl- ^3H -Thymidine (2 Ci/mmol) (Amersham, U.K.) (3HdThd). Tras 18 horas de incubación con la timidina tritiada se recogieron los cultivos sobre filtros de nitrocelulosa mediante un recogedor de cultivos (Skatron, Norway). La medición de la timidina radiactiva captada fue medida en un contador de centelleo líquido (Beckman, U.S.A.).

Los resultados se expresan en ng de IL-2 por ml por comparación con una curva estandar obtenida por la dilución seriada de una preparación de IL-2 recombinante (Boehringer Mannheim GmbH, W. Germany).

3.15 Quantificación de la citotoxicidad celular:

Marcaje de las células diana:

Las células de la línea celular K562 o Diana (PBMC) (10×10^6), fueron incubadas con 100 μCi de Cr^{51} en un volumen no superior a las 300 λ , durante 2 horas a 37° C, con agitaciones periódicas. Después de esta incubación se lavaron, una vez, las células con medio de cultivo. A continuación se resuspendieron en 50 ml de PBS y se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el fin de reducir al máximo la liberación espontánea de Cr^{51} durante la incubación final. Por último se realizó un lavado en RPMI-FCS y se ajustaron las células a una concentración de 1×10^6 células/ml.

Preparación de células efectoras citolíticas pre-estimuladas (CTL):

10^5 PBMC de la población efectora, por pocillo, en 150 μl de medio RPMI-AB, se han incubado junto con 10^5 PBMC del individuo alogénico diana irradiadas con 2000 Rads. Las células fueron cultivadas en placas de fondo romo de 96 pocillos a 37° C en una atmosfera de 5 % CO_2 después de 5 días de cultivo se recogieron las células, se lavaron y ajustaron a concentraciones de 40×10^6 cel./ml.

Determinación de la actividad citotóxica natural de las PBMC o de células preestimuladas:

En placas de 96 pocillos de fondo romo se distribuyeron 100 λ de células efectoras a diferentes concentraciones, desde 40×10^6 células/ml a 5×10^6 células/ml, junto con 100 λ de una concentración de 1×10^6 células/ml de la línea K562 (o de Diana PBMC) marcadas con Cr^{51} . Cada experimento se montó por triplicado, se dejó incubar a $37^{\circ} C$ durante 4 horas, pasadas las cuales se centrifugó la placa a 400 g. y se recogen 90 λ de sobrenadante.

El Cr^{51} liberado del interior de las células K562 (o de las Diana PBMC) fue cuantificado mediante un contador de radiaciones γ , Rack-gamma (LKB).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL Acm Cris-7 (CD3)

4.1.1 Estudio sobre la capacidad modificadora de la mitogénesis:

Una parte importante de los experimentos de esta tesis estan basados en la activación de los linfocitos T a través del complejo T3-Ti. Para activar lo linfocitos a través de esta vía hemos utilizado el Acm Cris-7 (CD3).

Antes de iniciar los experimentos utilizando este Acm, fue preciso demostrar que el Acm Cris-7 (CD3) era un representante adecuado de los del grupo CD3, y que poseía las mismas cualidades funcionales que las publicadas para otros Acms de su mismo grupo y más concretamente para el OKT3.

Con el objeto de determinar los efectos funcionales del Acm Cris-7 (CD3) en diferentes pruebas "in vitro" realizamos el estudio comparativo de este Acm con un grupo de Acms cuyas especificidades, isotipos i distribución celular, aparecen citados en el apartado de material y metodos. De entre ellos cabe destacar por su importancia funcional el Acm Edu-2 perteneciente al grupo CD4 (Haynes 1986) y el 109-2D4 adscrito al grupo CD8 (McMichael 1987).

El estudio de la capacidad mitogénica espontánea, mostró que tan solo el Acm Cris-7, aumentaba la captación de timidina tritiada en cultivos de PBMC estimulados por diferentes Acms durante 48 h. Fig. 1.

Este efecto mitogénico ya habia sido descrito para otros Acms del grupo CD3 (Van Wauwe 1980).

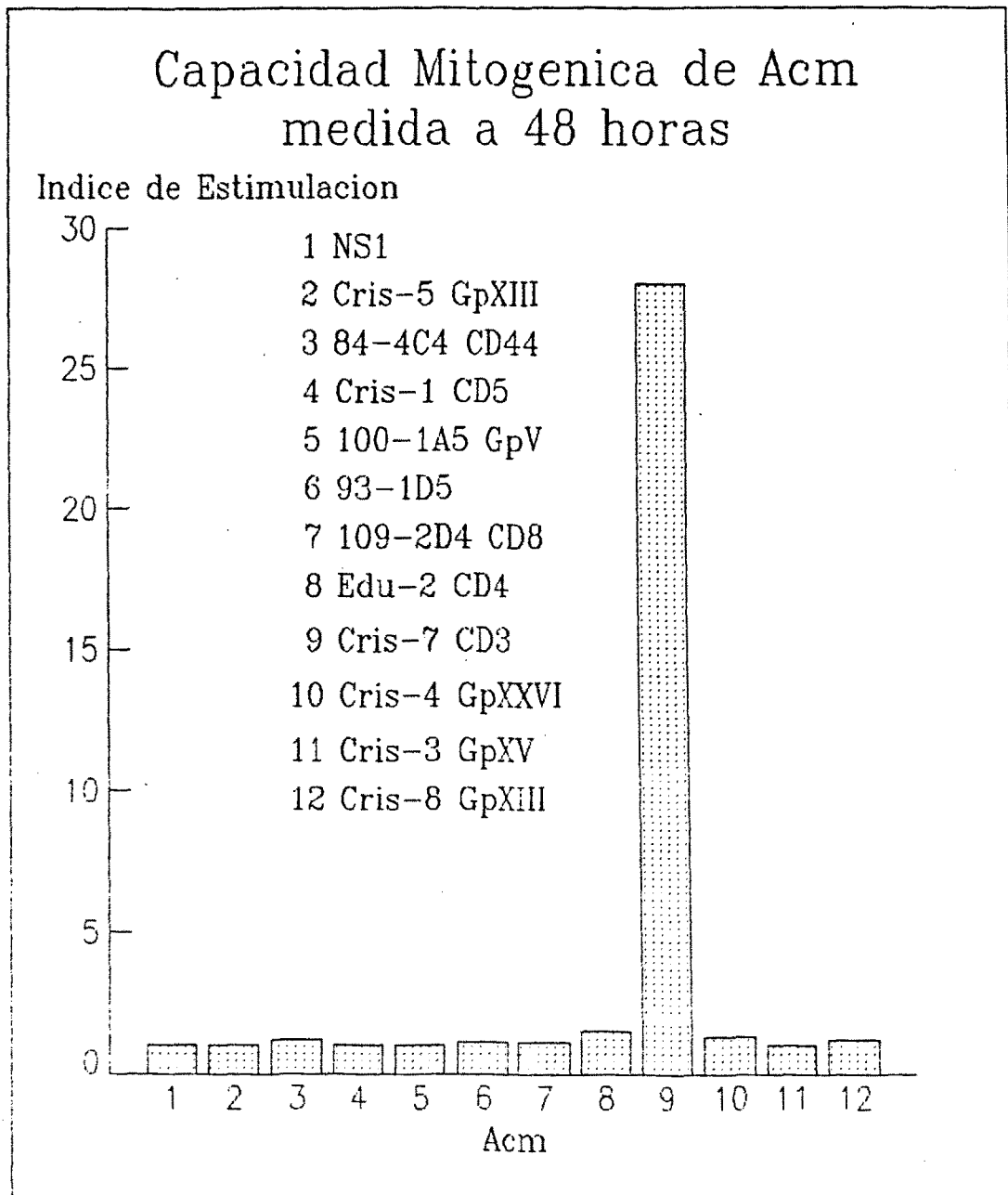


Fig. 1 - Mitogénesis inducida por diferentes Acm. en PBMC medida a 48 h.

resultados expresados en índice de estimulación.

(I.E.=cpm de 3HdTd problema/cpm de 3HdTd Control)

La mitogénesis fue máxima cuando se valoró a los tres días de cultivo, y casi indetectable cuando la timidina tritiada fue incorporada a partir del quinto día Fig. 2. Este hecho, probablemente sea debido a un agotamiento de la capacidad proliferativa de las PBMC mantenidas en estas condiciones.

Otros autores (Fleischer 1984) habían descrito que en aparente contradicción con los resultados anteriores, los Acms del grupo CD3 inhibían la mitogénesis inducida por PHA. Utilizando el Acm Cris-7 (CD3) pudimos confirmar que realmente este también inhibía la mitogénesis inducida por PHA Fig. 3. Esta inhibición no desapareció ni aun

cuadruplicando la concentración de PHA utilizada como activadora Fig. 4.

Las razones de este hecho no están aun claras si bien podrían ser debidas a la inhibición de la unión de la PHA a sus receptores, o a la interferencia entre los transductores intracelulares de las señales proporcionadas por los dos mitógenos.

La capacidad de proliferación de las PBMC frente a antígenos alogénicos, o cultivo mixto linfocitario (MLC), es otra de las funciones que según algunos autores (Reinherz 1984) es inhibida por los Acms del grupo CD3.

Como puede observarse en la Fig. 5, el Acm Cris-7 (CD3) mostró también, tener la capacidad de inhibir el cultivo mixto linfocitario. En este tipo de experimentos no puede descartarse un efecto de agotamiento de la capacidad proliferativa, inducida por el Acm CD3 durante los primeros días. Como puede verse en la mitogénesis inducida por el Acm Cris-7 (CD3) valorada a los 6 días.

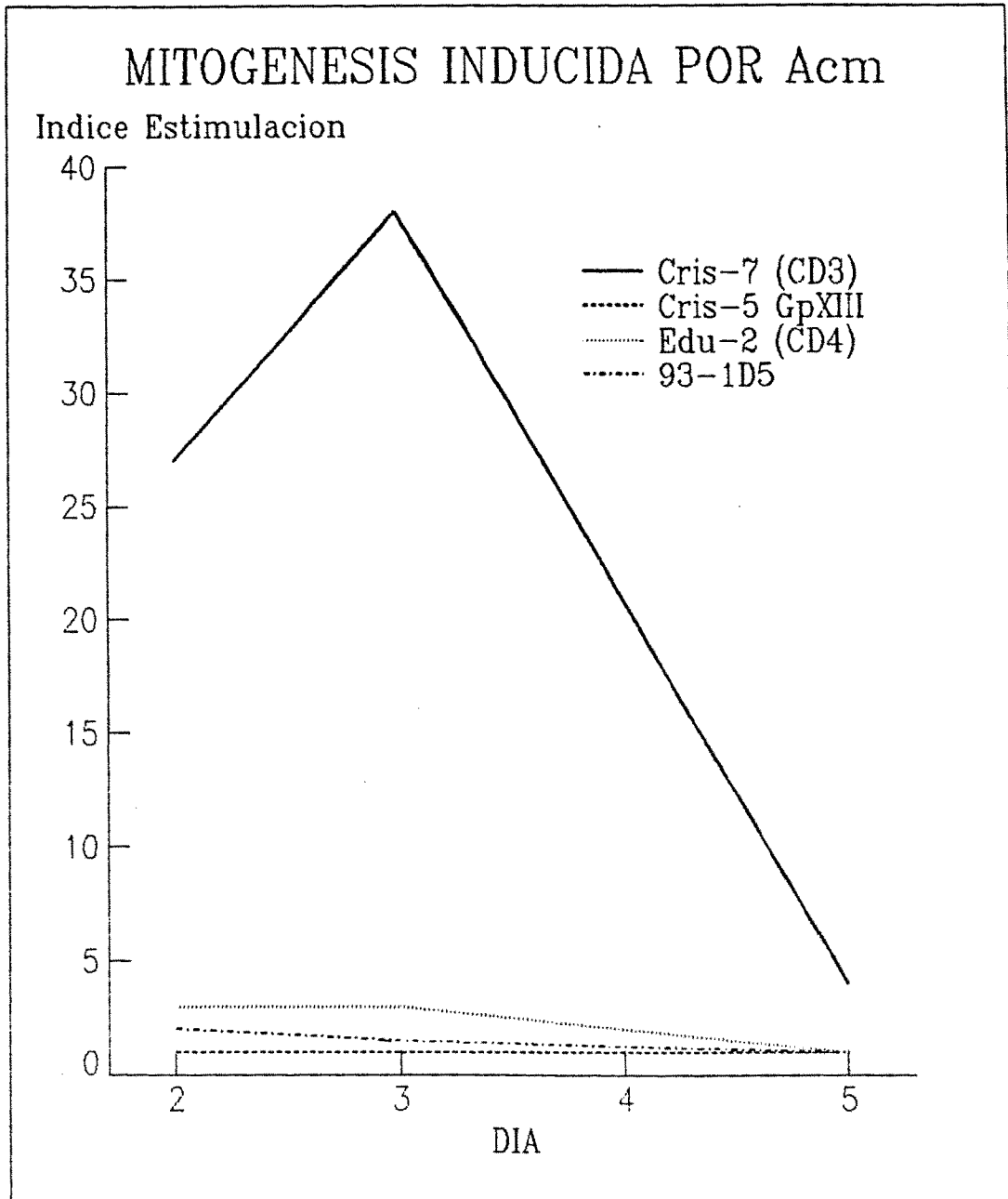


Fig. 2 - Mitogénesis inducida por diferentes Acm. en PBMC a 2,3 y 5 días, resultados expresados en indice de estimulación.

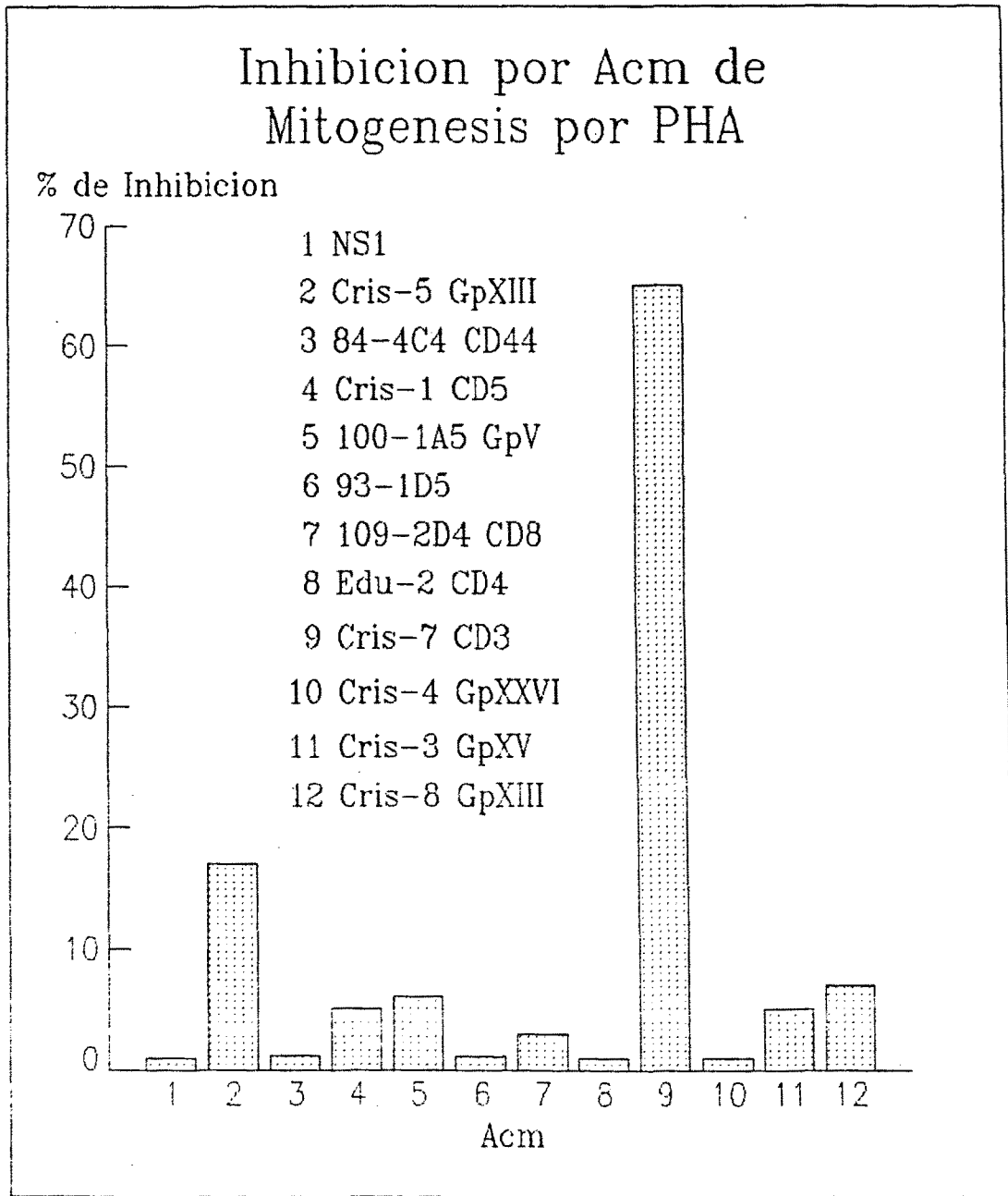


Fig. 3 - Inhibición de la mitogénesis inducida por PHA 30 µg/ml, por diferentes Acm. Resultados expresados en % de inhibición.
 (% inhibición= 100 x (cpm problema - cpm control neg.) / (cpm control pos. - cpm control neg.)

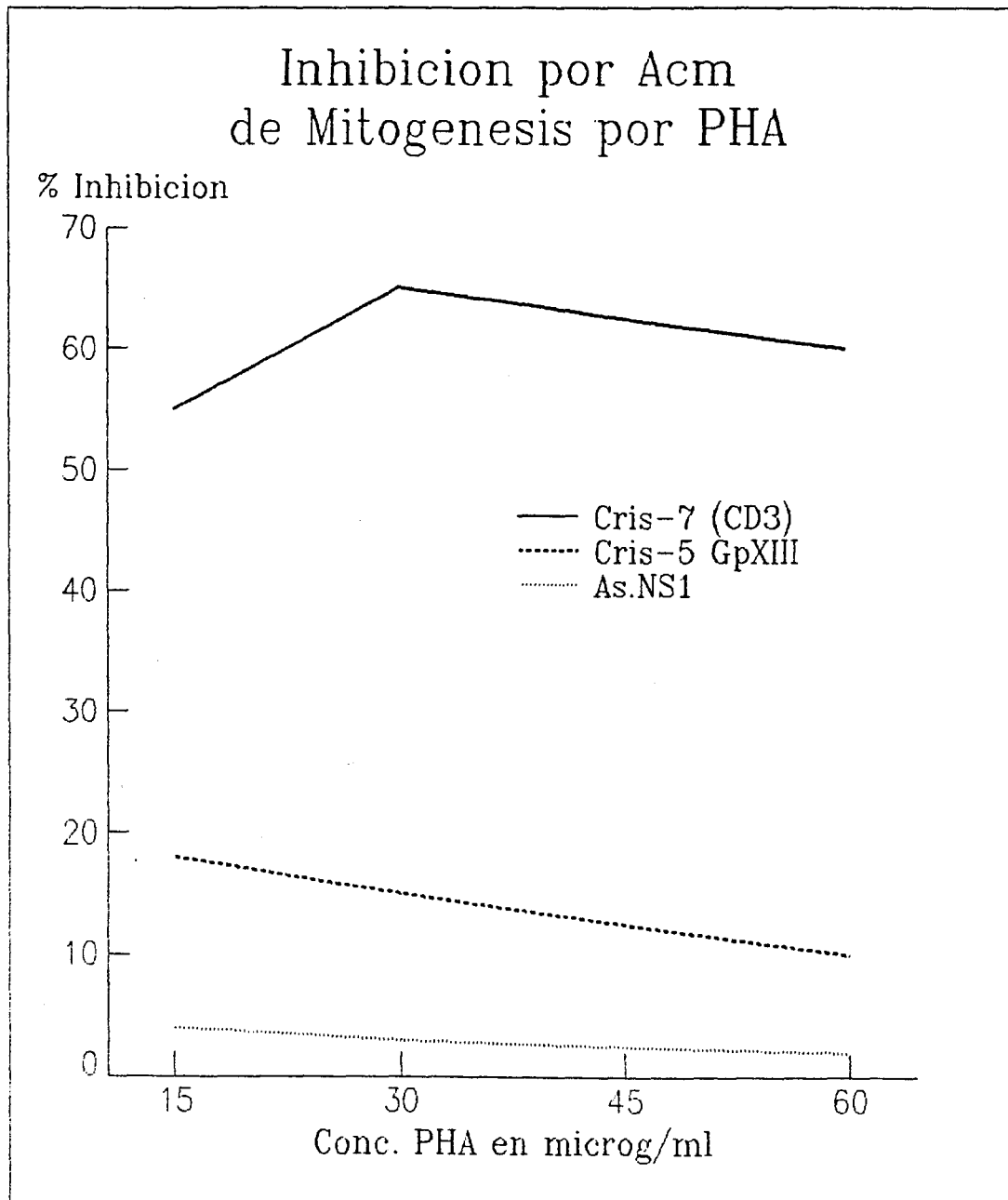


Fig. 4 - Inhibición producida por diferentes Acm en la mitogénesis inducida por diferentes concentraciones de PHA en PBMC, medida a 48 h..

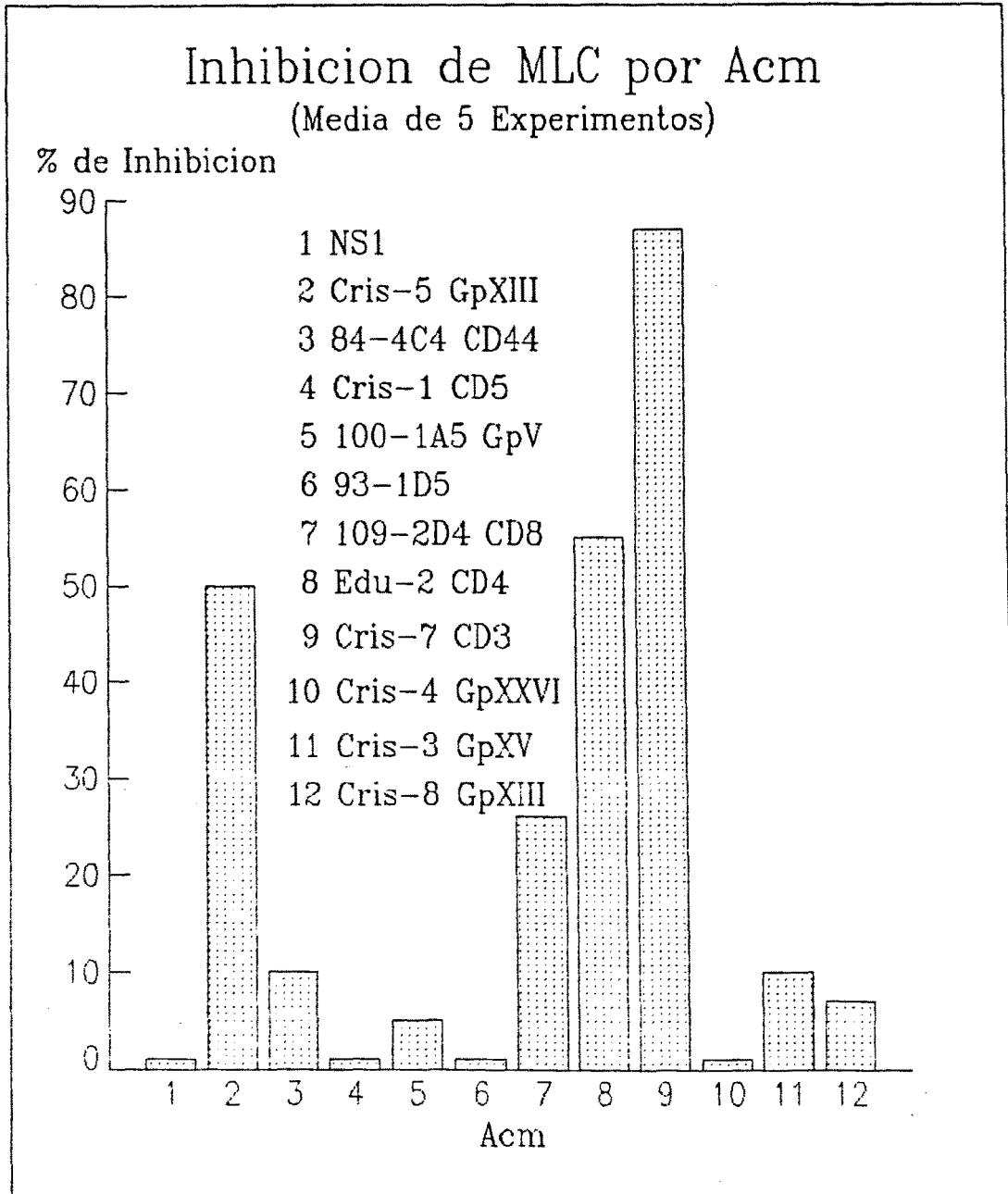


Fig. 5 - Inhibición producida por diferentes Acm en la mitogénesis inducida por un estímulo alogénico (Cultivo Mixto Linfocitario MLC).
 Resultados expresados en media del % inhibición obtenido en 5 experimentos diferentes.

En la misma Fig. 5, puede observarse que el Acm Edu-2 del grupo CD4 también inhibió el cultivo mixto linfocitario, este fenómeno, descrito por otros autores con otros Acm del grupo CD4 (Inaba 1987), será discutido más adelante.

Un efecto similar tuvieron los Acm 109-2D4 (CD8) y Cris-5 (GpXIII).

4.1.2 Estudios sobre la capacidad modificadora de la citotoxicidad:

Trabajos de otros autores, han demostrado que los Acms del grupo CD3, inhiben la capacidad citotóxica específica (CTL de "Citotoxic T Lymphocytes") (Wen Chang 1981), pero no la actividad citotóxica natural (NK de "Natural Killer"), ni la actividad citotóxica inespecífica frente a K562 de células previamente activadas ("NK-like" o LAK de "Lymphokine Activated Killer") (Kornbluth 1985) (Brooks 1983).

Como puede comprobarse en la Fig. 6, el Acm Cris-7 (CD3) fue el único, de los Acm analizados, que inhibió la actividad CTL. El Acm Cris-7 (CD3) no inhibió, sin embargo, ni la actividad NK ni la NK-like, Fig. 7 y Fig. 8.

La Fig. 9 muestra un estudio comparativo entre el Acm Cris-7 (CD3) y el Acm 68-5A5 perteneciente al grupo CD18 de la familia de los LFA-1.

Según algunos autores los Acm de este grupo poseen la capacidad de inhibir la adhesión celular (Martz 1987).

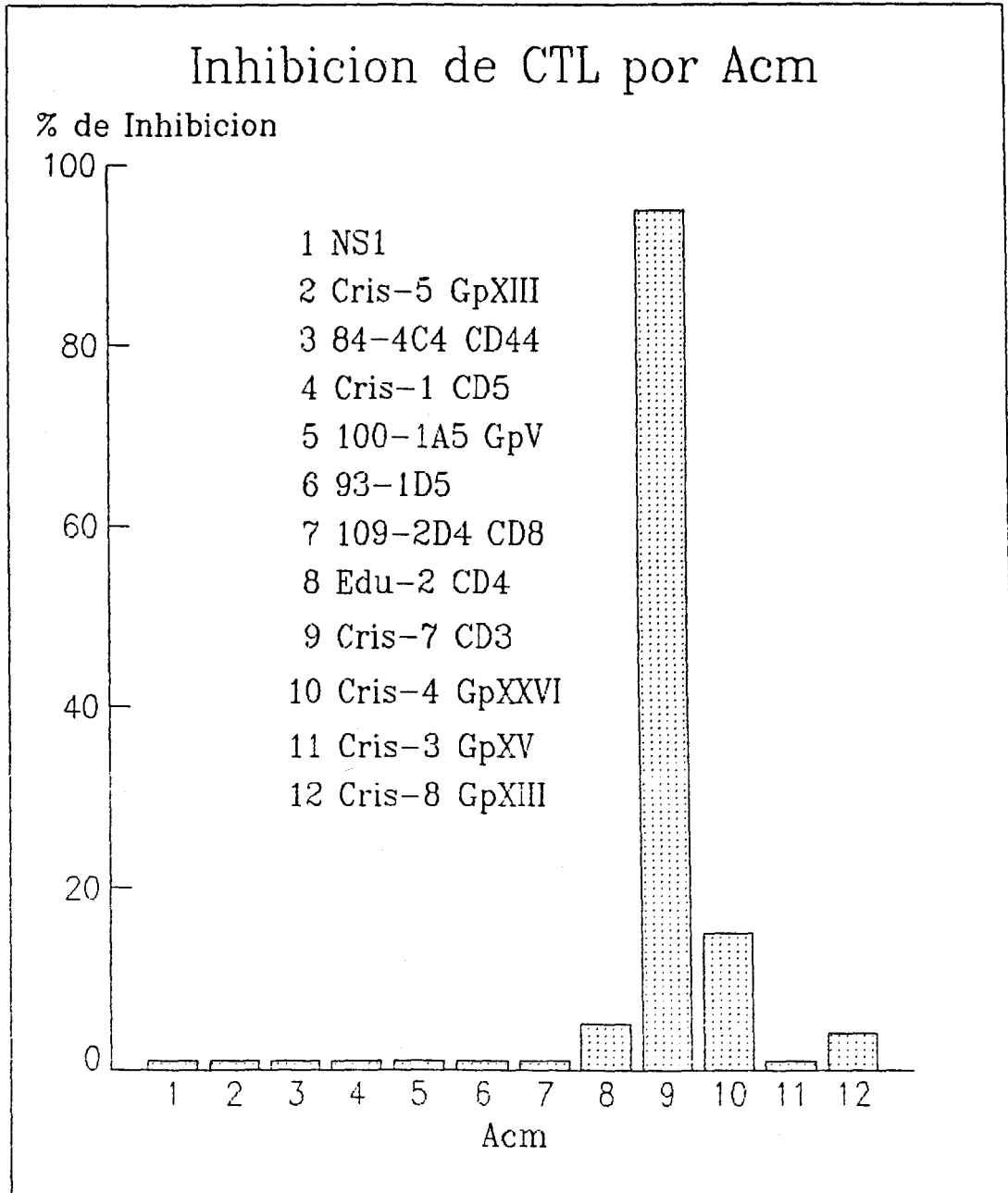


Fig. 6 - Inhibición producida por diferentes Acm en la actividad citotóxica específica de células PBMC preestimuladas durante 6 días en MLC frente a PBMC Alogénicas, medida por liberación de Cr^{51} , expresado en % de inhibición.

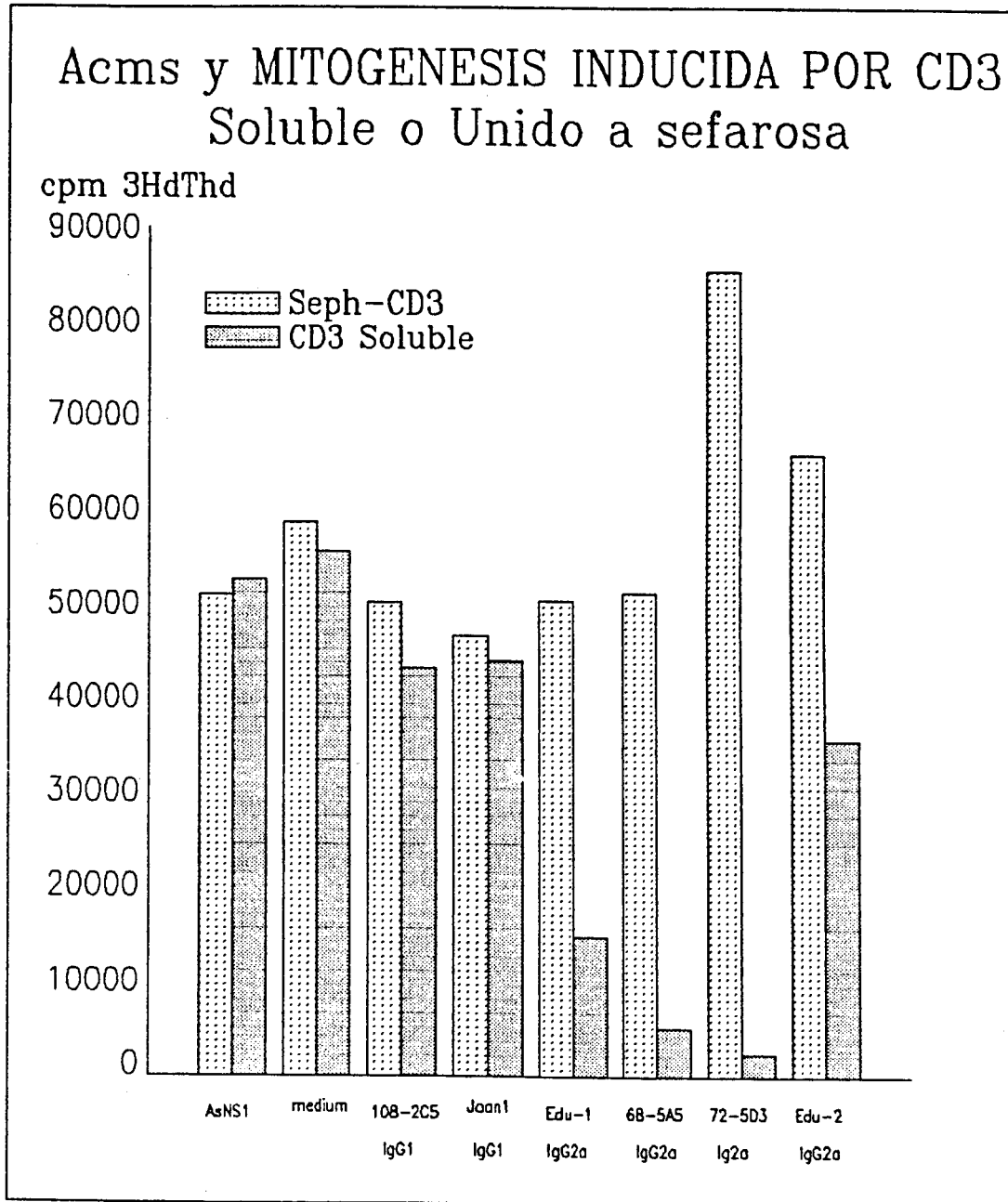


Fig. 11 - Efecto de diferentes Acm en la mitogénesis de PBMC inducida
Acm Cris-7 (CD3) unido a sefarosa o soluble, medida
a las 48 h. expresada en cpm de 3HdThd.

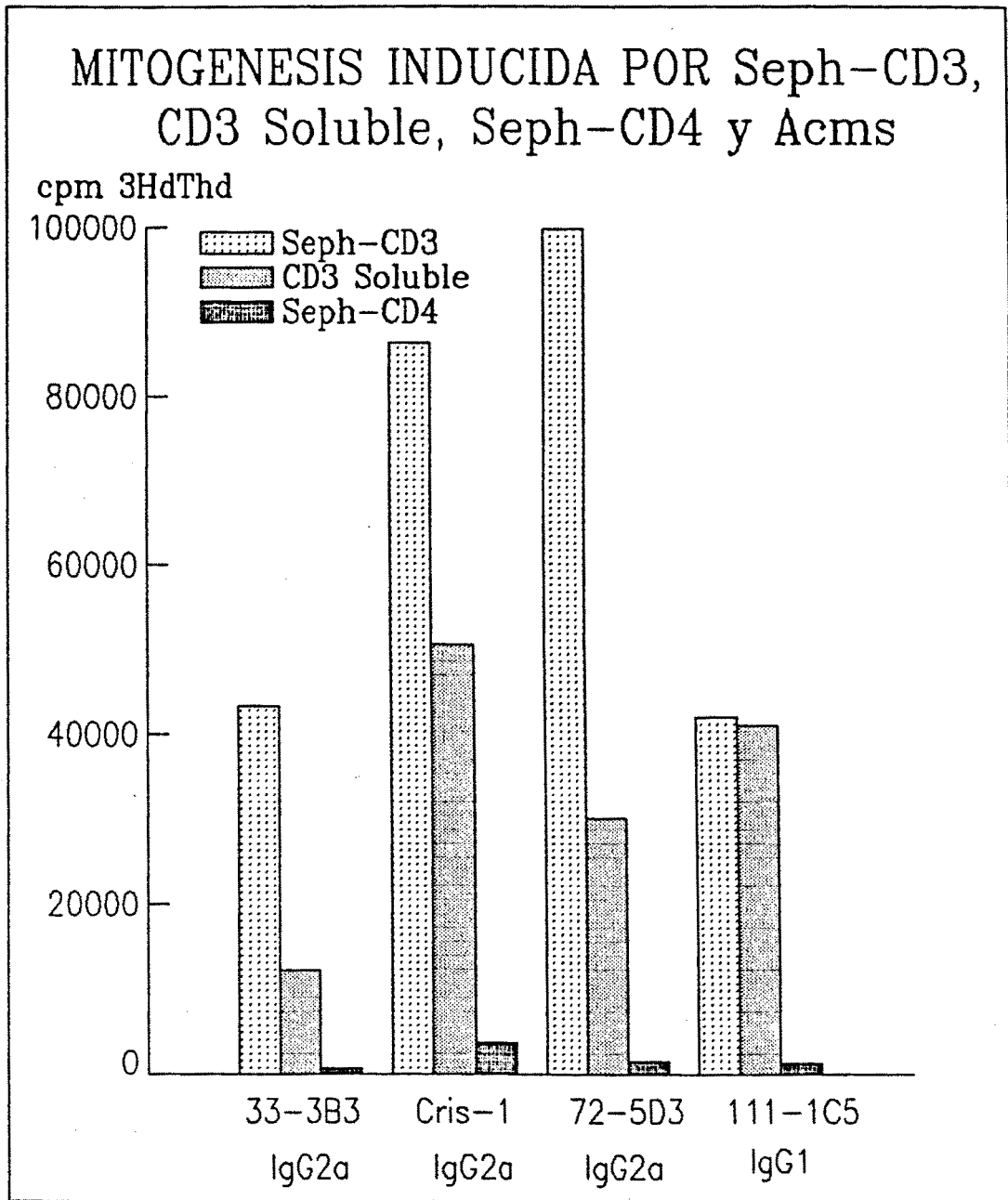


Fig. 12 - Efecto de diferentes Acm en la mitogénesis de PBMC inducida por Acm Cris-7 (CD3) unido a sefarosa o soluble, y control de Seph-CD4, medida a las 48 h. expresada en cpm de 3HdThd.

En este experimento se introdujo además un nuevo control consistente en un Acm del grupo CD4, el Edu-2, unido a esferas de Sefarosa (Seph-CD4). Para comprobar la especificidad de la mitogénesis inducida por Seph-CD3.

Tal y como puede comprobarse en la Fig. 12, la Seph-CD4 no es mitogénica para PBMC. El efecto facilitador de la mitogénesis de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5), solo se observó al utilizar Seph-CD3, pero no en los experimentos con Seph-CD4.

Estos primeros datos nos llevaron a sospechar un posible efecto facilitador de la mitogénesis por parte de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5).

Con la finalidad de confirmar la sensibilidad de diferentes individuos a este efecto facilitador de la mitogénesis, decidimos estudiar el efecto de estos Acm en la mitogénesis inducida por Seph-CD3 de cuatro individuos distintos, no emparentados. Los resultados de dichos experimentos pueden observarse en la Fig. 13. En ella se comprueba, que realmente, tanto el Acm 72-5D3 (CD45) como el Acm Cris-1 (CD5) incrementaron la captación de timidina inducida por Seph-CD3 en PBMC, con respecto de una ascitis obtenida con células NS1 utilizada como control.

En estos mismos experimentos pudo comprobarse un ligera inhibición de la mitogénesis inducida por Edu-2 (CD4), que se discutira más adelante.

Paralelamente con el desarrollo de estos experimentos en octubre de 1985 Ledbetter publicó en el "Journal of Immunology" el efecto facilitador de la mitogénesis de los Acm del grupo CD5 al que pertenece el Acm Cris-1 (CD5) (Ledbetter 1985). Por ello decidimos centrar nuestro esfuerzo en el estudio de la posible participación de la molécula reconocida por el Acm 72-5D3 (CD45), en la activación de las células T, para afrontar posteriormente un estudio comparativo con la reconocida por el Acm Cris-1 (CD5).

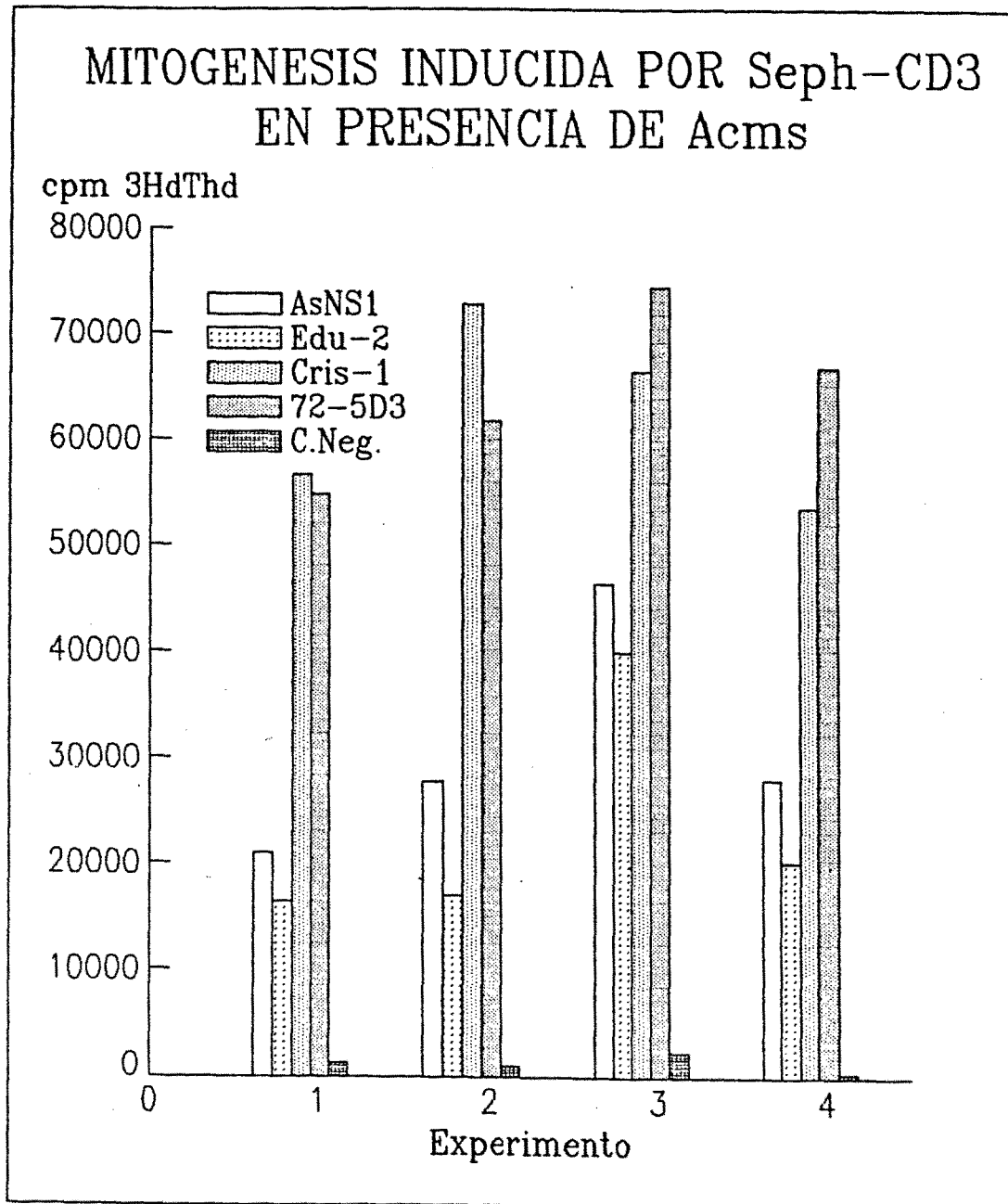


Fig. 13 - Efecto de los Acms 72-5D3 (CD45), Cris-1 (CD5), y Edu-2 (CD4) en la mitogénesis de PBMC inducida Acms Cris-7 (CD3) unido a sefarosa, medida a las 48 h. expresada en cpm de 3HdThd, cuatro experimentos diferentes.

4.2.2 Conclusiones parciales:

- 1) La mitogénesis inducida a través del Acm Cris-7 (CD3) soluble puede ser inhibida de forma inespecífica por Acm de isotipo IgG2a pero no con los estudiados del tipo IgG1.
- 2) La inespecificidad de esta inhibición se comprueba por el hecho de que esta desaparece al utilizarse Acm CD3 unidos a sefarosa.
- 3) La utilización de la sefarosa no interfiere las pruebas realizadas por captación de timidina.
- 4) El efecto mitogénico solo se observa utilizando Acm CD3 unido a Sefarosa pero no otros Acm como el Edu-2 (CD4).
- 5) Como conclusión final y más importante el hecho de que los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) producen un efecto facilitador de la mitogénesis inducida por Seph-CD3.

4.3 PARTICIPACION DE Acm 72-5D3 (CD45) EN LA ACTIVACION DE PBMC

4.3.1 Participación del Acm 72-5D3 (CD45) en la estimulación de PBMC por diferentes mitógenos:

Con la intención de definir si el efecto facilitador de la activación celular inducido por el Acm 72-5D3 (CD45) era específico para la activación inducida por Seph-CD3 o era común con otros sistemas de activación, decidimos estudiar el efecto producido por el Acm 72-5D3 (CD45) en la proliferación celular activada por diferentes tipos de mitógenos.

Los resultados obtenidos se detallan en la Fig. 14, en donde puede observarse que el Acm 72-5D3 (CD45), aumentó la captación de timidina tritiada en células activadas por Seph-CD3. Pero no en las estimuladas por ConA, PWM, PMA, o un estímulo allogénico (MLC), Fig. 14.

Otros autores habían descrito que un Acm del grupo CD45R, el G1-15, aumentaba la proliferación inducida por dosis sub-óptimas de PHA (Ledbetter 1986). Por ello decidimos estudiar si nuestro Acm CD45 tenía una capacidad similar a la descrita para el G1-15 del grupo CD45R.

Los resultados obtenidos mostraron que el Acm 72-5D3 (CD45) no poseía la capacidad de aumentar la mitogénesis inducida por dosis sub-óptimas de PHA, Fig. 14. Con ello se evidenciaba que CD45 y CD45R, además de ser diferentes en su distribución celular y en el abanico de cadenas que precipitaban, se mostraban también como funcionalmente distintos.

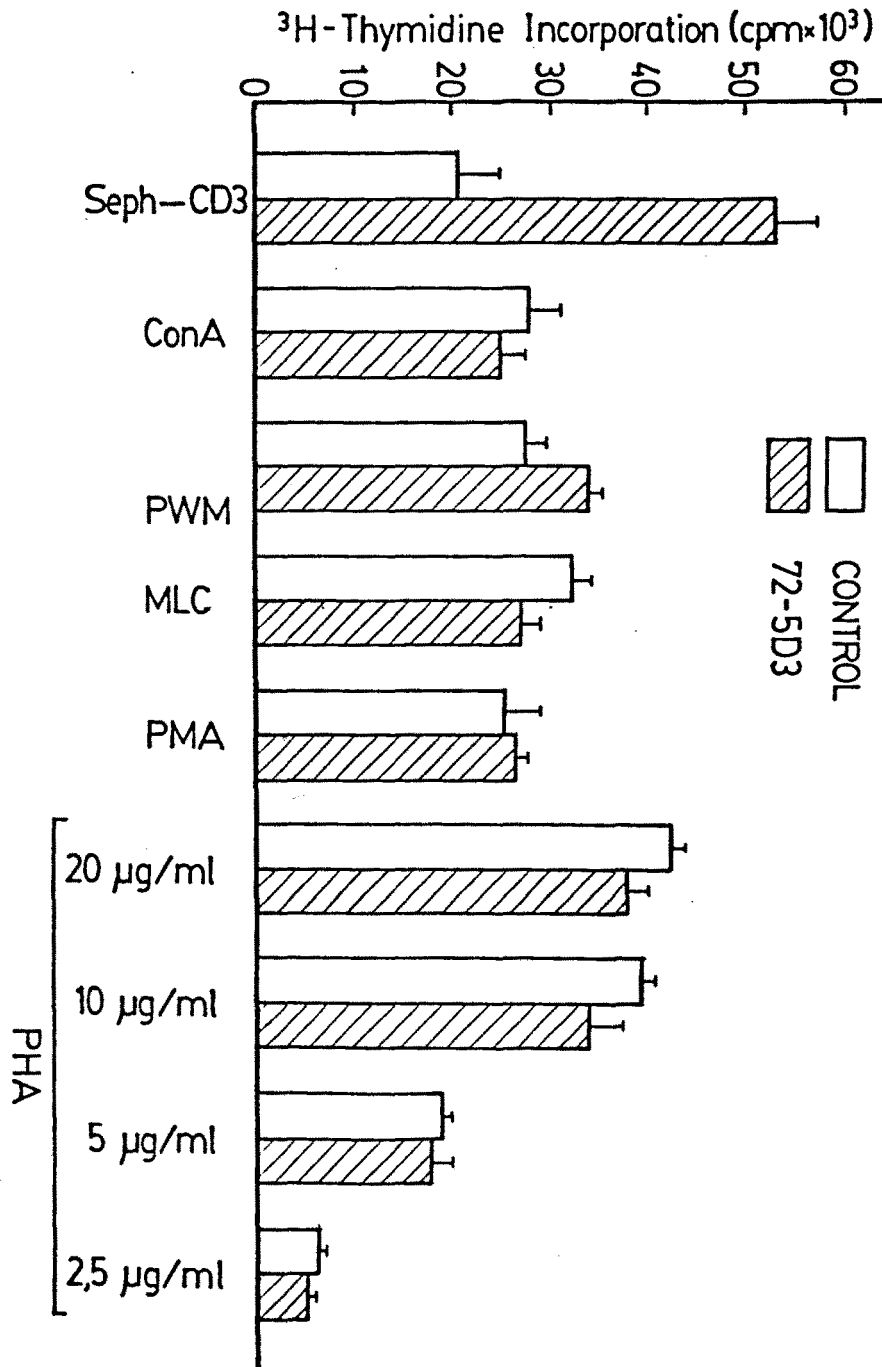


Fig. 14 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis de PBMC inducida por diferentes mitógenos medida a 48 h. (escepto para MLC a 120 h.), ConA 10 µg/ml, PWM 2 µg/ml, PMA 10 ng/ml, PHA 20,10,5,2.5 µg/ml.

4.3.2 Interacción de la rIL-2 con el efecto facilitador del Acm 72-5D3 (CD45) en mitogénesis inducida por Seph-CD3 en PBMC;

Frente al efecto facilitador de la mitogénesis inducida por Seph-CD3 del Acm 72-5D3 (CD45), cabía plantearse en principio cuatro hipótesis distintas:

- 1) Que aumentaba la secreción de IL-2.
- 2) Que aumentaba la expresión de receptores para la IL-2.
- 3) Que aumentaba la afinidad de los receptores para la IL-2.
- 4) Que utilizaba un mecanismo de facilitación independiente de la IL-2.

Si las hipótesis 2 ó 3 eran acertadas, en principio cabía esperar que la adición de IL-2 exógena potenciase el efecto facilitador del Acm 72-5D3 (CD45).

Con el objeto de examinar la posibilidad de que el Acm 72-5D3 (CD45) aumentara la mitogénesis, aumentando la expresión de receptores funcionalmente activos para la IL-2, decidimos estudiar la participación de la IL-2 recombinante (rIL-2) en la proliferación de PBMC inducida por Seph-CD3 y el efecto del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis inducida en estas condiciones.

En la Fig. 15, puede comprobarse que:

- 1) El Acm 72-5D3 (CD45) por sí solo no es mitogénico.
- 2) Tampoco lo es cuando se le añade rIL-2, lo que indica que por sí solo no induce la aparición de receptores funcionales para esta interleukina.
- 3) La adición de rIL-2 a PBMC estimuladas por Seph-CD3 incrementa significativamente la mitogénesis, indicando indirectamente, que en estas condiciones aun quedan receptores funcionales libres para la IL-2.

4) Cuando se añade rIL-2 exogena a PBMC+Seph-CD3, el Acm 72-5D3 (CD45) es incapaz de producir un aumento en la captación de timidina tritiada. Esto hace improbable que su efecto facilitador de la mitogénesis sea debido solamente a un aumento en la expresión de los receptores para la IL-2 o en un aumento de la afinidad de estos receptores.

4.3.3 Estudio de la concentración y cinética del efecto facilitador del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis de PBMC activadas por Seph-CD3:

Para confirmar que el efecto inducido por el Acm 72-5D3 (CD45) era específico era necesario demostrar que este era dependiente de la dosis de Acm. Para ello purificamos el Acm por precipitación con Sulfato de Amonio, determinamos su pureza por electroforesis y cuantificamos la proteína monoclonal disponible.

Como puede observarse en la Fig. 16, el aumento de la mitogénesis inducida por Seph-CD3 es dependiente de la concentración de Acm 72-5D3 (CD45) utilizado. Dosis de aproximadamente 10 ng ya producen aumentos significativos de la mitogénesis.

En otros Acm como los CD3 se había descrito que el exceso de Acm podía enmascarar sus efectos funcionales. Para descartar esta posibilidad, decidimos comprobar que el Acm 72-5D3 (CD45) no era mitogénico por si mismo, a diferentes dosis.

En el experimento que muestra la Fig. 16, se demostró que el Acm 72-5D3 (CD45) no inducía mitogénesis por si solo a dosis comprendidas entre 10 ng/ml y 10 µg/ml.

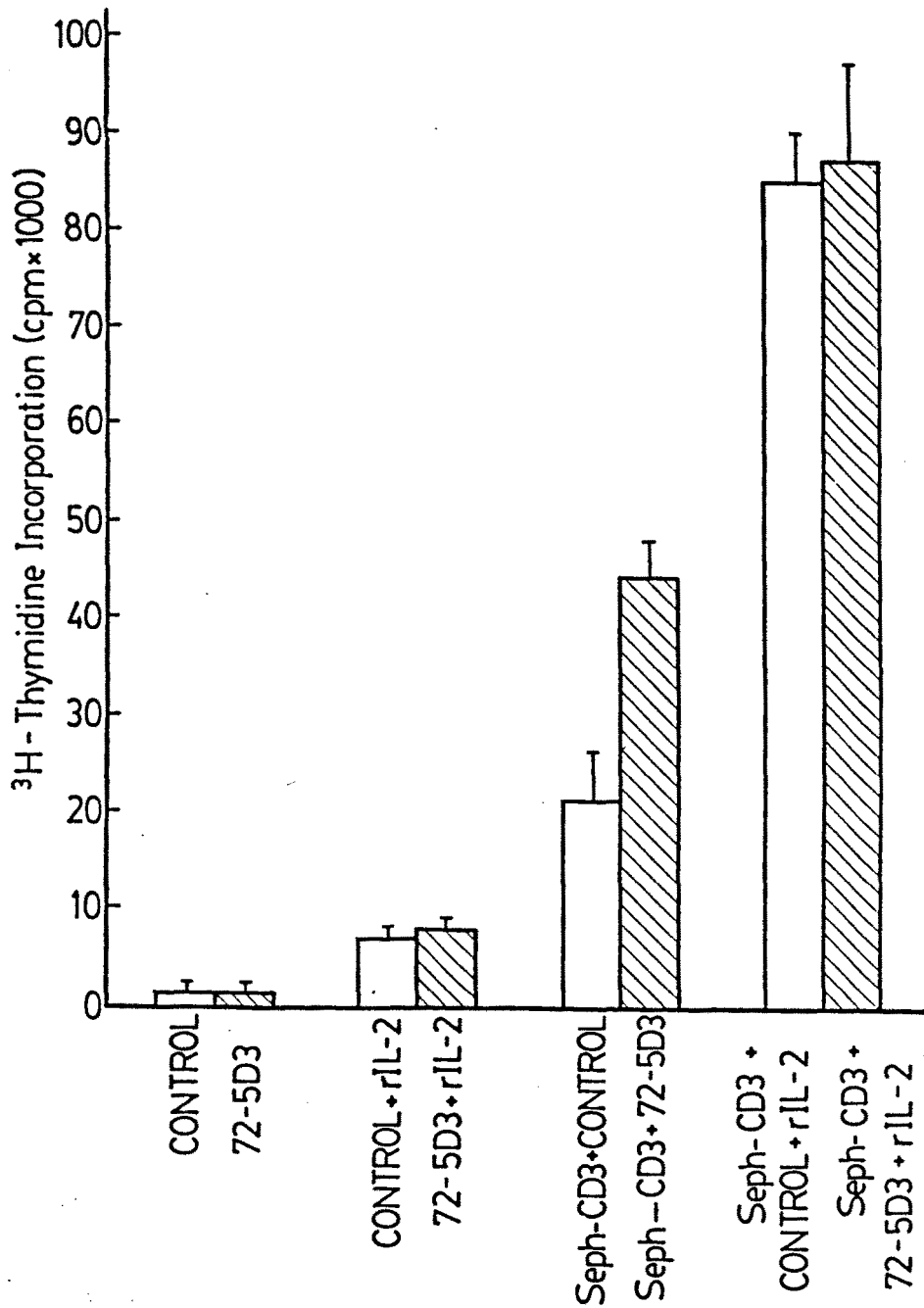


Fig. 15 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis de PBMC inducida por Seph-CD3 con y sin rIL-2 20 ng/ml.

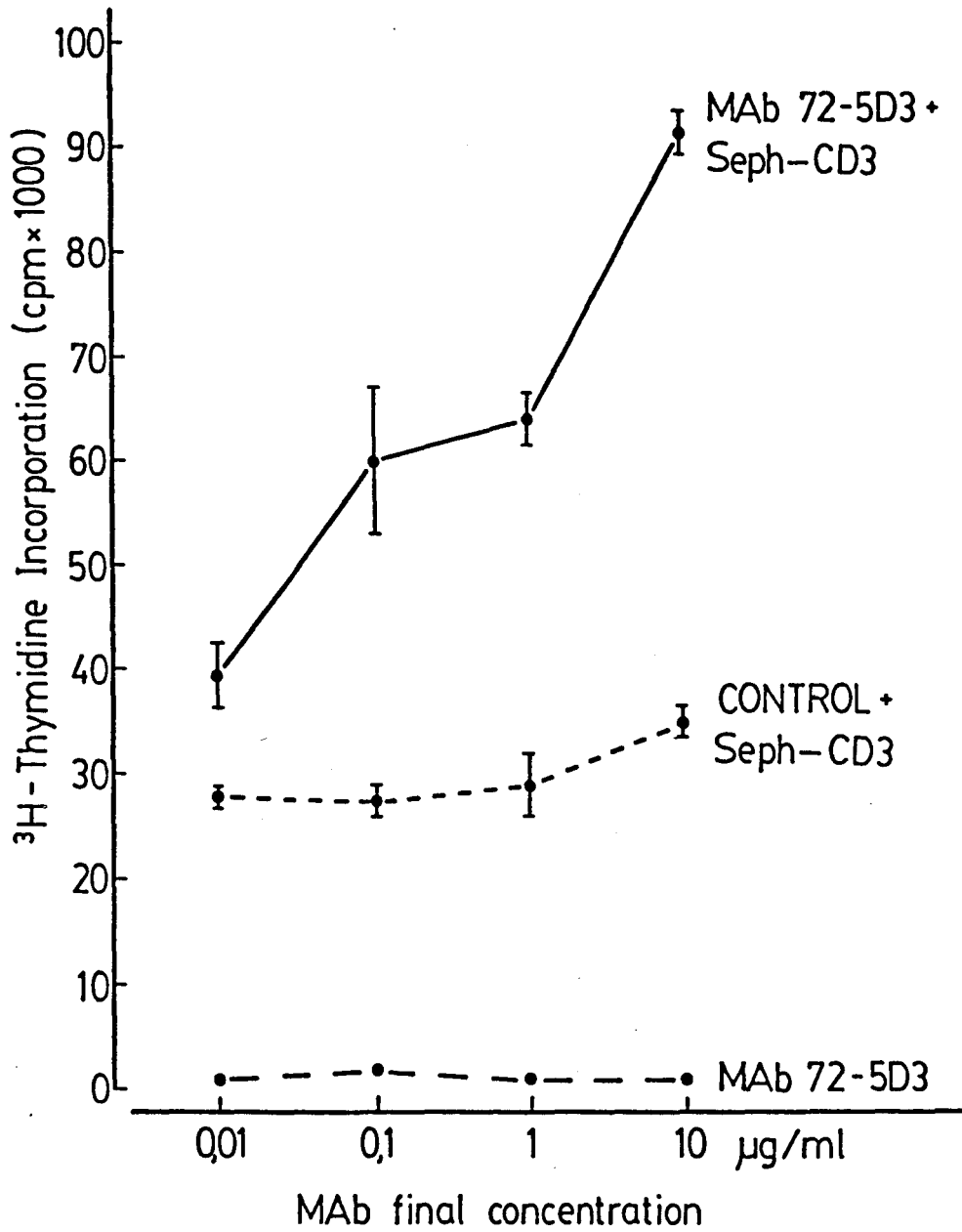


Fig. 16 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45) a diferentes concentraciones en la mitogénesis de PBMC inducida por Seph-CD3.

Para intentar identificar el mecanismo utilizado por el Acm 72-5D3 (CD45) para facilitar la mitogénesis, juzgamos necesario el determinar en que momento del proceso de activación celular intervenía el Acm 72-5D3 (CD45). Realizamos un estudio de cinética, añadiendo el Acm 72-5D3 (CD45) a diferentes periodos, desde 18 horas antes de la activación con Seph-CD3 hasta 48 h. después, recogiendo siempre los cultivos a las 72 horas, tras 18 horas de incubación en presencia de timidina tritiada.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 17, en la que puede observarse que el Acm 72-5D3 (CD45), aumenta la mitogénesis si es añadido 18 horas antes de la activación con Seph-CD3, al mismo momento que la Seph-CD3, o durante las siguientes 8 horas. Pero no si se añade 24 o 48 horas después de la Seph-CD3.

Estos datos indican que el Acm 72-5D3 (CD45) interviene en los primeros pasos de la activación celular.

4.3.4 Efecto del Acm 72-5D3 (CD45) sobre la síntesis de RNA de PBMC:

En base a los datos anteriores, existía la posibilidad de que el Acm 72-5D3 (CD45) por si solo pudiera "preparar" a la célula para la mitogénesis, activando sus mecanismos de síntesis de RNA, y la síntesis de proteínas. Pero que su señal fuera insuficiente para iniciar la duplicación celular y por tanto la síntesis de DNA.

Para descartar esta posibilidad, decidimos evaluar la capacidad del Acm 72-5D3 (CD45), para activar por si solo la captación de Uridina tritiada. Como puede observarse en la Fig. 18, el Acm 72-5D3 (CD45) por si solo no aumentó significativamente la captación de Uridina tritiada. Incrementó, sin

embargo, la incorporación de Uridina tritiada de las PBMC activadas por Seph-CD3, con respecto del control, tanto si esta se valora a las 24 horas como a las 48 horas.

Estos resultados hacen poco probable que el efecto del Acm 72-5D3 (CD45) sea debido a un "preparación para la mitogénesis" que implique el aumento de la síntesis de RNA y de la síntesis proteica.

4.3.5 Conclusiones parciales:

- 1) El efecto facilitador de la proliferación celular inducido por el Acm 72-5D3 (CD45) es específico para la mitogénesis inducida por Seph-CD3 y no es extrapolable a otros tipos de mitógenos.
- 2) El Acm 72-5D3 (CD45) actua en las fases iniciales de la activación.
- 3) El Acm 72-5D3 (CD45) no parece actuar a través de la modificación del numero o de la eficiencia de los receptores para la IL-2.
- 4) El Acm 72-5D3 (CD45) por si solo no tiene la capacidad de activar los mecanismos de síntesis de RNA.

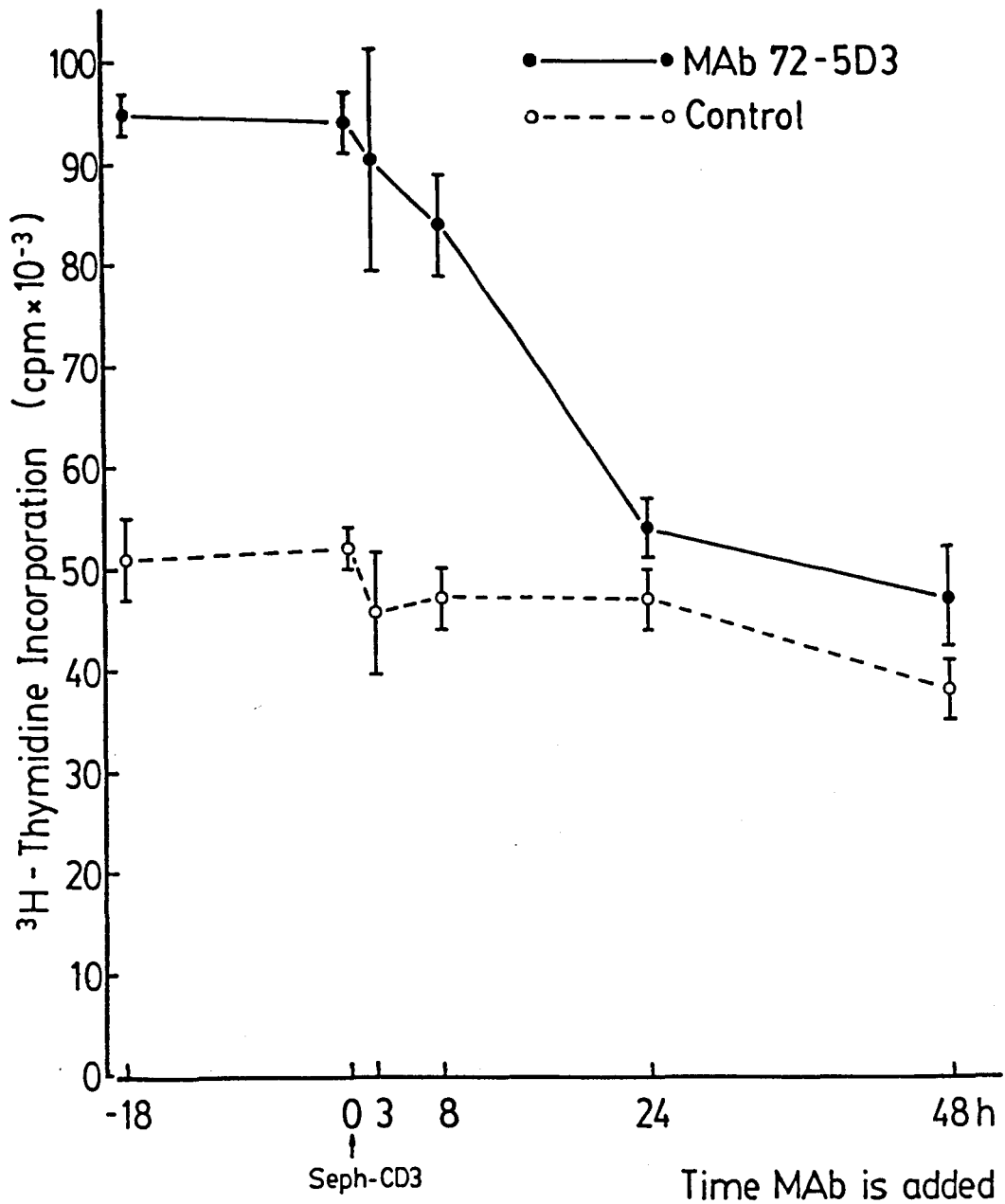


Fig. 17 - Cinética del efecto del Acm 72-5D3 (CD45), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, añadido a diferentes tiempos, en la mitogénesis de PBMC inducida por Seph-CD3, se considera tiempo 0 el momento en que se añade la Seph-CD3.

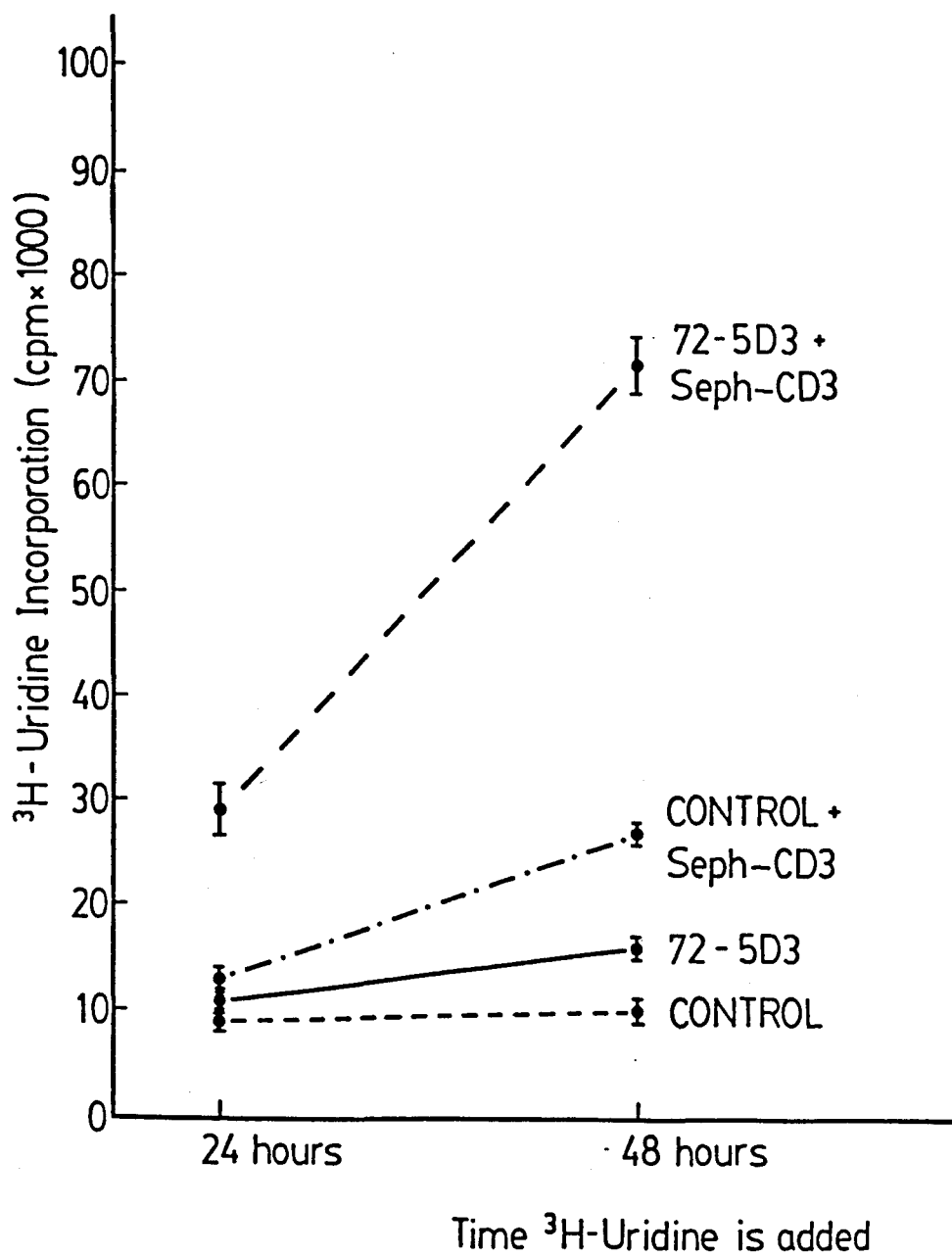


Fig. 18 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45), 10 µg/ml, en la síntesis de RNA de PBMC en presencia o ausencia de Seph-CD3.

4.4 LA "SEGUNDA SEÑAL" EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T Y

EL Acm 72-5D3 (CD45)

4.4.1 Participación del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis de MHDC por diferentes mitógenos:

Algunos autores han demostrado que los monocitos juegan un papel fundamental en la activación de los linfocitos T, proporcionando una "segunda señal" necesaria para la mitogénesis (Palacios 1985) (Meuer 1986) (Davis 1986) (Wakasuki 1985).

Las características de esta "segunda señal" están poco claras, si bien es cierto que existen evidencias, que en muchos procesos, esta es mediada a través de la IL-1. Otros autores postulan la necesidad de la presencia física de los monocitos, por lo menos para algunos tipos de activación (Davis 1986). Esta presencia física sería eficaz incluso en el caso de usarse células fijadas por Glutaraldehído (0.025 %) (Kim 1986).

Estos datos inducen a pensar en la posibilidad de la existencia de una vía de comunicación de esta "segunda señal", mediada por la interacción directa, entre alguna molécula de la membrana del linfocito y alguna molécula de la membrana del monocito.

Para determinar la relación entre la capacidad facilitadora de la mitogénesis que habíamos descubierto en el Acm 72-5D3 (CD45) y la "segunda señal" proporcionada por los monocitos, decidimos estudiar la mitogénesis inducida por diversos medios en células mononucleares de sangre periférica

altamente depleccionadas de monocitos (MHDC de "Monocytes Highly Depleted Cells").

En primer lugar ensayamos la capacidad de la Seph-CD3 de inducir mitogénesis en MHDC.

Como ya habían descrito otros autores, comprobamos que la Seph-CD3 apenas inducía mitogénesis en MHDC. Sin embargo, y para nuestra satisfacción, pudimos observar que el Acm 72-5D3 (CD45) tenía la capacidad de inducir la mitogénesis en poblaciones de células altamente depleccionadas de monocitos cuando estas habían sido activadas por Seph-CD3 Fig. 19.

En otras palabras, la "primera señal" proporcionada por la Seph-CD3, había sido insuficiente para inducir por sí misma mitogénesis, en ausencia de monocitos, sin embargo el Acm 72-5D3 (CD45) había activado la mitogénesis proporcionando la "segunda señal" y obviando la necesidad de los monocitos. La importancia de los monocitos en la proliferación inducida por lectinas, ha sido motivo de discusión (Mire-Sluis 1987). El grado de depleción de monocitos obtenido o el mecanismo de purificación utilizado, como hemos descrito en la introducción, podrían ser los motivos de esta discrepancia. Nuestro sistema de depleción de monocitos nos ha permitido obtener poblaciones de células MHDC, que apenas proliferan en presencia de lectinas tales como la PHA o la ConA, Fig. 20.

La adición del Acm 72-5D3 (CD45) no induce la mitogénesis de las MHDC activadas con ConA.

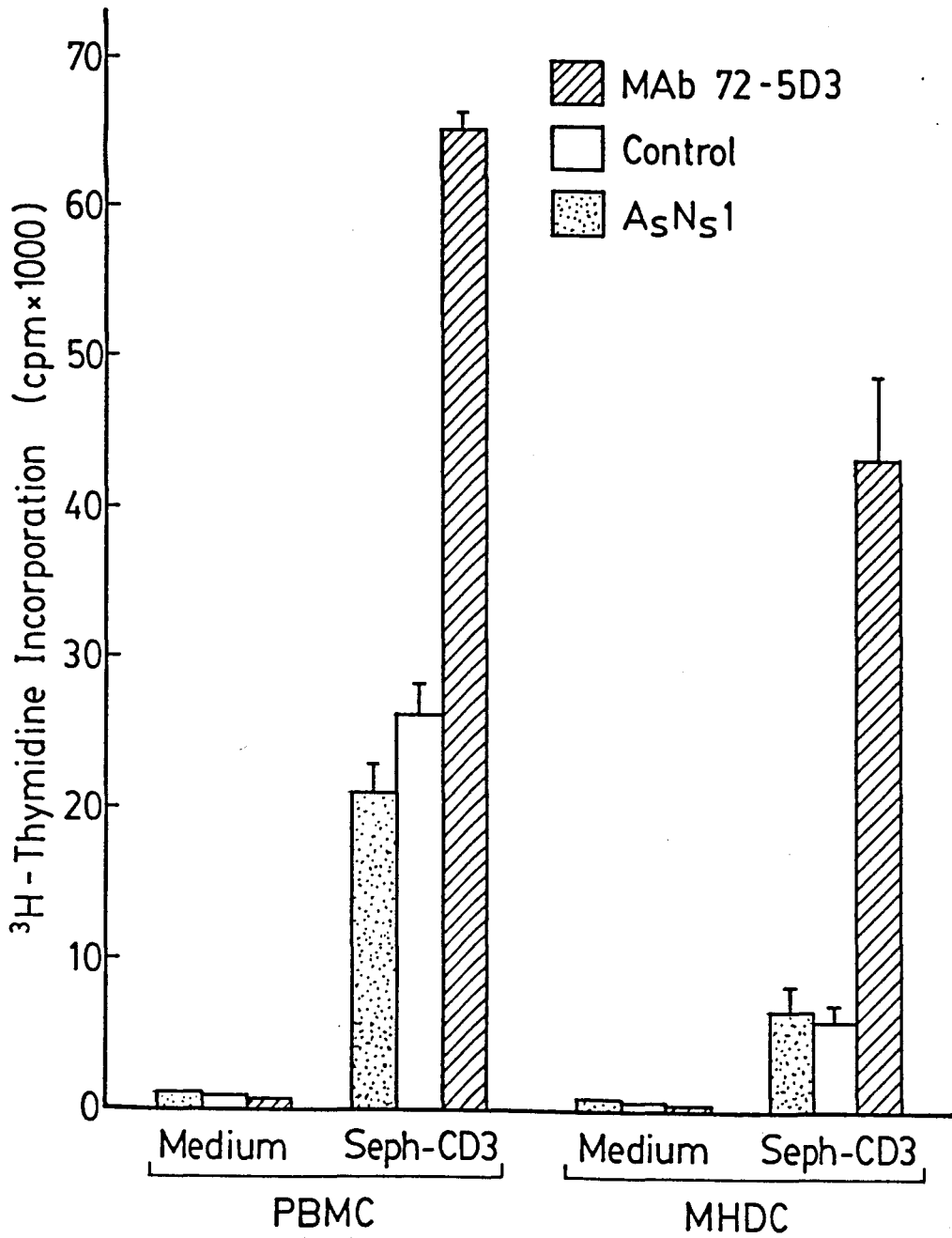


Fig. 19 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45), 10 µg/ml, en la mitogénesis de PBMC y de MHDC inducida por Seph-CD3 medida a 48 h.

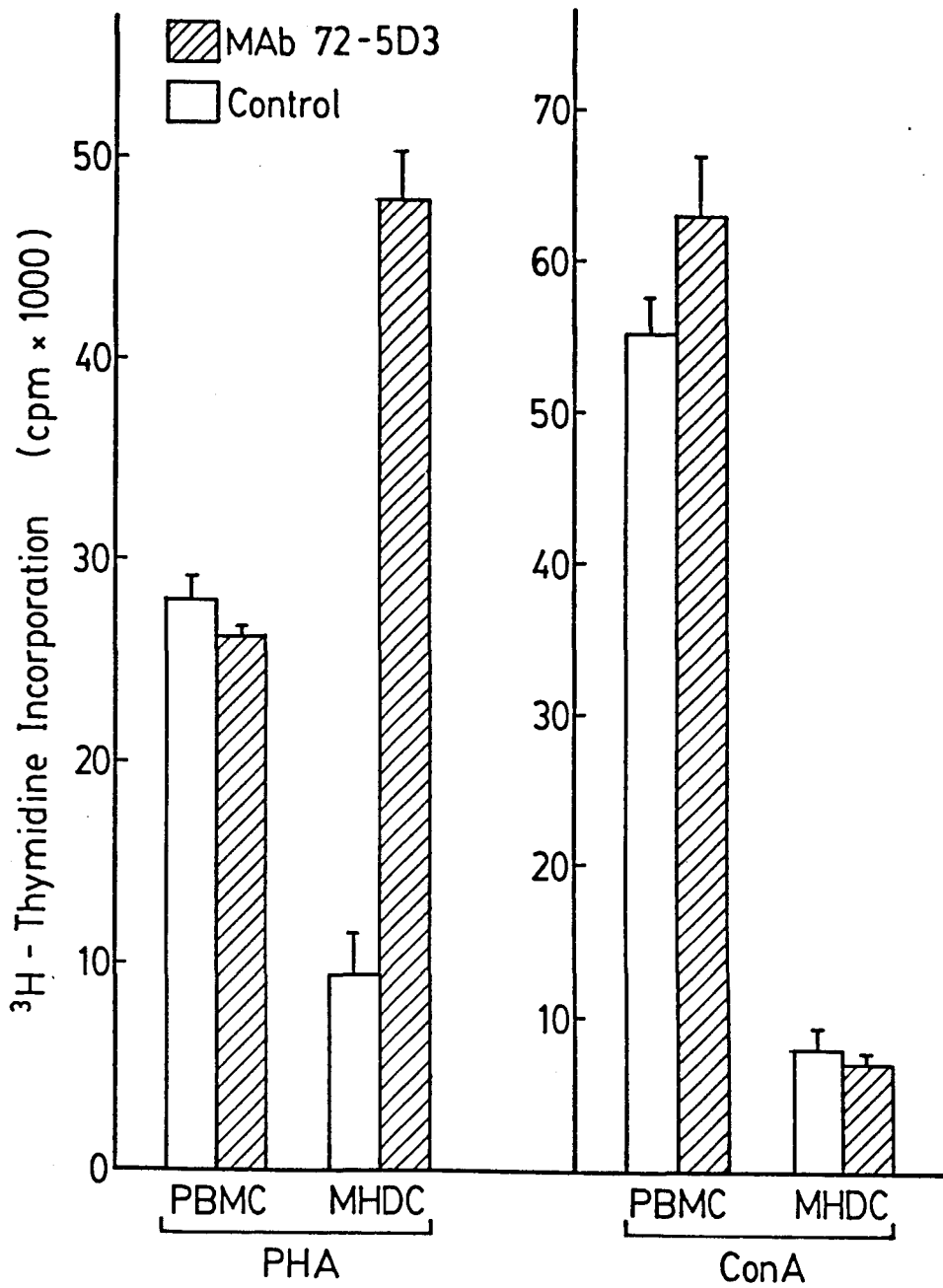


Fig. 20 - Estudio comparativo del efecto del Acm 72-5D3 (CD45), 10 µg/ml, en la mitogénesis de PBMC y de MHDC inducida por PHA 10 µg/ml, y ConA 10 µg/ml, medida a 48 h.

Por el contrario el Acm 72-5D3 (CD45) al parecer si induce la proliferación celular en las MHDC estimuladas por PHA. Este efecto facilitador de la mitogénesis inducida por PHA ha mostrado ser de una intensidad muy variable de unos experimentos a otros, no siendo tan reproducible como el de la mitogénesis inducida por Seph-CD3 y no podemos descartar que sea dependiente del tipo de PHA utilizada.

La mitogénesis inducida por el Acm 72-5D3 (CD45) en MHDC estimuladas por Seph-CD3 es un fenómeno dosis dependiente, como puede observarse en la Fig. 21. Concentraciones de Acm 72-5D3 (CD45) de 10 ng ya son suficientes para inducir un aumento significativo de la proliferación celular.

4.4.2 Estudio comparativo entre el efecto del Acm 72-5D3 (CD45) y la PMA en la mitogénesis de MHDC, participación de la IL2:

Dado que el phorbol myristate acetate (PMA), había sido descrito como capaz de proporcionar la "segunda señal", necesaria para la proliferación de los linfocitos T (Rosenterich 1979), mediante la activación de la Protein kinasa. Existía la posibilidad de que el Acm 72-5D3 (CD45) actuase por un mecanismo similar.

Para descartar esta posibilidad, decidimos emprender un estudio comparativo entre los efectos sobre la mitogénesis de la PMA y el Acm 72-5D3 (CD45). Los resultados obtenidos pueden observarse en la Fig. 22. Se muestra que en MHDC la PMA (a las dosis utilizadas), por si sola, es incapaz de inducir mitogénesis. En esta población celular el Acm 72-5D3 (CD45) es incapaz de inducir mitogénesis ni aun en presencia de PMA o rIL-2.

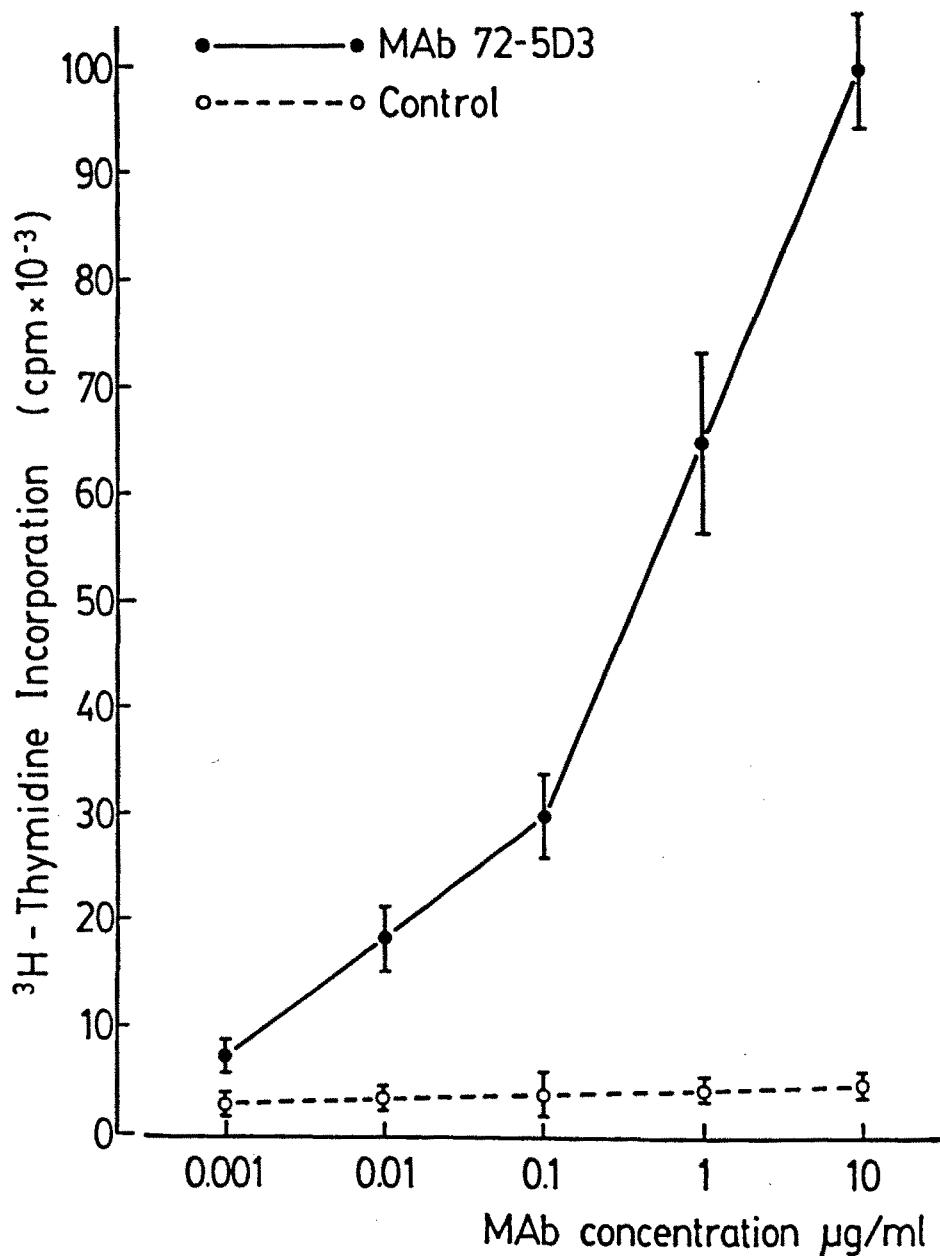


Fig. 21 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45), a diferentes concentraciones, en la mitogénesis de MHDC inducida por Seph-CD3, medida a 48 h.

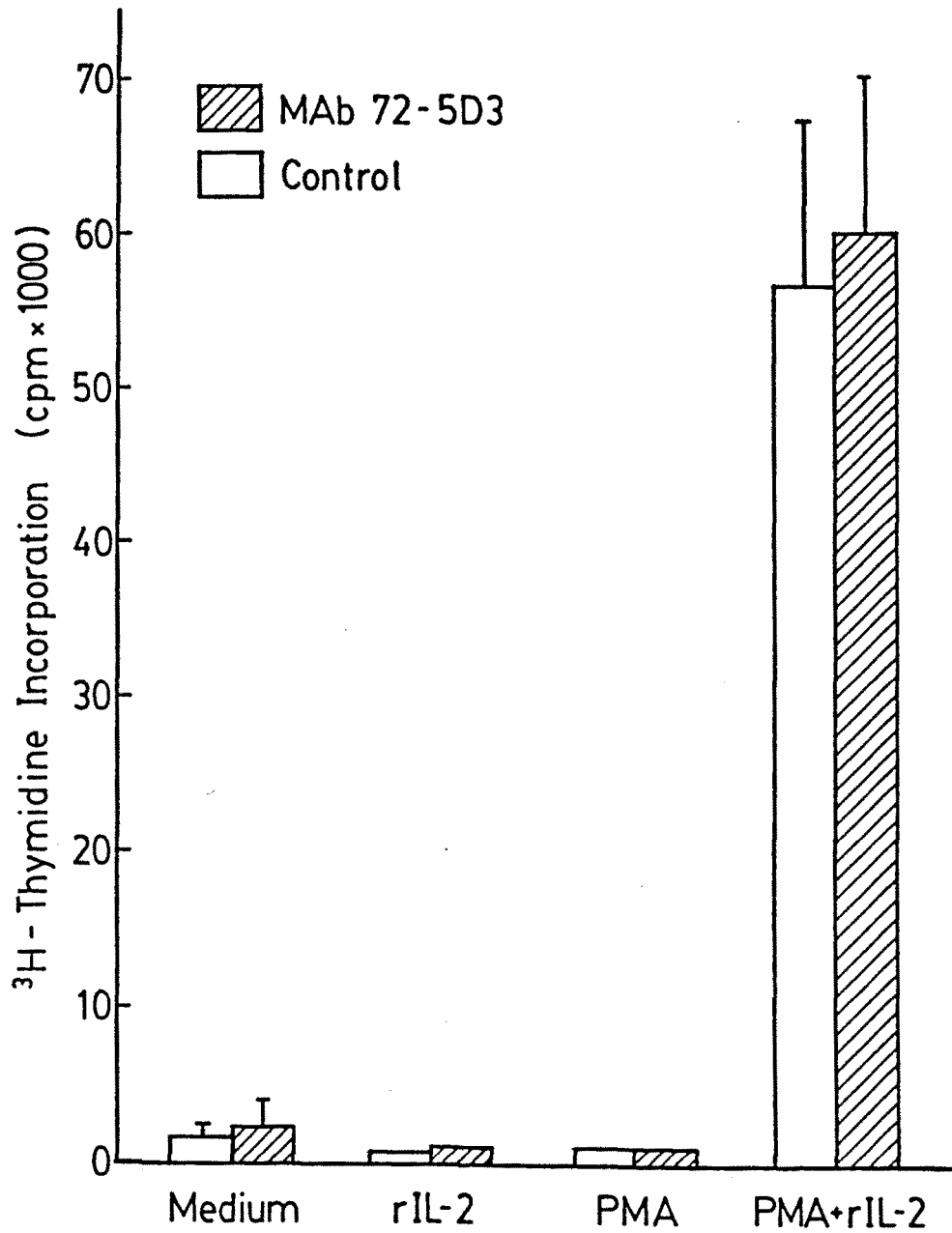


Fig. 22 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45), 10 μ g/ml, en la mitogénesis de MHDC inducida por PMA 10 ng/ml, rIL-2 20 ng/ml, y de ambas conjuntamente, medida a 48 h.

Por el contrario la activación de MHDC en presencia de PMA y rIL-2 aumenta extraordinariamente la mitogénesis. Incluso en ausencia de Acm 72-5D3 (CD45).

Este experimento, marca una diferencia importante entre la "segunda señal" proporcionada por la PMA y la proporcionada por el Acm 72-5D3 (CD45), mientras que la PMA es capaz de inducir en las MHDC la capacidad de responder a la rIL-2, induciendo receptores para la IL-2 según ha sido descrito (Holters 1985) (Shakelford 1987) (Isakov 1987). El Acm 72-5D3 (CD45) es incapaz de inducir esta capacidad de responder. Por lo tanto no se induce proliferación cuando Acm 72-5D3 (CD45) y rIL-2 son utilizados conjuntamente en cultivos de MHDC.

Las anteriores diferencias entre PMA y el Acm 72-5D3 (CD45) quedaron confirmadas por el hecho de que, si bien la PMA puede proporcionar la "segunda señal" induciendo la mitogénesis en las MHDC activadas por Seph-CD3, Fig. 23, la adición del Acm 72-5D3 (CD45) mostró tener un efecto aditivo al de la PMA.

En contraste con este fenómeno, la Fig. 23, muestra que tanto en las MHDC estimuladas por Seph-CD3, como en las estimuladas por Seph-CD3 más PMA, la adición de rIL-2 aumentó significativamente la mitogénesis. En este caso por el contrario el Acm 72-5D3 (CD45) no mostró tener ningún efecto aditivo.

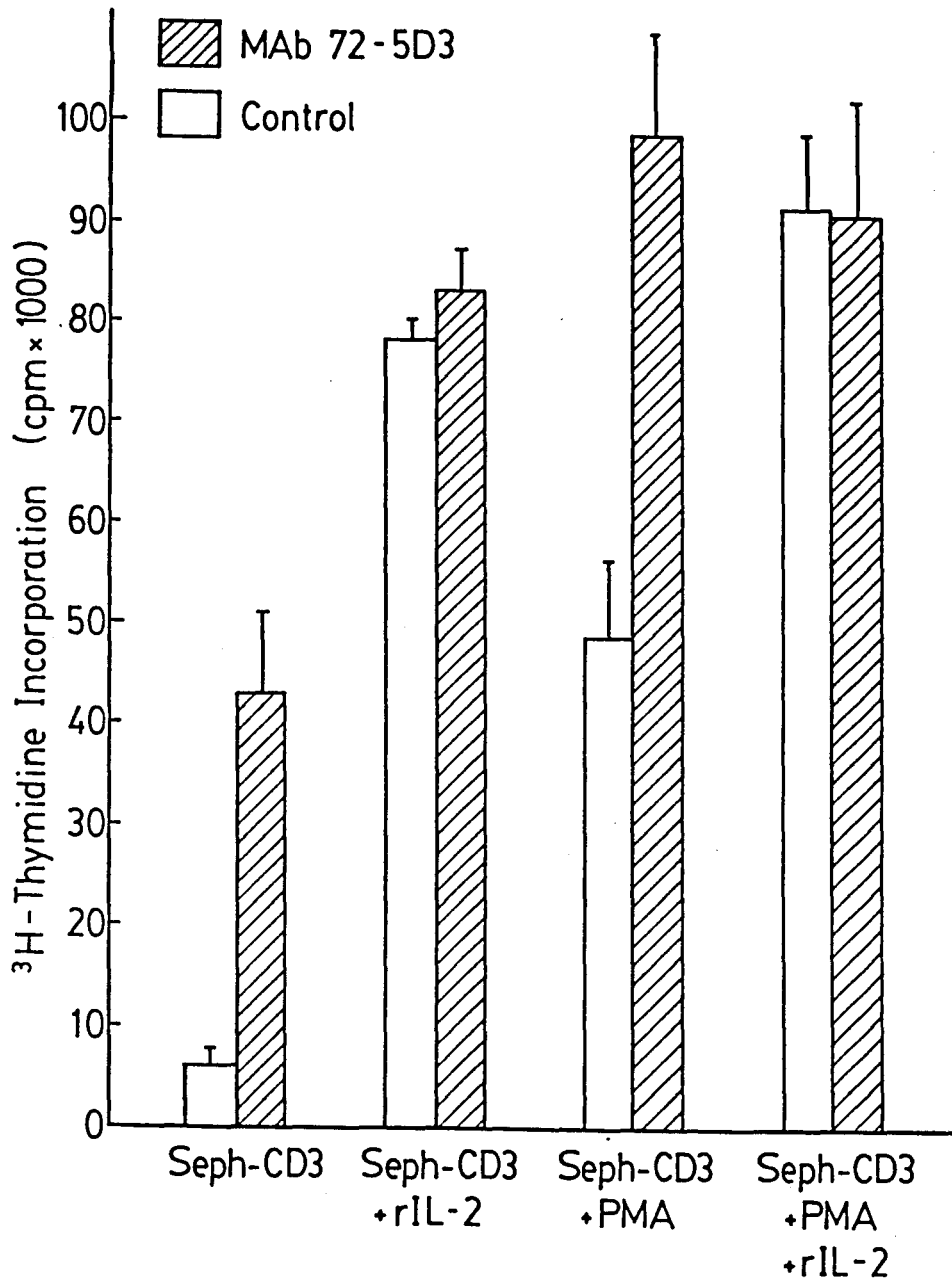


Fig. 23 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45), 10 μ g/ml, en la mitogénesis de MHDC inducida por Seph-CD3 en presencia de PMA 10 ng/ml, y de rIL-2 20 ng/ml, medida a 48 h.

4.4.3 Síntesis de RNA en MHDC y participación del Acm 72-5D3 (CD45):

Dado que algunos autores (Ledbetter 1985), habían descrito el efecto inhibitorio de los monocitos, sobre los efectos "in vitro" de algunos Acm. Decidimos descartar la posibilidad de que el Acm 72-5D3 (CD45), que ya habíamos determinado no inducía la síntesis de RNA en presencia de monocitos, si lo hiciera en ausencia de estos.

Tal como puede comprobarse en la Fig. 24, el Acm 72-5D3 (CD45) no fue capaz de inducir por si solo la síntesis de RNA en MHDC.

Se confirma para las MHDC el efecto facilitador de la síntesis de RNA de MHDC activadas por Seph-CD3, que ya hemos descrito en experimentos anteriores para las PBMC.

4.4.4 Estudio de las subpoblaciones celulares implicadas en el efecto mitogénico del Acm 72-5D3 (CD45) en MHDC activadas por Seph-CD3:

Las subpoblaciones linfocitarias definidas por los Acm CD4 y CD8 tienen además de diferencias en su función, colaboradora o citotóxica, unos distintos requerimientos para su activación respecto de la clase de antígenos de histocompatibilidad en el contexto de la cual son capaces de reconocer al antígeno. HLA clase II para la colaboradoras y clase I para la citotóxicas. Esto implica la posibilidad de que los requerimientos para ser activadas sean así mismo distintos (Goronzy 1987) (Emmrich 1986). Existen además, experimentos que inducen a sospechar que el tipo de señales recibidas durante su activación determine su posterior actividad funcional (Eimasry 1986).

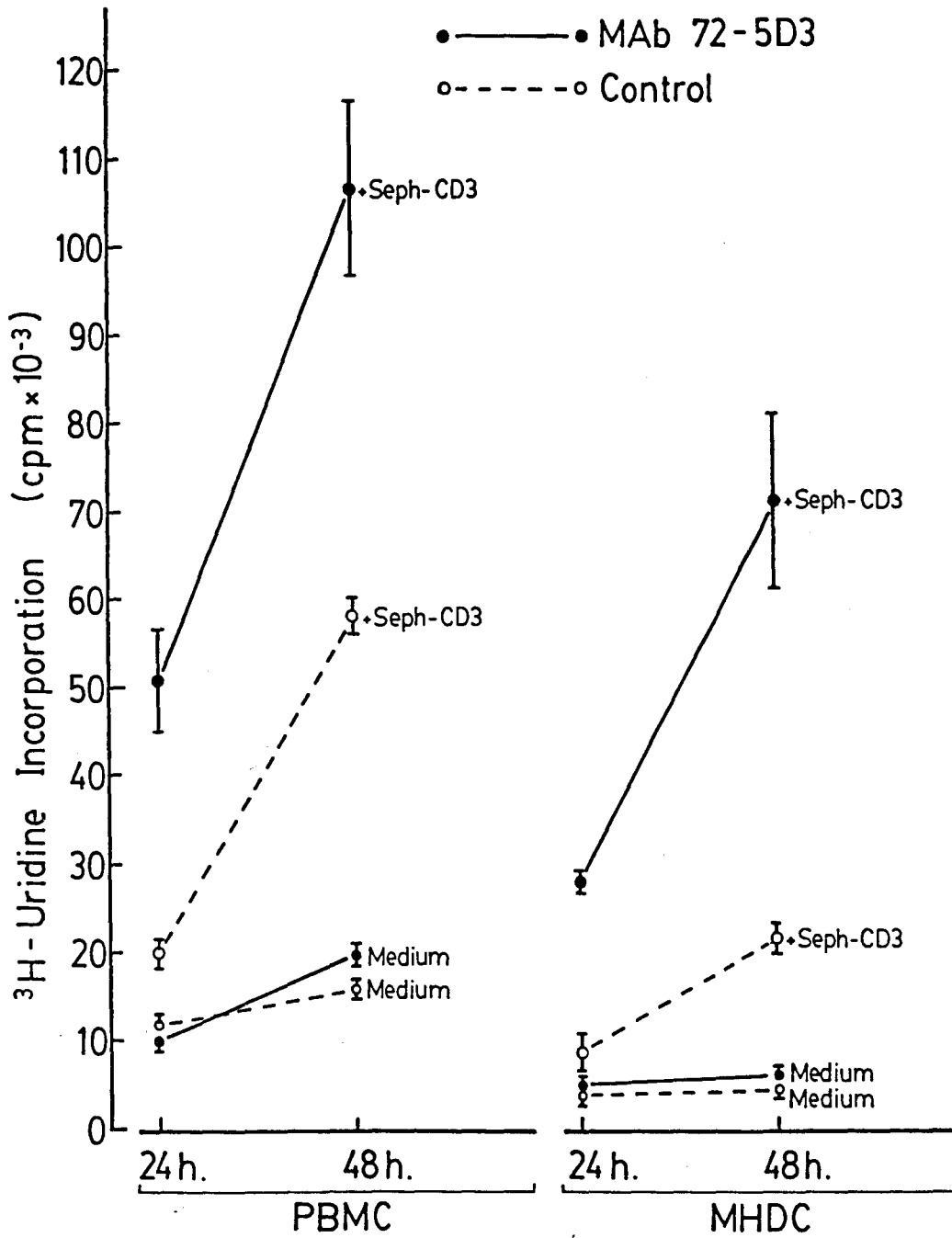


Fig. 24 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en la síntesis de RNA de MHDC y de PBMC en presencia o ausencia de Seph-CD3.

Con la finalidad de determinar cuales eran las subpoblaciones celulares sensibles al efecto facilitador de la mitogénesis, inducido por el Acm 72-5D3 (CD45), decidimos estudiar el efecto de este Acm sobre linfocitos T4+ y sobre linfocitos T8+. Para ello purificamos estas subpoblaciones celulares a partir de MHDC tal y como se describe en el apartado de material y métodos.

En la Fig. 25 puede observarse que el Acm 72-5D3 (CD45), indujo mitogénesis en la población T4+ estimulada con Seph-CD3, pero no en la T8+ estimulada con Seph-CD3, la población T4+ T220- (CD4+ CD45R-) mostró también ser sensible al efecto facilitador del Acm 72-5D3 (CD45) aunque, proporcionalmente, menos intensamente que la población T4+ total.

La especificidad para las células T4+ del efecto del Acm 72-5D3 (CD45), juntamente con los datos de otros autores (Palacios 1982) (Solbach 1982) en el sentido que las células T4+ eran las principales secretoras de rIL-2, indujeron a pensar en la posibilidad de que el efecto del Acm 72-5D3 (CD45) se debiera a un aumento en la producción de IL-2.

Si bien es cierto que las células T8+ también pueden producir IL-2, en determinadas condiciones (Inaba 1987) (Andrus 1984), su eficacia al parecer es inferior a la de las T4+.

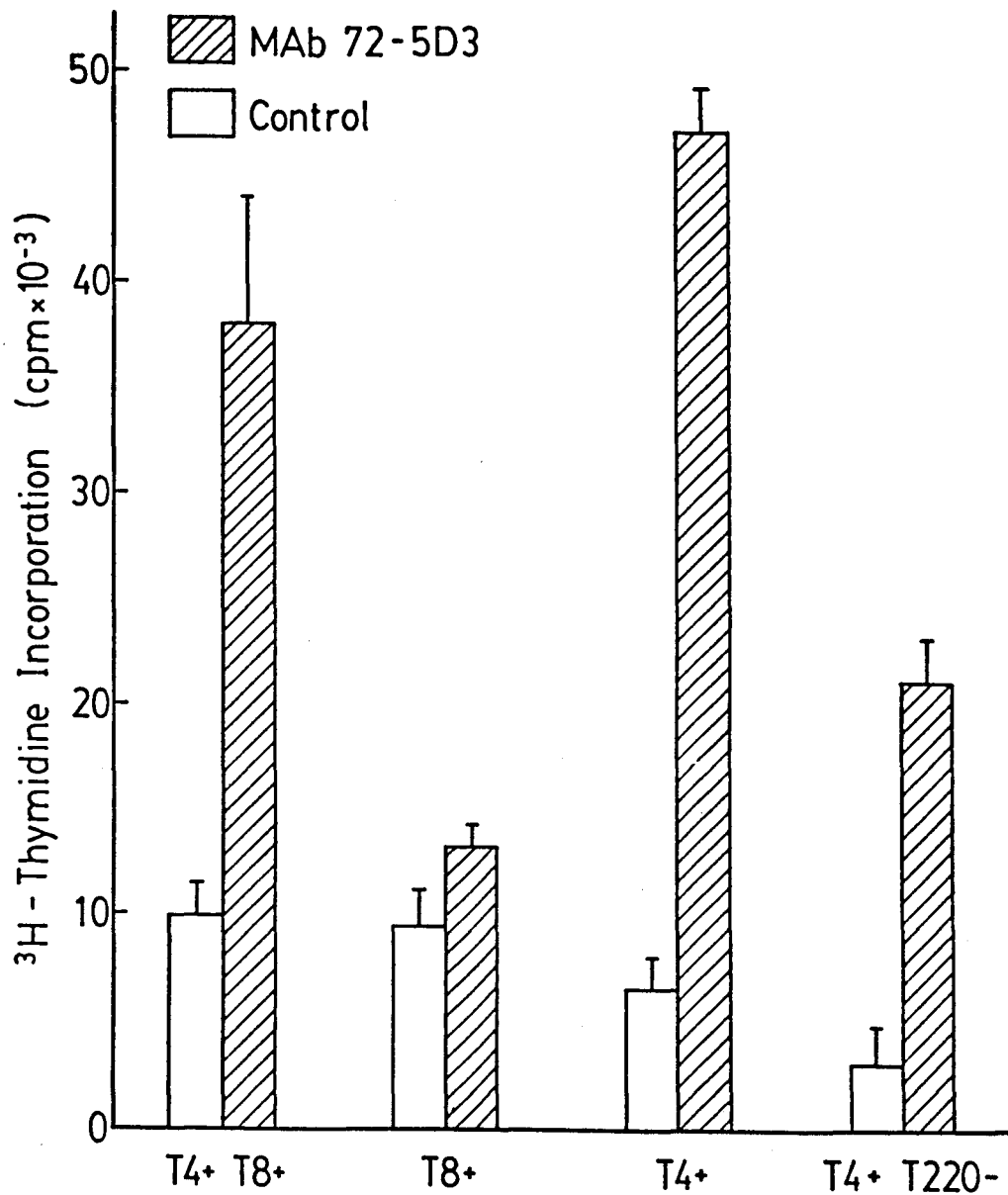


Fig. 25 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45), 10 μ g/ml, en la mitogénesis inducida por Seph-CD3 en diferentes subpoblaciones celulares, medida a 48 h.

4.4.5 Conclusiones parciales:

- 1) La Seph-CD3 es incapaz por si sola de inducir mitogénesis en MHDC.
- 2) El Acm 72-5D3 (CD45) puede substituir la "segunda señal" necesaria para inducir la mitogénesis de MHDC estimuladas con Seph-CD3,
- 3) La "segunda señal" proporcionada por el Acm 72-5D3 (CD45) y la PMA, utilizan mecanismos distintos.
- 4) El Acm 72-5D3 (CD45) solo es capaz de inducir la mitogénesis en la subpoblación T4+ pero no en la T8+.

4.5 CARACTERIZACION DEL EFECTO FACILITADOR DEL Acm 72-5D3 COMO UN FENOMENO COMUN A TODOS LOS Acm DEL GRUPO CD45

4.5.1 Efecto facilitador de la mitogénesis de 11 Acm del grupo CD45:

En los experimentos desarrollados hasta el momento habíamos utilizado el Acm 72-5D3. Este Acm reconoce un epítope contra el cual reaccionan solo una minoría de los Acm CD45 (Hale 1987). Existía pues la posibilidad que el efecto funcional descrito con el Acm 72-5D3 fuese propio de este Acm, o en todo caso de los Acm que reconocen su mismo epítope.

Para descartar esta posibilidad, solicitamos diferentes Acm asignados al grupo CD45 durante el "III international workshop on leucocyte differentiation antigens", obtenidos por diferentes investigadores. Con ello pretendíamos determinar si los Acm asignados como CD45 dirigidos contra diferentes epítopes poseían la misma actividad funcional que 72-5D3 (CD45). Recibimos Acm dirigidos contra todos los epítopes descritos (P, Q, R, S y T), y que habían sido identificados durante los trabajos de "workshop" por G. Hale. (Hale 1987). Pertenecían a diferentes isotipos de inmunoglobulinas y procedían de diferentes autores.

Los Acm recibidos, fueron convenientemente dializados (para eliminar los conservantes) y ajustados a concentraciones finales aproximadas de 10 µg/ml.

El efecto de estos Acm en la mitogénesis de MHDC o PBMC activadas por Seph-CD3 puede observarse en la Tabla I. Los resultados obtenidos muestran que todos los Acm del grupo CD45 estudiados, indujeron la mitogénesis de

MHDC activadas por Seph-CD3 y aumentaron la mitogénesis de PBMC activadas de la misma forma.

Estos datos confirmaban que el hallazgo funcional identificado con el Acm 72-5D3, era extrapolable a todos los Acm del grupo CD45 estudiados, fuera cual fuese el epitopo con el que reaccionaban o el isotipo de inmunoglobulina al que pertenecían.

Estos datos nos permite afirmar que muy probablemente todos los Acm del grupo CD45 poseen esta propiedad funcional.

4.5.2 Conclusiones parciales:

1) Todos los Acm del grupo CD45 estudiados, pertenecientes a diferentes isotipos y dirigidos contra diferentes epítomos, poseen la capacidad de proporcionar la "segunda señal" necesaria para la mitogénesis linfocitaria.

DIFERENTES Acm CD45 EN MHDC Y PBMC ACTIVADAS POR Seph-CD3

Acm	subclase Ig	3H Thymidina cpmx10 \pm S.D.		Origen
		MHDC	PBMC	
BMAC1	G1	73.6 \pm 8.7	92.5 \pm 3.9	Dalchau
Anti-H1e-1	G1	9.7 \pm 0.8	74.8 \pm 5.8	Beverley
9.4	G2a	30.1 \pm 1.3	48.9 \pm 1.2	Martin
VIT 200	G2a	26.2 \pm 3.2	59.2 \pm 9.5	Knapp
YTH24.5	G2b	62.6 \pm 3.6	65.0 \pm 4.1	Hale,Waldman
YTH54.12	G2b	66.2 \pm 4.7	75.1 \pm 7.2	Hale,Waldman
F10-89-4	G2a	9.7 \pm 0.8	74.8 \pm 5.8	Dalchau
S-80	ND	70.6 \pm 5.0	80.7 \pm 2.3	Pesando
B MAC2	G1	35.2 \pm 6.3	78.0 \pm 2.6	Dalchau
B MAC3	G1	42.9 \pm 8.1	67.2 \pm 9.1	Dalchau
GRT2	G1	8.9 \pm 0.3	78.4 \pm 2.9	Garrido
72-5D3	G2a	66.8 \pm 1.4	82.0 \pm 5.6	Vilella
Controles:				
Ascites NS1		1.7 \pm 0.1	30.1 \pm 3.4	
33-3B3(CDw44)	G2a	1.6 \pm 0.6	33.5 \pm 2.2	Vilella
68-5A5(CD18b)	G2a	1.2 \pm 0.4	29.6 \pm 0.5	Vilella

TABLA I

4.6 EFECTO DE LOS Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) EN LA SECRECIÓN DE IL-2 DE CELULAS ACTIVADAS POR Seph-CD3.

4.6.1 Quantificación de la IL-2 en los sobrenadantes de PBMC Y MHDC activadas por Seph-CD3 y el Acm 72-5D3 (CD45) Y Cris-1 (CD5).

Algunos de los experimentos presentados apuntaban la posibilidad, de que tanto el Acm 72-5D3 (CD45) como el Acm Cris-1 (CD5), indujesen la mitogénesis de células altamente deplecionadas de monocitos activadas por Seph-CD3 actuando sobre la secreción de IL-2. Era preciso intentar demostrar experimentalmente esta hipótesis. Para ello estudiamos el efecto producido por estos dos Acm sobre la producción de IL-2, tanto de MHDC como de PBMC activadas por Seph-CD3 durante 24 horas.

La IL-2 secretada, fue cuantificada, mediante un ensayo biológico sobre una línea celular de ratón (Gillis 1978), la cual depende de la presencia de IL-2 para su crecimiento.

El Acm 72-5D3 (CD45) indujo la secreción de IL-2 en MHDC activadas por Seph-CD3 Tabla II. Lo mismo ocurrió con el Acm Cris-1 (CD5). Ambos anticuerpos además aumentaron la secreción de IL-2 de PBMC activadas por Seph-CD3.

Como cabía esperar ninguno de ellos fue capaz de iniciar por sí mismo la secreción de IL-2, en ausencia de Seph-CD3.

Este hallazgo concordaba con todos los experimentos anteriores y nos permitía afirmar que, el efecto facilitador de la mitogénesis proporcionado por los Acm CD45 era, por lo menos en parte, mediado a través de un aumento en la secreción de IL-2.

En definitiva pues los Acm del grupo CD45 pueden conferir a la célula activada por Seph-CD3 una "segunda señal" que induce la secreción de IL-2 y permite una proliferación de estas células independiente de los monocitos.

4.6.2 Conclusiones parciales:

- 1) Los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5), inducen la secreción de IL-2 de MHDC activadas por Seph-CD3.
- 2) Los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5), aumentan la secreción de IL-2 de PBMC activadas por Seph-CD3.

SECRECIÓN DE IL-2 POR MHDC Y PBMC ACTIVADAS POR Seph-CD3
y Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5)

Producción de IL-2 en ng/10⁶ células

Acm	MHDC	MHDC+Seph-CD3	PBMC	PBMC+Seph-CD3
Control	<0.04	<0.04	<0.04	0.15 ± 0.03
72-5D3	<0.04	0.21 ± 0.04	<0.04	0.56 ± 0.06
Cris-1	<0.04	0.21 ± 0.04	<0.04	0.87 ± 0.06

TABLA II

4.7 ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LOS EFECTOS DE LOS Acm 72-5D3 (CD45) Y Cris-1 (CD5)

Dado que ya conocíamos, por experimentos presentados anteriormente, y por la literatura (Lebdecker 1985), la participación de los Acm CD5 en la activación de los linfocitos T, decidimos determinar si las señales proporcionadas a los linfocitos por los Acm CD45 y CD5 eran funcionalmente equivalentes, tanto en su capacidad de activar la mitogénesis en ausencia de monocitos, como en su interacción con la PMA y la IL-2, como en su efecto diferencial sobre las subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8.

4.7.1 Estudio comparativo entre Acm 72-5D3 (CD45) y Acm Cris-1 (CD5) en la mitogénesis inducida por diferentes mitógenos.

En primer lugar comparamos el efecto de Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) en la mitogénesis de células deplecionadas de monocitos activadas por diferentes mitógenos.

Como era de esperar por experimentos anteriores, tanto Seph-CD3 como PHA como ConA, resultaron incapaces de inducir la mitogénesis de células mononucleares de sangre periférica altamente deplecionadas de monocitos.

La presencia de los Acm 72-5D3 (CD45) o Cris-1 (CD5) activó la mitogénesis de estas poblaciones, cuando los mitógenos utilizados fueron Seph-CD3 o PHA pero no cuando se utilizó ConA, Fig. 26.

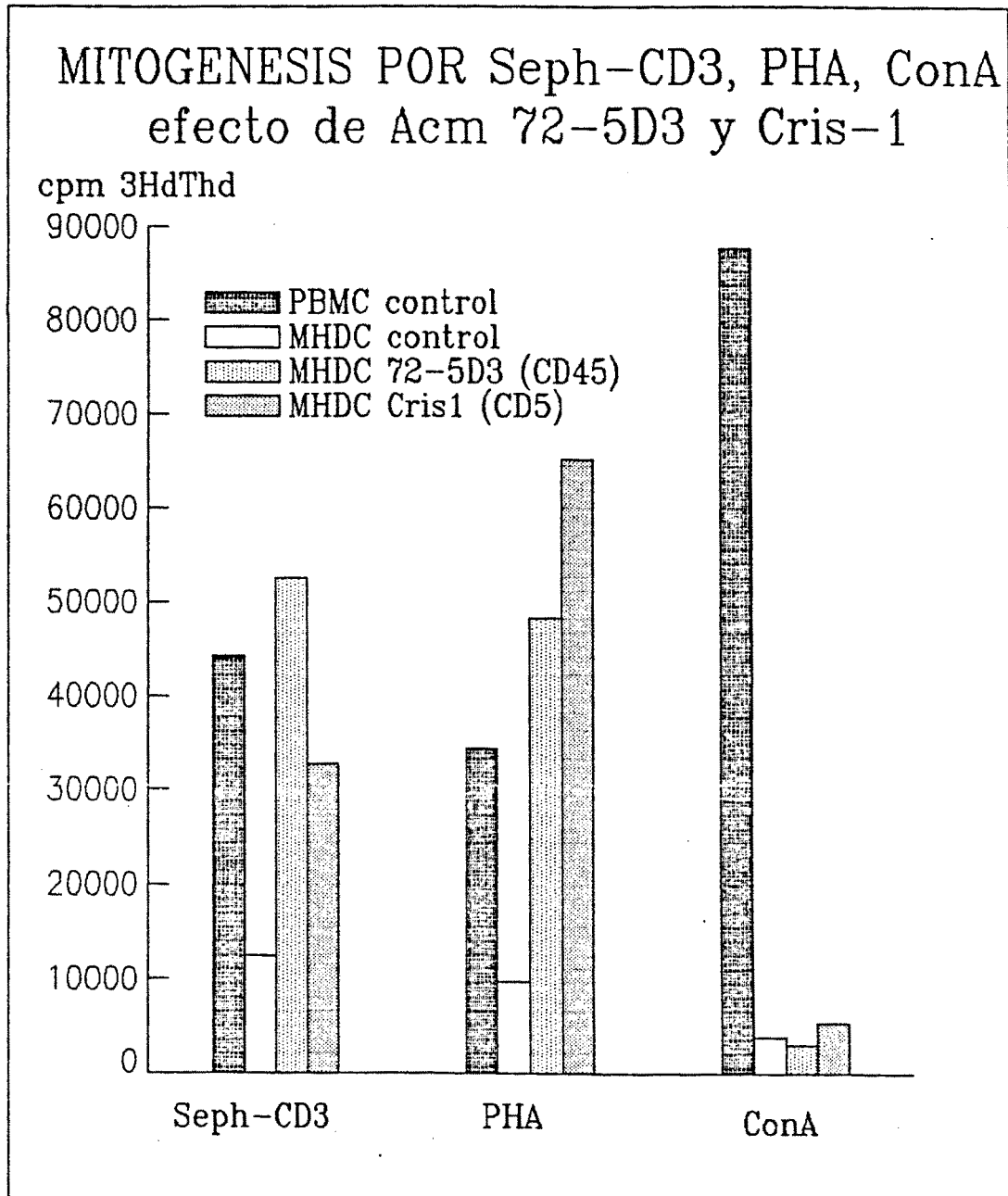


Fig. 26 - Estudio comparativo del efecto de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en la mitogénesis de MHDC inducida por Seph-CD3 5000 esferas/pocillo, PHA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y ConA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, medida a 48 h.

Para explicar este efecto diferencial entre la dos lectinas PHA y ConA, no tenemos aun una hipótesis definida, pero en principio parece apuntar a que los requerimientos de "segundas señales" de ambas lectinas serian diferentes.

Merece resaltarse que el efecto facilitador de ambos Acm en la mitogénesis por PHA es cuantitativamente muy variable de unos experimentos a otros, a diferencia del efecto sobre la mitogénesis inducida por Seph-CD3 que es cuantitativamente mucho más reproducible.

4.7.2 Estudio comparativo entre Acm 72-5D3 (CD45) y Acm Cris-1 (CD5) participación de IL-2, PMA y Ionomicina:

Como hemos descrito para el Acm 72-5D3 (CD45), el Acm Cris-1 (CD5) no fue mitogénico en presencia de PMA o de rIL-2. Sin embargo ambos Acms aumentaron la mitogénesis de MHDC inducida Seph-CD3+PMA. Ello indica en principio que los mecanismos de activación utilizados por la PMA son distintos de los utilizados por ambos Acms.

La adición de rIL-2 incrementó, significativamente, la mitogénesis de MHDC+Seph-CD3 en ausencia de cualquier otro tipo de señal (control en Fig. 27).

En la situación MHDC+Seph-CD3+rIL-2, ni el Acm 72-5D3 (CD45), ni tampoco el Acm Cris-1 (CD5) aumentaron significativamente la mitogénesis con respecto de la inducida en el control.

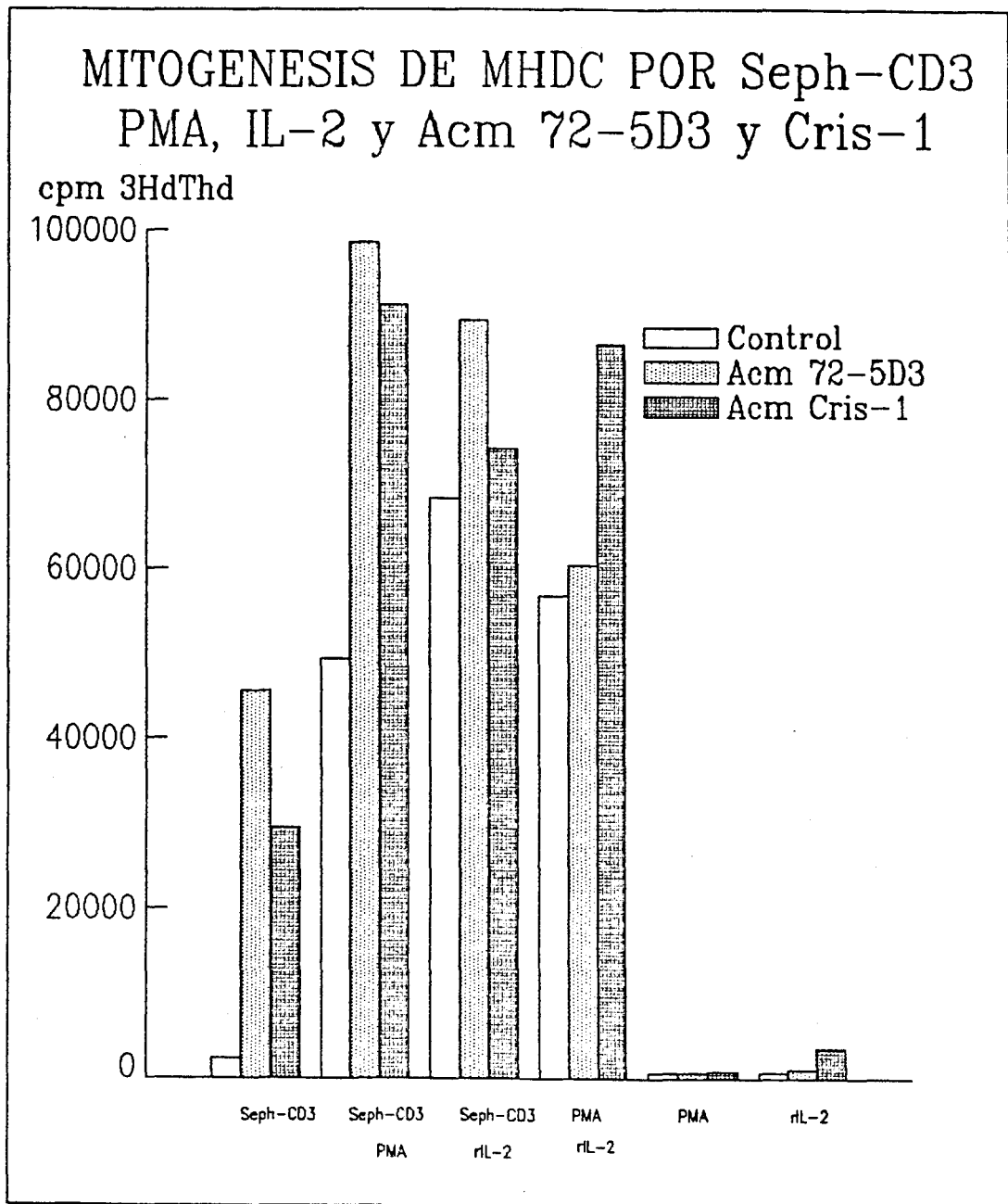


Fig. 27 - Estudio comparativo del efecto de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5), 10 µg/ml, en la mitogénesis de MHDC inducida por Seph-CD3 5000 esferas/pocillo, efecto de la presencia PMA 10 ng/ml, y de rIL-2 20 ng/ml, mitogénesis medida a 48 h.

Este dato va en contra de que el efecto de ambos Acm en este modelo se produzca por un aumento en la expresión de receptores por la IL-2. Favorece en cambio la hipótesis de que estos dos Acms actúen incrementando la secreción de IL-2.

Parece oportuno resaltar aquí que tanto el Acm 72-5D3 (CD45) como el Acm Cris-1 (CD5), no actúan como la IL-2, dado que está en presencia de PMA induce mitogénesis, hecho que no ocurre con ninguno de los dos Acm en estudio.

A continuación decidimos comparar el efecto de ambos Acm en MHDC en las cuales se había inducido un incremento de Ca⁺⁺ intracelular por medio de la Ionomicina.

En la Fig. 28, puede observarse que ni el Acm 72-5D3 (CD45) ni el Acm Cris-1 (CD5), indujeron la mitogénesis de MHDC más Ionomicina sola o en presencia de rIL-2 exógena.

Como era de esperar la combinación de Ionomicina+PMA, sí que se mostró como altamente mitogénica (Koretzy 1983). Ninguno de los dos Acm en estudio produjo en este modelo modificación alguna de la mitogénesis.

4.7.3 Sinergia de Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) en la activación por Seph-CD3 :

Para determinar si las señales proporcionadas por los Acms 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) resultaban acumulativas, decidimos estudiar el efecto de ambos Acm a diferentes concentraciones en la mitogénesis inducida por Seph-CD3 en MHDC.

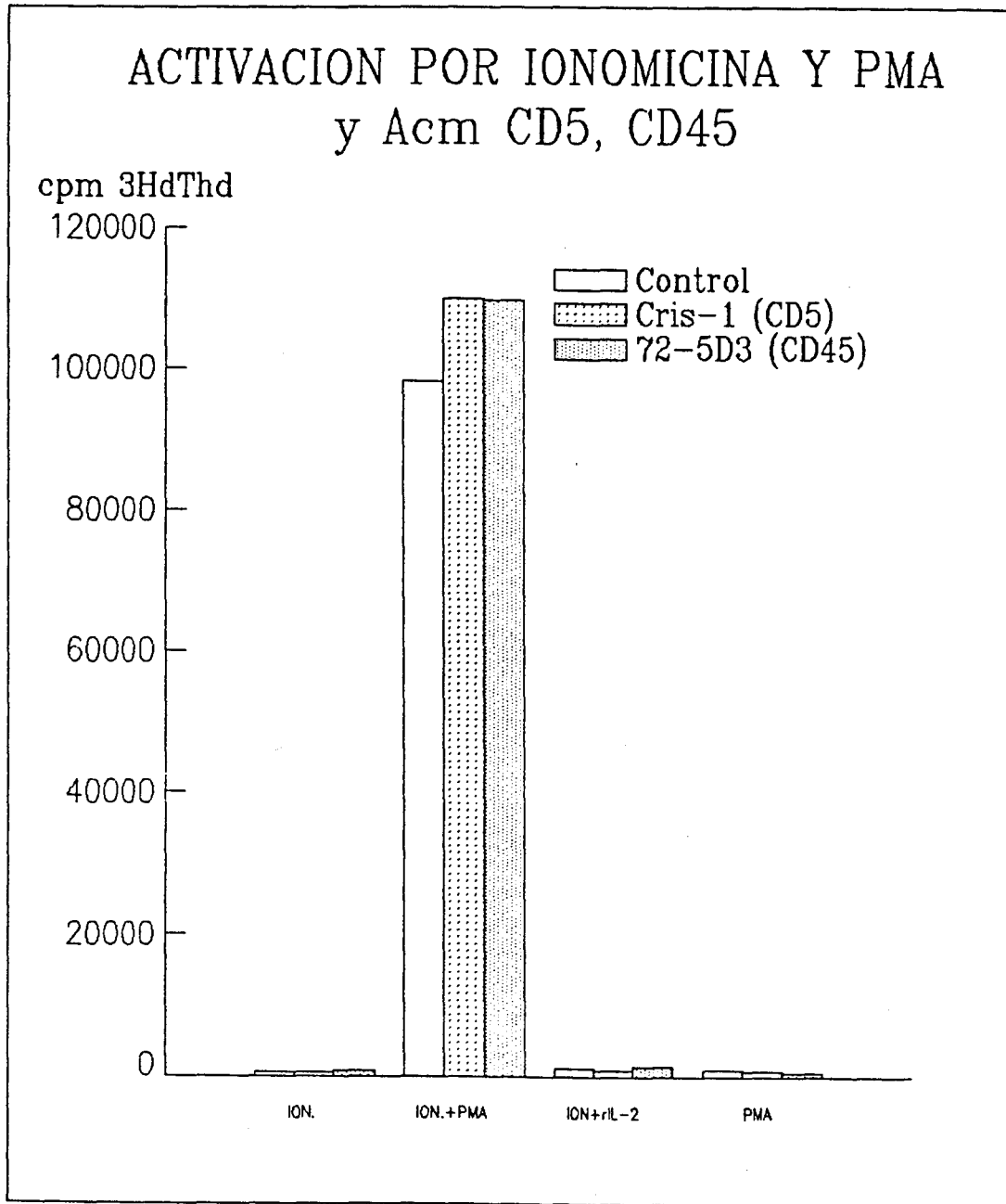


Fig. 28 - Estudio comparativo del efecto de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5), 10 µg/ml, en la mitogénesis de MHDC inducida por Ionomicina 10 µg/ml, efecto de la PMA 10 ng/ml, y de rIL-2 20 ng/ml, mitogénesis medida a 48 h.

Para ello realizamos curvas de concentración del Acm (desde 1 ng/ml hasta 1000 ng/ml). Utilizando los Acm por separado o conjuntamente.

Como puede observarse en la Fig. 29, el efecto facilitador de la mitogénesis para la misma concentración de Acm es similar para ambos Acm.

La utilización conjunta de ambos Acm a dosis sub-óptimas (de 10 ng/ml a 100 ng/ml) dio lugar a un efecto no solo sumatorio sino incluso sinérgico. Este hallazgo plantea la posibilidad de que a pesar de que los resultados sobre los diferentes tipos de mitogénesis son muy parecidos para ambos Acm, los mecanismos intracelulares utilizados sean distintos.

4.7.4 Estudio comparativo de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) sobre diferentes subpoblaciones de linfocitos T:

Con el fin de determinar la sensibilidad de las distintas subpoblaciones celulares a las señales proporcionadas a través de la molécula reconocida por los Acm CD5, decidimos estudiar el efecto del Acm Cris-1 (CD5) sobre las subpoblaciones linfocitarias T4+ y T8+ obtenidas a partir de células mononucleares de sangre periférica altamente deplecionadas de monocitos. Los resultados obtenidos, mostraron que tanto el Acm 72-5D3 (CD45) como el Acm Cris-1 (CD5), aumentaban solo la mitogénesis de la subpoblación T4+ pero no de la T8+, Fig. 30.

Por el contrario la adición de rIL-2 aumentó la mitogénesis tanto de la subpoblación T4+ como de la T8+ Fig. 30.

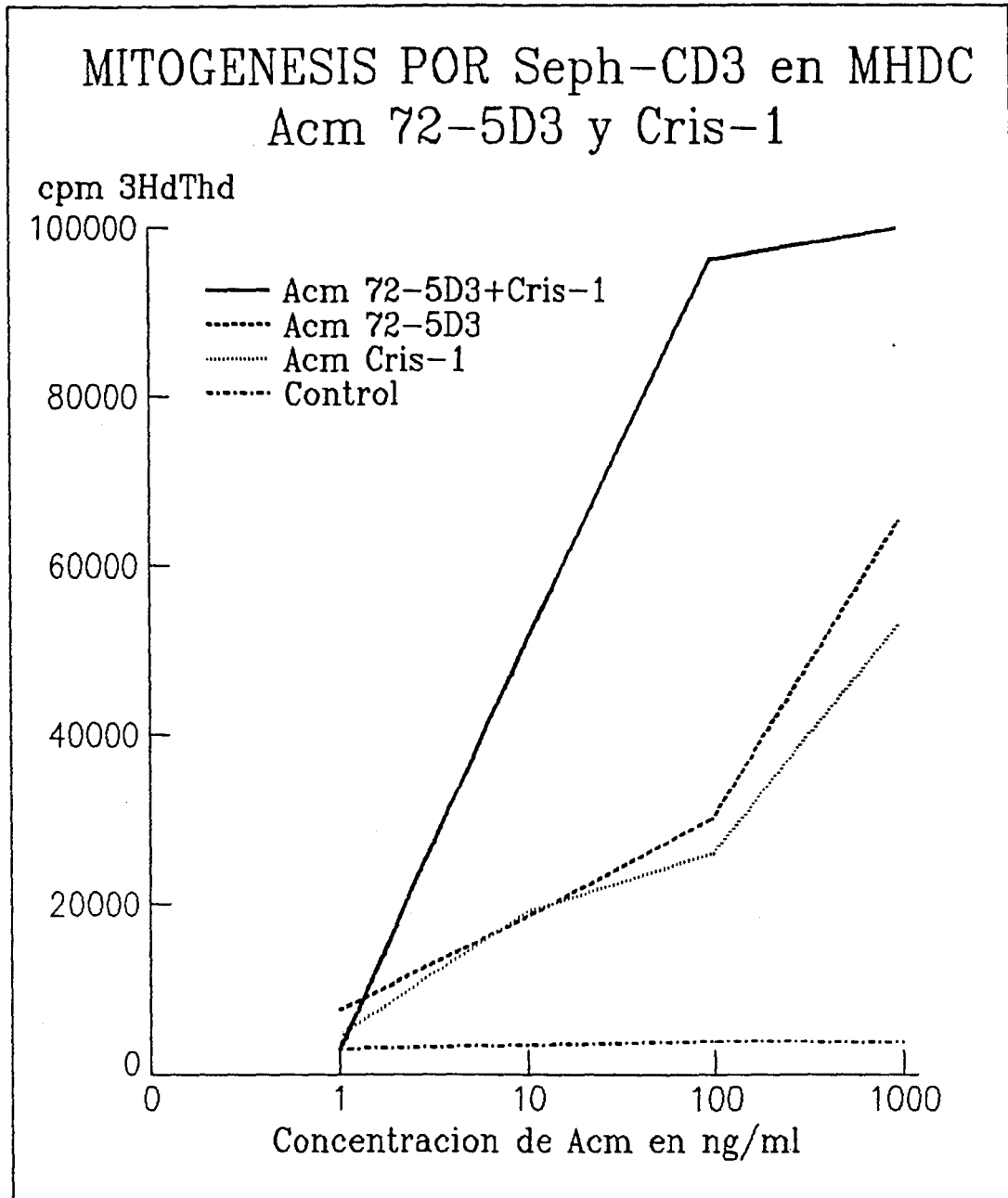


Fig. 29 - Estudio comparativo del efecto de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5), juntos o por separado, a diferentes concentraciones, en la mitogénesis de MHDC inducida por Seph-CD3, mitogénesis medida a 48 h.

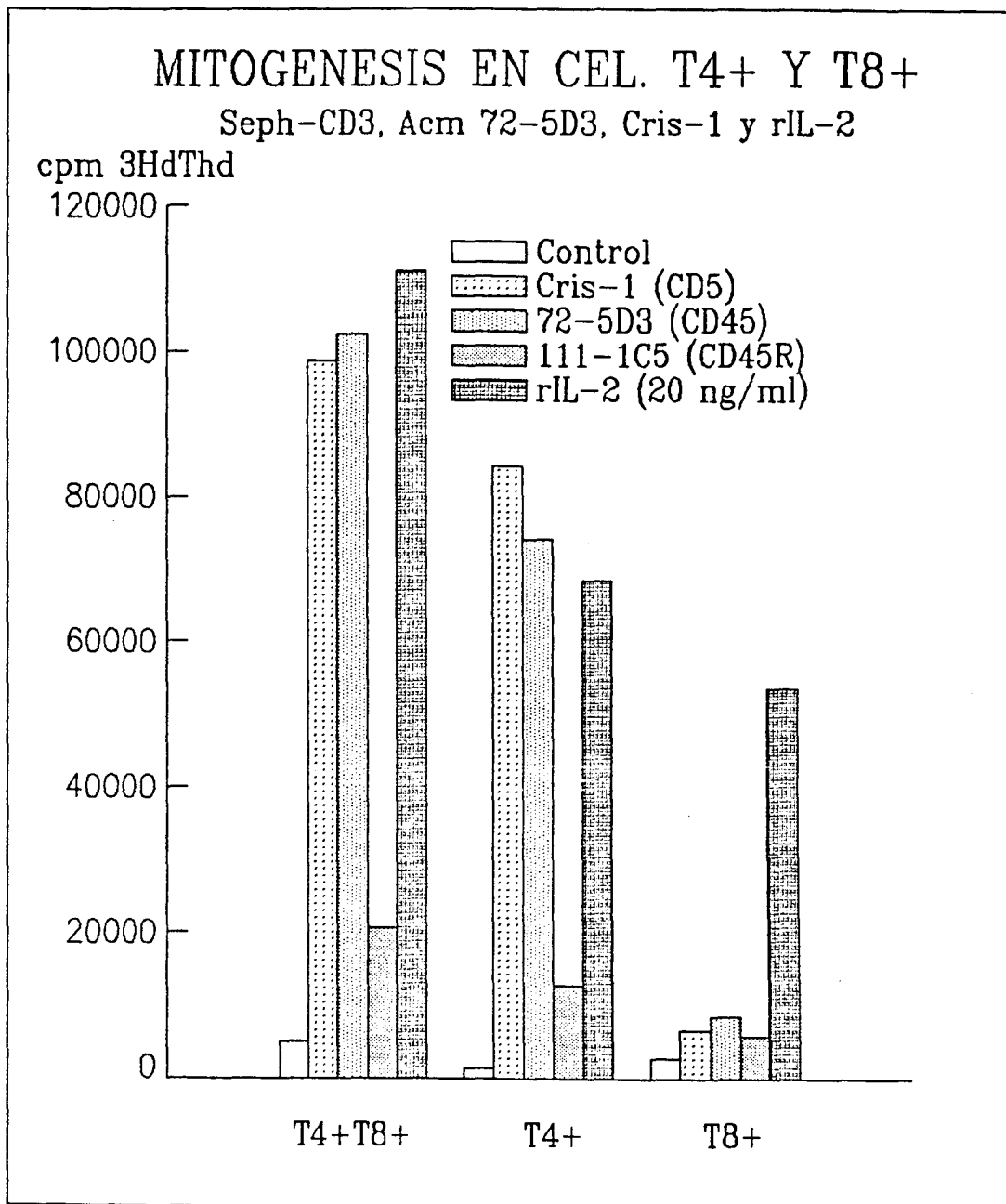


Fig. 30 - Estudio comparativo del efecto de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5), 10 μ g/ml, y de rIL-2 20 ng/ml, en la mitogénesis de diferentes subpoblaciones de linfocitos T MHDC inducida por Seph-CD3, mitogénesis medida a 48 h.

Ello indica que tanto la subpoblación T8+ como la T4+ activadas por Seph-CD3 en ausencia de monocitos tiene receptores funcionales para la rIL-2, y sugiere que la falta de proliferación de las T8+ en presencia de los Acm en estudio podría ser debida a las incapacidad de estas células para sintetizar suficientes cantidades de IL-2, por lo menos en las condiciones estudiadas, tal y como ya había sido sugerido por otros autores (Palacios 1982) (Solbach 1982).

A partir de esta fase del estudio decidimos introducir un nuevo Acm, el 111-1C5, dado que reconoce solo las dos cadenas más pesadas de la familia LCA-T200 es decir las de 205 y 220 kD. Este Acm fue asignado al grupo CD45-Restringido (CD45R) en el "III international workshop on leucocyte differentiation antigens" celebrado en Oxford 1986 (Cobbold 1987).

Como puede observarse este Acm mostró tener efectos funcionales distintos del Acm 72-5D3 (CD45) y del Acm Cris-1 (CD5). En la Fig 30 puede verse que el Acm 111-1C5 incrementó solo muy ligeramente la mitogénesis inducida por Seph-CD3 en la subpoblación T4+ pero no en la T8+.

El hecho de que el Acm 111-1C5 (CD45R), que reconoce dos cadenas comunes con el Acm 72-5D3 (CD45) la de 220 y 205 kD, tenga un efecto apenas perceptible sobre la mitogenesis, indica que probablemente no son estas dos cadenas las implicadas en el efecto funcional del Acm 72-5D3 (CD45). Si bien con estos datos no se puede descartar la posibilidad de que el efecto facilitador pueda ser proporcionado por las cuatro cadenas y que su activación sea epítome dependiente.

4.7.5 Estudio comparativo de los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5) en la síntesis de RNA:

Decidimos descartar la posibilidad de que la señal proporcionada por el Acm Cris-1 (CD5), pudiera inducir por si misma un aumento en la síntesis de RNA. Para ello incubamos PBMC o MHDC en presencia de los diferentes Acm en estudio y en presencia o ausencia de Seph-CD3.

Como puede observarse en la Fig. 31 y Fig. 32, en ausencia de Seph-CD3, ninguno de los Acm estudiados (incluido el 111-1C5 (CD45R)) incrementó significativamente la captación de uridina tritiada medida a las 24 o 48 horas.

Por el contrario en presencia de Seph-CD3 tanto el Acm 72-5D3 (CD45) como el Acm Cris-1 (CD5) aumentaron la síntesis de RNA de MHDC+Seph-CD3.

El efecto inducido por el Acm Cris-1 (CD5) es menos intenso en PBMC+Seph-CD3, ello puede ser debido a que tal como han descrito algunos autores (Ledbetter 1985) la presencia de monocitos puede interferir en determinadas condiciones el efecto de los Acm CD5.

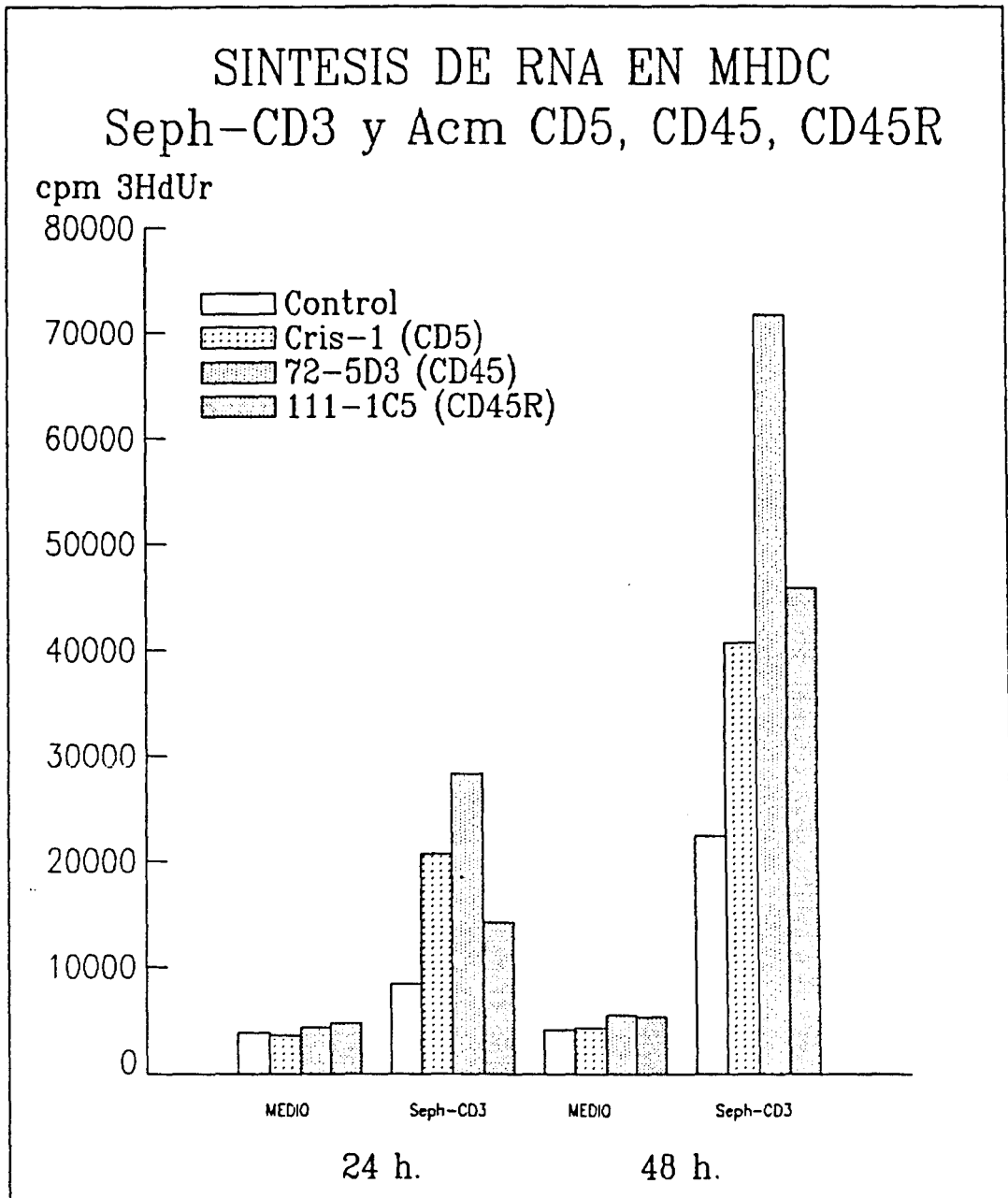


Fig. 31 - Estudio comparativo del efecto de los Acm 72-5D3 (CD45), Cris-1 (CD5), 111-1C5 (CD45R), 10 µg/ml, en la síntesis de RNA por MHDC en presencia o ausencia de Seph CD3, medida a 24 ó 48 h.

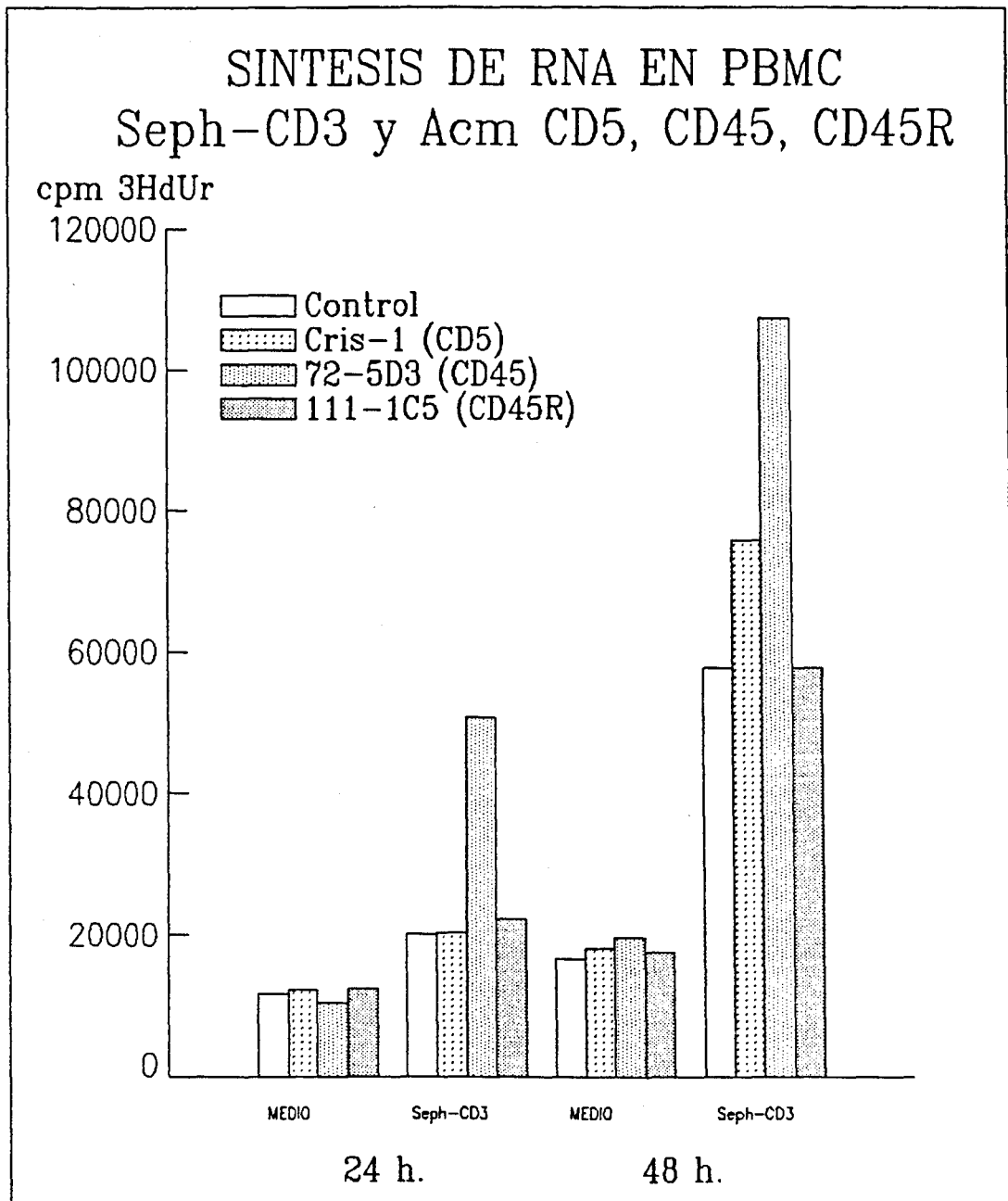


Fig. 32 - Estudio comparativo del efecto de los Acm 72-5D3 (CD45), Cris-1 (CD5), 111-1C5 (CD45R), 10 µg/ml, en la síntesis de RNA por PBMC en presencia o ausencia de Seph-CD3, medida a 24 ó 48 h.

4.7.6 Conclusiones parciales:

- 1) Tanto el Acm 72-5D3 (CD45) como el Acm Cris-1 (CD5) ejercen unos efectos muy similares sobre la mitogénesis inducida por diferentes mitógenos.
- 2) Si bien ambos Acm parecen capaces de proporcionar a la célula una "segunda señal" esta es diferente de la proporcionada por la PMA.
- 3) Ninguno de los dos Acm actúa imitando a la IL-2.
- 4) La utilización conjunta del Acm 72-5D3 (CD45) y del Acm Cris-1 (CD5) produce un efecto sinérgico sobre la mitogénesis de MHDC+Seph-CD3.
- 5) Tanto el Acm 72-5D3 (CD45) como el Acm Cris-1 (CD5) actúan solo sobre las células T4+ (CD4) pero no sobre las T8+, las cuales, sin embargo, poseen la capacidad de responder a la IL-2 exógena.
- 6) Ninguno de los dos Acm es capaz de inducir la síntesis de RNA por sí mismo.
- 7) El Acm 111-1C5 (CD45R) no tiene las mismas capacidades funcionales que el Acm 72-5D3 (CD45)

4.8 CARACTERIZACION FUNCIONAL DE LOS Acm 68-5A5 (CD18) y Edu-2 (CD4)

4.8.1 Introducción:

Hemos apuntado en la introducción la actividad inhibidora de la activación linfocitaria inducida por los Acm de los grupos CD4 y CD18. En ambos casos se han postulado dos tipos de hipótesis para explicar los mecanismos a través de los cuales estos Acm desarrollan su efecto inhibidor. Por una parte existe la posibilidad que estos Acm inhiban la llegada de señales positivas de activación por la interferencia de los contactos intercelulares, fundamentalmente con los monocitos, y por otra parte es posible que estos Acm proporcionen una auténtica señal negativa a través de las moléculas que reconocen.

En nuestro caso, disponíamos de un sistema (el Acm 72-5D3 (CD45)) que nos permitía proporcionar una señal positiva independientemente de los monocitos.

Ello nos planteaba la posibilidad de estudiar por una parte, la activación linfocitaria mediante un sistema independiente de los monocitos, que además posiblemente no se saltaba tantos mecanismos de control como lo hace la PMA.

Por otra parte nos daba la posibilidad de estudiar la interacción entre la señal positiva proporcionada por el Acm 72-5D3 (CD45) y las supuestas señales negativas proporcionadas a través de CD4 y CD18.

El primer paso necesario para iniciar este estudio era caracterizar nuestros Acm CD4 y CD18 y demostrar que funcionalmente actuaban como había sido descrito para otros Acm de su mismo grupo.

Antes de iniciar el estudio de la interferencia entre el efecto inducido por los Acm 72-5D3 (CD45) y el Acm Cris-1 (CD5) y los efectos inhibidores de CD18 y CD4, vamos a presentar algunos datos sobre la caracterización funcional de los Acm 68-5A5 (CD18) y Edu-2 (CD4).

4.8.2 Caracterización funcional del Acm 68-5A5 (CD18):

El Acm 68-5A5 (CD18) precipita dos moléculas de 95 y 180 kD presentes en los linfocitos T y B al igual que en los granulocitos y monocitos. Este Acm fue caracterizado durante el "III International workshop on leucocyte differentiation antigens" celebrado en Oxford en el año 1986 durante el cual fue asignado al grupo CD18.

Trabajos previos, de diferentes autores, habían descrito que otros anticuerpos de este mismo grupo inhibían un buen número de funciones celulares. Entre la funciones inhibidas se encontraba:

- 1) La estimulación por determinados mitógenos (Keizer 1985) (Dongworth 1985).
- 2) La actividad citotóxica de células preestimuladas (CTL).
- 3) La actividad citotóxica natural o "Natural Killer" (NK) (Sanchez-Madrid 1982) (Krensky 1983).

Con la finalidad de poder utilizar el Acm 68-5A5 (CD18), como instrumento en futuros estudios de mitogénesis, decidimos estudiar cuales eran las funciones inhibidas por este Acm en concreto.

El Acm 68-5A5 (CD18) inhibió intensamente la mitogénesis inducida por PHA, Con A, PWM, Toxoide Tetánico y por un estímulo alogénico (MLC), Fig 33.

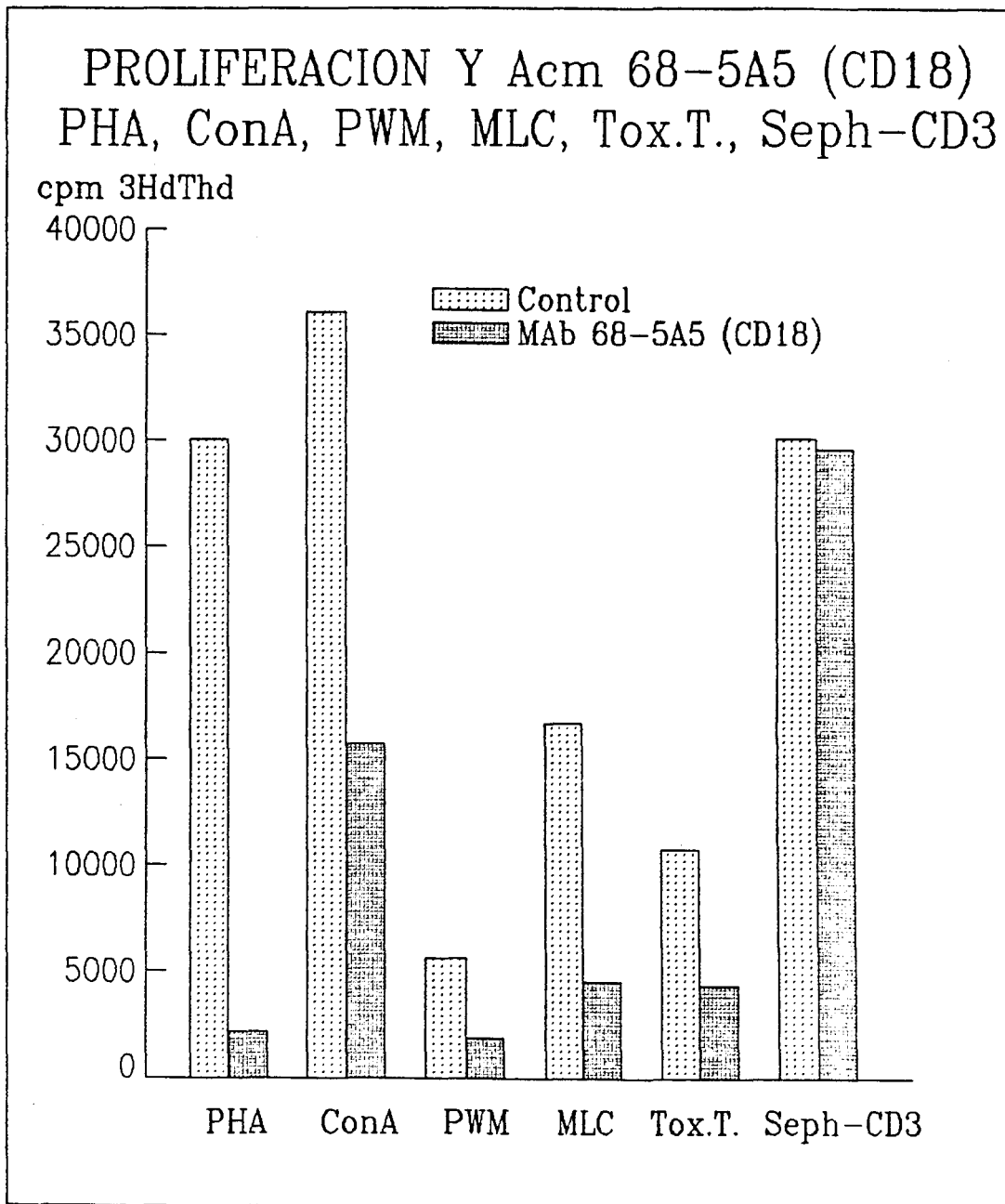


Fig. 33 - Efecto del Acm 68-5A5 (CD18), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en la mitogénesis de PBMC inducida por diferentes mitógenos medida a 48 h. (excepto para MLC a 120 h.), ConA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PWM 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PMA 10 ng/ml , PHA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Seph-CD3 5000 esferas/pocillo, Toxide Tetánico 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

No inhibió sin embargo la mitogénesis inducida por Seph-CD3, este hallazgo ha sido confirmado por otros autores, utilizando otros Acms CD18 (Dongworth 1985).

El Acm 68-5A5 (CD18) inhibió la actividad "Natural Killer" de células de sangre periférica, no estimuladas, frente a la línea eritroblastoide K562, a todas las proporciones Efectoras/Diana estudiadas, Fig 34.

De estos resultados se deduce que el Acm 68-5A5 (CD18) funcionalmente actúa tal y como ha sido descrito para otros Acm del grupo CD18, y por tanto puede ser utilizado como un buen representante de este grupo.

4.8.3 Participación del Acm 72-5D3 (CD45) en la actividad "Natural Killer":

Algunos autores habían descrito que los anticuerpos dirigidos contra determinados epitopos de la molécula LCA-T200, Acms del grupo CD45, tenían la capacidad de inhibir la actividad "Natural Killer" de células de sangre periférica humana frente a la línea eritroblastoide K562 (Newman 1983).

Con la finalidad de confirmar que nuestro Acm 72-5D3 (CD45) era similar a los demás del grupo CD45 en cuanto a capacidad de inhibir la actividad "Natural Killer", estudiamos el efecto de la presencia del Acm 72-5D3 (CD45) en el desarrollo "in vitro" de la actividad "Natural Killer".

Como puede verse en la Fig. 35, el Acm 72-5D3 (CD45) inhibió la actividad "Natural Killer" a todas las proporciones de células Efectoras/Diana estudiadas.

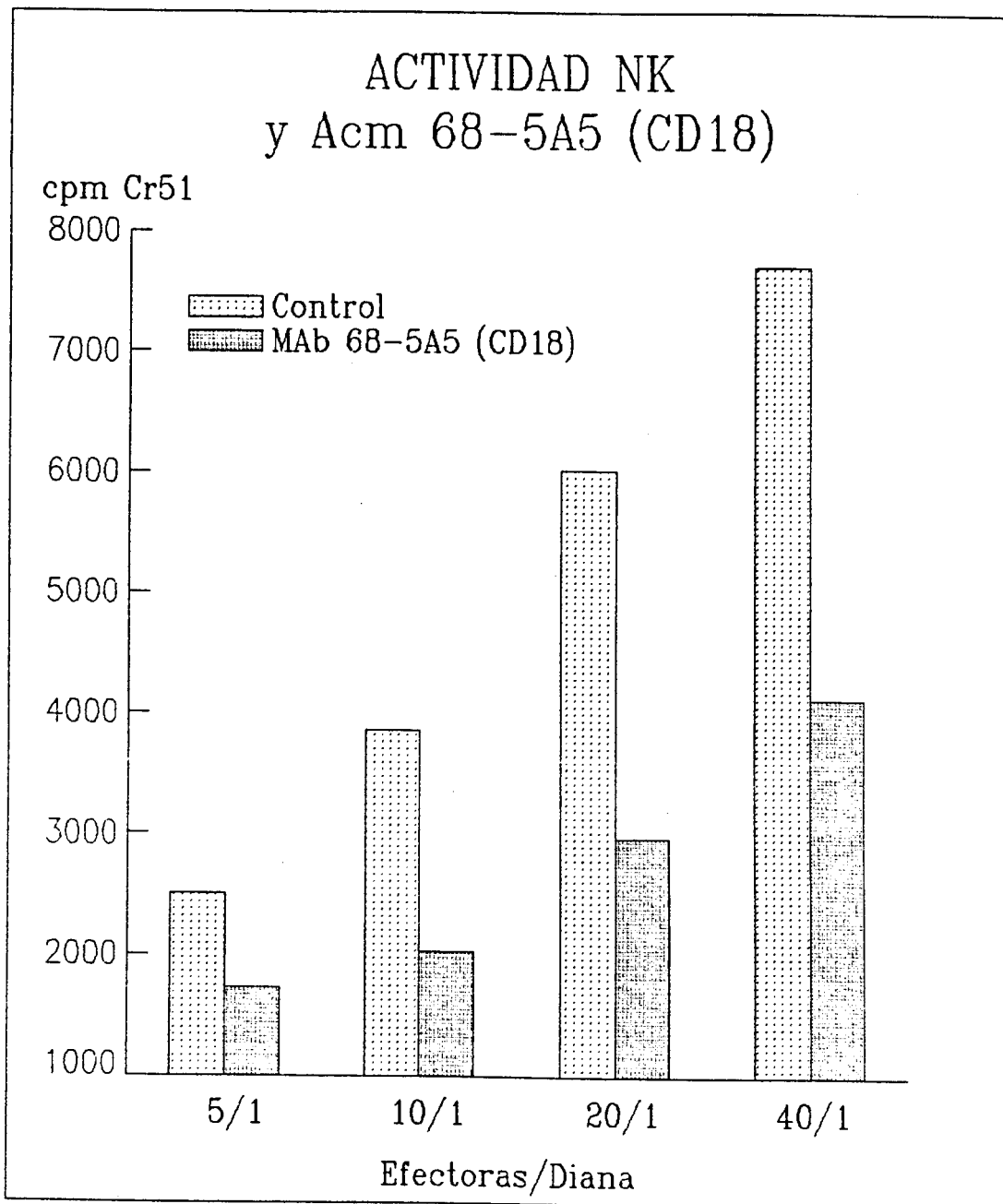


Fig. 34 - Efecto del Acm 68-5A5 (CD18), 10 μ g/ml, en la actividad "Natural Killer" (NK) de PBMC frente a la línea celular K562, a diferentes proporciones Efectoras/Diana, medida por liberación de Cr^{51} .

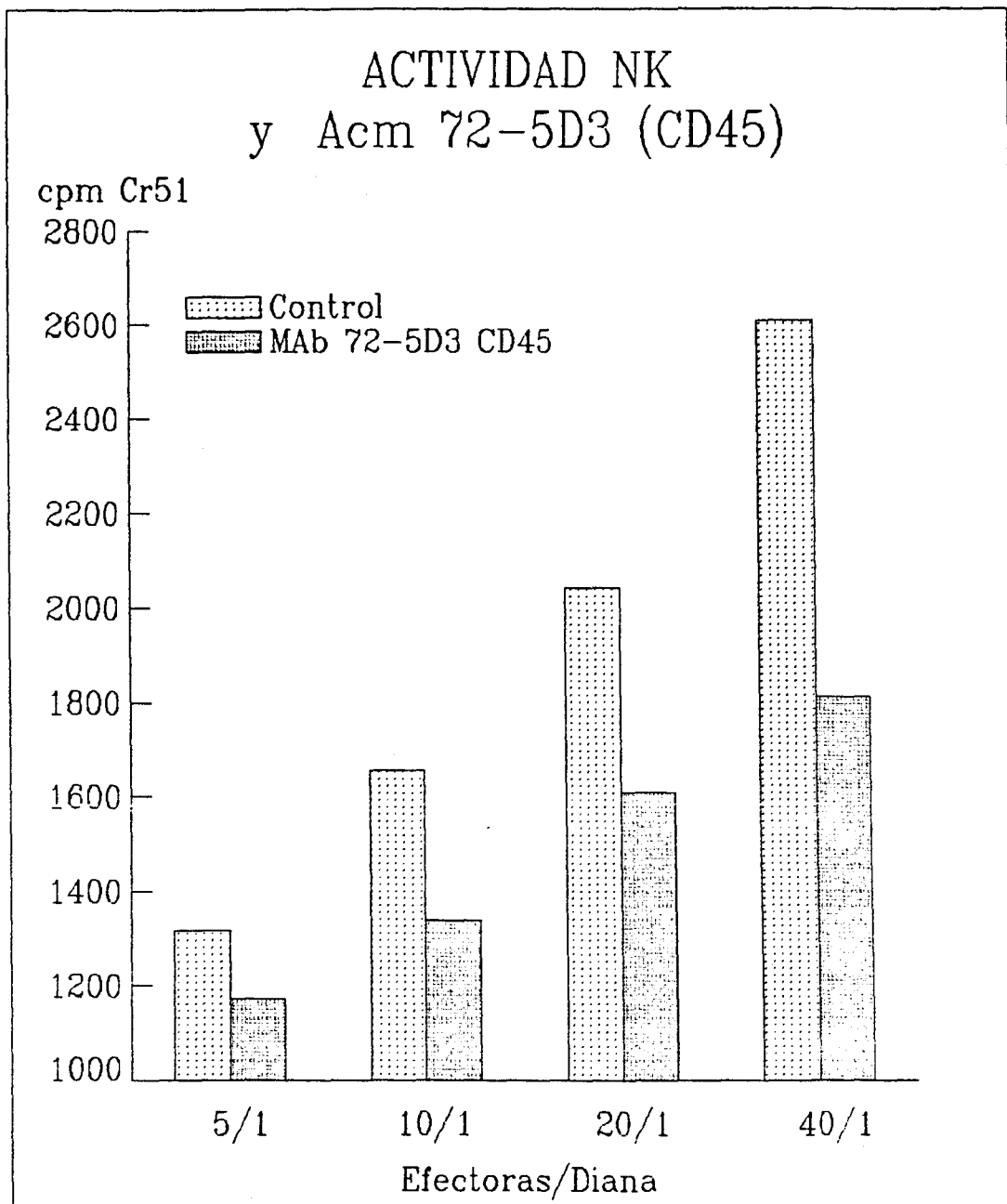


Fig. 35 - Efecto del Acm 72-5D3 (CD45), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en la actividad "Natural Killer" (NK) de PBMC frente a la línea celular K562, a diferentes proporciones Efectoras/Diana, medida por liberación de Cr^{51} .

4.8.4 Caracterización funcional del Acm Edu-2 (CD4):

El Acm Edu-2 precipita una molécula de 55 kD expresada solo en una subpoblación de linfocitos T. Fue asignado al grupo CD4 durante el "II International Workshop on leucocyte differentiation antigens" celebrado en Boston el año 1984 (Haynes 1986).

Los Acm del grupo CD4 habían sido involucrados con anterioridad en la inhibición de algunas funciones celulares, entre la que destaca particularmente la respuesta a estímulos alogénicos o cultivo mixto (MLC) (Engleman 1981) (Biddinson 1982) (Inaba 1987). Con posterioridad algunos autores lanzaron la hipótesis que las células activadas podrían recibir a través de su molécula T4 (CD4) algún tipo de señal inhibidora (Dalglish 1986) (Wassmer 1985).

Con la finalidad de poder utilizar el Acm Edu-2 como instrumento en futuros estudios de mitogénesis, decidimos estudiar su efecto sobre la proliferación inducida por diferentes mitógenos.

Tal como puede verse en la Fig. 36 el Acm Edu-2 (CD4), no inhibió la mitogénesis inducida por PHA ni por PWM. La inhibición producida sobre la mitogénesis inducida por ConA fue insignificante.

Por el contrario el Acm Edu-2 si inhibió la mitogénesis inducida por un estímulo alogénico (Cultivo Mixto linfocitario a 6 días) por el Toxoide Tetánico y por Seph-CD3.

Las inhibiciones poducidas por este Acm no fueron tan espectaculares como las observadas con el Acm 68-5A5 (CD18).

Es conveniente resaltar el hecho de que mientras el Acm 68-5A5 (CD18) inhibe la mitogénesis inducida por PHA pero no la inducida por Seph-CD3, el Acm Edu-2 (CD4) por el contrario inhibe la inducida por Seph-CD3 pero no

la inducida por PHA. Este hecho indica que el efecto inhibitor de estos dos Acm utiliza muy probablemente mecanismos distintos.

4.8.5 Conclusiones parciales:

De los experimentos desarrollados en este apartado podemos concluir:

- 1) El Acm 68-5A5 (CD18) posee todas las características funcionales tanto de inhibición de la proliferación linfocitaria como de inhibición de la citotoxicidad, descritas para los Acm del grupo CD18 y por tanto puede ser considerado un buen prototipo de este grupo.
- 2) El Acm 72-5D3 (CD45) Inhibe la actividad NK tal y como ha sido descrito para otros Acm de su mismo grupo.
- 3) El Acm Edu-2 CD4 posee las características funcionales descritas para otros Acm de su mismo grupo.

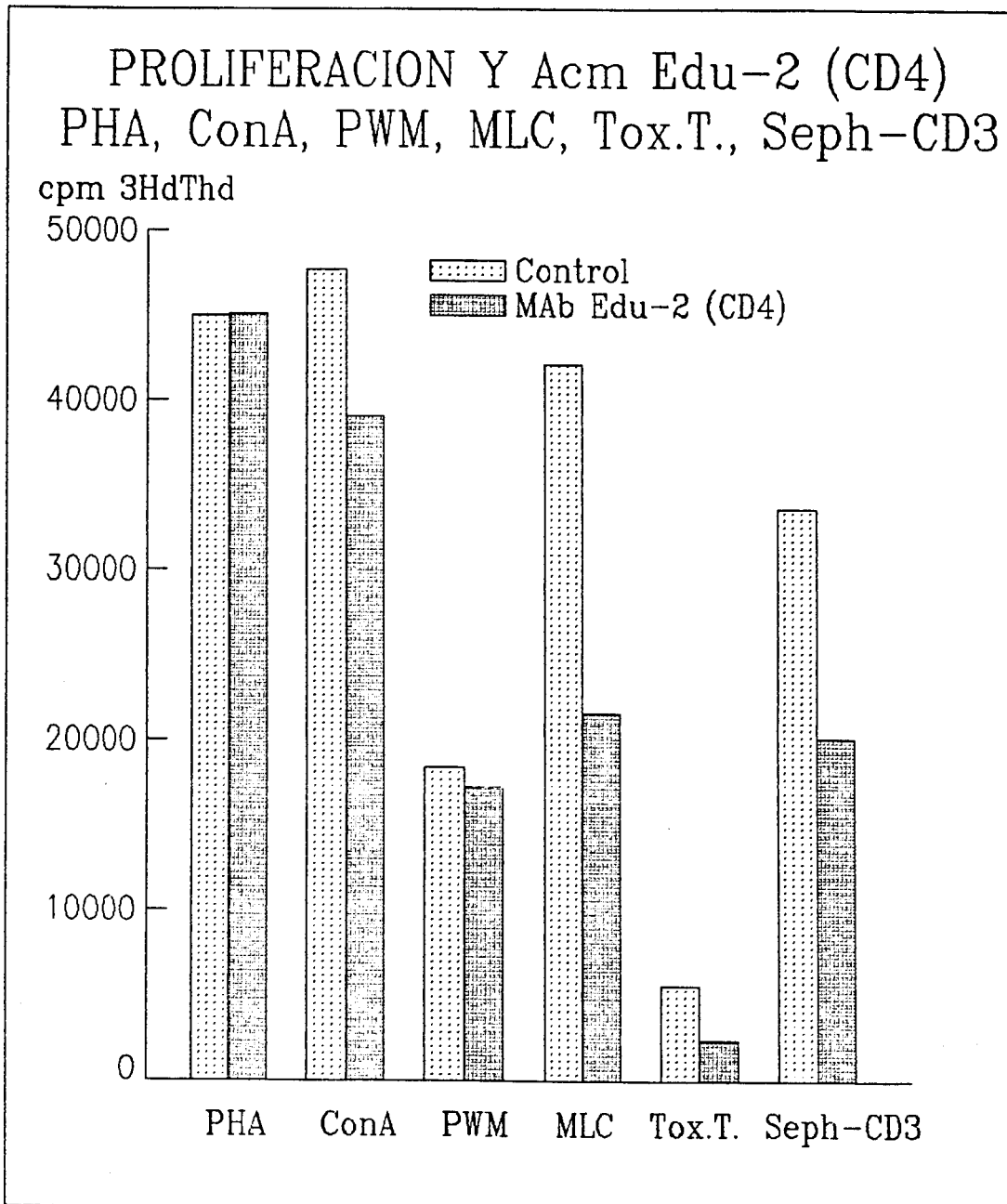


Fig. 36 - Efecto del Acm Edu-2 (CD4), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en la mitogénesis de PBMC inducida por diferentes mitógenos medida a 48 h. (excepto para MLC a 120 h.), ConA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PWM 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PMA 10 ng/ml , PHA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Seph-CD3 5000 esferas/pocillo, Toxide Tetanico 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.9 INTERFERENCIA DE ALGUNOS Acm INHIBIDORES DE LA MITOGENESIS EN EL EFECTO FACILITADOR DE LOS Acm 72-5D3 (CD45) Y Cris-1 (CD5).

4.9.1 Introducción

Conocíamos por datos, procedentes de la literatura y por numerosos experimentos realizados por nosotros mismos, que había por lo menos tres tipos de Acm capaces de interferir diferentes tipos de mitogénesis. Estos eran los Acm del grupo CD18 (LFA-1) (Keizer 1985), los del grupo CD4 (Dalglish 1986) y los Acm que reconocían a los antígenos HLA de clase I (Turco 1985) (Taylor 1986) (Dasgupta 1987).

Por lo menos para los dos primeros estaba abierta la discusión acerca de si actuaban inhibiendo comunicaciones intercelulares o proporcionando auténticas señales negativas.

La posibilidad de estudiar la activación linfocitaria T en un sistema independiente de los monocitos nos permitía descartar que las inhibiciones que se observasen, pudieran ser atribuibles a inhibiciones de la comunicación entre los monocitos y la célula T.

Por otra parte y en el intento de desentrañar los mecanismos utilizados por los Acm CD45 y CD5 para facilitar la mitogénesis, era necesario conocer si el efecto de las señales proporcionadas por estos Acm, era inhibible por Acm que reconocían otros antígenos de membrana.

En base a estas consideraciones decidimos comprobar si el efecto facilitador de la mitogénesis proporcionado por los Acm 72-5D3 (CD45) o Cris-1 (CD5), era interferido por el efecto inhibitor desarrollado por Acm de los grupos CD18, CD4 o HLA Clase I.

4.9.2 Capacidad inhibidora de Acm CD18 y CD4 en el efecto facilitador de CD45 y CD5 en mitogénesis por Seph-CD3 :

El Acm Edu-2 (CD4) inhibió la mitogénesis inducida en MHDC por Seph-CD3, tanto en presencia de Acm 72-5D3 (CD45) como de Acm Cris-1 (CD5), así como en presencia de los dos utilizados conjuntamente Fig. 37.

El Acm 68-5A5 (CD18) por el contrario no inhibió la mitogénesis en ninguna de las dos situaciones.

La presencia de monocitos (PBMC) hizo que el efecto inhibidor de Edu-2 (CD4) fuera apenas perceptible Fig. 38.

Los Acm HLA Clase I no interfirieron la mitogénesis de este modelo.

Estos resultados sugieren por una parte, el mecanismo inhibidor desarrollado por Acm CD4 puede ser compensado parcialmente por la presencia de monocitos, y por otra que este mecanismo inhibidor puede hacerse mucho más patente cuando se utiliza un sistema mitogénico independiente de los monocitos tal como es el de Seph-CD3+Acm 72-5D3 (CD45) o el de Seph-CD3+Acm Cris-1 (CD5).

Haciendo una lectura de estos resultados en otro sentido, podríamos decir que el Acm CD4 pero no Acm CD18 inhiben los mecanismos facilitadores inducidos por Acm 72-5D3 (CD45) y Acm Cris-1 (CD5) en el modelo de MHDC activadas por Seph-CD3.

Este hecho, favorece la hipótesis que el efecto inhibidor inducido por los Acm CD4 sea debido no solo a la interferencia de la adhesividad celular, sino que además exista un mecanismo activo de inhibición.

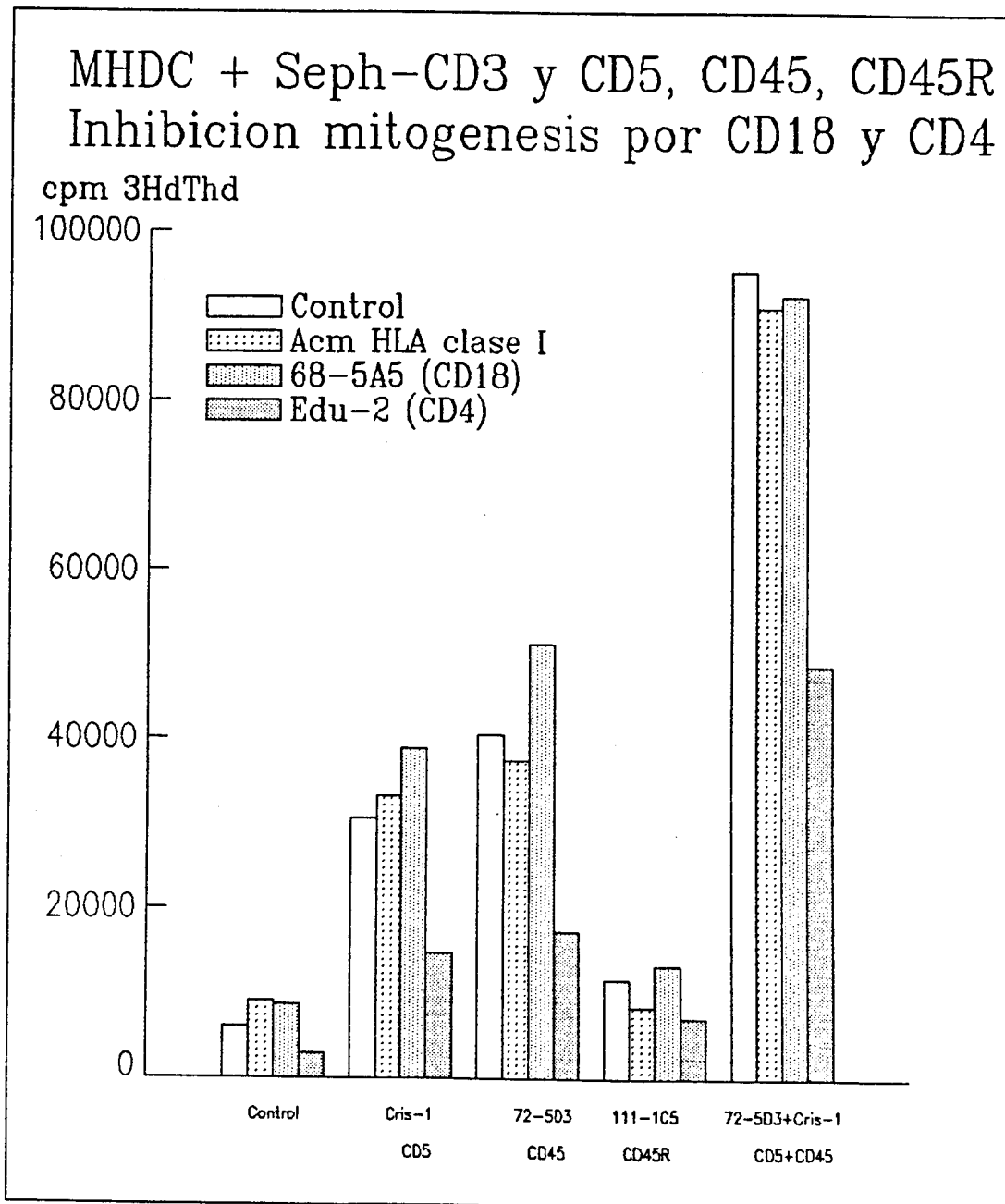


Fig. 37 - Efecto inhibitor de los Acm 68-5A5 (CD18) y Edu 2 (CD4) sobre la mitogenesis de MHDC inducida por Seph-CD3 en presencia de los Acm 72-5D3 (CD45), Cris-1 (CD5), 111-1C5 (CD45R), 10 µg/ml, mitogenesis medida a 48 h.

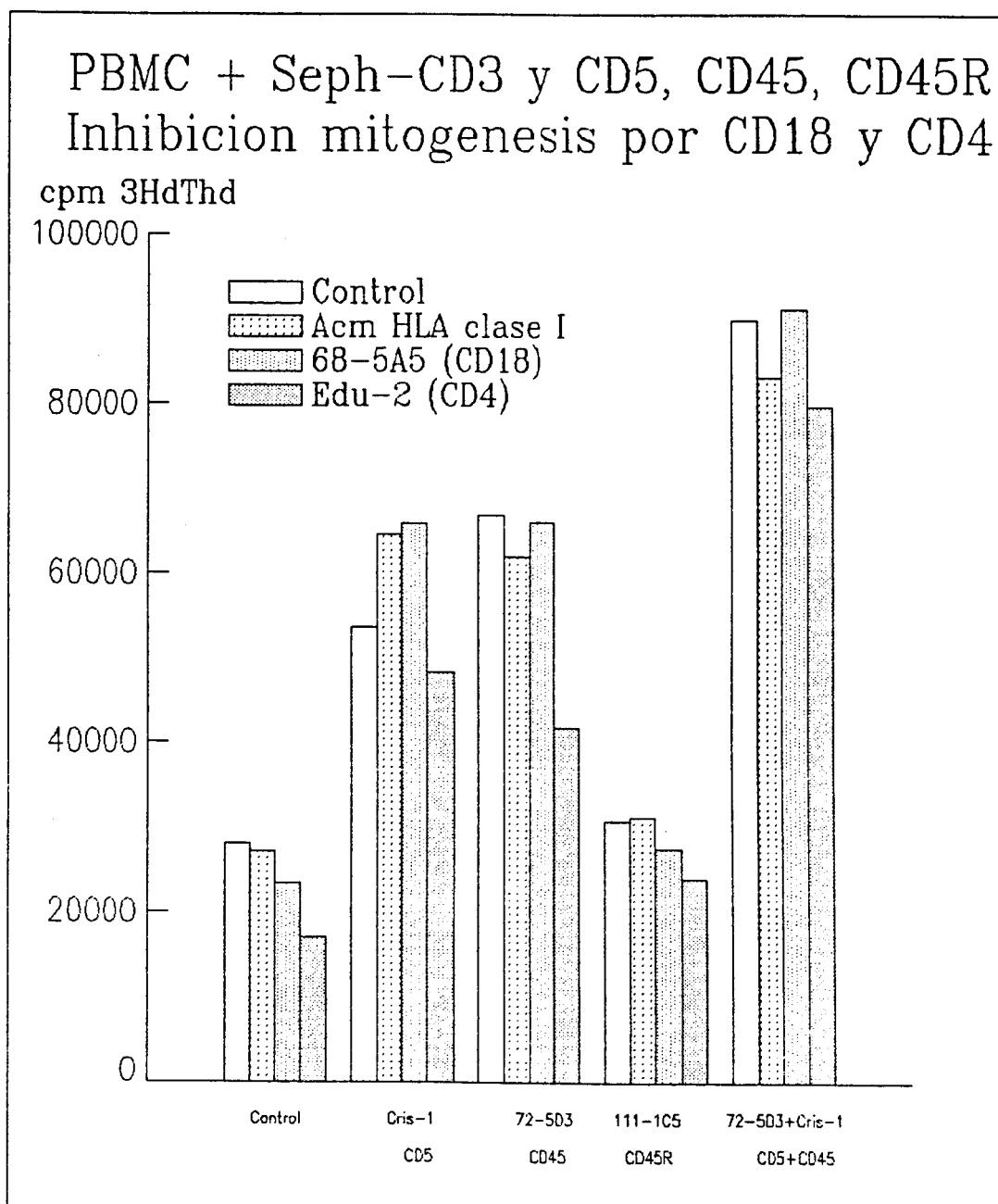


Fig. 38 - Efecto inhibitor de los Acm 68-5A5 (CD18) y Edu 2 (CD4) sobre la mitogenesis de PBMC inducida por Seph-CD3 en presencia de los Acm 72-5D3 (CD45), Cris-1 (CD5), 111-1C5 (CD45R), 10 μ g/ml, mitogenesis medida a 48 h.

Sin embargo como hemos citado en la introducción los mecanismos inhibidores de la mitogénesis por CD3 inducidos por CD4 podrían ser debidos a que los antígenos CD4 comodulan con los CD3 y por tanto la disponibilidad de moléculas de T3 para los Acm CD3 unidos a la Sefarosa puede ser menor y esto podría condicionar una menor eficacia en la inducción de mitogénesis.

4.9.3 Capacidad inhibidora de Acm CD18 y CD4 en el efecto facilitador de CD45 y CD5 en mitogénesis por PHA :

El Acm 68-5A5 (CD18) inhibió la mitogénesis inducida en MHDC por PHA en presencia de cualquiera de los Acm estudiados Fig. 39.

Los Acm anti-HLA-clase I mostraron también un efecto inhibidor, aunque mucho menos intenso.

El Acm Edu-2 (CD4) por el contrario no inhibió la mitogénesis de este sistema.

En presencia de monocitos (PBMC) el efecto observado fue cualitativamente el mismo, aunque cuantitativamente menos importante Fig 39.

Estos experimentos sugieren, por una parte que el efecto inhibidor de la mitogénesis por PHA inducido por Acm CD18 no actúa exclusivamente a través de interferir su interacción con los monocitos. Dado que también puede observarse en un sistema deplecionado de monocitos como es la activación de MHDC+PHA+Acm Cris-1 (CD5).

Esta hipótesis concuerda además con datos obtenidos recientemente por otros autores utilizando otros modelos (Inaba 1987).

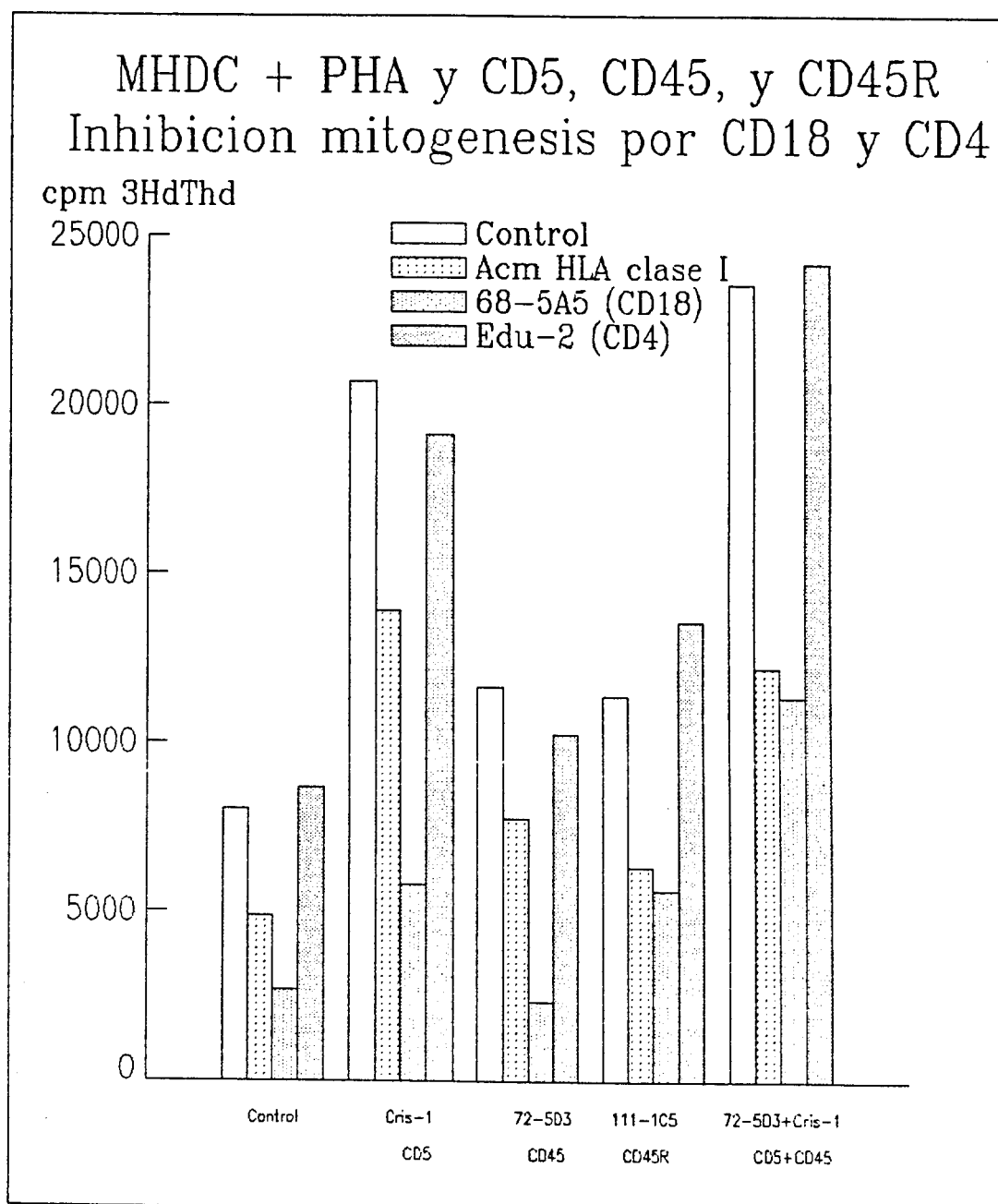


Fig. 39 - Efecto inhibitor de los Acm 68-5A5 (CD18) y Edu 2 (CD4) sobre la mitogenesis de MHDC inducida por PHA 10 μ g/ml en presencia de los Acm 72-5D3 (CD45), Cris-1 (CD5), 111-105 (CD45R), 10 μ g/ml, mitogenesis medida a 48 h.

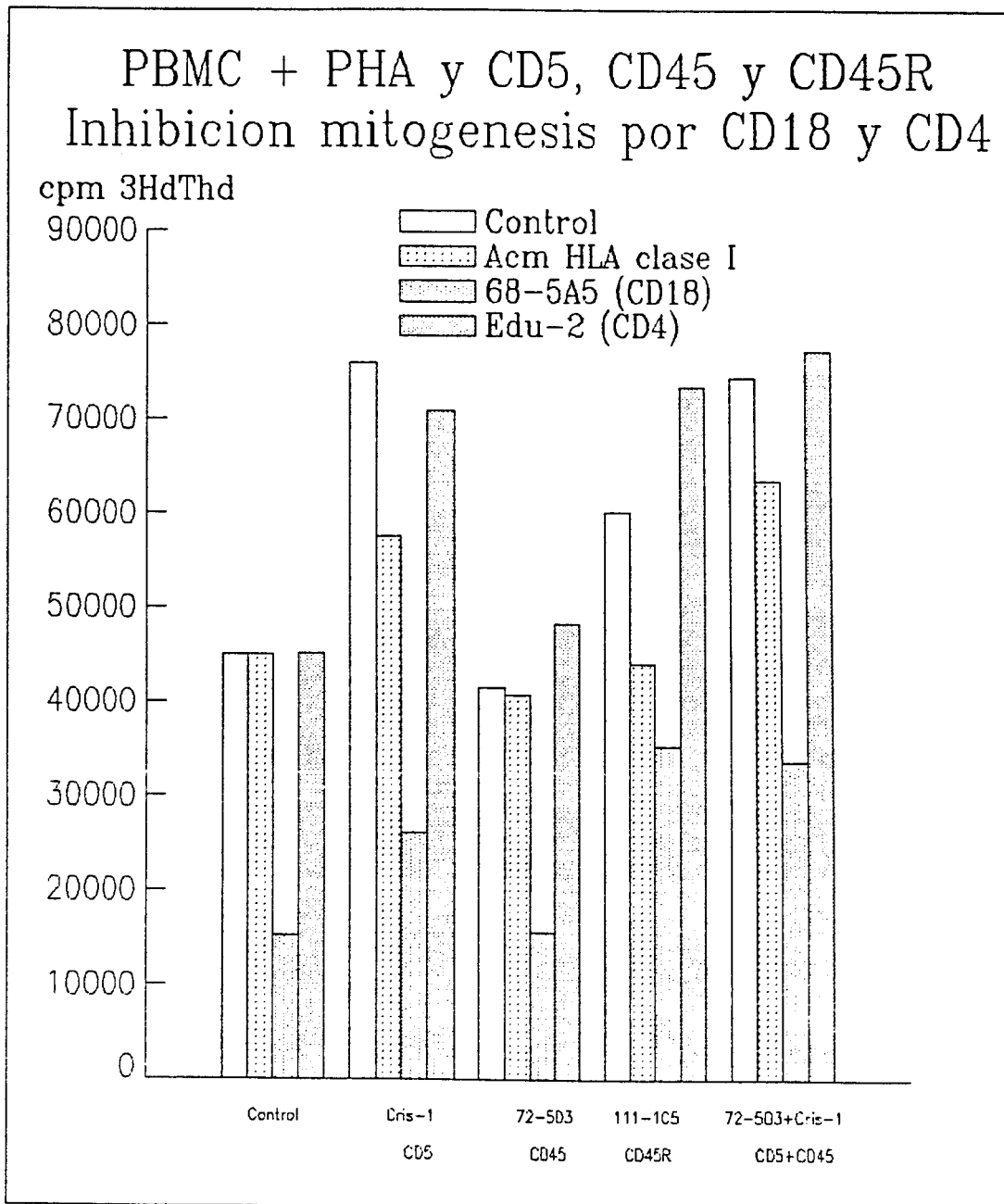


Fig. 40 - Efecto inhibitor de los Acm 68-5A5 (CD18) y Edu 2 (CD4) sobre la mitogenesis de PBMC inducida por PHA 10 μ g/ml en presencia de los Acm 72-5D3 (CD45), Cris-1 (CD5), 111-105 (CD45R), 10 μ g/ml, mitogenesis medida a 48 h.

Por otra parte, el que los mecanismos utilizados por los Acm CD4 para inhibir la mitogénesis por Seph-CD3+Acm Cris-1 (CD5) no sean eficaces en el caso de la mitogénesis por PHA+Acm Cris-1 (CD5), indican que las diferencias de sensibilidad estan en función del tipo de mitógeno utilizado y probablemente no se hallan mediadas por la inhibición o el enmascaramiento de la "segunda señal", proporcionada por el Acm Cris-1 (CD5) en el modelo de la activación por Seph-CD3. De ser así, el Acm CD4 debería inhibir también el efecto facilitador en el caso de la mitogénesis inducida por PHA.

4.9.4 Conclusiones parciales:

- 1) El Acm Edu-2 (CD4) inhibe la mitogénesis inducida por Seph-CD3 pero no la inducida por PHA.
- 2) Este efecto inhibitor es más claro cuando se utiliza un sistema independiente de monocitos como el de Seph-CD3 más Acm 72-5D3 (CD45) o Acm Cris-1 (CD5).
- 3) El Acm 68-5A5 (CD18) por el contrario inhibe la mitogénesis inducida por PHA pero no la inducida por Seph-CD3.
- 4) El efecto inhibitor del Acm 68-5A5 (CD18), sobre la mitogénesis por PHA no puede ser contrarrestado por el efecto facilitador del Acm 72-5D3 (CD45) ni del Acm Cris-1 (CD5).

5 DISCUSION

5.1 LA ACTIVACION LINFOCITARIA POR ACM CD3

5.1.1 El Acm Cris-7 (CD3) y función del linfocito T:

En la primera parte de esta Tesis hemos descrito, como el Acm Cris-7, poseía, las cualidades funcionales descritas para otros Acm de su mismo grupo CD3:

- 1) Era mitogénico para PBMC.
- 2) Inhibía la mitogénesis inducida por PHA y por un estímulo alogénico.
- 3) Inhibía la actividad CTL pero no la NK ni la LAK.

Estos datos nos permitían establecer, en base a nuestros propios experimentos, algunas premisas de las que habíamos partido basandonos en informaciones procedentes de la literatura (Isakov 1986) (Meuer 1986) (Mentzer 1985):

- 1) Que es posible imitar señales de activación de los linfocitos utilizando Acm CD3 y concretamente el Acm Cris-7, y por tanto también tiene que ser posible imitar otras señales utilizando Acm contra los receptores adecuados.
- 2) Que el efecto de estas señales es interdependiente con otras señales de activación recibidas simultaneamente por los linfocitos, y por tanto tiene sentido estudiar el efecto de la administración simultanea de diferentes señales.
- 3) El efecto de los Acm sobre las funciones celulares, tienen la capacidad de distinguir entre dos mecanismos citotóxicos distintos, y por tanto se

puede pensar que los efectos funcionales inducidos por la presencia de Acm en estudios "in vitro", tienen un cierto caracter de especificidad que los hace útiles como modelos de estudio.

El hecho de que Acm CD3 inhiban la actividad CTL pero no la NK o la LAK indica además que muy posiblemente el mecanismo de reconocimiento utilizado por NK y LAK no involucra al complejo T3-Ti, complejo que por el contrario si se halla involucrado en la actividad CTL.

5.1.2 La importancia de algunos aspectos físicos en la activación por Acm CD3:

Nuestros experimentos han confirmado la necesidad de un soporte físico sobre el que anclar los Acm CD3, para que estos puedan actuar como señal activadora (Clement 1985) (Heumann 1987) (Van Lier 1987).

Hemos confirmado también la utilidad de la sefarosa como base de este soporte físico. Y hemos comprobado un efecto inhibitor inespecifico de los Acm del isotipo IgG2a, independiente de la especificidad de la molecula reconocida, cuando el Acm Cris-7 (CD3) es utilizado en su forma soluble, pero no si se utiliza unido a sefarosa. Es importante establecer este punto, por cuanto la posible comparación de experimentos de esta Tesis con otros publicados, debe considerar siempre en que forma el Acm CD3 ha sido utilizado, en forma soluble, o por el contrario unido a esferas de sefarosa, ya que las señales proporcionadas en ambos casos son distintas.

Una situación similar ocurre con la presencia o no de monocitos. Algunos trabajos no destacan suficientemente esta cuestión y es preciso recurrir a una detallada lectura del apartado de material y metodos, para discernir si

en el modelo utilizado estaban o no presentes los monocitos. Como hemos visto en los resultados, los monocitos son esenciales para la activación de los linfocitos T en determinadas condiciones, y de su presencia o no, dependen muchos de los efectos funcionales descritos para los Acm.

Al considerar trabajos realizados por el modelo de activación utilizando Acm CD3 debemos considerar la presencia o no de monocitos en el experimento y la forma física en que se halla el Acm CD3.

5.1.3 Los diferentes pasos en la activación a través de Acm CD3:

Los resultados presentados en esta tesis son coherentes con el siguiente modelo de activación celular:

En ausencia de monocitos los Acm CD3 solubles inducen un incremento intracelular de Ca^{++} (O'Flynn 1985).

Es preciso que estos anticuerpos estén fijados a un soporte sólido para dar lugar al "cross-linking" del complejo T3-Ti y como consecuencia de éste a la señal necesaria para la aparición de receptores para la IL-2 (Ledbetter 1986) (Scheurich 1985) (Stingl 1987). Esta señal, sin embargo, no es por sí misma suficiente para iniciar la secreción de IL-2 y por tanto no induce mitogénesis a menos que los monocitos proporcionen una "segunda señal" que induce la secreción de IL-2 e inicia un circuito autocrino con activación de los mecanismos de síntesis de DNA y de duplicación celular (Emmrich 1987).

5.2 Acm MODIFICADORES DE LA MITOGENESIS DE PBMC

5.2.1 La modificación por Acm de la proliferación inducida por Acm CD3:

Según el esquema anterior la regulación de la activación de los linfocitos T puede, efectuarse por:

- a) Regulación de la expresión de los receptores para la IL-2.
- b) Regulación de la secreción de IL-2.
- c) Otros mecanismos ajenos a la IL-2.

Al considerar el posible efecto modulador de los Acm en el proceso de activación "in vitro", deben considerarse dos tipos de hipótesis alternativas: a) Que actúen por inhibición de señales. b) Que intervengan imitando señales positivas o negativas.

En esta tesis hemos descrito el efecto de diferentes Acm e identificado su mecanismo de actuación. El primero de ellos y más importante por su originalidad es la descripción de la capacidad que tienen los Acm CD45 de proporcionar a los linfocitos T4+, activados por Seph-CD3, una "segunda señal" necesaria para que se inicie la secreción de IL-2.

Hemos descrito que la señal proporcionada por Acm CD45 es semejante pero no idéntica a la proporcionada por el Acm CD5.

Por otra parte hemos abordado los mecanismos inhibitorios de los Acm CD18 y CD4 en un intento de esclarecer si actúan interfiriendo señales positivas o imitando señales negativas. Nuestros datos, apoyan la hipótesis, que los Acm CD4 y CD18, además de su posible efecto inhibitorio de contactos de los linfocitos con los monocitos, tienen otras acciones. Entre las posibles, estarían, la inhibición de contactos entre linfocitos T, pero muy

probablemente estos Acms pueden proporcionar señales negativas. Las cuales, en todo caso serian diferentes para CD18 y CD4 dado su efecto inhibitor es distinto segun se utilize PHA o Seph-CD3 como activador.

5.2.2 Efecto del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis de PBMC por Seph-CD3:

El Acm 72-5D3 (CD45) ha mostrado tener la capacidad de aumentar la mitogénesis inducida en PBMC por Seph-CD3. Esta capacidad es específica para la activación inducida por Seph-CD3 e indetectable con otros mitógenos. Este dato indica que su efecto facilitador esta ligado de alguna forma a la vía de activación a través del antígeno T3 (CD3). Este efecto facilitador de la mitogenesis de PBMC no se observa cuando se utiliza la ConA como mitógeno.

Los estudios sobre la cinética, demuestran que el efecto del Acm 72-5D3 (CD45), solo es detectable si el Acm está presente durante las primeras fases de la activación por Seph-CD3. Ello descarta un efecto sobre las últimas fases de la activación linfocitaria.

Estos datos apuntan la posibilidad, que el efecto facilitador del Acm 72-5D3 (CD45) este relacionado con la facilitación de la agrupación (o "cross-linking") de los complejos T3-T1 en la membrana celular.

Por último, el hecho de que el Acm 72-5D3 (CD45) sea incapaz, por si mismo, de inducir no solo mitogénesis sino incluso síntesis de RNA. Indican la ausencia de un efecto inductor de la síntesis proteica que pudiera "preparar" a la célula para los posteriores pasos de división celular.

Así mismo la falta de mitogenicidad del Acm 72-5D3 (CD45) en presencia de rIL-2, y ausencia de Seph-CD3, descartan que el Acm 72-5D3 (CD45) actúe induciendo por sí solo receptores funcionales para la IL-2.

5.2.3 Participación del Acm 72-5D3 (CD45) en la mitogénesis comparación con el Acm G1-15 (CD45R):

De los Acm relacionados con el LCA (T200) únicamente el Acm G1-15 (CD45R) se ha relacionado con actividades funcionales sobre la mitogénesis de los linfocitos T. Este Acm pertenece al grupo CD45R dado que solo reconoce las moléculas de 205 y 220 kD y el antígeno que reconoce únicamente se halla expresado en un 50 % de las células T (Ledbetter 1986).

Se ha descrito que el Acm G1-15 (CD45R), es capaz de incrementar la mitogénesis de dosis subóptimas de PHA y de incrementar la expresión de receptores para la IL-2 en la activación de PBMC por Acm CD3.

Los efectos funcionales descritos en esta tesis para el Acm 72-5D3 (CD45) difieren de los descritos para el Acm G1-15 (CD45R) en diferentes aspectos:

- 1) El Acm 72-5D3 (CD45), en presencia de monocitos, no incrementa la mitogénesis inducida por PHA ni aun utilizando dosis subóptimas de esta lectina, mientras que se ha descrito que el Acm G1-15 (CD45R) incrementa la proliferación inducida por dosis subóptimas de PHA.
- 2) El Acm G1-15 (CD45R) necesita de la presencia de rIL-2 exógena para incrementar la mitogénesis inducida a través de T3 (CD3), mientras que el Acm 72-5D3 (CD45) no necesita la adición de rIL-2 exógena. La adición de rIL-2 exógena a PBMC activadas por Seph-CD3 hace que no sea apreciable el aumento de la proliferación celular inducido por el Acm 72-5D3 (CD45).

3) El Acm 72-5D3 (CD45) inhibe la actividad "Natural Killer", está descrito que el G1-15 (CD45R) no la inhibe (Ledbetter 1986).

Estas diferencias funcionales, no son en principio, sorprendentes por cuanto anticuerpos reconociendo epítomos diferentes de una misma molécula puedan dar lugar a efectos funcionales distintos (Olive 1986) (Brotier 1985).

Resulta lógico que Acms que reconocen moléculas distintas (aunque antigénicamente relacionadas) puedan dar lugar a señales funcionales diferentes.

Dado que el Acm 72-5D3 (CD45) no muestra un incremento de la mitogénesis cuando se añade rIL-2 exógena a PBMC activadas por Seph-CD3, difícilmente podemos atribuir su efecto a un aumento en la expresión, o en la eficiencia, de los receptores para la IL-2, tal y como ha sido propuesto para el Acm G1-15 (CD45R).

5.3 Acm COMO IMITADORES DE LAS "SEGUNDAS SEÑALES" DE ACTIVACION LINFOCITARIA

5.3.1 El Acm 72-5D3 (CD45) como "segunda señal" en la activación de MHDC por Seph-CD3:

Hemos discutido con anterioridad la dependencia de la activación linfocitaria por Seph-CD3 de los monocitos y la posibilidad de que esta necesaria "segunda señal" pueda ser sustituida por la PMA o la IL-1.

Los experimentos diseñados para estudiar la relación entre el efecto del Acm 72-5D3 (CD45) y de los monocitos, en la activación de linfocitos T por Seph-CD3, llevaron a la conclusión que el Acm 72-5D3 (CD45) tenía la capacidad de inducir la mitogénesis de los linfocitos T en ausencia de monocitos incluso a concentraciones de 10 ng/ml.

El efecto facilitador de la mitogénesis inducido por el Acm 72-5D3 (CD45), mostro ser específico para los linfocitos T4+, ello descartaba un efecto indiscriminado sobre la activación linfocitaria y apuntaba la posibilidad que el efecto facilitador de la mitogénesis fuera mediado por la vía de la secreción de IL-2, dado que las células T4+ son predominantemente las que secretan IL-2 (Palacios 1982) (Solbach 1982).

5.3.2 Características de la "segunda señal":

No está en aun bien definido el tipo de señal que necesitan recibir los linfocitos T de los monocitos. Algunos autores postulan que las señales proporcionadas por la presencia de los monocitos sería diferente de la proporcionada por la IL-1 y por la PMA, (Davis 1985) (Davis 1986) (Wakasugi 1985). Lo que si parece claro, es que la presencia física de monocitos, incluso fijados con glutaraldehido, proporciona una señal distinta de la IL-1. La PMA por otra parte actuaría activando directamente la protein kinasa C y por tanto obviando probablemente la regulación ejercida sobre los pasos intermedios de la activación por la vía fisiológica.

Según algunos autores, los monocitos participarían en la activación de los receptores de alta afinidad para la IL-2 en células T, absolutamente, no

Según algunos autores, los monocitos participarían en la activación de los receptores de alta afinidad para la IL-2 en células T, absolutamente, no activadas y su acción no podría ser sustituida por la IL-1 (Wakasuki 1986). Por el contrario cuando se utilizan linfocitos T clonados, células de hecho ya estimuladas, sí que podría sustituirse la presencia de los monocitos por la IL-1 (Kaye 1984).

Para otros autores la presencia de los monocitos sería necesaria para activar la secreción de IL-2 (Ledbetter 1986).

La polémica acerca de si la "segunda señal" proporcionada por los monocitos actúa a través del incremento en la afinidad de los receptores para la IL-2 (Wakasuki 1986) o en la secreción de ésta (Ledbetter 1986), permanece aun abierta. En nuestra opinión la acción directa sobre la secreción de IL-2 es más plausible por varias razones:

- 1) El aumento de afinidad de los receptores sería inútil sin la existencia de IL-2 con la que reaccionar, por tanto deberíamos aceptar un cierta actividad secretora basal de IL-2, o bien una "tercera señal" que indujera su secreción.
- 2) En nuestros experimentos la adición de IL-2 exogena permite inducir la mitogénesis de linfocitos, tanto T4+ como T8+, altamente deplecionados de monocitos en presencia de Seph-CD3, lo cual indica la existencia de receptores con la suficiente capacidad funcional para iniciar una respuesta en ambas subpoblaciones, aun en ausencia de monocitos. Si esta respuesta no se inicia en las células MHDC activadas por Seph-CD3, no parece pues que sea debido a la falta de receptores funcionales.
- 3) Por último la IL-2 parece tener, por lo menos en los primeros momentos de la activación, un efecto de retroalimentación positivo sobre la expresión de su propio receptor (Wakasugi 1985), por lo que parece coherente que

cuando se induce la secreción de IL-2 pueda detectarse una mayor actividad funcional de su receptor.

La "segunda señal" necesaria para la proliferación podría, también, ser distinta según que la "primera señal" sea la PHA, la ConA, el Acm CD3, el Acm CD3 unido a Sefarosa (Wakasugi 1985).

5.3.3 El Acm 72-5D3 (CD45) en la activación de MHDC por Seph-CD3 comparación con PMA y rIL-2:

La señal proporcionada por el Acm 72-5D3 (CD45) tiene características diferentes de la proporcionada por la PMA, en tanto y en cuanto, la PMA a concentraciones de 10 ng/ml, puede inducir mitogénesis en presencia de IL-2. El Acm 72-5D3 (CD45) por el contrario es incapaz de inducir mitogénesis en presencia de IL-2, hecho en el cual se parecería a los monocitos. Además el efecto de la PMA y del Acm 72-5D3 (CD45) sobre la mitogénesis de MHDC activadas por Seph-CD3 son aditivos.

El efecto inducido por el Acm 72-5D3 (CD45) también es distinto del inducido por la IL-2, dado que esta es mitogénica en presencia de concentraciones submitogénicas de PMA, el Acm 72-5D3 (CD45) sin embargo no es mitogénico en las mismas condiciones.

Estos datos nos permiten además confirmar las diferencias descritas (Davis 1985) (Davis 1986) entre la señal proporcionada por la PMA, a dosis submitogénicas, y la proporcionada por los monocitos, en el sentido de que la IL-2 induce mitogénesis en presencia de PMA pero no en presencia de monocitos.

5.3.4 Los Acm CD5 como "segunda señal":

Los Acm del grupo CD5 reconocen una molécula de 67 kD, expresada fundamentalmente en los linfocitos T y en una pequeña subpoblación de linfocitos B (McMichael 1987). En 1985 Ledbetter describió el efecto facilitador de la mitogénesis de los Acm de este grupo (Ledbetter 1985). Al año siguiente se describió que los Acm CD5 poseían la capacidad de sustituir a los monocitos en la activación de células T por Seph-CD3 (Ceupens 1986). Según esta descripción los Acm CD5 actuaban, facilitando tanto la proliferación como la secreción de IL-2, de MHDC activadas por Seph-CD3. Trabajos posteriores confirmaron que los Acm CD5 podían inducir un incremento en el Ca^{++} intracelular así como un aumento en los niveles de cGMP (Ledbetter 1986) (June 1987).

5.3.5 Estudio comparativo entre los Acm CD5 (Cris-1) y CD45 (72-5D3) sobre la mitogénesis:

Los estudios comparativos desarrollados con los Acm Cris-1 (CD5) y 72-5D3 (CD45) han demostrado que no existen diferencias funcionales significativas entre ambos. En todo caso podría decirse que el Acm Cris-1 (CD5) incrementa la mitogénesis inducida por PHA en PBMC y MHDC mientras que el Acm 72-5D3 (CD45) solo lo hace en las MHDC. En general el Acm 72-5D3 (CD45) acostumbra a ser algo más eficaz que el Acm Cris-1 (CD5) en las mitogénesis inducidas por Seph-CD3. Cuando las células son activadas por PHA ocurre el fenómeno inverso.

Sin embargo es importante destacar que cuando los dos Acm son utilizados conjuntamente, su efecto sobre la mitogénesis es, no solo sumatorio, sino que se produce sinergia, ello indica que a pesar de que el resultado final de su acción, la secreción de IL-2, es el mismo en ambos casos, las vías intracelulares utilizadas por los dos Acm podrían ser distintas.

Debido a la descripción que los Acm (CD5) inducían un incremento de Ca^{++} intracelular (June 1987), quisimos comparar los efectos de este Acm con los de un inductor químico del incremento de Ca^{++} intracelular, la ionomicina. La ionomicina fue capaz de inducir mitogénesis en presencia de PMA, el Acm Cris-1 (CD5) por el contrario no fue mitogénico en estas circunstancias. Este hecho puede ser debido a la existencia de un umbral, el cual no sería alcanzado por el incremento de Ca^{++} intracelular producido por el Acm Cris-1 (CD5) pero si por el producido por la ionomicina, si bien no se puede descartar que la ionomicina induzca otros efectos además del incremento intracelular de Ca^{++} .

Tampoco el Acm 72-5D3 (CD45) indujo mitogénesis en presencia de Ionomicina incluso cuando se añadió IL-2 exogena, estos experimentos indican que la ionomicina ni aun en presencia de Acm 72-5D3 (CD45) era capaz de inducir receptores funcionales para la IL-2, y además establecía una nueva diferencia entre el efecto de la PMA y el del Acm 72-5D3 (CD45), por cuanto ionomicina+PMA si que inducían mitogénesis.

5.4 LAS "SEGUNDAS SEÑALES" PROPORCIONADAS POR Acm COMO INSTRUMENTOS

5.4.1 Sensibilidad de las Subpoblaciones CD4+ y CD8+ a las señales de CD5 y CD45 :

Tanto el Acm 72-5D3 (CD45) como el Acm Cris-1 (CD5) mostraron ser eficaces, en la mitogénesis inducida por Seph-CD3 sobre la subpoblación T4+ pero no en las células T8+ purificadas. Este resultado era coherente con los datos de algunos autores acerca de que las células T4+ son fundamentalmente las responsables de la secreción de IL2 (Palacios 1982) (Solbach 1982). Este punto sin embargo no está definitivamente establecido y algunos autores defienden que los linfocitos T8+ también pueden secretar IL-2 (Welte 1983).

En esta tesis hemos demostrado que los linfocitos T8+ activados por Seph-CD3 poseen receptores funcionales para IL-2 que les permiten proliferar cuando esta es aportada al sistema desde el exterior. Dado que las células T8+ no proliferan en presencia de los Acm 72-5D3 (CD45) o Cris-1 (CD5), debemos aceptar que los linfocitos T8+ son insensibles a señales inductoras de la secreción de IL-2 proporcionadas por ambos Acm.

5.4.2 CD45 y CD5 y Seph-CD3 como modelo de activación independiente de los monocitos:

Hemos descrito con anterioridad los efectos inhibidores de los Acm CD18 y CD4 sobre la mitogénesis inducida por diferentes mecanismos. Una de las

discusiones que han surgido a la vista de estos efectos se ha centrado en determinar si el efecto inhibitor de estos Acm, era debido exclusivamente a que estos interferían la comunicación intercelular, y más concretamente el contacto entre los linfocitos T y los monocitos, o si además estos Acms tenían la capacidad de proporcionar a la célula algún tipo de señal negativa (Dalglish 1986) (Wassmer 1985).

La utilización de anticuerpos monoclonales tales como el Acm 72-5D3 (CD45) y el Acm Cris-1 (CD5), para proporcionar a la célula T la "segunda señal", nos han permitido utilizar un modelo independiente de la señal proporcionada por los monocitos, y por tanto abordar la problemática de una posible señal inhibitor de los Acm CD18 o CD4 desde un ángulo distinto.

5.4.3 Efectos de Acm CD4 sobre la mitogénesis monocito independiente :

Los datos experimentales mostraron que en la mitogénesis de MHDC, activadas por Seph-CD3 junto con Acm 72-5D3 (CD45) o Acm Cris-1 (CD5), los Acm CD4 eran inhibidores. El efecto inhibitor de los Acm CD4 era más intenso en las MHDC que en el caso de las PBMC activadas por Seph-CD3.

Estos datos indicaban:

- 1) La existencia de una inhibición, de la mitogénesis activada por Seph-CD3, proporcionada por Acm CD4, independiente de la posible interferencia o no de estos Acm en la comunicación entre los monocitos y los linfocitos T, dado que esta inhibición se producía incluso en un modelo independiente de monocitos.
- 2) Que los monocitos podían, en cierta forma, contrarrestar esta inhibición dado que el efecto negativo de los Acm CD4 era más intenso en el modelo en

que la señal de los monocitos había sido sustituida por la de Acm CD45 y CD5 que en células activadas en presencia de monocitos.

En el caso de la activación por PHA los Acm CD4 mostraron no tener ninguna capacidad inhibidora,

Las diferencias entre los efectos de los Acm CD4, según que el mitógeno utilizado sea Seph-CD3 o PHA, pueden estar ligadas a la inespecificidad de la PHA. Esta lectina podría utilizar múltiples vías para desarrollar su efecto activador CD3, CD2, (O'Flynn 1982), u otras aun no identificadas, y así esquivar el efecto inhibidor de los Acm CD4.

Existe también la posibilidad de una interferencia específica de la vía de T3-Ti bien sea fisiológica o artefactual. Los antígenos T3 (CD3) y T4 (CD4), en ciertos casos pueden modular conjuntamente (Saizawa 1987) (Weyand 1987) ello podría suponer interferencias en la internalización o en la disponibilidad de estos antígenos en la membrana, y podría dar lugar a una interferencia artefactual de la proliferación.

En conclusión podríamos decir que nuestros datos apoyarían la existencia de efectos inhibidores específicos de CD4 sobre la mitogénesis inducida a través de T3-Ti, independientes de la interferencia del contacto con los monocitos.

5.4.4 Efectos de Acm CD18 sobre la mitogénesis monocito independiente :

Los Acm CD18 no proporcionan ningún tipo de señal negativa para el modelo de activación de MHDC o PBMC por Seph-CD3, en presencia o no de Acm CD5 o CD45.

La mitogénesis inducida por PHA, por el contrario si fue inhibida por los Acm CD18, tanto en el modelo de las PBMC, como en el caso en que la señal proporcionada por los monocitos fue sustituida por la de Acm CD45 o CD5.

En este caso indicaría un posible efecto negativo, independiente de la inhibición del contacto entre los monocitos y los linfocitos T.

Este efecto negativo, de los Acm CD18, no es específico de la mitogénesis inducida por PHA, dado que esta inhibición también se produce en la mitogénesis inducida por PWM o ConA.

De estos datos podemos extraer dos tipos de conclusiones:

- 1) Que la mitogénesis inducida por Seph-CD3 y la inducida por otros mitógenos son distintas en tanto en cuanto que unas se inhiben por Acm CD18 y otras no.
- 2) Que la mitogénesis inducida por PHA, ConA y PWM necesita un tipo de contacto intercelular independiente de los monocitos, que es inhibido por los Acm CD18, o bién, este proporciona una señal negativa que no afecta a la vía T3-Ti.

5.5 LOS MECANISMOS UTILIZADOS POR LOS ACM CD45 y CD5 PARA ACTIVAR LA MITOGENESIS.

5.5.1 Efecto de los Acm 72-5D3 (CD45) y Acm Cris-1 (CD5) en la secreción de IL-2 por MHDC activadas por Seph-CD3:

Como hemos dicho anteriormente la señal proporcionada por los monocitos es necesaria para que se inicie la secreción de IL-2. En esta tesis hemos demostrado que tanto el Acm 72-5D3 (CD45), como Acm Cris-1 (CD5), tienen la capacidad de inducir la secreción de IL-2 en linfocitos T, depleccionados de monocitos, activados por Seph-CD3.

Nuestros datos además indican que muy posiblemente este efecto es directo, y no mediado a través del incremento del número o la afinidad de los receptores de IL-2.

No podemos descartar que la capacidad de estas moléculas, de recibir la señal que permite el inicio de la síntesis detectable de IL-2, sea solo un epifenómeno no relacionado con su función fisiológica. En este sentido cabría la posibilidad que estos dos antígenos fueran receptores de señales no relacionadas con la proliferación celular, pero que sus mecanismos intracelulares de transducción de señales se entrecruzaran con los proporcionados a través de la vía T3-Ti, proporcionando la señal necesaria para el inicio de la secreción de IL-2. Si bien esta es una posibilidad que por el momento no podemos descartar, creemos existen indicios que el papel funcional de estas moléculas este relacionado con los mecanismos de defensa. Entre ellos, con respecto al Acm 72-5D3 (CD45) cabría destacar los siguientes:

- 1) Las moléculas reconocidas por el Acm 72-5D3 (CD45) solo se encuentran en los leucocitos (Dalchau 1980).
- 2) Las moléculas relacionadas con el Antígeno Leucocitario Común, reconocido por el Acm 72-5D3 (CD45), han sido implicadas además con algunas otras funciones linfocitarias. Entre ellas la actividad "Natural Killer" (Newman 1983) (Starlín 1987), la actividad citotóxica (CTL) (Harp 1984) (Lefrancois 1985), la diferenciación de las células B (Yakura 1983) (Mittler 1987), y la expresión de receptores para la IL-2 (Ledbetter 1985).
- 3) Las distintas moléculas de esta familia se hallan expresadas de distinta forma en las diferentes poblaciones linfocitarias implicadas en funciones distintas (Moore 1986) (Moore 1987) (Morimoto 1986).

En cuanto al Acm Cris-1 (CD5) se halla expresado solo en los linfocitos T y en una subpoblación de los linfocitos B.

Parece lógico pensar que moléculas expresadas solo en células relacionadas con la defensa, tanto antígeno específica como inespecífica, del organismo esten relacionadas con funciones características de estas células.

5.5.2 Relación entre la señal proporcionada por el Acm 72-5D3 (CD45) y la proporcionada por los monocitos:

No hemos podido evidenciar diferencias funcionales importantes entre la señal proporcionada por los monocitos y la producida por el Acm 72-5D3 (CD45). Ello no quiere decir evidentemente, que la diana de la señal fisiológica, aportada por los monocitos sea alguna de la moléculas reconocidas por el Acm 72-5D3 (CD45). Sabemos que una de las señales proporcionadas por el monocito es mediada a través de la IL-1 y no parece

que ninguna de las moléculas de la familia T200 sea el receptor para esta interleukina (Kilian 1986) (Dover 1986). Sin embargo, la presencia física de los monocitos proporciona una señal distinta a la de la IL-1 (Davis 1985). Por el momento no puede descartarse que esta señal, producida directamente por el monocito, no sea vehiculizada a través de alguna de las moléculas de la familia T200.

Uno de los problemas que resta por resolver, es el de cual de las moléculas de la familia T200 es la responsable de la transmisión de la señal proporcionada por el Acm al interior de la célula. La enorme diferencia en la eficacia de la señal cuando se utiliza el Acm 111-1C5 (CD45R) parecen indicar que posiblemente no serían las moléculas reconocidas por este Acm (205 y 220 kD) las responsables de esta señal. Si bien por el momento no podemos descartar que esta falta de respuesta al Acm 111-1C5 sea debida a que reconoce un epítipo no funcional.

Lo evidente es, que algunas de las moléculas reconocidas por los Acm CD45 pueden participar en la activación de los linfocitos, proporcionando la señal necesaria para que linfocitos T activados por Seph-CD3 inicien su secreción de IL-2 y puedan iniciar un proceso autocrino de proliferación celular con síntesis de DNA.

5.6 LOS DATOS PRESENTADOS COMO BASE PARA UNA NUEVA HIPOTESIS

5.6.1 Propuesta de un modelo de participación de las glicoproteínas de membrana en la regulación de la activación de los linfocitos T:

La pregunta inicial que nos hemos planteado: ¿Cuales son los antígenos de membrana que participan en la regulación de la activación de los linfocitos T a través de T3-Ti, y como actúan?

Nos ha llevado a caracterizar por una parte, dos posibles vías de señales positivas que inducirían la secreción de IL-2 de MHDC activadas a través de la vía T3-Ti, las de las moléculas reconocidas por los Acm CD45 y CD5.

Por otra parte nos han aportado indicios experimentales que las moléculas reconocidas por CD4, podrían actuar como receptores de señales negativas específicos de la vía de activación a través de T3-Ti.

A partir de estos datos y de los aportados por la bibliografía reciente, proponemos una hipótesis de como algunos antígenos de membrana participan en la regulación de la activación de los linfocitos T.

La secuencia de acontecimientos sería la siguiente:

- 1) La activación de un linfocito mediante la movilización del complejo T3-Ti en su membrana induciría la aparición de receptores funcionales para la IL-2 tanto en las subpoblaciones T4+ como en las T8+.
- 2) La subpoblación T4+ necesitaría una "segunda señal" para activar su secreción de IL-2, esta señal podría ser recibida por el contacto de las moléculas LCA (T200 CD45), o T1 (CD5), con una hipotética molécula diana del monocito. Solo células en determinadas condiciones de preactivación podrían recibirla a través de IL-1. La existencia de una posible molécula

diana en el monocito para la molécula de LCA T200, explicaría los resultados presentados, y estaría acorde con la estructura característica de los receptores que posee molécula LCA T200.

No podemos descartar, por el momento, que el LCA (T200) sea diana de una molécula soluble, lo que si parece clara es su función de molécula receptora de señales.

3) La IL-2 secretada, induciría la proliferación tanto de las células T4+ como de las T8+. Este modelo implicaría que las células T8+ dependerían para su activación de las T4+ activadas en presencia de monocitos, y sugeriría la posibilidad de que las T8+ no precisen para su activación, de la presentación del antígeno por el monocito (por lo menos en algunos casos), sino que les podría ser presentado por cualquier célula con antígenos de HLA de clase I, de lo que si precisarían es de una célula T4+ activada y secretora de IL-2.

4) Por otra parte las moléculas T4 (CD4), serían posibles receptores de una señal de retroalimentación negativa, que inhibiría la secreción de IL-2 en los linfocitos T4+. Si aceptamos que las moléculas diana de los antígenos T4 son los antígenos HLA de clase II, podríamos pensar que la expresión de antígenos HLA de clase II en las células T activadas, podría tener algún papel en los mecanismos de retroalimentación negativa de este sistema. Esta señal podría tener un cierto carácter ambivalente, por cuanto los Acm CD4 inhiben la proliferación de células activadas cuando es utilizado en forma soluble pero pueden actuar como señales facilitadoras de la proliferación cuando se emplean unidos a un soporte rígido (Anderson 1987). De cuanto hemos expuesto en esta tesis queda como aportación prioritaria, por su originalidad e interés, la capacidad que tienen las moléculas del LCA (T200) de recibir una señal que activa la secreción de IL-2 de células

preactivadas, señal que puede ser imitada por los Acm CD45. A partir de aquí se han planteado, como casi siempre en investigación, nuevos interrogantes. Veamos algunos:

¿ Cual es exactamente el fenómeno intracelular, que desencadena la recepción de la señal a través de LCA (T200) ?

¿ Cual es la molécula, soluble o de membrana, que fisiológicamente interactúa con LCA (T200) y le proporciona la señal ?

¿ Cual de las moléculas de LCA (T200) es la realmente involucrada en la recepción de la señal ?

La definición de modelos capaces de responder a estas cuestiones son algunos de los retos que tenemos planteados actualmente.

6 CONCLUSIONES FINALES:

6.1 Principales:

La activación de los linfocitos por Seph-CD3, precisa de una "segunda señal" proporcionada por los monocitos. En ausencia de monocitos tanto los linfocitos T4+ como T8+, activados por Seph-CD3 expresan receptores funcionales para la IL-2 pero son incapaces de secretar ésta y por tanto no proliferan a menos que se les proporcione IL-2 exógena.

Las moléculas del Antígeno Común Leucocitario T200, reconocidas por los Acm CD45 pueden actuar como receptoras de una "segunda señal", necesaria para que los linfocitos CD4+ activados mediante Seph-CD3, secreten IL-2 e inicien los mecanismos de duplicación de su DNA.

Esta señal es similar, en cuanto a sus resultados finales, con la recibida a través del antígeno T1 (CD5), el hecho que el efecto de ambas señales sobre la mitogenesis, de MHDC activados por Seph-CD3, sea sinérgico indica que las vías intracelulares utilizadas podrían ser distintas.

Solo las subpoblaciones T4+, pero no las T8+, son sensibles a la "segunda señal" proporcionada por Acm CD45 o CD5. Por lo tanto los requerimientos para activar ambas subpoblaciones son distintos, por lo menos en cuanto a la naturaleza de la "segunda señal" que necesitan para proliferar.

El efecto inhibitor inducido por Acm CD4 sobre la mitogénesis, inducida por Seph-CD3, es más evidente en los sistemas sin monocitos y por tanto no puede ser atribuido a la interferencia de la comunicación entre estos y las células T, al parecer los Acm CD4 pueden proporcionar una señal activa de inhibición específica de la vía T3-T1.

6.2 Secundarias:

El efecto facilitador de la proliferación de MHDC inducido por el Acm 72-5D3 (CD45) se puede observar en la mitogénesis inducida por Seph-CD3 y PHA pero no en la inducida por ConA.

El Acm 72-5D3 (CD45) actúa en las fases iniciales de la activación.

Si bien, tanto el Acm 72-5D3 (CD45) como el Acm Cris-1 (CD5), son capaces de proporcionar a la célula una "segunda señal" esta es diferente de la proporcionada por la PMA.

El efecto producido por ambos Acm es diferente del obtenido por la adición directa de IL-2 exógena.

Ninguno de los dos Acm es capaz, por si mismo, de inducir la síntesis detectable de RNA o DNA.

Todos los Acm del grupo CD45 estudiados pertenecientes a diferentes isotipos y dirigidos contra diferentes epítomos poseen la capacidad de proporcionar la "segunda señal" necesaria para la mitogénesis de MHDC activadas por Seph-CD3.

Los Acm 72-5D3 (CD45) y Cris-1 (CD5), además de inducir la secreción de IL-2 en MHDC activadas por Seph-CD3 aumentan la secreción de IL-2 de PBMC activadas por Seph-CD3.

El Acm 72-5D3 (CD45) inhibe la actividad NK tal y como ha sido descrito para otros Acm de su mismo grupo.

Los mecanismos de inhibición de los Acm CD18 sobre la mitogénesis inducida por PHA son distintos de la simple interferencia de las interacciones monocito-linfocito T.

La activación por ConA es distinta de la activación por Seph-CD3, en cuanto al tipo de segundas señales que precisan.

La activación por PHA es distinta de la activación por Seph-CD3 en cuanto al tipo de señales que las inhiben.

El Acm Cris-7 posee las características funcionales descritas para otros Acm del isotipo IgG2a del grupo CD3: Es mitogénico para PBMC. Inhibe la mitogénesis inducida por PHA, el Cultivo Mixto Linfocitario y la actividad CTL. No inhibe la actividad NK ni NK-like (o LAK).

La mitogénesis inducida a través del Acm Cris-7 (CD3) soluble puede ser inhibida de forma inespecífica por Acm de isotipo IgG2a pero no con los del isotipo IgG1. Esta inhibición inespecífica desaparece al utilizarse Acm CD3 unido a sefarosa.

El Acm 68-5A5 (CD18) inhibe la mitogénesis inducida por PHA, ConA, PWM, MLC, y Toxoide Tetánico pero no la inducida por Seph-CD3. Además inhibe la actividad NK y CTL, como ya había sido descrito para otros Acm del grupo CD18.

El Acm Edu-2 (CD4) inhibe la mitogénesis inducida por Seph-CD3, MLC y Toxoide Tetánico pero no la producida por PHA, ConA y PWM. Estos efectos concuerdan con lo descritos para otros Acm de su mismo grupo.

7 BIBLIOGRAFIA

Acres, R.B., A. Larsen, and P.J. Conlon. 1987. IL 1 expression in a clone of human T cells. *J.Immunol.* 138:2132-2136.

Acuto, O., R.E. Hussey, K.A. Fitzgerald, J.P. Potentis, S.C. Meuer, S.F. Schlossman, and E.L.Reinherz. 1983. The human T cell receptor: appearance in ontogeny and biochemical relationship of α and β subunits on IL-2 dependent clones and T cell tumors. *Cell* 34:717-726.

Acuto, O., and E.L.Reinherz. 1985. The human T cell receptor. *N.Engl.J.Med.* 312:1100-1111.

Alcover, A., C. Milanese, and E.L. Reinherz. 1985. Pathways of human T lymphocyte development and activation. *BioEssays* 4:259-264.

Alcover, A., M.J. Weiss, J.F. Daley, and E.L. Reinherz. 1986. The T11 glycoprotein is functionally linked to a calcium channel in precursor and mature T lineage cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83:2614-2618.

Alvarez, J.M., A. Silva, and M.O. de Landazuri. 1979. Human T cell growth factor, I optimal conditions for its production. *J.Immunol.* 123:977-983.

Anderson, P. M.L. Blue, C. Morimoto, and S.F. Schlossman. 1987. Cross-linking of T3 (CD3) with T4 (CD4) enhances the proliferation of resting T lymphocytes. *J.Immunol.* 139:678-682.

Andrus, L., A. Granelli-Piperno, and E. Reich. 1984. Cytotoxic T cells both produce and respond to IL-2. *J.Exp.Med.* 59:647-652.

Arai, K., T. Yokota, A. Miyajima, N. Arai and F. Lee. 1986. Molecular biology of T-cell-derived lymphokines. *BioEssays* 5:166.

- Ashwell, J.D., R.J. Robb, and T.R. Malek. 1986. Proliferation of T lymphocytes in response to interleukin 2 varies with their state of activation. *J.Immunol.* 137:2572-2578.
- Auron, P.E., S.J.C. Warner, A.C. Webb, J.G. Cannon, H.A. Bernsheim, K.J.P. McAdam, L.J. Rosenwasser, G. Lopreste, S.F. Mucci, and C.A. Dinarello. 1987. Studies on the molecular nature of human interleukin-1. *J.Immunol.* 138:1447-1456.
- Baker, P.E., S. Gillis, and K.A. Smith. 1979. Monoclonal cytotoxic T cell lines. *J.Exp.Med.* 149:273-278.
- Bank, I., and L. Chess. 1985. Perturbation of the T4 molecule transmits a negative signal to T cells. *J.Exp.Med.* 162:1294-1303.
- Barclay, A.M., D.I. Jackson, A.C. Willis, and A.F. Williams. 1987. Lymphocyte specific heterogeneity in the rat leucocyte common antigen (T200) is due to differences in poly peptide sequences near the NH₂-terminus. *EMBO J.* 6:1259-1264.
- Bentwich, Z., and H.G. Kunkel. Specific properties of human B and T Lymphocytes and alterations in disease. *Transplant.Rev.* 16:29-50.
- Bernabeu, C., A.C. Carrera, M.O. De Landauri, and F. Sanchez-Madrid. 1987. Interaction between the CD45 antigen and phytohemagglutinin. Inhibitory effect on the lectin-induced T cell proliferation by anti-CD45 monoclonal antibody. *Eur.J.Immunol.* 17:1461-1466.
- Biddinson, W.E., P.E. Rao, M.A. Talle, G. Golstein, and S. Shaw. 1982. Possible involvement of the OKT4 molecule in T cell recognition of class II HLA antigens. *J.Exp.Med.* 156:1065.
- Biddinson, W.E., P.E. Rao, M.A. Talle, C.M. Bosselli, and G. Goldstein. 1984. Distinct epitopes on the T8 molecule are differentially involved in Cytotoxic T cell function. *Human Immunol.* 9:117-130.

Blanchard, D., C. Van Els, J. Borst, S. Carrell, A. Boylston, J.E. De Vries, and H. Sptis. 1987. The role of the cell receptor, CD8, and LFA-1, in different stages of the cytolytic reaction mediated by alloreactive T lymphocyte clones. *J.Immunol.* 138:2417-2421.

Borche, L., F. Lozano, R. Vilella, J. Vives. 1987. CD43 monoclonal antibodies recognize the large sialoglycoprotein of human leukocytes. *Eur.J.Immunol.* 17:1523-1526.

Braciale, T.J., L.A. Morrison, M.T. Sweetser, J. Sambrook, M.J. Gething, and V.L. Braciale. 1987. Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-Restricted T lymphocytes. *Immunol.Rev.* 98:95-114.

Brooks, C.G., D.L. Urdal and C.S. Henney. 1983. Lymphokine-driven "differentiation" of cytotoxic T-cell clones into cells with NK-like specificity. *Immunol.Rev.* 72:43-71.

Brottier, P., L. Boumsell, C. Gelin, and A. Bernard. 1985. T cell activation via CD2 (Tgp50) molecules: accessory cells are required to trigger T cell activation via CD2-D66 plus CD2-9.6/T11-1 epitopes. *J.Immunol.* 135:1624-1631.

Bruszewski, W.B., J.A. Bruszewski, H. Tonnu, S.L. Ferezy, R.L. O'Brien, and J.W. Parker. 1984. Early mitogen-induced metabolic events essential to proliferation of human T lymphocytes: dependence of specific events on the influence of adherent accessory cells. *J.Immunol.* 132:2837-2843.

Burns, G.F., J.A. Werkmeister, and T. Triglia. 1984. A novel antigenic cell surface protein associated with T200 is involved in the post-activation stage of human NK cell mediated lysis. *J.Immunol.* 133:1391-1396.

Cantrell, D.A. and K.A. Smith. 1984. The interleukin-2 T-cell system a new cell growth model. *Science* 224:1312-1316.

- Cantrell, D., A.A. Davies, M. Londei, M. Feldman, and M.J. Crumpton. 1987. Association of phosphorylation of T3 antigen with immune activation of T lymphocytes. *Nature* 325:540-542.
- Carrel, S., S. Salvi, L. Giuffre, P. Isler, and J.C. Cerottini. 1987. A novel 90-kDa polypeptide (Tp90) possibly involved in an antigen-independent pathway of T cell activation. *Eur.J.Immunol.* 17:835-841.
- Casali, P., S.E. Burastero, M. Nakamura, G. Inghirami, A.L. Notkins. 1987. Human lymphocytes making reumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1 B-cell subset. *Science* 236:77-81.
- Ceuppens, J.L., and M.L. Baroja. 1986. Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT-3. *J.Immunol.* 137:1816-1821.
- Chu, E., L.J. Rossenwasser, C.A. Dinarello, M. Lareau, and R.S. Geha. 1984. Role of interleukin 1 in antigen-specific T cell proliferation. *J.immunol.* 132:1311-1316.
- Claman, H.N., E.A. Chaperon. 1966, R.F. Triplett. Thymus-marrow cell combinations synergism in antibody production. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 122:1167-1171.
- Clark, E.A. and J.A. Ledbetter. 1986. Amplification of the immune response by agonistic antibodies. *Immunol.Today* 7:267-269.
- Clement, L.T., A.B. Tilden, N.E. Dunlap. 1985. Analysis of the monocyte Fc receptors and antibody mediated cellular interactions required for the induction of T cell proliferation by anti-T3 antibodies. *J.Immunol.* 135:165-171.
- Conlon, P.J., 1983. A rapid biologic assay for the detection of interleukin 1. *J. Immunol.* 131:1280-1282.

Cowen, M. and G.R. Mundy. 1986. Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon γ on bone resorption in vitro. J.Immunol. 131:1160-1165.

Cowing, C., 1985. Does T cell restriction to Ia limit the need for self-tolerance?. Immunol.Today 6:72-74.

Dalchau, R., J. Kirkley, and J.W. Fabre. 1980. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. Eur.J.Immunol. 10:737-744.

Dalchau R., B.F. Flanagan, and J.W. Fabre. 1986. Structural implications of the location and stability to proteolytic enzymes of immunodominant determinants of the human leucocyte common molecule. Eur.J.Immunol. 16:993-999.

Dalchau, R., B.E. Flanagan, and J.W. Fabre. 1987. Analysis by binding to pure antigens and by flow cytometry of the antigenic determinants recognized by the Workshop anti-leucocyte common (LC)-antigen antibodies. in McMichael et al. (eds.) Leucocyte typing III. Oxford University Press. Oxford 1987.

Dalgleish, A.G. 1986. The T4 molecule: function and structure. Immunol.Today. 7:142-144

Damle, N.K., N. Mohaghehpour, and E.G. Engleman. 1984. Activation of antigen-specific suppressor T lymphocytes in man involves dual recognition of self class I MHC molecules and Leu-4/T3 associated structures on the surface of inducer T lymphocytes. J. Immunol. 133:1235-1239.

Damle, N.K., L.V. Doyle, and E.C. Bradley. 1986. Interleukin 2-activated human killer cells are derived from phenotypically heterogeneous precursors. J.Immunol. 137:2814-2822.

Dasgupta, J.D., K. Cemach, D.P. Dubey, E.J. Yunis, and D.B. Amos. 1987. The role of class I histocompatibility antigens in the regulation of T-cell activation. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 84:1094-1098.

- Davis, L., and P.E. Lipsky. 1985. Signals involved in T cell activation, I Phorbol esters enhance responsiveness but cannot replace intact accessory cells in the induction of mitogen-stimulated T cell proliferation. *J.Immunol.* 135:2946-2952.
- Davis, L. and P.E. Lipsky. 1986. Signals involved in T cell activation. II distinct roles of intact accessory cells , phorbol esters, and interleukin 1 in activation and cell cycle progression of resting T lymphocytes. *J.Immunol.* 136:3588.
- Dinarello, C.A., and J. Cannon. 1986. Interleukin-1. *Progress in Immunology.* B. Cinader et Al. eds. Academic Press. Toronto. 1986 p.449-457.
- Doherty, P.C., and R.M. Zinkernagel. 1975. H-2 compatibility is required for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J.Exp.Med.* 141:502-506.
- Dongworth, D.W., F.M. Gotch, J.E.K. Hildreth, A. Morris and A.J. McMichael. 1985. Effects of monoclonal antibodies to the α and β chains of the human lymphocyte function-associated (H-LFA-1) antigen on T Lymphocyte functions. *Eur.J.Immunol.* 15:888-892.
- Donohue, J.H., M. Rosenstein, A.E. Chang, M.T. Lotze, R.J. Robb and S.A. Rosenberg. 1984. The systemic administration of purified interleukin 2 enhances the ability of sensitized murine lymphocytes to cure a disseminated syngeneic lymphoma. *J.Immunol.* 132:2123-2128.
- Dower, S.K., S.R. Kronheim, C.J. March, P.J. Conlon, T.P. Hopp, S. Gillis, and D.L. Urdal. 1985. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J.Exp.Med.* 162:501-515.
- Dower, S.K., S.R. Kronheim, T.P. Hopp, M. Cantrel, M. Deely, S. Gillis, C.S. Henney, and D.L. Urdal. 1986. The cell surface receptors for interleukin α and interleukin β are identical. *Nature* 324:266-268.

Dower, S.K., and D.L. Urdal. 1987. The interleukin 1 receptor. *Immunol.Today* 8:46-51.

Doyle, C., J.L. Strominger. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*. 330:256-259.

Dröge, W., 1986. Protein kinase C in T-cell regulation. *Immunol.Today* 7:340-343.

Dukovich, M., Y. Wano, L. Bich Thuy, P. Katz, B.R. Cullen, J.H. Kerhl, and W.C. Greene. 1987. A second human interleukin-2 binding protein that may be a component of high-affinity interleukin-2 receptor. *Nature* 327:518-521.

Eismary, M.N., E.J. Fox, and R.R. Rich. 1986. Opposing immunoregulatory functions of CD8+ lymphocytes: a requirement for monocytes in suppressor cell induction. *J. Immunol.* 137:2468-2477.

Engleman, E.G., C.G. Benike, E. Glickman, and R.L. Evans. 1981. Antibodies to membrane structures that distinguish suppressor/cytotoxic and helper T lymphocyte subpopulations block the mixed leukocyte reaction in man. *J.Exp.Med.* 154:193-197.

Emrich, F., K. Eichmann, and H.U. Weltzien. 1986. The generation of the repertoire of T cell specificities and functions: toward a consistent model. *Progress in Immunology*. B. Cinader et Al. eds. Academic Press. Toronto. 1986. p.406-417.

Emrich, F., L. Kanz, K. Eichmann. 1987. Cross-linking of the T cell receptor complex with the subset-specific differentiation antigen stimulates interleukin 2 receptor expression in human CD4 and CD8 T cells. *Eur.J.Immunol.* 17:529-534.

Fantes, P. 1986. Growth factor, G0 and cell cycle controls. *BioEssays* 4:32-33.

- Farrar, W.L., J.L. Cleveland, S.K. Beckner, E. Bonvini and S.W. Evans. 1986. Biochemical and molecular events associated with interleukin-2 regulation of lymphocyte proliferation. *Immunol.Rev.* 92:49-65.
- Ferrini, S., C. Bottino, R. Biassoni, A. Poggi, R.P. Sekaly, L. Moretta, and A. Moretta. 1987. Characterization of CD3+, CD4-, CD8-, clones expressing the putative T cell receptor γ gene products. *J.Exp.Med.* 166:277-282
- Finnegan, A., and J.A. Berzofsky. 1986. Antigen recognition by T cells. *Immunol.Today.* 7:317-319.
- Fisher, A., G. Sterkers, D. Charron, and A. Durandy. 1986. Possible T4-HLA class II interaction as an essential event in antigen-specific helper T lymphocyte dependent B cell activation. *Eur.J.Immunol.* 16:1111-1116.
- Fleischer, B. 1984. Activation of human T lymphocytes II. Involvement of the T3 antigen in Polyclonal T cell activation by mitogenic lectines and oxidation. *Eur.J.Immunol.* 14:748-752.
- Fleischer, B., H. Schrezenmeier, and H. Wagner. 1986. Function of the CD4 and CD8 molecules on human cytotoxic T lymphocytes: regulation of T cell triggering. *J.Immunol.* 136:1625-1628.
- Fox, D.A., R.B. Hussey, K.A. Fitzgerald, A. Bensussan, J.F. Daley, S.F. Schlossman and E. Reinherz. 1985. Activation of human thymocytes via the 50 kD T11 Sheep erythrocyte binding protein induces the expression of interleukin 2 receptors on both T3+ and T3- populations. *J.Immunol.* 134:330-335.
- Gadol, N., and K.A. Ault. 1986. Phenotypic and functional characterization of human Leu1 (CD5) B cells. *Immunol.Rev.* 93:23-34.
- Gallagher, R.B., A. Whelan, and C. Feighery. 1986. Studies on the accessory requirement for T lymphocyte activation by Concanavalin A. *Clin.Exp.Immunol.* 66:118-125.

- Gay, D., P. Maddon, R. Sekaly, M.A. Talle, M. Godfrey, E. Long, G. Goldstein, L.Chess, R. Axel, J. Kappler, and P. Murrack. 1987. Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature* 328:626-629.
- Gearing, A.J.H., A.P. Johnstone and R. Thorpe. 1985. Production and assay of the interleukins. *J.Immunol.Methods* 83:1-27.
- Geffer, M., and P. Murrack. 1986. Development and modification of the lymphocyte repertoire. *Nature* 321:116-118.
- Gelfand, E.W., R.K. Cheung, S. Grinstein, and G.B. Mills. 1986. Characterization of the role for the calcium influx in mitogen-induced triggering of human T cell, identification of calcium dependent and calcium independent signals. *Eur.J.Immunol.* 16:907-912.
- Geppert, T.D., and P.E. Lipsky. 1987. Accessory cell independent proliferation of human T4 cells stimulated by immobilized monoclonal antibodies to CD3. *J.Immunol.* 138:1660-1666.
- Gery, I. and B.H. Waksman. 1972. Potentiation of the T lymphocyte response to mitogen. *J.Exp.Med.* 137:143.
- Gillis, S., M.M. Ferm, W. Ou, K.A. Smith. 1978. T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J.Immunol.* 120:2027-2032.
- Grabstein, K., S. Dower, S. Gillis, D. Urdal, and A. Larsen. 1986. Expression of interleukin 2, interferon γ , and the IL-2 receptor by human peripheral blood lymphocytes. *J.Immunol.* 136:4503-4508.
- Greaves, M.F., J.T.T. Owen, and M.C. Raff. 1973. T and B lymphocytes; properties and roles in immune responses. American Elsevier. New York. 1973.

Greene, W.C., J.M. Depper, M. Krönke and Warren Leonard. 1986. The human interleukin-2 receptor analysis of structure and function. Immunol.Rev. 92:29-47.

Gonez, L.J., I.D. Walker, M.S. Sandrin, and I.F.C. McKenzie. 1987. High sequence conservation between Rat (T200) and Mouse (Ly-5) Leucocyte Common Antigens. Immunogenetics 25:263-266.

Goronzy, J., C. Weyand, J. Imboden, B. Manger, and C.G. Fathman. 1987. Heterogeneity of signal requirements in T cell activation within a panel of human of human proliferative T cell clones. J. Immunol. 138:3087-3093.

Gunter, K.C., R.N. Germain, R.A. Kroccek, T. Saito, W.M. Yokoyama, C. Chan, A. Weiss, and E.M. Shevach. 1987. Nature. 326:505-507.

Haeffener-Cavaillon, N., J.M. Cavaillon, M. Moreau, and L. Szabo. 1984. Interleukin 1 secretion by human monocytes stimulated by the isolated polysaccharide region of the bordetella pertusis endotoxin. Mol.Immunol. 21:389-395.

Hale, G., C. Buckie, P. Lovat, T. Prospero, and H. Waldmann. Epitope mapping of the human leucocyte common antigen by competitive binding and synergistic lysis. in McMichael et Al. (Eds). Leucoyte Typing III. Oxford University Press. Oxford U.K. 1987. p.811-814

Hamann, A., D. Jablonski, and H.G. Thiele. 1986. Contact interaction between lymphocytes is a general event folowing activation and is mediated by LFA-1. Eur.J.Immunol. 16:847-850.

Hara, T., S.M. Fu, and J.A. Hansen. 1985. Human T cell activation. J.Exp.Med. 161:1513-1524.

Hardy, R.R., and K. Hayakawa. 1986. Development and Physiology of LY-1B and its human homolog, LEU-1 B. Immunol.Rev. 93:53-79.

Hardy, R.R., K. Hayakawa, M. Shimizu, K. Yamasaki, and T. Kishimoto. 1987. Rheumatoid factor secretion from human Leu-1+ B cells. *Science* 236:81-83.

Harp, J.A., B.S. Davis, and S.J. Ewald. 1984. Inhibition of T cell responses to alloantigens and polyclonal mitogens by Ly-5 antisera. *J.Immunol.* 133:10-15.

Haskard, D., D. Cavender, P. Beatty, T. Springer, and M. Ziff. 1986. T lymphocyte adhesion to endothelial cells: mechanisms demonstrated by anti-LFA-1 monoclonal antibodies. *J.Immunol.* 137:2901-2906.

Haynes, B.F. 1986. Summary of T cell studies performed during the second international workshop and conference on human leucocyte differentiation antigens in L. Reinherz et al. (eds.). Springer-Verlag. New York. *Leukocyte Typing II Vol.I* p.3-8.

Herberman R.B. 1987. Lymphokine-activated killer cell activity. *Immunol.Today* 8:178-181.

Heumann, D., and T.L. Vischer. 1987. Activation of resting lymphocytes by cross-linked anti CD3 (T3). *Eur.J.Immunol.* 17:1657-1660.

Hoffman, T., and H.G. Kunkel. The E-rosette Test, p71. in B.R. Bloom and J.R. David (eds). *In vitro methods in cell mediated and tumor immunity*. Academic Press inc. New York. 1976.

Hogg, N., L. Takaes, D.G. Palmer, Y. Sevendran, and C. Allen. 1986. The p150,95 molecule is a marker of human mononuclear phagocytes: comparison with expresion of class II molecules. *Eur.J.Immunol.* 16:240-248.

Holter, W., O. Majdic, H. Stockinger and W Knapp. 1985. Analysis of T cell activation with a non mitogenic anti CD3 antibody and the phorbol ester TPA. *Clin.Exp.Immunol.* 62:600-606.

Holter, W., G.F. Fisher, O. Majdic, H. Stockinger, and W. Knapp. 1986. T cell stimulation via the erythrocyte receptor. *J.Exp.Med.* 163:654-664.

- Huang, H.S., N.H. Jones, J.L. Strominger, and L. Herzenberg. 1987. Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of T lymphocytes and a subset of B cells: Molecular homology to its human counterpart Leu-1/T1 (CD5). Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:204-208.
- Hünig, T. 1985. The cell surface molecule recognized by the erythrocyte receptor of T lymphocytes. J.Exp.Med. 162:890-901.
- Hünig, T., R. Mitnatch, G. Tiefenthaler, C. Kohler, and M. Miyasaka. 1986. T11TS, the cell surface molecule binding to the "erythrocyte receptor" of T lymphocytes: cellular distribution, purification to homogeneity and biochemical properties. Eur.J.Immunol. 16:1615-1621.
- Inaba, K. and R.M. Steinman. 1987. Monoclonal antibodies to LFA-1 and to CD4 inhibit the mixed leukocyte reaction after the antigen-dependent clustering of dendritic cells and T lymphocytes. J.Exp.Med. 165:1403-1417.
- Inaba, K., J.W. Young, R.M. Steinman. 1987. Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. J.Exp.Med. 166:182-194.
- Imboden, J.B., A. Weiss, and J.D. Stobo. 1985. Transmembrane signaling by the T3 antigen receptor complex. Immunol.Today 6:328-331.
- Imboden, J.B., and J.D. Stobo. 1985. Transmembrane signaling by the T3 antigen receptor. J.Exp.Med. 161:446-456.
- Isakov, N.I., W. Scholz, and A. Altman. 1986. Signal transduction and intracellular events in T-lymphocyte activation. Immunol.Today 7:271-277.
- Isakov, N. and A. Altman. 1986. Lymphocyte activation and immune regulation. Immunol.Today 7:155-157.
- Isakov, N. and A. Altman. 1987. Human T lymphocyte activation by tumor promoters: Role of protein kinase C. J.immunol. 138:3100-3107.

Jacobson, S., and W.E. Biddison. 1984. Major histocompatibility complex molecules as virus receptors. *Immunol.Today* 5:262-263.

Jones, N.H., N.L. Clabby, D.P. Dialynas, H.S. Huang, L.A. Herzsenberg, and J.L. Strominger. 1986. Isolation of complementary DNA clones encoding lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* 323:346-349.

June, C.H., P.S. Rabinovitch, and J.A. Ledbetter. 1987. CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J.Immunol.* 138:2782-2792

Kaczmarek, L., B. Callabretta and R. Baserga. 1985. Expression of cell-cycle-dependent genes in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 82:5375-5379.

Kappler, J., R. Kubo, K. Haskins, J. White, and P. Marrack. 1983. The mouse T cell receptor comparison of MHC restricted receptors on two cell hybridomas. *Cell* 34:727-737.

Kaye, J., S. Gillis, S.b. Mizel, E.M. Shevach, T.R. Malek, C.A. Dianrello, L.B. Lachman, and C.A. Janeway. 1984. Growth of a cloned helper T cell line induced by monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. *J.Immunol.* 133:1339-1345.

Keizer, G.D., J. Borst, C.G. Figdor, H. Spits, F. Miedema, C. Tershorst and J.E. De Vries. 1985. Biochemical and functional characteristics of the human leucocyte membrane antigen family LFA-1, Mo-1, and p150,95. *Eur.J.Immunol.* 15:1142-1147.

Kelso, A., H.R. Macdonald, K.A. Smith, J.C. Cerottini, and K.T. Brunner. 1984. Interleukin 2 enhancement of lymphokine secretion by T lymphocytes: analysis of established clones and primary limiting dilution microcultures. *J.Immunol.* 132:2932-2938.

Kholer, G. and C. Milstein. 1975 Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.

Kholer, G. and C. Milstein. 1976 Derivation of specific antibody-producing tissue cultures and tumor lines by cell fusion. *Eur.J.Immunol.* 6:292-296.

Kilian P.L., K.L. Kaffka, A.S. Stern, D. Woehle, W.R. Benjamin, T.M. Dechiara, U. Gubler, J.J. Farrar, S.B. Mizel, and P.T. Lomedico. 1986. Interleukin 1 α and interleukin 1 β bind to the same receptor on T cells. *J.Immunol.* 136:4509-4514.

Kim, K.H., R.A. Shivdasani, and D.W. Thomas. 1986. Two roles for Ia in antigen-specific T lymphocyte activation. *J. Immunol.* 137: 3393-3400.

Knowles, R., 1987. Three distinct CD1 molecular complexes can be distinguished by the co-immunoprecipitation of unique extra subunits, in addition to beta-2-microglobulin. in McMichael et al. (eds.) *Leucocyte typing III*. Oxford University Press. Oxford 1987. p.86-89

Koretzky, G.A., R.P. Daniele, W.C. Greene, and P.C. Nowell. 1983. Evidence for an interleukin-independent pathway for human lymphocyte activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 80:3444-3447.

Kornbluth, J. 1985. Comparison of human natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes using cloned and uncloned lines of effector cells. in H. Von Boehmer and W. Haas (eds.) *T cell clones*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. p.297-310.

Krensky, A.M., F. Sanchez-Madrid, E. Robbins, J. Nagy, T.A. Springer and S.J. Burakof. 1983. The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA2, and LFA-3: Cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J. Immunol.* 131:611-615.

Krensky, AM., S.J. Mentzer, C. Calyberger, D.C. Anderson, F.C. Schmalstieg, S.J. Burakoff, and T.A. Spinger. 1985. Heritable lymphocyte function-associated antigen-1 deficiency abnormalities of cytotoxicity and proliferation associated with abnormal expression of LFA-1. *J.Immunol.* 135:3102-3108.

Lainer, L.L., M.A. Arnaout, R. Schwating, N.L. Warner, and G.D. Ross. 1985. p150/95, Third member of the LFA1/CR3 polypeptide family identified by anti-leu M5 monoclonal antibody. *Eur.J.Immunol.* 15:713-718.

Lainer, L.L. and J.H. Philips. 1986. Evidence for Three types of human cytotoxic lymphocyte. *Immunol.Today* 7:132-134.

Lakhanpal, S., N.J. Gonchoroff, B.S. Handwerger. 1987. Interleukin 2 induces proliferation of normal "resting" human T cells in the absence of other known external stimulation. *Cell.Immunol.* 106:62-75.

Landsteiner, K., M.W. Chase. 1942. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 49:688-690.

Lanzavechia, A.. 1986. Is the T cell receptor involved in T-cell killing. *Nature* 319:778-780.

Lamb, J.R., E.D. Zanders, W.Sewell, M.J. Crumpton, M. Feldmann and M.J. Owen. 1987. Antigen-specific T cell unresponsiveness in cloned helper T cell mediated via CD2 or CD3/Ti receptor pathways. *Eur.J.Immunol.* 17:1641-1644.

Ledbetter, J.A., R.L.Evans, M. Lipski, C. Cunningham-Rundles, R.A. Good and L.A. Herzenberg. 1981. Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocytes helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J.Exp.Med.*153:310-315.

Ledbetter, J.A., P.J. Martin, C.E. Spooner, D. Wofsy, T.T. Tsu, P.G. Beatty and P. Gladstone. 1985. Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells. *J.Immunol.* 135:2331-2336.

- Ledbetter, J.A., M. Parson, P.J. Martin, J.A. Hansen, P.S. Rabinovitch, and C.H. June. 1986. Antibody binding to CD5 (Tp67) and Tp 44 cell surface molecules: effects on cyclic nucleotides, cytoplasmic free calcium, and cAMP-mediated suppression. *J.Immunol.* 137:3299-3305.
- Lefrancois, L., M.J. Beva. 1985. Functional modifications of cytotoxic T-lymphocyte T200 glycoprotein recognized by monoclonal antibodies. *Nature* 314:449-452.
- Leonnard, W.J., J.M. Depper, G.R. Crabtree. et Al. 1984. Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature* 311:626-631.
- Lesslauer, W., F. Koning, T. Ottenhoff, M. Giphart, E. Goulmy, and J.J. Van-Rood. 1986. T90/44 (9.3 antigen) a cell surface molecule with a functional T cell activation. *Eur.J.Immunol.* 16:1289:1296.
- Lesslauer, W., and H. Gmunder. 1986. Biochemical characterization of the 9.3 antigens of human T cells: simultaneous expression of disulfide bonded 90 kilodalton dimers and free subunits at the cell surface. *Mol.Immunol.* 23:271-278.
- Ling, N.R., I.C.M. MacLennan. and D.Y Mason. 1987. B-cell and plasma cell antigens: new and previously defined clusters. in McMichael et al. (eds.) *Leucocyte typing III.* Oxford University Press. Oxford 1987. p.336.
- Lisowska-Grosspierre, B., M.C. Bohler, A. Fisher, C. Mawas, T.A. Springer, and G. Giscelli. 1986. Defective membrane expression of the LFA-1 complex may be secondary to the absence of the β chain in a child with recurrent bacterial infection. *Eur.J.Immunol.* 16:205-208.
- Looney, R.J., and G.N. Abraham. 1984. The Fc portion of intact IgG Blocks stimulation of human PBMC by anti-T3. *J.Immunol.* 133:154-156.

Lopez-Botet, A. Moretta, J. Lowenthal, R. Accolla, G. Pantaleo y L. Moretta. 1986. Caracterización de anticuerpos monoclonales específicos para el receptor de IL-2. *Inmunologia*. 5:46-50.

Lydyard, P.M., P.Y. Youinou, and A. Cooke. 1987. CD5-positive B cells in rheumatoid arthritis and chronic lymphocytic leukemia. *Immunol.Today* 8:37-39.

Main, E.K., J. Strizki, and P. Schochet. 1987. Placental production of immunoregulatory factors: trophoblast is a source of interleukin-1. *Trophoblast Res.* 2:149-160.

Malek, T.R., C. Chan, L.H. Glimcher, R.N. Germain, and E.M. Shevach. 1985. Influence of accessory cell and T cell surface antigens on mitogen-induced IL-2 receptor expression. *J.Immunol.* 135:1826-1833.

Marrack, P., C. Hannum, M. Harris, K. Haskins, R. Kubo, M. Pigeon, R. Shimonkevits, J. White, and J. Kappler. 1983. Antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell receptors. *Immunol.Rev.* 76:131-145.

Martin, P.J., J.A. Ledbetter, Y. Morishita, C.H. June, P.G. Beatty, and J.A. Hansen. 1986. A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J.Immunol.* 136:3282-3287.

Martz, E. 1987. LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes. *Human Immunol.* 18:3-37.

Marx, J.L., 1985. The T-cell receptor - the genes and beyond. *Science* 227:733-735.

McMichael, A., and F. Gotch. T cell antigens new and previously defined clusters. Thirt international workshop and conference on human leucocyte differentiation antigens in Mc Michael et al (eds). *Leucocyte Typing III*. Oxford University Press. Oxford U.K. p31-62.

Medawar, P.B. 1944. The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. *J.Anat.* 78:176-199.

Mentzer, S.J., J.A. Barbosa, and S.J. Burakoff. 1985. T3 monoclonal antibody activation of nonspecific cytotoxicity: a mechanism of CTL inhibition. *J.Immunol.* 135:34-38.

Mentzer, S.J., S.H. Gromkowski, A.M. Krensky, S.J. Burakoff, and E. Martz. 1985. LFA-1 Membrane molecule in the regulation of homotypic adhesions of human B lymphocytes. *J.Immunol.* 135:9-11.

Mentzer, S.J., E. Remold, M.A.V. Crimmins, B.E. Bierer, F.S. Rosen, and S.J. Burakoff. 1987. Sialophorin a surface sialoglycoprotein defective in the wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *J.Exp.Med.* 165:1383-1390.

Meuer, S.C., K.A. Fitzgerald, R.E. Hussey, J.C. Hodgdon, S.F. Schlossman, and E.L. Reinherz. 1983. Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. *J.Exp.Med.* 157:705-719.

Meuer, S.C., 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. 1984. An alternative pathway of T cell activation a functional role for the 50 kD T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36:897-906.

Meuer, S., M.Hauer, U. Moebius, E. Schiedhelm, K. Deusch, M. Schykouski and K.H. Meyer. 1986. Definition of discrete signals involved in human T-cell activation. *Mol.Immunol.* 23:1157.

Mire-Sluis, A.R., R.G. Wickremasinghe, A.V. Hoffbrand, A.M. Timms, and G.E. Francis. 1987. Human T lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin undergo a single round of cell division without a requirement for interleukin-2 or accessory cells. *Immunol.* 60:7-12.

Mittler, R.S., R.S. Greenfield, B.Z. Schacter, N.F. Richard, and M.K. Hoffmann. 1987. Antibodies to the common leukocyte antigen (T200) inhibit an early phase in the activation of resting human B cells. *J. Immunol.* 138:3159-3166.

Moore, K., and N.A. Nesbitt. 1986. Identification and isolation of OKT4+ suppressor cells with the monoclonal antibody WR16. *Immunol.* 58:659-664.

Moore, K., and N.A. Nesbitt. 1987. Functional heterogeneity of CD4+ T lymphocytes: two subpopulations with counteracting immunoregulatory functions identified with the monoclonal antibodies WR16 and WR19. *Immunol.* 61:159-165.

Moore, K., A.M. Nesbitt, and D.B. Jones. 1987. Subsets of CD4+ tonsillar lymphocytes with helper and suppressor functions and their distribution in lymphoid tissue. in McMichael et al. (eds.) *Leucocyte typing III*. Oxford University Press. Oxford 1987 p.228-230.

Moretta, A., D. Olive, A. Poggi, G. Pantaleo, C. Mawas, and L. Moretta. 1986. Modulation of surface T11 molecules induced by monoclonal antibodies: analysis of the functional relationship between antigen-dependent and antigen-independent pathways of human T cell activation. *Eur.J.Immunol.* 16:1427-1432.

Morimoto, C., N.L. Letvin, C.E. Rudd, M.Hagan, T. Takeuchi, and S.F. Schlossman. 1986. The role of The 2H4 molecule in the generation of suppressor function in ConA-activated T cells. *J.Immunol.* 137:3247-3253.

Murray, A.W., A. Fournier, and S.J. Hardy. 1987. Proteolytic activation of protein kinase C: a physiological reaction. *TIBS* 12:53-54.

Nabholz, M., and H.R. MacDonald. 1983. Cytolytic T lymphocytes. *Ann.Rev.Immunol.* 1:273-306.

- Nel, A.E., P. Buic, G.R. Lattanze, H.C. Stevenson, P. Miller, W. Dirienzo, G.F. Stefanini, and R.M. Galbraith. 1987. Reaction of T lymphocytes with anti-T3 induces translocation of C-Kinase activity to the membrane and specific substrate phosphorylation. *J. Immunol.* 138:3519-3524.
- Newman, W., L.D. Fast and L.M. Rose. 1983. Blockade of NK cell lysis is a property of monoclonal antibodies that bind to distinct regions of T-200. *J. Immunol.* 131:1742.
- Newman, W., S.R. Tragan, and L.D. Fast. 1984. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. *Mol. Immunol.* 21:1113-1121.
- Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233:305-312.
- Noonan, D.J., N. Isakov, A.N. Theofilopoulos, F.J. Dixon, and A. Altman. 1987. Protein kinase C activating phorbol esters augment expression of T cell receptor genes. *Eur. J. Immunol.* 17:803-807.
- Norcross, M.A. 1986. Models for MHC-Restricted T-cell antigen recognition. *BioEssays* 5:153-157.
- Nowell, P.C. 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal leucocytes. *Cancer Res.* 20:462-466.
- O'Flynn, K.O., A.M. Krensky, P.C. Beverley, S.J. Burakoff, and D.C. Linch. 1985. Phytohaemagglutinin activation of T cells through the sheep red blood cell receptor. *Nature.* 313:686-687.
- O'Flynn, K.O., E.D. Zanders, J.R. Lamb, P.C. Beverley, D.L. Wallace, P.E.R. Tathan, W.J.M. Tax, and D.C. Linch. 1985. Investigation of early T cell activation: analysis of the effect of specific antigen, interleukin 2 and monoclonal antibodies on intracellular free calcium concentration. *Eur. J. Immunol.* 15:7-11.

O'Flynn, K., L.J. Knot, M. Russul-Salb, R. Abdul-Gaffar, G. Morgan, P.C.L. Beverley, and D.C. Linch. 1986. CD2 and CD3 antigens mobilize Ca⁺⁺ independently. *Eur.J.Immunol.* 16:580-584.

Olive, D., M. Rageneau, C. Cerdan, P. Dubreuil, M. Lopez, and C. Mawas. 1986. Anti-CD2 (sheep red blood cells receptor) monoclonal antibodies and T cell activation. *Eur.J.Immunol.* 16:1063-1068.

Omary, B., I.S. Trowbridge, and H.A. Battifora. 1980. Human homologue of murine T200 glycoprotein. *J.Exp.Med.* 152:842-852.

Oppenheim, J.J., and B. Schecter. Lymphocyte transformation in N.R. Rose and H. Friedman (Eds) *Manual of clinical Immunology* p.233-245. American society for microbiology 1980.

Palacios, R., 1982. Mechanism of T cell activation: role and functional relationship of HLA-DR antigens and interleukins. *Immunological Rev.* 63:73-110

Palacios, R. 1985. Monoclonal antibodies against human Ia antigens stimulate monocytes to secrete interleukin 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 82:6652-6656.

Pantaleo, G., D. Olive, A. Poggi, T. Pozzan, L. Moretta, and A. Moretta. 1987. Antibody-induced modulation of the CD3/T cell receptor complex causes T cell refractoriness by inhibiting the early metabolic steps involved in T cell activation. *J.Exp.Med.* 166:619-625.

Pantaleo, G., D. Olive, A. Poggi, W.J. Kozumbo, L. Moretta, and A. Moretta. 1987. Transmembrane signaling via the T11 dependent pathway of human T cell activation. Evidence for the involvement of 1,2-diacylglycerol and inositol phosphates. *Eur.J.Immunol.* 17:55-60.

Ralph, S.J., M.L. Thomas, C.C. Morton, and I.S. Trowbridge. 1987. Structural variants of human T200 glycoprotein (leucocyte common antigen). *EMBO J.* 6:1251-1257.

Raschke, W.C., and R. Hyman. 1985. Stable expression of the mouse lymphocyte T200 antigen in L cells after transfection with lymphoma DNA. *Mol.Immunol.* 10:1137-1143.

Reed, J.C., J.D. Alpers, P.C. Nowell and R.G. Hoover. 1986. Sequential expression of protooncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 83:3982-3986.

Reinherz, E.L., and Schlossman. 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. *cell* 19:821-825

Reinherz, E.L., R.E. Hussey, S.F. Schlossman. 1980. A monoclonal antibody blocking human T cell function. *Eur.J.Immunol.* 10:758-762.

Reinherz, E.L., R.E. Hussey, K. Fitzgerald, P. Snow, C. Terhorst, and S.F. Schlossman. 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytolytic but not suppressor function of human T lymphocytes. *Nature* 294:168-170.

Ress, S.R., G. Strassmann, and F.H. Bach. 1984. The phenotype of antigen-specific suppressor T cells generated in human mixed leucocyte culture depends on the nature of the major histocompatibility regions recognized. *Human Immunol.* 10:41-55.

Robb R.J. 1984. Interleukin 2: the molecule and its function. *Immunol.Today* 5:203-209.

Robb, R.J., C.M. Rusk, J. Yodoi, and W. Greene. 1987. Interleukin-2 binding molecule distinct from the Tac protein : analysis of its role in formation of high-affinity receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 84:2002-2006.

Robertson, M., 1985. The present state of recognition. *Nature* 317:768-771.

Rock, K.L., and B. Benacerraf. 1983. MHC-restricted T cell activation: Analysis with T cell Hybridomas. *Immunol.Rev.* 76:29-58.

Rogozinski, L., A. Bass, E. Glickman, M.A. Talle, G. Goldstein, J. Wang, L. Chess, and Y. Thomas. 1984. The T4 surface antigen is involved in the induction of helper function. *J.Immunol.* 132:735-739.

Rosenterich, D.L. and S.B. Mizel. 1979. Signal requirements for T lymphocyte activation. I replacement of macrophage function with phorbol myristic acetate. *J.Immunol.* 123:1749-1752.

Roska, A.K., and P.E. Lipsky. 1985. Dissection of the function of antigen-presenting cells in the induction of T cell activation. *J.Immunol.* 135:2953-2961.

Ross, G.D., R.A. Thompson, M.J. Walport, T.A. Springer, J.V. Watson, R.H.R. Ward, J. Lida, S.L. Newman, R.A. Harrison, and P.J. Lachmann. 1985. Characterization of patients with an increased susceptibility to bacterial infections and a genetic deficiency of leukocyte membrane complement receptor type 3 and the related membrane antigen LFA-1. *Blood* 66:882-890.

Rothlein, R., and T.A. Springer. 1986. The requirements for lymphocyte function-associated antigen 1 in homotypic leukocyte adhesion stimulated by phorbol ester. *J.Exp.Med.* 163:1132-1149.

Rinnooy, E.A., E. Platzner, K. Welte, and C. Yi Wang. 1984. Modulation induction of the T3 antigen by OKT3 antibody is monocyte dependent. *J.Immunol.* 133:2979-2985.

Saizawa, K., J. Rojo, and C.A. Janeway. 1987. Evidence for a physical association of CD4 and the CD3 $\alpha\beta$ T-cell receptor. *Nature* 328:260-263.

Sanchez-Madrid, F., A.M. Krensky, C.F. Ware, E. Robbins, J.L. Strominger, S.J. Burakoff and T.A. Springer. 1982. Three distinct antigens associated with human T Lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, LFA-3. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 79:7489-7492.

Santtentau, Q.J., A.G. Dalgleish, R.A. Weiss, and P.C. Beverley. 1986. Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science.* 234:1120-1122.

- Sayre, P.H., and E.L. Reinherz. 1985. Structural invariance of T4 molecules from T cell clones of different antigen and major histocompatibility complex specificities. *Eur.J.Immunol.* 15:291-295.
- Sayre, P.H., H.C. Chang, R.E. Hussey, N.R. Brown, N.E. Richardson, G. Spagnoli, L.K. Clayton, and E.L. Reinherz. 1987. Molecular cloning and expression of T11 cDNAs reveal a receptor-like structure on human T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:2941-2945.
- Scheurich, P., U. öcer, M. Wrann and K. Pfizenmaier. 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.
- Schwab, R., M.K. Crow, C. Russo, and M.E. Weksler. 1985. Requirements for T cell activation by OKT3 monoclonal antibody: Role of modulation of T3 molecules and interleukin 1. *J.Immunol.* 135:1714-1718.
- Selvaraj, J., M.L. Plunket, M. Dustin, M.E. Sanders, S. Shaw, and T.A. Springer. 1987. The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* 326:400-403.
- Sheng Tung, J., M.C. Deere, and E.A. Boyse. 1984. Evidence That Ly-5 product of T and B cells differ in protien structure. *Immunogen.* 19:149-154.
- Shackelford, D.A., A.V. Smith and I.S. Trowbridge. 1987. Changes in gene expression of IL-2 receptor, T3, and T cell antigen receptor. *J.Immunol.* 138:613-619.
- Shipp, M.A., and E.L. Reinherz. 1987. Differential expression of nuclear proto-oncogenes in T cells triggered with mitogenic and non mitogenic T3 and T11 activation signals. *J.Immunol.* 139:2143-2148.
- Simonsen, M., 1984. May T3 protect us all. *Immunol.Today* 5:314-315.

Smith, K.G.C., J.M. Austyn, G. Hariri, P.C.L. Beverley, and P.J. Morris. 1986. T cell activation by anti-T3 antibodies: comparison of IgG1 and IgG2b switch variants and direct evidence for accessory function of macrophage Fc receptors. *Eur.J.Immunol.* 16:478-486.

Smith, K.A., 1987. The two-chain structure of high-affinity IL-2 receptors. *Immunol.Today* 8:11-13.

Solbach, W., S. Barth, M. Rollinghoff and H. Wagner. 1982. Interactions of human T cell subsets during the induction of cytotoxic T Lymphocytes: the role of interleukins. *Clin.Exp.Immunol.* 49:167.

Starlin, G.C., S.E. Davidson, J.L. McKenzie, and D.M.J. Hart. 1987. Inhibition of natural killer-cell mediated cytolysis with monoclonal antibodies to restricted and non-restricted epitopes of the leucocyte common antigen. *Immunol.* 61:351-356.

Stingl, L.A., A. Sinska, U. Landesmann, J.S. Smolen. 1987. Induction of interleukin 2 receptiveness and proliferation in resting peripheral T cells by monoclonal anti-CD3(T3) antibodies does not require the presence of macrophages. *Clin.Exp.Immunol.* 68:146-155.

Sunderland C.A. W.R. Macmaster, and A.F. Williams. 1979. Purification with monoclonal antibody of a predominant leukocyte-common antigen and glycoprotein from rat thymocytes. *Eur.J.Immunol.* 9:155-159.

Suthanthiran, M., A. Novogrodsky, and K.H. Stenzel. 1987. Human T cell activation: involvement of T cell differentiation antigen cluster (CD) 2 in the generation and/or transduction of accessory signals. *Immunobiology Sup.*3:181.

Swain, S.L. 1983. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol.Rev.* 74:129-142.

Takeuchi, T., C.E. Rudd, S.F. Schlossman, and C. Morimoto. 1987. Induction of suppression following autologous mixed lymphocyte reaction; role of a novel 2H4 antigen. *Eur.J.Immunol.* 17:97-103.

Targan, S.R., and W. Newman. 1983. Definition of a trigger stage in the NK cytolytic reaction sequence by a monoclonal antibody to the glycoprotein T200. *J.Immunol.* 131:1149-1153.

Tax, W.J.M., F.F.M. Hermes, R.W. Willems, P.J.A. Capel, and R.A.P. Koene. 1984. Fc receptors for mouse IgG1 on human monocytes: polymorphism and role in antibody-induced T cell proliferation. *J.Immunol.* 133:1185-1189.

Taylor, D.S., P.C. Nowel, and J. Kornbluth. 1986. Functional role of HLA class I cell-surface molecules in human T-lymphocyte activation and proliferation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 83:4446-4450.

Terry, L., A. Pickford, and P.C.L. Beverley. 1987. Phenotypic heterogeneity of the CD4+ and CD8+ subsets. in McMichael et al. (eds.) *Leucocyte typing III.* Oxford University Press. Oxford 1987 p.225-227.

Thomas, Y., L. Rogozinski, and L. Chess. 1983. Relationship between human T cell functional heterogeneity and human T cell surface molecules. *Immunol.Rev.* 74:113-128.

Thomas, M.L., A.N. Barclay, J. Gagnon, and A.F. Williams. 1985. Evidence from cDNA clones that the rat leukocyte-common antigen (T200) spans the lipid bilayer and contains a cytoplasmic domain of 80,000 Mr. *Cell* 41:83-93.

Tilden, A.B., K. Itoh, and C. Balch. 1987. Human lymphokine-activated killer (LAK) cells: identification of two types of effector cells. *J.Immunol.* 138:1068-1073.

Trowbridge, I. 1978. Interspecies Spleen-Myeloma hybrid producing monoclonal antibodies against mouse lymphocyte surface glycoprotein, T200. *J.Exp.Med.* 148:313-323.

Trowbridge, I. 1987. Interleukin-2 receptor proteins. *Nature* 327:461-462.

Tsoukas, C.D., M. Valentine, M. Lotz, J.H. Vaughan, and D.A. Crason. 1984. The role of the T3 molecular complex in antigen recognition and subsequent activation events. *Immunol.Today* 5:311-313.

Turco, M.C., M. De Felice, L. Corbo, G. Morrone, R. Mertelsmann, S. Ferrone, and S. Venuta. 1985. Regulatory role of a monomorphic determinant of HLA class I antigens in T cell proliferation. *J.Immunol.* 135:2268-2273.

Van Lier, R.A.W., J.H.A. Boot, E.R.D. Grood, and L.A. Aarden. 1987. Induction of T cell proliferation with anti-CD3 swich-variant monoclonal antibodies: effects of heavy chain isotype in monocyte-dependent systems. *Eur.J.immunol.* 17:1599-1604.

Van Seventer, G.A., R.A.W. Van Lier, H. Spits, P. Ivanyi, and C.J.M. Melief. 1986. Evidence for a regulatory role of T8 (CD8) antigen in antigen-specific and anti-T3-(CD3)-induced lytic activity of allospecific cytotoxic T lymphocytes clones. *Eur.J.Immunol.* 16:1363-1371.

Van Waume, J.P., J.R. De Mey, and J.G. Goossens. 1980. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J.Immunol.* 124:2708-2713.

Van Waume, J.P., J.G. Goossens, and P.C. Beverley. 1984. Human T lymphocyte activation by monoclonal antibodies; OKT3, but not UCHT1, triggers mitogenesis via interleukin-2-dependent mechanism. *J.Immunol.* 133:129-132.

Vilella, R., J. Yagüe and J. Vives. 1983. Monoclonal antibody against HLA-Aw32+A25, is HLA-Aw32 an allele with no unique antigenic determinant?. *Human Immunol.* 6:53-61.

Wakasugi, H., J. Bertoglio, T. Tursz and D. Fradelizi. 1985. IL2 receptor induction on human T Lymphocytes: role for IL2 and monocytes. *J.Immunol.* 135:321-327.

Walker, C., F. Bettens, and W.J. Pichler. 1987. Activation of T cells by cross-linking an anti-CD3 antibody with a second anti-T cell antibody: mechanism and subset-specific activation. *Eur.J.Immunol.* 17:873-880.

Wallis, W.J., D.D. Hickstein, B.R. Schwartz, C.H. June, H.D. Ochs, P.G. Beatty, S.J. Klebanoff, and J.M. Harlan. 1986. Monoclonal antibody-defined functional epitopes on the adhesion-promoting glycoprotein complex (CDw18) of human Neutrophils. *Blood* 67:1007-1013.

Wang, A., S.D. Lu, D.F. Mark. 1984. Site-Specific mutagenesis of the human interleukin 2 gene: structure-function analysis of the Cysteine residues. *Science* 224:1431-1433.

Wassmer, P., C. Chan, L. Lögdberg, and E.M. Shevach. 1985. Role of the L3T4 antigen in T cell activation. *J.Immunol.* 135:2237-2241.

Weber, W.E., W.A. Buurman, M.P. Vardermeeren, and J.C.M. Raus. 1985. Activation through CD3 molecule leads to clonal expansion of all human peripheral blood T lymphocytes: functional analysis of clonally expanded cells. *J.Immunol.* 135:2337-2342.

Weiss, A., R.L. Wiscocil, and J.D. Stobo. 1984. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J.Immunol.* 133:123-128.

Welte, K., E. Platzer, C.Y. Wang, E.A. Rinnooy, M.A.S. Moore, and R. Mertelmann. 1983. OKT8 antibody inhibits OKT3-induced IL-2 production and proliferation in OKT8+ cells. *J. Immunol.* 131:2356-2361.

Wen Chang, T., P.C. Kung, S.P. Gingras and G. Golstein. 1981. Does OKT3 monoclonal antibody react with an antigen-recognition structure on human T cells?. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78:1805-1808.

Wen Chang, T., 1985. Regulation of immune response by antibodies : the importance of antibody and monocyte Fc receptor interaction in T-cell activation. *Imunol.Today*. 6:245-249.

Weyand, C.M., J. Goronzy, and C.G. Fathman. 1987. Modulation of CD4 by antigenic activation. *J.Immunol*. 138:1351-1354.

Williams, J.M., D. Deloria, J.A. hansen, C.A. Dianrello, R. Loertscher, H.M. Shapiro, and T.B. Strom. 1985. The events of primary T cell activation can be staged by use of the Sepharose-bound anti-T3 (64.1) monoclonal antibody and purified interleukin 1. *J.Immunol*. 135:2249-2255.

Yakura, H., F.W. Shen, E. Bourcet, and E.A. Boyse. 1983. On the function of Ly-5 in the regulation of antigen-driven B cell differentiation. *J.Exp.Med*. 157:1077-1082.

Yamada, H., P.J. Martin, M.A. Bean, M.P. Braun, P.G. Beatty, K. Sadamoto, and J.A. Hansen. 1985. Monoclonal antibody 9.3 and anti-CD11 antibodies define reciprocal subsets of lymphocytes. *Eur.J.Immunol*. 15:1164-1168.

Young Yang, S., S. Chouaib, and B. Dupont. 1986. A common pathway for T lymphocyte activation involving both the CD3-Ti complex and CD2 sheep erythrocyte receptor determinants. *J.Immunol*. 137:1097-1100.

Zola, H. 1987. The surface antigens of human B lymphocytes. *Immunol.Today* 8:308-313.