



* 5 3 0 9 5 7 9 7 0 9 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TESIS DOCTORAL

AUTORA:

María José Sánchez Sanz

TITULO:

Ontogenia de los linfocitos T humanos: Estudio de los eventos madurativos pretímicos e intratímicos implicados en la diferenciación de los linfocitos T.

DIRECTOR:

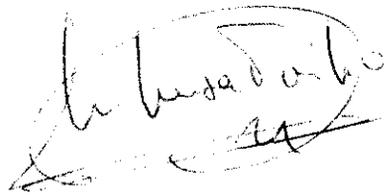
Dra. María Luisa Toribio
Colaborador Científico del C.S.I.C.

REALIZACION:

Centro de Biología Molecular,
Universidad Autónoma de Madrid

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular
Madrid 1991**



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'María Luisa Toribio', written in a cursive style.

VºBº del Director de Tesis
Dra. María Luisa Toribio.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'María José Sánchez Sanz', written in a cursive style.

Firmado: María José Sánchez Sanz

Dedicado

a mis padres

a mis hermanas

por vuestro cariño y ayuda incondicional

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que con su tiempo, sugerencias, enseñanzas y apoyo, proporcionaron elementos imprescindibles para mi formación en Inmunología y las bases para la realización del presente proyecto.

- Al servicio de Inmunología del Hospital general Gregorio Marañón, por su amistad y ayuda a dar los primeros pasos en el mundo de la investigación.

- Mi agradecimiento al Dr. Theophilopoulos y sus colaboradores, por sus discusiones y enseñanzas.

- A todos los compañeros del laboratorio 203 del CX donde se ha desarrollado este trabajo, especialmente a aquellos que más se cruzaron en el laberíntico camino hacia la realización de este proyecto: A J. María Alonso, por hacer más amena la citometría de flujo, a Pedro Aparicio por su entusiasmo y dedicación, a Alicia Bárcena por haberme ayudado en todo momento, a Jose Carlos Gutierrez por los innumerables conocimientos transmitidos, a Esther Leonardo por su estupenda labor técnica y su amistad, a Carlos Marquez por su ayuda en la corrección de este trabajo y a los "nuevos" por su apoyo en todo momento.

- A la Dra. María Luisa Toribio por dirigirme esta Tesis. Le agradezco el inestimable esfuerzo y trabajo volcado en este proyecto .

- Al Dr. Carlos Martinez por mostrarme que nada es imposible y por brindarnos todos los medios necesarios para la ejecución del presente proyecto.

- Al Dr. Agustín Zapata y a Nines por la ayuda en la caracterización de las células estromales.

-Al Servicio de Cirugía Cardiovascular Infantil del Hospital Ramón y Cajal de Madrid por la donación de muestras tímicas humanas, a la unidad de Obstetricia y Ginecología del Hospital de Móstoles y Hospital Severo Ochoa de Madrid así como al Dr. Juanjo Lozano por las muestras fetales, a los Servicios de Inmunología del Hospital Ramón y Cajal y Gregorio Marañón de Madrid por las muestras de médula ósea y a todos los que cedieron reactivos, sondas, anticuerpos y protocolos.

- También agradezco a la Caja de Ahorros de Madrid la concesión de un préstamo para sufragar los gastos de publicación y al Ministerio de Educación por la concesión de una beca perdoctoral FPI, gracias a la cual ha sido posible la realización de esta tesis..

INDICE

ABREVIATURAS	1
1.INTRODUCCION	
1. ORIGEN EMBRIONARIO DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS	2-5
1.1. MICROAMBIENTES DEL DESARROLLO HEMATOPOYETICO.	5-7
1.2. INMIGRACION AL TIMO DE LAS CELULAS PROGENITORAS	7-8
1.3. INTERACCIONES CELULARES EN EL SISTEMA INMUNE: IMPLICACION DE LAS MOLECULAS DE ADHESION EN LA ONTOGENIA Y FUNCION	8-9
2. EL TIMO: FORMACION, ESTRUCTURA Y FUNCION	9
2.1. FORMACION DEL TIMO: VARIACION DE LOS COMPONENTES CELULARES LINFOIDES Y ESTROMALES DURANTE SU DESARROLLO	9-11
2.2. IMPLICACION DEL TIMO EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.	11-13
3. DESARROLLO DE LAS CELULAS T	13
3.1. RUTAS DE MADURACION DE LOS LINFOCITOS T	13-15
3.2. REGULACION ONTOGENICA DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR PARA EL ANTIGENO DE LAS CELULAS T, COMPLEJO TCR-CD3	16-18
3.3. ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T	19
3.3.1 <i>Papel de las interleuquinas y sus receptores en diferenciación de linfocitos T</i>	19
3.3.1.1 Implicación de la IL-2 en el desarrollo de timocitos inmaduros	19-20
3.3.1.2. Otras citoquinas implicadas en la maduración de timocitos.	21-23
3.3.2. <i>Papel del componente celular estromal tímico en la diferenciación de linfocitos T</i>	23-25

2. OBJETIVOS	26-27
3. MATERIALES Y METODOS	
1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE TIMO E HIGADO FETAL.	28-29
2. CULTIVOS DE PRECURSORES HEMATOPOYETICOS	29
3. CLONAJE DE CELULAS DE HIGADO FETAL Y CELULAS PRO-T DE TIMO NEONATO.	29-30
4. CULTIVO DE CELULAS EPITELIALES DE TIMO Y CELULAS ESTROMALES DE MEDULA OSEA E HIGADO FETAL	30-31
5. DETECCION DE ANTIGENOS CELULARES	32
5.1. INMUNOFLUORESCENCIA Y CITOMETRIA DE FLUJO.	32
5.2. INMUNOHISTOQUIMICA.	32-33
6. DETERMINACION DEL CICLO CELULAR.	33-36
7. ANALISIS DEL REORDENAMIENTO DE GENES PARA EL RECEPTOR DE CELULAS T POR TRANSFERENCIA DE DNA A MEMBRANAS DE NYLON (SOUTHERN BLOT).	36
8. DETECCION DE TRANSCRITOS POR TRANSFERENCIA DE RNA A MEMBRANAS DE NYLON (NORTHERN BLOT).	36-37
9. OBTENCION DE cDNA Y AMPLIFICACION POR PCR.	37-38
10. HIBRIDACION IN SITU	38-39
11. ENSAYOS DE UNION DE ¹²⁵ I-IL-2	39-40
4. RESULTADOS	
1. CARACTERIZACION DE LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE LA SERIE LINFOIDE T EN ESTADIOS TEMPRANOS DE LA EMBRIOGENESIS.	41-42
1.1. ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS T DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	42-47

1.2. CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS LOCALIZADOS EN EL HIGADO FETAL	48-49
1.2.1. <i>Expresión de antígenos asociados a procesos de activación-proliferación.</i>	49-51
1.2.2. <i>Expresión de moléculas de adhesión en precursores hematopoyéticos</i>	52-55
1.3. REGULACION ONTOGENICA DE LA EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA EL COMPLEJO CD3-TCR.	56-57
1.3.1. <i>La expresión de los genes que codifican para los componentes del complejo CD3 es un acontecimiento temprano en la ontogenia de los linfocitos T.</i>	57-61
1.3.2. <i>La expresión de los genes que codifican para el TCR acontece posteriormente a la migración al timo.</i>	62-70
2. MEDIADORES SOLUBLES IMPLICADOS EN LA ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS T	70-71
2.1 EXPRESION DEL RECEPTOR DE AFINIDAD INTERMEDIA PARA LA IL-2 (p75, IL-2R β) EN LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE HIGADO FETAL	71-76
2.2.-REGULACION ONTOGENICA DE LA PRODUCCION DE LINFOQUINAS: ACTIVACION INTRATIMICA DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA IL-2	77-79
2.3. IMPLICACION DE LA RUTA DE LA IL-2 EN LA MADURACION DE LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE LOS LINFOCITOS T	80
2.3.1. <i>Efecto de la IL-2 en la diferenciación de la población precursora pretímica.</i>	80-85
2.3.2. <i>Efecto de la IL-2 en la diferenciación de los precursores intratímicos del linaje T</i>	86-88
2.3.3. <i>La IL-2 es una señal necesaria pero no suficiente para la diferenciación de los precursores linfoides del linaje T</i>	89-91
3.REQUERIMIENTO DEL COMPONENTE ESTROMAL TIMICO EN LA DIFERENCIACION DE LOS LINFOCITOS T.	92-93
3.1. CARACTERIZACION IN VITRO DEL COMPONENTE CELULAR ESTROMAL DE MEDULA OSEA, HIGADO FETAL Y TIMO.	93-95
3.1.1 <i>Características fenotípicas de las líneas estromales obtenidas "in vitro".</i>	96-100
3.1.2.- <i>Caracterización funcional de las líneas estromales obtenidas "in vitro": Producción de linfoquinas.</i>	101-102
3.1.3. <i>Análisis comparativo de la expresión de marcadores específicos de epitelio tímico y producción de linfoquinas.</i>	102-105

IV

3.2. LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE HIGADO FETAL EN PRESENCIA DE EPITELIO TIMICO E IL-2 EXPRESAN IL-2R α Y SE DIFERENCIAN EN CELULAS TCR α/β^+ /CD4 $^+$	106-111
5. DISCUSION	112
1. CARACTERISTICAS FENOTIPICAS Y MOLECULARES DE LOS PRECURSORES DEL HIGADO FETAL.	113-115
1.1. CD7:IMPLICACION DE SU EXPRESION EN LA DETERMINACION DE LINAJE T	115-117
1.2. CD3: IMPLICACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA EL COMPLEJO CD3 EN LA DETERMINACION DE LINAJE T.	117-120
1.3. MOLECULAS DE ADHESION: SIGNIFICADO FUNCIONAL DE SU EXPRESION EN PRECURSORES DE CELULAS T	120-123
1.4. REAGRUPAMIENTO Y EXPRESION DE LOS GENES ESPECIFICOS DEL RECEPTOR DE LAS CELULAS T. LOCALIZACION ESPACIAL Y TEMPORAL DURANTE LA ONTOGENIA	123-125
2 EL HIGADO FETAL COMO LOCALIZACION EXTRATIMICA DE MADURACION T	125-126
3. RUTAS DE MADURACION T: IMPLICACION DEL ESTROMA TIMICO Y FACTORES SOLUBLES.	126-127
3.1 PARTICIPACION DEL ESTROMA TIMICO EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.	128-130
3.2. DIFERENCIACION DE LINAJE T FRENTE A LINAJE NK. DIFERENCIACION DE CELULAS T α/β FRENTE A CELULAS T $\gamma\delta$	130-133
6. CONCLUSIONES	134-136
7. BIBLIOGRAFIA	137-153
8. ANEXO	

ABREVIATURAS

mAb	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
CD	Cluster de diferenciación
Ig	inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
IL-R	Receptor de interleuquina
IP	Ioduro de propidio
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NK	Citotoxicidad natural
PBL	Linfocito de sangre periférica
PE	Ficoeritrina
PHA	fitohemaglutinina
TCR	Receptor clonotípico de las células T

1. INTRODUCCION

1. ORIGEN EMBRIONARIO DE LAS CELULAS HEMATOPOYETICAS

Para entender los mecanismos operativos en un Sistema Inmune (S.I.) funcional maduro, hay que analizar su desarrollo y diferenciación. Lo que una célula del S.I. "ve" no es más que aquello para lo que fué educada durante su proceso de diferenciación. Este desarrollo comienza a partir de células progenitoras pluripotenciales hematopoyéticas cuyo origen ha sido un tema controvertido desde los comienzos de la Inmunología. Las primeras células progenitoras pluripotenciales hematopoyéticas, células stem, se localizan en el saco vitelino a la tercera semana de desarrollo del embrión humano. Los primeros elementos sanguíneos surgen a partir de las células del mesénquima situado entre medias de las capas de endodermo y mesodermo que forman el saco vitelino. El origen de estas células del mesénquima situadas en el saco vitelino se desconoce, aunque algunos embriólogos piensan que las células destinadas a ser células progenitoras hematopoyéticas vendrían de la cresta neural desde donde migrarían al saco vitelino y mitad anterior del embrión (Klein, 1989). Desde el saco vitelino, o bien directamente desde la cresta neural, estos progenitores migrarán al hígado, principal órgano hematopoyético durante momentos tempranos de la vida embrionaria (día 8 de gestación en raton y entre las semanas 5-6 de gestación en humanos) (Moore y Metcalf, 1970; Le Douarin y cols., 1984; Lobach y Haynes, 1987; Ogawa y cols, 1988). Posteriormente desde el hígado fetal, dichos precursores se trasladarán a un rudimento epitelial emergente, el timo, que pasa a ser el órgano principal de maduración y diferenciación de los linfocitos T, existiendo además migración hacia la médula ósea, principal órgano hematopoyético en la vida

adulta y periodo final fetal y lugar de maduración de la estirpe linfoide B en mamíferos. Una vez en el timo, estos precursores se expanden y diferencian sufriendo procesos de selección "positiva " y "negativa", después de los cuales emergerá una colección de linfocitos T maduros capaces de responder a cualquier antígeno con excepción de los propios (Ploegh y cols, 1981; Kappler y cols, 1987; von Boehmer, 1988).

Una de las principales características del S.I. junto con su alta especificidad y dinamismo circulatorio, es la elevada tasa de renovación de su componente celular linfoide (de los 10^{12} linfocitos presentes en un individuo humano adulto, 10^9 mueren diariamente). Esta gran tasa de recambio celular es mantenida por un "compartimento celular generativo" acompañado de otro que permite la expansión y maduración de los componentes celulares del S.I. La generación de células hematopoyéticas es, por tanto, un proceso continuo a lo largo de la vida del individuo en el que pueden distinguirse tres estadios principales de desarrollo: células progenitoras multipotentes, con capacidad de auto-renovación, propiedad que comparten con células progenitoras de otros sistemas regeneradores; células precursoras con capacidad uni o bipotencial que están determinadas a un programa de desarrollo para llegar a un tercer estadio de célula madura, con características fenotípicas y funcionales propias, (Dexter y Spooner, 1987; Heyworth y cols.,1990). El término de célula progenitora como tal es operacional. Su existencia como una entidad biológica independiente sólo se puede demostrar de una manera retrospectiva por la progeie generada, mediante experimentos de reconstitución hematopoyética empleando células de médula ósea e hígado fetal marcados molecularmente y analizando la descendencia en los

animales receptores (Lemischka y cols, 1986), o por ensayos de formación de unidad de colonias, CFU, desarrollados por McCulloch y Till, 1964. Físicamente se reconocen por ser células pequeñas (menor velocidad de sedimentación), quiescentes (Spangrude, 1989) y con características fenotípicas definidas parcialmente, Thy-1^{Lo}Lin⁻Sca-1⁺ en ratón, (Spangrude, 1989) o Lin⁻CD34⁺DR⁻ en médula ósea humana (Lu y cols., 1987; Sutherland y cols., 1989; Verfaillie y cols., 1990). Estas propiedades, junto con la determinación de los mecanismos que progresivamente restringen su capacidad de autoproliferación y pluripotencialidad en su ruta de diferenciación, son temas fundamentales en la biología del desarrollo del S.I. aún no esclarecidos.

En cualquier caso, es importante tener presente que una célula no es un ente aislado y autónomo, y que el proceso de su desarrollo depende de las interacciones celulares específicas con el microambiente en el que se localizan, que va variando en concordancia con el momento ontogénico y con su posición relativa en el organismo. En el S.I. se ha puesto de manifiesto la existencia de un elevado número de polipéptidos específicos implicados en procesos de crecimiento y diferenciación, así como moléculas de interacción con la matriz extracelular y componenets celulares que tienen un papel fundamental en su desarrollo, (Montovani y Dejana, 1989; Toribio y cols, 1990; Springer, 1990). El objetivo de este trabajo se engloba en la línea general de embriología de determinar molecularmente estas señales ambientales y los mecanismos mediante los cuales dichas señales son interpretadas en forma de cambios en la expresión génica y por lo tanto en el comportamiento celular, centrándonos específicamente en los precursores de los linfocitos T.

1.1. MICROAMBIENTES DEL DESARROLLO HEMATOPOYETICO.

La célula hematopoyética progenitora, capaz de generar los linfocitos, es también precursora de otros linajes hematopoyéticos como son eritrocitos, granulocitos, plaquetas, monocitos y macrófagos (Greaves, 1986). Al mismo tiempo que en el embrión se establece la circulación sanguínea, estas células progenitoras y sus descendientes más diferenciados, poblarán distintos órganos donde se piensa que microambientes específicos serán responsables de diferenciarlos divergentemente hacia cada uno de los linajes posibles (Moore y Owen, 1967a; Scolay, 1986). Las dos localizaciones principales de linfopoyesis en el embrión humano y de ratón son el hígado y el timo, mientras que la médula ósea es el sitio fundamental en el adulto.

Estos microambientes específicos en los que los precursores hematopoyéticos van adquiriendo grados secuenciales de determinación de linaje tienen una estructura propia. Así, el hígado fetal humano, principal órgano hematopoyético de la semana 6 a la 22 de gestación, presenta a lo largo de la vida embrionaria una proporción variable de células linfoides constituyendo entre el 5-15% de las células mononucleares no pertenecientes al parénquima hepático. La proporción se mantiene relativamente constante hasta las 20-24 semanas, constituyendo más del 20% de las células mononucleadas y disminuyendo el número de células inmaduras hasta el 2%. El componente estromal en hígado fetal está compuesto por células de parénquima hepático, células endoteliales y posiblemente células de Kupffer. En cuanto a la localización de la actividad hematopoyética no parece existir una relación particular

entre los diversos linajes. Eritropoyesis y mielopoyesis parecen tener lugar alrededor de sinusoides y vasos de la red portal respectivamente, mientras que la linfopoyesis no parece tener una localización concreta (Gale, 1987; Klein, 1989; Kamps y cols, 1989).

Alrededor de la semana 12 del desarrollo fetal humano la médula ósea comienza a funcionar como órgano hematopoyético. Muchos tipos de células constituyen el estroma medular: endotelio vascular que selecciona el paso de las células y produce diversas citoquinas, células reticulares que ocupan el espacio intersinusoidal, fibroblastos y adipocitos cuyo origen parece ser incierto (Dorshkind, 1990). La hematopoyesis está localizada en los espacios sinusoidales aunque no hay ninguna evidencia clara de organización compartimentalizada de células estromales en cuanto a su papel específico en procesos de proliferación/diferenciación de distintas estirpes celulares hematopoyéticas. Sólo en el caso de los precursores B parece haber una especial localización en la región subendosteal (Osmond y Batten, 1984; Osmond y Park, 1987; Hermans y cols, 1989).

El microambiente tímico con el que un precursor linfocitario T se encuentra en la vida fetal difiere con el que pueda encontrarse en el periodo neonatal. Si analizamos la estructura del timo neonatal, se observa que presenta una organización compartimentalizada, respecto a la distribución de subpoblaciones de linfocitos T y componentes estromales, más definida que en otros órganos hematopoyéticos, diferenciándose tres zonas histológicas definidas por otros tantos estadios de maduración de subpoblaciones linfocitarias T. En la corteza subcapsular externa se encuentran timocitos indiferenciados en división, en contacto con células epiteliales especializadas. La zona cortical interna contiene la

progenie de estos linfoblastos, es decir la gran población de timocitos pequeños, quiescentes (CD1+4+8+), que con frecuencia están asociados a otro tipo de células estromales: las células dendríticas corticales. Por último la médula contiene predominantemente timocitos de tamaño medio, interaccionando con una variedad de células no linfoides que incluyen a las células epiteliales medulares y a las células dendríticas/interdigitantes (Papiernik, 1970).

1.2. INMIGRACION AL TIMO DE LAS CELULAS PROGENITORAS

Si las células progenitoras de linfocitos T derivan de una localización extratímica, varias cuestiones son inmediatas: qué elementos las atraen al timo, en qué momento del desarrollo del individuo migran hacia el timo y que número de precursores colonizan este órgano.

El cultivo de precursores de hígado o médula ósea en presencia de lóbulos tímicos parece indicar que la migración está guiada por quimiotaxis (Lepault y Weissman, 1981; Ben Slimane y cols., 1983), habiendo sido parcialmente caracterizados algunos péptidos activamente implicados en el proceso, como la β_2 -microglobulina (Dunon y cols., 1990). Por otra parte este proceso de migración parece tener un componente temporal, de manera que no siempre el timo está receptivo. En pollo se ha descrito que sólo un número discreto de ondas de colonización existen en los primeros momentos del desarrollo, (Le Douarin y Jotereaueu, 1975), mientras que en ratón, experimentos de reconstitución de animales irradiados indican que la migración de un número muy bajo de células es continua, (Scollay y cols, 1986). En cuanto al número de

progenitores que llegan al timo, parece ser muy bajo, si bien no existe acuerdo por lo que respecta al número exacto. Así, mientras que existen experimentos de irradiación-reconstitución que indican la llegada al timo de entre 10 y 30 precursores diarios otros autores manejan números más altos, entre 100-300 (Boersma, 1981; Lepault y Weissman, 1981).

1.3. INTERACCIONES CELULARES EN EL SISTEMA INMUNE: IMPLICACION DE LAS MOLECULAS DE ADHESION EN LA ONTOGENIA Y FUNCION

Las interacciones adhesivas intercelulares y de células con la matriz extracelular son cruciales en todo proceso de desarrollo. La localización de una célula está influida por interacciones de la superficie celular con el microambiente en su componente celular y fibrilar, que regulan la adhesión, y por los gradientes de sustancias quimiotácticas que dirigen la migración. Este sistema general es especialmente relevante en el S.I., cuya respuesta depende de la regulación de las interacciones con otras células para activar y dirigir la respuesta inmune.

Tres familias de receptores de adhesión median estas interacciones: 1) la superfamilia de las inmunoglobulinas, que incluye los receptores específicos del antígeno de las células T y B; las moléculas de clase I y II del MHC; y los antígenos no polimórficos CD2, LFA3, ICAM-1, VCAM-1, así como los componentes del complejo CD3; 2) la familia de las integrinas, importante en la dinámica de regulación de adhesión y migración, cuya estructura consiste en una cadena α y otra β , distinguiéndose tres subfamilias, integrinas β_1 (CD29; proteínas VLA), β_2 (CD18; LFA1, MAC-1, p150,95) y β_3 (CD61) y 3) La familia de las selectinas Mel-14,

ELAM-1 y GMD-14, con función prominente en interacción de linfocitos y neutrófilos con el endotelio vascular, (Springer, 1990).

Gran número de trabajos se han centrado en el estudio del papel que estas moléculas tienen en funciones de citotoxicidad, migración y colonización específica de órganos linfoides. Sin embargo, su papel en la ontogenia del sistema inmune está menos definido. En este aspecto hay trabajos que muestran como la actividad invasiva de los precursores embrionarios que colonizan el timo de aves parece depender de fibronectina y/o laminina y es inhibido por peptidos RGD (denominación del dominio de interacción del receptor con la fibronectina) y Abs contra la subunidad β_1 de las integrinas (Savagner y cols, 1986). Por otra parte, en ratón se ha descrito que los timocitos inmaduros $CD4^+CD8^+$ y $CD4^+8^-$ se unen preferencialmente a la fibronectina (Cardarelli, 1988) y cómo el mecanismo de unión-desunión de células $CD3^{debil}CD4^+CD8^+$ a epitelio tímico es dependiente de moléculas de adhesión como LFA-1 (Lepesant y cols, 1990).

2. EL TIMO: FORMACION, ESTRUCTURA Y FUNCION

2.1. FORMACION DEL TIMO: VARIACION DE LOS COMPONENTES CELULARES LINFOIDES Y ESTROMALES DURANTE SU DESARROLLO.

El timo deriva de tres capas embrionarias: ectodermo y endodermo, que dan cuenta del componente epitelial estromal, y mesodermo, del que, aparte de las células linfoides, derivan las células interdigitantes/dendríticas y los macrófagos. Este último componente proviene de la médula ósea y puede ser reconstituido en animales irradiados (Longo y Schwartz, 1980). En humanos, el timo

se desarrolla en momentos tempranos de la embriogénesis. A las 4 semanas se genera el rudimento tímico formado por un componente ectodérmico y otro endodérmico derivados de la 3ª hendidura faríngea y bolsa branquial respectivamente. Entre las 8-10 semanas de gestación los primeros precursores T, identificados en base a la expresión de CD7, aparecen en el timo. A las 10 semanas el tejido conectivo derivado de mesodermo acompañado de los vasos sanguíneos comienza a invaginar produciendo, junto con la lobulación, un incremento en la proliferación de las células epiteliales. La distinción entre zona cortical y medular se produce a la semana 14 del desarrollo embrionario y la formación de corpúsculos de Hassal entre las semanas 15-16 de gestación, adquiriendo una configuración histológica postnatal con componentes celulares linfoides y estromales: células epiteliales, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, endotelio vascular y fibras de matriz extracelular, (Haynes, 1984).

El desarrollo de diferentes anticuerpos monoclonales (mAbs) ha permitido caracterizar fenotípicamente los componentes celulares del microambiente tímico. El componente epitelial de la corteza subcapsular y la médula parecen derivar del ectodermo, por la reactividad con mAbs específicos (TE4/A2B5/p19/RFD4), con los que también reaccionan otros tejidos derivados de la misma capa germinal, como la epidermis, mientras que la zona cortical intermedia, parece derivar del endodermo y es reactivo con los mAbs TE3 y TE4 (Mac Farland y cols, 1984). Las células fibroblásticas son identificadas específicamente por el mAb TE7.

La aparición en el timo de los componentes estromales celulares es un proceso secuencial en el desarrollo. A las 7 semanas se encuentran células positivas para TE4 y A2B5 (este último mAb

reconoce un gangliósido también expresado en cerebro y tejidos neuroendocrinos) formando la porción central del órgano en desarrollo. A las 12 semanas de la embriogénesis humana estas células se encuentran tanto en la corteza subcapsular como en la médula. Células positivas para TE3 aparecen posteriormente en el desarrollo, a las 8.5 semanas, expandiéndose posteriormente a la vez que aparecen por vez primera en el timo las células CD1+, alrededor de la semana 12 gestación. La expresión de moléculas asociadas a macrófagos o células dendríticas derivadas de médula ósea, así como moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II y moléculas implicadas en adhesión celular como LFA-3 e ICAM-1, también tienen una regulación ontogénica en su expresión, detectándose en el timo células positivas para moléculas MHC de clase II, LFA-3 e ICAM-1 desde la semana 7 de gestación, mientras que las moléculas MHC de clase I no se detectan hasta la semana 8.5 y los macrófagos no aparecen hasta la semana 10 (Haynes 1984; Denning y cols., 1987a; Singer y cols., 1990).

2.2. IMPLICACION DEL TIMO EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.

El desarrollo eficiente de las células T requiere un microambiente tímico (Metcalf, 1966; Moore, y Owen, 1967b; Miller y Osoba, 1967; Stutman, 1978). El tráfico celular desde y hacia el timo ha sido analizado en detalle. Los primeros colonizadores proliferan y maduran, y una pequeña fracción sale a la periferia para migrar hacia los nódulos linfáticos y el bazo. La colonización del timo por células precursoras de los linfocitos T en periodos tempranos del desarrollo del individuo es de crítica importancia

para la adquisición de un compartimento linfóide T inmunocompetente. De hecho, la función tímica disminuye marcadamente con la edad, de manera, que el órgano acaba atrofiándose, siendo irrelevante la timectomía para la función inmune en individuos adultos. Aunque bien es cierto que existen rutas madurativas extratímicas, aún no exactamente determinadas, que pueden proporcionar señales adecuadas para emprender o continuar un programa genético de maduración T, su acción es menos eficiente que en el timo (Oosterom y cols, 1981), y parece tener mayor relevancia en el individuo adulto. Estas rutas madurativas alternativas y/o simultáneas a la establecida en el timo han sido puestas de manifiesto en ratones *átimicos nude*. En estos animales, la diferenciación de las células T es mucho menos eficaz en términos cuantitativos y en cuanto a la diversidad del repertorio en base a la distribución de segmentos V β del TCR (MacDonald y cols, 1987). Por otra parte, el timo no sólo proporciona factores quimiotácticos imprescindibles para el asentamiento de los precursores, sino que también se ha descrito la producción local de factores de crecimiento, promotores de la gran expansión de los timocitos inmaduros (Cederig y cols, 1985; Raulet, 1985; Sideras y Palacios, 1987; Carding y cols, 1989; Toribio y cols, 1989). Aparte de la producción de factores, el contacto de los precursores con los elementos celulares estromales del timo constituye un hecho crucial en la diferenciación de aquéllos (Palacios y cols, 1989).

Cuando un precursor llega al timo los procesos madurativos que siguen pueden dividirse en dos grupos: procesos de diferenciación y proliferación y procesos de selección. Esta selección se produce en base a la interacción del TCR con moléculas del MHC y tiene un doble carácter: por una parte de "rescate" de

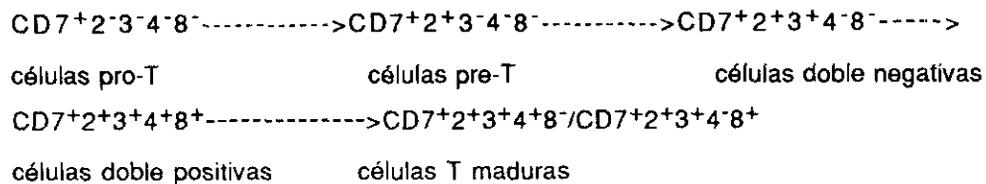
aquellas células que pueden interaccionar de forma correcta con las moléculas del MHC (selección positiva), y por otro de eliminación de aquellas con capacidad autorreactiva que reconozcan antígenos propios en el contexto del MHC (selección negativa), resultando un repertorio periférico que es restringido por el MHC y tolerante a lo propio, (Fink y Bevan, 1978; Zinkernagel y cols, 1978; Kappler y cols, 1987; Blackman y cols, 1988). Tan pronto como la célula adquiera el TCR, será esta molécula la que junto con moléculas del MHC (con la participación de otras accesorias, CD4 y CD8 entre las más estudiadas), la responsable del futuro de esa célula (Adkins y cols, 1987), que en la mayoría de los casos es la muerte, ya que de las 10^8 células que se localizan en el timo del ratón, sólo un 2-5% salen a la periferia (Shortman y cols, 1974).

3. DESARROLLO DE LAS CELULAS T

3.1. RUTAS DE MADURACION DE LOS LINFOCITOS T.

Estudios fenotípicos y funcionales en humanos y ratón han permitido establecer una jerarquía en la ruta de maduración de los linfocitos T. El análisis fenotípico de leucemias, los trabajos de repoblación, el análisis de expresión de marcadores durante el desarrollo fetal y los estudios de diferenciación "in vitro" mediante el empleo de factores solubles han definido diferentes rutas de maduración T (Reinhertz y cols, 1980; Lanier y cols, 1986a; Toribio y cols., 1986; Scollay y cols, 1988). Así, en humanos, la subpoblación $CD7^+3^-4^-8^-$ se ha identificado como la población intratímica más inmadura por ser fenotípicamente similar a las primeras células que aparecen en el timo durante la ontogenia (Haynes y cols, 1988a) y por su capacidad de originar "in vitro" células T funcionalmente

maduras, que expresan el receptor para el antígeno α/β o γ/δ (TCR α/β , TCR γ/δ) (Toribio y cols., 1988). En base a este tipo de aproximación experimental se ha definido una ruta de diferenciación de linfocitos T en humanos teniendo en cuenta la expresión secuencial de antígenos específicos de membrana que se presenta como sigue:



Dentro de este esquema general de diferenciación, teniendo en cuenta la combinación de estos y otros marcadores, se han descrito diversas subpoblaciones con capacidades progenitoras y funcionales diferentes que pueden incluirse en el esquema o formar rutas de diferenciación alternativas. Así, en ratón, se ha descrito una población CD3 $^-$ 8 $^+$ 4 $^-$ que "in vitro" es capaz de generar células TCR α/β 4 $^+$ 8 $^+$ (Paterson y cols., 1987; Berger y cols., 1989), que a su vez, pueden originar células maduras CD4 $^+$ ó CD8 $^+$. En experimentos de bloqueo específico de las moléculas CD4 y CD8, así como, en experimentos de transfección génica de estas moléculas, se ha puesto de manifiesto su importancia en los procesos de generación y función de los linfocitos T, especialmente en su interacción con moléculas del MHC. Sin embargo, la expresión simultánea no parece ser un requisito indispensable en la maduración de precursores de linfocitos T "in vitro", aunque puede que si lo sea en la selección del repertorio, (Bierer y cols., 1989; Ramsdell y Fowlkes, 1989; Zuñiga-Pflucker y cols, 1990). En el hombre se han encontrado diversas subpoblaciones intratímicas, no incluidas en la ruta general establecida, tales como CD1 $^+$ CD3 $^-$ 4 $^-$ 8 $^-$ (de la Hera y cols,

1989a). y CD2⁺3⁺4⁻8⁻ (Kabelitz y Conradt, 1988) probablemente implicadas en alternativas de diferenciación.

Por otra parte, grandes esfuerzos se han centrado en el entendimiento de la función que tienen estas moléculas asociadas a estadios concretos de diferenciación. Así CD1, que típicamente se expresa en timocitos inmaduros doble positivos y está ausente en células maduras de sangre periférica, se ha implicado en señales específicas de reconocimiento de células T $\gamma\delta$ (Porcelli y cols, 1989) y células de Langerhans; CD2, que por su expresión temprana en la ontogenia ha sido especialmente útil en la identificación de la subpoblación pre-T o estadio I de timocitos (CD2⁺1⁻3⁻4⁻8⁻), tiene un papel esencial en la activación de timocitos, aunque no así en el desarrollo de los mismos, ya que el bloqueo de esta molécula "in vitro" o "in vivo" no parece repercutir sobre la linfopoyesis T, al menos en ratón (Kyewski y cols, 1989a; Moingeon y cols, 1989). CD45 es otra estructura de membrana expresada en la mayoría de las células hematopoyéticas. Engloba a una familia de glicoproteínas entre 180-240 Kd. Existen mAbs específicos de CD45 que reconocen dos isomorfos, CD45RA y CD45RO que se han asociado con estadios discretos de diferenciación. Así los timocitos CD3⁺4⁻8⁻ son mayoritariamente CD45RA mientras que las subpoblaciones doble positiva y maduras son CD45RO (Pilarski y cols, 1989). Especial mención hay que hacer del Ag CD7, ya que es uno de los primeros marcadores expresados durante el desarrollo de los linfocitos T (Lobach y cols, 1985). La molécula CD7 está estructuralmente relacionada con la familia de las inmunoglobulinas y su función se desconoce. Está presente en subpoblaciones inmaduras y maduras de timo y sangre periférica adscritas al linaje T, así como en

progenitores de células mieloides, monocitos y células B, (Haynes y cols, 1989; Grümayer y cols, 1991).

3.2. REGULACION ONTOGENICA DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR PARA EL ANTIGENO DE LAS CELULAS T, COMPLEJO TCR-CD3.

El reordenamiento y expresión en membrana de los genes que codifican para el receptor del antígeno de los linfocitos T es un punto fundamental en la secuencia de eventos de regulación de expresión génica que tiene lugar en el desarrollo de los linfocitos T, (Born y cols, 1988; Strominger, 1989.). Cuatro loci codifican para los segmentos génicos de las cadenas polipeptídicas que van a formar el TCR: α , β , γ , δ (Allison y Lanier, 1987). La combinación de estas cuatro cadenas polipeptídicas dará lugar a dos tipos de receptores heterodiméricos: α/β y γ/δ , que se asocian al componente monomórfico CD3, formado en humanos por al menos 4 cadenas ϵ , γ , δ y ζ e implicado en la transducción de señales de activación (Weiss y cols, 1986). Los genes del TCR se reordenan siguiendo una secuencia temporal durante la diferenciación de timocitos, reordenándose a nivel de precursores T CD3⁻4⁻8⁻ (Raulet y cols, 1985; Snodgrass y cols, 1985; Robey y cols, 1990). Así los genes que codifican para la cadena δ , incluidos físicamente en el locus α , se reordenan junto con los genes γ y β alrededor del día 14 del desarrollo fetal en ratón. En principio se producen reordenamientos parciales de los diferentes segmentos (VDJC), de manera que los reordenamientos DJ β aparecen al mismo tiempo que VJ γ a día 14 del desarrollo en ratón, mientras que el reordenamiento completo VDJ β no se da hasta el día 16. Consecuentemente transcritos inmaduros del TCR β de 1.0kb se detectan a día 15 del desarrollo embrionario, mientras que el transcrito completo de 1.3kb no aparece hasta el día 16 en el ratón

ratón (Pardoll y cols, 1987; Strominger, 1989). De esta forma, a día 14 de desarrollo, un 26% timocitos fetales de ratón presentan reordenados los genes δ y un 15% los genes β y γ . A día 17, más del 80% de los timocitos tienen reordenados los genes que codifican para las cuatro cadenas del TCR.

A nivel fenotípico el TCR γ/δ aparece primero en la ontogenia del ratón en timocitos $CD4^{-}8^{-}$ (Havran y Allison, 1988). La subsiguiente maduración en el timo conduce a una progresiva disminución de células γ/δ , que llegan a constituir el 10% de las células $CD4^{-}8^{-}$, (1% del timo total), mientras que el TCR α/β se expresa en más del 65% de los timocitos en el ratón neonato (Robey y cols, 1990). Esta aparición secuencial en el tiempo, primero de las células $T\gamma/\delta$ y dos otros días más tarde en el desarrollo de ratón, de las células $T\alpha/\beta$ conduce al planteamiento de una importante cuestión: ¿cuál es la relación de linaje entre las células $T\alpha/\beta$ y $T\gamma/\delta$? Lo que parece claro es que una célula T una vez que ha tomado la decisión genética de ser TCR α/β^{+} o TCR γ/δ^{+} no puede revertir, de forma que ni en experimentos "in vitro" ni "in vivo" se ha logrado obtener células $T\alpha/\beta$ apartir de células $T\gamma/\delta$. Teniendo además en cuenta que los reordenamientos de la cadena γ son aberrantes en la mayoría de las células $T\alpha/\beta$ (Traunecker y cols, 1986), condujo, a pensar que ambas subpoblaciones celulares provenian de diferentes precursores. Sin embargo, posteriormente se ha descrito que la expresión de una cadena β transgénica ya reordenada hace desaparecer por completo la población $T\gamma/\delta$ (von Boehmer y cols, 1988). Estos datos junto con la descripción "in vitro" de la generación de células $T\alpha/\beta$ y $T\gamma/\delta$ apartir de un precursor común dependiendo de los factores presentes en el medio de cultivo (Palacios y cols., 1989) apoyarían la idea del linaje común para

ambas subpoblaciones T, α/β y γ/δ . Se ha postulado que la cadena δ , en base a su especial localización génica dentro del locus α , tendría un papel relevante en la regulación de la determinación de dichos linajes. Dos teorías generales han surgido en base a la consideración de este elemento, una que propone que ambas subpoblaciones tendrían un origen común como resultado de reordenamientos secuenciales de los loci del TCR de manera que cuando el reordenamiento en el locus δ es productivo se inhibirían posteriores reordenamientos en la cadena α (Takeshita y cols, 1989). La otra teoría apoyaría la idea de linajes separados de manera que las células tomarían la decisión antes de reordenar los loci del TCR regulado por factores transcripcionales que activarían o silenciarían determinados loci controlando su accesibilidad a las recombinasas (Winoto y cols, 1989)

En precursores humanos pro-T intratímicos que no expresan en la membrana el complejo TCR-CD3 se han descrito reordenamientos de los genes γ , δ y β , junto con la producción de transcritos funcionales para γ y no funcionales para β , (Furley y cols, 1986; Toribio y cols, 1988a; Toribio y cols., 1988c). La expresión de transcritos del complejo CD3 se produce también en momentos tempranos del desarrollo de linfocitos T, (Furley y cols, 1986; Campana y cols, 1989), ya que tanto transcritos para CD3 δ y CD3 ϵ , como péptidos intracitoplasmáticos para CD3 ϵ se detectan en células pro-T (CD7⁺2⁻3⁻4⁻8⁻).

3.3. ELEMENTOS IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T

3.3.1 *Papel de las interleuquinas y sus receptores en diferenciación de linfocitos T.*

Muchas de las linfoquinas descritas parecen tener un pronunciado efecto "in vitro" sobre precursores y sobre células inmaduras, lo cual ha hecho estudiar la disponibilidad de éstas en momentos tempranos de la generación del S.I. Desde el momento en que las interleuquinas median su efecto biológico a través de su unión específica a receptores existentes en la superficie de la célula (Paul, 1989), la disponibilidad del factor de crecimiento en un momento determinado del desarrollo no basta, ya que se requiere la presencia simultánea de sus receptores específicos.

3.3.1.1 Implicación de la IL-2 en el desarrollo de timocitos inmaduros.

En los últimos años se han realizado numerosos intentos para identificar las señales que median la intensa proliferación intratímica de las células progenitoras, así como su papel en procesos de diferenciación. Estos estudios han puesto de manifiesto que los timocitos inmaduros responden a factores que inducen la proliferación de los linfocitos T maduros como son las interleuquinas IL-2, IL-4 e IL-7 entre los más caracterizados (Toribio y cols, 1988a,b; Kishimoto y cols, 1988; Groh y cols., 1990; Mossalayi y cols, 1990; Bárcena y cols, 1990).

Entre ellos, uno de los sistemas más estudiados es el de la IL-2/IL-2R, (Lowenthal y cols, 1986; Palacios, y von Boehmer, 1986; Toribio y cols, 1988; Scollay y cols, 1988). El IL-2R está constituido

al menos por dos cadenas: la p55/IL-2R α (identificada por el mAb anti-TAC) y la p75/IL-2R β . (Teshigawara y cols, 1986; Tsudo, 1986). Ambas moléculas unen IL-2 independientemente, con afinidad baja (K_d 2-30nM) e intermedia (K_d 1nM), respectivamente (Smith, 1988). El receptor de alta afinidad está formado por la asociación de, al menos, las dos cadenas y parece ser la IL-2R β la molécula implicada en la transducción de señales de la IL-2 al interior celular. Las células T maduras quiescentes expresan bajos niveles de IL-2R β (Toribio y cols, 1989). En estas células maduras, la expresión de los genes para la IL-2 y las moléculas IL-2R β y α se induce específicamente por la estimulación antigénica via complejo TCR-CD3. Sin embargo, en el timo la activación de la via IL-2/IL-2R precede a la expresión del TCR. Diferentes grupos han aportado evidencias acerca de la expresión de la cadena p55 en la población CD4-8⁻, tanto en ratón (Ceredig y cols,1985; Roulet, 1985), como en humanos (de la Hera y cols, 1985; Toribio y cols, 1988). En timocitos fetales murinos la expresión de p55 así como la producción de IL-2 es máxima entre los días 14 y 15 de gestación (Carding y cols, 1989). Tanto "in vitro" (Toribio y cols, 1988b) como "in vivo" (Zuñiga Pflucker y cols,1990) el bloqueo de los receptores de IL-2 interfiere en los procesos de proliferación y diferenciación inducidos por esta interleuquina. No obstante, también se han publicado datos que sugieren que los receptores de la IL-2 en células inmaduras no son operativos (Palacios y cols, 1986) y que la proliferación inducida por IL-2 en timocitos fetales en cultivos de órganos no es inhibible por mAbs anti-IL-2R α (Plum y Smith 1988), apuntando así, en contra de un papel funcional del IL-2R expresado en células pro-T en momentos tempranos del desarrollo T.

3.3.1.2. Otras citoquinas implicadas en la maduración de timocitos.

Otros factores de crecimiento distintas de la IL-2 han sido implicados en el crecimiento y diferenciación de los timocitos. En el control de estos procesos madurativos intratímicos pueden implicarse, por una parte, interacciones celulares y por otra factores solubles, aunque la regulación de ambos factores está estrechamente relacionada (inducción de producción de IL-1 por mAbs contra la estructura LFA-3, inducción de expresión de IL-2/IL-2R por IL-1, etc) formando como Sporn y cols (1988) indican las letras de un alfabeto cuya estructura lingüística tiene un significado contextual que se traduce en una respuesta de maduración. En general, la mayoría de las linfoquinas tienen un efecto proliferativo sobre los linfocitos, proceso que, por otra parte, en algunos casos va acompañado de modificaciones moleculares expresadas como cambios fenotípicos celulares que, entre otros, pueden representar estadios discretos de maduración o cambios funcionales.

La expresión de IL-4/IL-4R parece presentar, al igual que IL-2/IL-2R, una regulación ontogénica. Así, se ha descrito la expresión de receptores para la IL-4 en timocitos de ratón CD4⁺8⁻ (Lowenthal y cols, 1988). En timocitos humanos CD2⁺3⁺4⁺8⁻ se ha demostrado que estos receptores para la IL-4 son funcionales, de forma que la presencia de esta interleuquina en los cultivos de células pre-T induce una respuesta proliferativa y la adquisición del fenotipo de células T maduras (Bárcena y cols, 1990). Es más, los timocitos de ratón a día 15 del desarrollo embrionario producen transcritos para IL-4 (Carding, 1989). Si la misma población produce IL-2 o IL-4, y si

ambas linfoquinas ejercen su acción en la misma o en diferentes subpoblaciones tímicas es una cuestión no determinada. Sin embargo, la actuación selectiva de cada una de ellas puede ser crítica en la decisión hacia los linajes $T\alpha/\beta$ o γ/δ ya que estudios "in vitro" han demostrado que células pro-T cultivadas en presencia de IL-4 se diferencian preferencialmente a células $TCR\gamma/\delta^+$ mientras que en presencia de IL-2 se generan selectivamente células $TCR\alpha/\beta^+$ (Bárcena y cols, 1990).

La respuesta proliferativa de los progenitores T a la IL-1 (Howed y cols, 1986; Le y cols, 1987; Takashy y cols, 1991), IL-3 (Cederig, 1986; Denning y cols, 1988), IL-6 (Le J. y cols, 1988), IL-7 (Morrissay y cols, 1988; Watson y cols, 1989) y IL-10 (MacNeil y cols, 1990) muestra el amplio espectro de señales a las que un precursor es vulnerable. Tanto la IL-1 como el GM-CSF inducen la proliferación de células $CD4-8^-$. Por otra parte, la IL-3 se ha sugerido que promueve la proliferación de precursores tempranos de células T (Scheider y cols, 1988). La IL-7 es un factor recientemente descrito (Namen y cols, 1988) que induce proliferación tanto de linfocitos T maduros (Morryssey y cols, 1988) como de timocitos inmaduros $CD4-8-IL-2R\alpha^+$ y su diferenciación (Groh y cols, 1990). Igualmente se ha demostrado que la IL-10 (Moore y cols, 1990) presenta efecto coestimulador con IL-2 e IL-4 en la inducción de proliferación de timocitos inmaduros de ratón $CD3-4-8^-$ (MacNeil y cols, 1990) En cuanto a la interrelación entre las diversas linfoquinas recientemente se ha descrito que tanto la IL-1 como la IL-6 inducen la expresión del $IL-2R\alpha$ y de la IL-2 en timocitos inmaduros $CD4-8^-$ (Rothember, 1989), mientras que la IL-4 regula de forma negativa la expresión del $IL-2R\alpha$ (Loughnan y cols, 1989). Por otra parte la IL-10 se describió en principio como un

factor inhibidor de la producción de citoquinas (CSIF) ejerciendo su efecto inhibidor en la producción de IFN α por células T maduras Th1 (Fiorentino y cols, 1991)

3.3.2. Papel del componente celular estromal tímico en la diferenciación de linfocitos T

La interacción entre protimocitos y células del estroma tímico (células epiteliales, células derivadas de médula ósea, así como fibras de matriz extracelular) es necesaria para la proliferación, diferenciación y selección de los timocitos (Sprent y cols, 1987; Papiernik y cols, 1987; Denning y cols, 1987b; Denning y cols, 1988; de la Hera y cols, 1989b). La aportación más relevante en los últimos años ha sido el establecimiento de técnicas que permiten la obtención de líneas y clones epiteliales tímicos (Picciano y cols, 1984; Singer y cols, 1985; Palacios y cols, 1989). De este modo, ha sido posible realizar ensayos funcionales "in vitro" y determinar la implicación de tales poblaciones celulares en distintas fases de la diferenciación y selección de las células T, así como establecer la heterogeneidad fenotípica y funcional de los diferentes componentes epiteliales en el timo. Determinados clones epiteliales son capaces de promover la diferenciación de los precursores linfoides a subpoblaciones T concretas, mientras que otros sólo inducen proliferación en ausencia de diferenciación (Palacios y cols, 1989). Un aspecto importante de la implicación del estroma tímico en la diferenciación de las células T es la demostración de la producción de linfoquinas entre las que se encuentran IL-1, -3, -6 y -7, por las células estromales (Le y cols, 1987a; Mizutani y cols, 1987; Le y cols, 1987b; Gutierrez y Palacios, 1991). Estas linfoquinas, además de constituir factores de

crecimiento para las células precursoras linfoides y estromales, podrían regular la producción y la capacidad de respuesta a otros factores (IL-2 e IL-4) sintetizados por los timocitos, e implicados, a su vez, en el proceso de diferenciación (Cederig y cols, 1985; Raulet, 1985; Toribio y cols, 1988; Bárcena y cols, 1990).

Tanto las células epiteliales como las dendríticas derivadas de la médula ósea expresan "in vivo" moléculas MHC de clase I y II, ambas, por tanto, podrían intervenir en la adquisición de la restricción MHC y de la tolerancia, aunque la cuestión no ha sido clarificada hasta el momento. Hay datos que favorecen la idea de que la adquisición de la restricción (reconocimiento de Ag presentados por moléculas MHC propias) está controlada por las células epiteliales, mientras que la tolerancia al MHC propio dependería de macrófagos y células dendríticas, de forma que cuando una célula T durante su diferenciación intratímica comienza a expresar el TCR, algunas serían capaces de unirse al epitelio cortical. De la afinidad de la unión del TCR a las moléculas del MHC dependería su selección, de manera que sólo las que interaccionasen fuertemente con moléculas MHC (nivel de interacción presumiblemente requerida para el proceso de restricción), serían seleccionadas positivamente, migrando a la zona córtico-medular. En esta localización, las células interaccionarían con macrófagos/células dendríticas que, a su vez, seleccionarían negativamente las células que presentan una reactividad "excesivamente alta" para el MHC y serían eliminadas (selección negativa), (Sprent y cols, 1987) .

La estructura histológica del timo refleja la compartimentalización de los complejos fenómenos de proliferación, maduración y selección de células precursoras que en él tienen lugar. En líneas generales parece ser aceptado que la

selección ocurriría a nivel de timocitos doble positivos (CD4+8+). La selección positiva de células CD4+8+3⁺debilTCR $\alpha\beta$ +debil capaz de reconocer lo propio ocurriría mediante contacto con el epitelio cortical, mientras que la selección negativa de las células autorreactivas CD4+8+3^dTCR $\alpha\beta$ +debil ocurriría por contacto con células dendríticas y macrófagos en la zona cortico-medular (Sprent y cols, 1988; Kyewski y cols,1989; Fowlkes y Pardoll, 1989)

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este proyecto de Tesis Doctoral se centra en el estudio de la biología del desarrollo del compartimento celular T del S.I. humano, principalmente en el análisis de los programas madurativos que acontecen en momentos tempranos de la vida fetal, previa migración de los precursores del linaje T a timo, y los programas genéticos que se inician en este órgano. Los puntos concretos desarrollados son:

1.- Análisis comparativo de las características moleculares y funcionales de los precursores hematopoyéticos T presentes en el hígado fetal en momentos tempranos de la embriogénesis previa migración al timo y de los precursores intratímicos tempranos, células pro-T.

1.1.- Estudio de la expresión de distintas moléculas de adhesión y antígenos de activación durante la ontogenia de las células T.

1.2.- Análisis de los procesos madurativos que determinarán el compromiso de los precursores hematopoyéticos tempranos al linaje linfóide T: Expresión de los genes que codifican para el complejo CD3.

1.3.- Regulación ontogénica del reordenamiento y la expresión de los genes que codifican para el TCR.

2.- Efecto de distintas interleuquinas en la modulación de los procesos de proliferación y diferenciación que operan en los precursores pretímicos: Implicación de la ruta de la IL-2 en la diferenciación de células T.

2.1.- Análisis de la producción de IL-2 y IL-4 y regulación de la expresión de los receptores de IL-2 en precursores T pretímicos e intratímicos.

2.2.- Implicación de la IL-2 y la IL-4 en la proliferación y diferenciación de los precursores T.

3.- Estudio del estroma de diferentes ambientes hematopoyéticos: médula osea, hígado fetal y timo. Análisis fenotípico y producción de citoquinas

3.1- Papel de células epiteliales tímicas en la maduración de los precursores T.

3. MATERIALES Y METODOS

1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE TIMO E HIGADO FETAL.

La suspensión de timocitos humanos se obtuvo a partir de fragmentos de timo obtenidos durante operaciones de corrección cardíaca en pacientes de 1 mes a 3 años de edad. Después de la homogeneización del tejido, los timocitos viables se aislaron mediante centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia). Las poblaciones celulares tímicas fueron seleccionadas por tratamiento con mAbs específicos durante 30 min a 4°C a una concentración de 10^8 células/ml en RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Scotland) seguido de una incubación de 45 min a 37° con complemento de conejo no citotóxico (Sera-Lab Ltd., Sussex, U.K.) (Toribio y cols., 1986). Los anticuerpos empleados como sobrenadantes a una dilución 1/2 para la inmunoselección fueron: Na1/34 (anti-CD1), HP2/6 (anti-CD4), B9.4 (anti-CD8) y SPV-T3b (anti-CD3). Las células viables recuperadas se incubaron a 20×10^6 células/ml con ascitis purificada de los mAbs mencionados más el mAb purificado comercial Leu5B (anti-CD2) (Becton-Dickinson Corp., Mountain View, C.A., USA) a la concentración de 0.5 µg/ml durante 30 min a 4°C y pasadas por esferas magnéticas recubiertas con anti-IgG de ratón (Dynabeads M-450, Dynal, Oslo, Noruega), en una relación esferas/células de 5:1 incubando 15 min. a temperatura ambiente. Esferas y células unidas se retiraron con un imán.

Las muestras de tejido fetal se obtuvieron de abortos legales realizados entre las 8-20 semanas de gestación. La determinación de la edad del feto se realizó en base a la longitud antero/caudal, longitud de pies y registro de menstruación. (Kelemen y cols, 1979).

La suspensión celular de timo, bazo e hígado se separó por centrifugación en Ficoll-Hypaque lavándose posteriormente en medio completo (MC): RPMI 1640 suplementado con 2 mM L-glutamina (Flow,U.K.), 10mM hepes (Flow, U.K.), 100 U/ml penicilina (Antibióticos S.A., España), 100 µg/ml estreptomina (Antibióticos S.A., España) y 10% de suero de ternera fetal (STF) descomplementado (Gibco, Scotland).

2. CULTIVOS DE PRECURSORES HEMATOPOYETICOS.

Las distintas poblaciones celulares (células purificadas de timo e hígado fetal) se cultivaron en placas de 24 pocillos (Costar, Cambridge, USA) a 10^6 células/ml en medio RPMI-1640 suplementado en presencia de rIL-2 (100 U/ml) (Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza) o rIL-4 (300ng/ml) (Sandoz, Basel, Suiza). En cocultivos de células de hígado fetal y células de epitelio tímico, éstas se sembraron 48 h. antes en placas de 24 pocillos (2×10^4 células por pocillo), de forma que no sobrepasaran una confluencia del 60-70%. Cuando la capa de células adherentes estaba sobrecrecida, las células hematopoyéticas de hígado se retiraron, pipeteando suavemente y se sembraron sobre monocapas de células estromales que se llevaron en paralelo. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en un incubador Heraeus con 95% de humedad y 5% de CO₂.

3. CLONAJE DE CELULAS DE HIGADO FETAL Y CELULAS PRO-T DE TIMO NEONATO.

Los timocitos inmaduros CD7⁺2⁻3⁻4⁻8⁻ obtenidos por tratamientos sucesivos con mAbs más complemento y posterior purificación con esferas magnéticas y las células de hígado fetal

de 10 semanas de gestación obtenidas por centrifugación en Ficoll-Hypaque, se cultivaron en dilución límite (entre 0.5-100 células por pocillo), en placas de Terasaki (Nunc, Roskilder, Dinamarca) en presencia de 100 U/ml rIL-2 y una mezcla de células feeder irradiadas: 20.000 células EBV-B (línea linfoblástica B) más 20.000 PBL por pocillo en RPMI suplementado con 2% suero AB humano y 10% STF. Tras 7-9 días de cultivo se determinó el número de pocillos negativos para cada dilución, seleccionando los clones crecidos en aquella dilución para la que el 37% de los pocillos no habían crecido, en base al análisis estadístico dado por la distribución de Poisson (Lefokovits y cols., 1979), que predice que cuando el 37% de los cultivos son negativos existe una media de una célula por pocillo. Los clones crecidos se reestimularon durante dos semanas con células feeder e IL-2 para su posterior caracterización fenotípica por inmunofluorescencia (IF) y citometría de flujo en un EPICS-Profile II.

4. CULTIVO DE CELULAS EPITELIALES DE TIMO Y CELULAS ESTROMALES DE MEDULA OSEA E HIGADO FETAL.

Tanto las células de médula ósea obtenidas de donantes normales para trasplante, como la suspensión celular de hígado fetal entre 9-12 semanas de gestación se lavaron varias veces lisándose los eritrocitos con medio Gey's (Mishell y Shügi, 1980). Brevemente, 10^8 células se resuspendieron en 1ml de BSS y se añadieron 3 ml de solución de lisis durante 5 min. a 4°C lavándose seguidamente. Durante una semana se dejaron los cultivos en M.C. con 10% STF en placas de 6 pocillos. Para eliminar las células linfoides los cultivos se trataron con 5 µg/ml de ácido

micofenólico (Sigma, St Louis, MO, USA) previamente disuelto en RPMI y NaOH 0.1M (10 mg/ml). El cultivo se mantuvo durante un mes con cambios de medio dos veces por semana. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% se tripsinizaron (5-10 min. a 37°C) con solución tripsina-EDTA (1x) preparada en medio modificado Puck's salino (Gibco, Scotland) y se subcultivaron a una dilución 1/2-1/5. Todos los medios empleados se atemperaron a 37°C, excepto el de lavado que se realizó a 4°C. Los fibroblastos de piel se cultivaron en similares condiciones.

Para la obtención de células epiteliales de timo, fragmentos de 20 µm se lavaron en BSS suplementado con antibióticos. Entre 5-10 explantes se cultivaron en botellas de 25 cm² en medio mínimo esencial con D-valina (MEM-D-val) (Gibco, Scotland) para evitar el sobrecrecimiento de fibroblastos, ya que estos no metabolizan la forma D de la valina (Nieburgs y cols, 1984; Palacios y cols. 1989), suplementado como el RPMI con 10% STF. Cuando los explantes están adheridos se lavaron y trataron con micofenólico durante dos días. Entre la segunda y tercera semana los explantes se tripsinizaron y las células se cultivan a 5 x 10⁴ células/ml (cada pase se diluye 1/5-1/10). Los sucesivos pases se realizaron como se ha descrito previamente para las células adherentes de médula ósea e hígado fetal. El establecimiento de líneas de epitelio tímico se realizó por diluciones sucesivas 1/100-1/500 (el número mínimo de células que crecen en placas de 24 pocillos es de 10-25) en medio suplementado con 15% STF mas sobrenadante del estroma heterogeneo diluido 1/5.

5. DETECCION DE ANTIGENOS CELULARES

5.1. INMUNOFLOURESCENCIA Y CITOMETRIA DE FLUJO.

La determinación de marcadores de superficie se realizó por tinción de 10^4 células con mAbs unidos a un fluorocromo y posterior análisis en un citómetro de flujo EPICS-Profile II (Coulter Electronics, Hialeach, FL). La tinción se realizó incubando las células durante 30 min a 4°C con cantidades saturantes del correspondiente mAb en placas de 96 pocillos con fondo cónico en un volumen final de 50 μl . Cuando el mAb no estaba directamente conjugado con FITC, las células, después de lavar en PBS a 700 rpm, se incubaron con la fracción F(ab')_2 de un Ab de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, AL). Para análisis biparamétricos, las células teñidas como se describe o con mAbs directamente conjugados con FITC se incubaron posteriormente, bien con mAbs conjugados con biotina seguido de ficoeritrina-estreptavidina (PE-Strav) (Southern Biotechnology) o con mAbs directamente unidos a PE. Como control negativo se emplearon mAbs irrelevantes de ratón del mismo isotipo que el específico. En la Tabla 1 se muestran los mAbs empleados.

5.2. INMUNOHISTOQUIMICA.

La detección de Ag intracitoplasmáticos de células estromales adheridas a superficie se realizó por técnicas inmunohistoquímicas. Para ello, las células se fijaron previamente durante toda la noche en una mezcla 3:1 de solución A (0.1M Na_2HPO_4 , 0.2M monoclóhidrato de lisina, Merk) y solución B (Paraformaldehído 4%, Merk, glutaraldehído 2%, Fluka). Después de

lavar con PBS las células se trataron con 1% H₂O₂ de 30% v/v en metanol durante 30 min para inhibir peroxidasas endógenas. Tras el lavado se visualizó la reactividad de los mAbs empleando el complejo avidina-biotina peroxidasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Vector, Burlingame, CA) y revelando la reacción con diaminobencidina (0.5mg/ml) en PBS más 0.05% de H₂O₂.

6. DETERMINACION DEL CICLO CELULAR.

El número relativo de células en cada fase del ciclo celular (G₀/G₁, S+G₂+M) se estimó por tinción con ioduro de propidio (IP) (Calbiochem, Behring Corp. S. Diego, CS) y análisis por citometría de flujo. En resumen, 5 x 10⁴ células en placas de 96 pocillos se permeabilizaron con 50 µl de digitonina a 0.005mg/ml (Sigma) incubando durante 3 min. a 25°C, lavándose posteriormente con PBS/1%STF/2% BSA (Merk, Alemania). Seguidamente las células se trataron con 25 µl de RNasa (10mg/ml) durante 20min. a 37°C. Finalmente se lavaron y tiñeron con IP durante 1h. a temperatura ambiente.

Tabla 1. Anticuerpos monoclonales empleados en la caracterización fenotípica de células hematopoyéticas y estromales.

CD ^a	ANTICUERPO MONOCLONAL	ANTIGENO RECONOCIDO	REFERENCIA
CD1a	Na1.34, T6 ^b	T6/HTA1, gp49	McMichel y cols,1987; Reinherz y cols,1980
CD2	OKT11 ^c ,Leu5b ^d , T11 ^b	T11/LFA2,gp50	Howard y cols,1981; Verbi y cols,1982
CD3	SPV/T3b, OKT3 ^c ,Leu4 ^d	T3,gp26,20,16	Kung y cols, 1979;Kaneoka y cols,1983;Spits y cols,1985
CD4	HP2/6,OKT4 ^c , Leu3a ^d	T4,gp59	Reinhertz y cols, 1979a;Evans y cols,1981;Carrera y cols,1987
CD5	OKT1 ^c ,Leu1 ^d	T1,gp67	Reinherz y cols,1979b;Kung y cols1979;Engleman y cols,1981
CD7	3A1 ^e	gp40	Haynes y cols,1979
CD8	B9.4,OKT8 ^c ,Leu2a ^d	T8,gp32	Reinhertz y cols,1980;Evans y cols,1981;Malissen y cols,1982
CD11b	MO1 ^b	C3biR,gp155/95	Todd y cols,1981
CD13	My7 ^b	gp150	Griffin y cols,1981
CD14	MO2 ^b	gp55	Todd y cols, 1981
CD16	Leu11c ^d	FcRIII,gp50-65	Perussia y cols,1983
CD18	Ts1/18	LFA1β,gp90	Sanchez Madrid y cols,1982
CD19	B4 ^b	gp95	Nadler y cols,1983
CD20	B1 ^b	p37/32	Stashenko y cols,1980
CD25	MAR-108	IL-2Rα/Tac,gp55	Carrera y cols, 1987
CD28	9.3 ^f	T44,gp44	Hansen y cols,1980
CD29	Ts2/16	VLAβ,gp130	Hemler y cols,1984
CD34	HPCA1 ^d	gp105-120	Civin y cols,1984

CD38	OKT10 ^c	T10, gp45	Reinhertz y cols, 1980
CD45	GAP8.3 ^e	T200/LCA, gp180-220	Berger y cols, 1981
CDw49d	HP2/1	VLA4, gp150	Sánchez Madrid y cols, 1986
CD57	Leu7 ^d	HNK-1, gp110	Abo y cols, 1981
CD58	Ts2/9	LFA3, gp40-65	Sánchez Madrid y cols, 1982
CD71	OKT9 ^c	T9/TfR, gp180	Reinhertz y cols, 198-
-	4F2 ^e	gp120	Haynes y cols, 1981
-	W6/32 ^e	HLA A,B,C; gp40	Barnstable y cols, 1978
-	anti-HLA-DR ^d	HLA-DR, gp29/34	Lampson y cols, 1980
-	WT31 ^g	α/β -TCR	
-	TCR-delta-1	γ/δ -TCR	Band y cols, 1987
-	YTA-1	p75 IL-2R	Nakamura y cols, 1989.
-	RFD4	-	Janossy y cols, 1986
-	anti-p19(12/1-2)	queratinas 46, 48, 50 kDa	Haynes y cols, 1983
-	AE-3	queratinas basicas de alto peso molecular	Haynes y cols, 1984; Lobach y cols, 1985; McFarland y cols, 1984
-	TE16	p62kDa	Haynes

^a De Leukocyte typing IV. Oxford University Press. 1989

^b Coulter Clone, Hialeah, FL

^c Ortho Diagnostic, Raritan, NJ.

^d Becton-Dickinson Corp., Mountain View, CA.

^e American Type Culture Collection, Rockville, MD

^f New England Nuclear, Boston, MA

^g Sambio

7. ANALISIS DEL REORDENAMIENTO DE GENES PARA EL RECEPTOR DE CELULAS T POR TRANSFERENCIA DE DNA A MEMBRANAS DE NYLON (SOUTHERN BLOT).

El DNA de diferentes poblaciones celulares se aisló por procedimientos estandarizados, digiriéndose con EcoRI o Hind III (Boehringer Mannheim, FRG). Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0.7% y se transfirieron a membranas de nylon. Las membranas se prehibridaron durante toda la noche a 42°C en 5x SSPE, 50% formamida desionizada (Merk, Alemania), 0.1% de albúmina de suero bobino (Sigma, USA), 0.1% ficoll, 0.1% polivinilpirrolidona, 5% sulfato de dextrano, 1% dodecil sulfato sódico (SDS) y 200 mg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. La hibridación se realizó en idénticas condiciones con sondas de cDNA marcadas con ^{32}P por random priming. Las sondas empleadas fueron JUR- β 2,(fragmento Pst I del clon pBR-322 de 800bp) que incluye el segmento C β 2 de la cadena β del TCR (Yoshikai y cols, 1984) y la sonda J γ 1 (fragmento Hind III del clon M13-160 de 2.1kb)(Lefrnac y cols, 1985) que incluye el segmento J γ 1. Los filtros hibridados se lavaron en 2X SSPE dos veces durante 5 min a temperatura ambiente y en 0.2X SSPE 0.5% SDS dos veces a 65°C durante 15 min. Las membranas se expusieron utilizando películas Kodak de rayos X para autorradiografía.

8. DETECCION DE TRANSCRITOS POR TRANSFERENCIA DE RNA A MEMBRANAS DE NYLON (NORTHERN BLOT).

El RNA total de diferentes poblaciones celulares se aisló por el método del isotiocianato de guanidinium (Chirwing y cols.,

1979). 12ug de RNA se cargaron en un gel de agarosa-formaldehido al 1% transfiriéndose e hibridándose como previamente se ha descrito para el DNA con sondas cDNA específicas de C β (Yoshikai y cols, 1984) y de C γ (Yoshikai y cols., 1987) marcadas con ^{32}P por random priming. La sonda de β Actina se empleó como control positivo.

9. OBTENCION DE cDNA Y AMPLIFICACION POR PCR.

Para el análisis de la expresión de transcritos para citoquinas se empleó la técnica de MAPPING (Clontech Lab., Inc Palo Alto ,CA) amplificando por PCR el cDNA obtenido por transcripción inversa del RNA total procedente de diferentes poblaciones celulares (Saiki y cols., 1988). En resumen, para obtener el RNA, $0.2-1 \times 10^6$ células adherentes y 10^7 células hematopoyéticas se lavaron en frío con PBS lisándose posteriormente mediante incubacion de 1min. a 4°C con 250ul de tampon de lisis (0.14M ClNa. 1.6mM MgCl $_2$, 10mM TrisClH pH 8.6, 0.5% WP-40). Posteriormente se centrifugaron durante 2 min a 10.000 rpm y al sobrenadante (SN) se le añadió 250 μl de tampón 2x para proteinasa K (PK) (0.2M TrisClH, 25mM EDTA, 0.3M NaCl, 2% SDS) más 10 μl de PK (20mg/ml) (Boehringer Mannheim, Alemania), incubándose durante 30 min. a 37°C . Después de extraer con fenol/cloroformo, precipitar en etanol y resuspender en Tris-EDTA, el RNA se trató con DNasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Alemania). El cDNA obtenido de 2 μg de RNA por transcripción inversa con AMV, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Alemania) se amplificó por PCR empleando la Taq-polimerasa (Perkin Elmer Cetus Inc., Norwalk CT, USA) y oligonucleotidos de

IL-1 β (811), IL-2 (460), IL-3 (450), IL-4 (460), IL-6 (636), IL-7 (707), TNF α (691), y β -Actina (1000) específicos de los extremos 5' y 3' de la región codificante (entre paréntesis se indica la longitud del fragmento amplificado). Un ciclo de amplificación consistió en 1 min a 94°C, 2 min a 55°C, y 3 min a 72°C. Después de 60 ciclos las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1,5% junto con el marcador de tamaño, 1Kb ladder (BRL, Bethesda, MR)

10. HIBRIDACION IN SITU.

Sobre portas polilisinados (Poly-L-lysine > 300.000MW a 0.5mg/ml, Sigama, USA) se depositaron 10⁴ células en 10 μ l durante 30 min a 4°C en cámara húmeda. Después de fijar en paraformaldehído al 4% en PBS y deshidratar en concentraciones crecientes de etanol, las muestras se parafinaron, (parafina de punto de fusión 56°C, Monoject, St Louis, U.S.A.) para su posterior almacenamiento. Una vez desparafinadas y rehidratadas, se desproteinizaron mediante tratamiento con CIH 0.2M durante 30 min seguido de una incubación en 2x SSC a 50°C durante 1h y posteriormente con proteinasa K (Boehringer Mannheim, Alemania) a una concentración de 50 μ g/ml durante 5 min en PBT (PBS Tween 0.1%) parando la reacción con glicina a 2 mg/ml en PBT. Posteriormente las células se refijaron en paraformaldehído neutralizándose las cargas de la poli-L-lisina con trietanolamina 0.1M mas ácido acético al 0.25%

Para la hibridación se emplearon sondas de cDNA marcadas por random priming con la base modificada digoxigenina-11-dUTP (Boehringer Mannheim, FRG) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y siguiendo los protocolos descritos por Samoszuk y

Nansen, 1990 y Tautz y Pfeiflec, 1989 con modificaciones. Las sondas empleadas son específicas para CD3- ϵ (Gold y cols, 1986), CD3- δ (van den Elsen, 1984), CD3- γ (Krissansen y cols, 1986) CD3- ζ (Weissman y cols, 1988), IL-2R α (fragmento HindIII de 1.35Kb derivado de pKCR Tac2A, Nikaido y cols, 1984) y IL-2R β (fragmento XbaI-XhoI de 2.3Kb, derivado de pIL-2Rb30, Hatekeyama y cols., 1989). La eficiencia de marcaje de la sonda se monitorizó por diluciones seriadas en dot blot descartándose aquellas en las que el nivel de detección no llegaba a 1 pg/ μ l. La prehibridación se realizó durante 1h a 42°C en 50% de formamida, 5x SSC, 50 μ g/ml de heparina, 0.1% Tween 20 y 100 μ g/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. La hibridación se llevó a cabo a 42°C durante la noche empleando 80 ng de sonda marcada en 100ul de tampón de hibridación.

Para la detección inmunológica se incubaron las células 2h con una dilución 1/1000 de Ab anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y preabsorbido durante 1h con células frescas. Después de lavar en PBT, la reacción coloreada del sustrato de la enzima se desarrolló durante 6 h. en solución de NTB (nitrobluetetrazolium) y X-fosfato en 100mM ClH, 50mM MgCl₂, 100mM Tris pH9.5, 1mM levamisol y 0.1% tween 20. La reacción de color se paró sumergiendo los portas en Tris-EDTA y deshidratando posteriormente antes de montar en solución DPX.

11. ENSAYOS DE UNION DE ¹²⁵I-IL-2

Alicuotas de células recién obtenidas de hígado fetal de 10 semanas, 2×10^7 , se lavaron 5 veces durante 3 min a 4°C con tampon glicina, 0.15M NaCl, 0.1M glicina, pH4. Posteriormente, 10^6

células se incubaron con diluciones seriadas (1pM-25nM concentración final) de IL-2 marcada con ^{125}I (^{125}I -IL-2) (Amersham Corp., Amersham, UK) durante 1h a 4°C (Robb y cols, 1984). La ^{125}I -IL-2 específicamente unida y la libre se determinaron en un contador de centelleo. Los valores calculados para la constante de disociación (K_d) y el número de sitios de unión por célula se calcularon por análisis computadorizado de Scatchard para la unión en el equilibrio, (Munson y cols, 1980). Los datos se corrigieron para la unión no específica de IL-2, determinada en presencia de un exceso 250 molar de rIL-2 no marcada (Hoffman-La Roche), y para la pérdida de actividad de ligando ocurrida durante el ensayo de unión de IL-2.

4. RESULTADOS

1. CARACTERIZACION DE LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE LA SERIE LINFOIDE T EN ESTADIOS TEMPRANOS DE LA EMBRIOGENESIS.

La creciente disponibilidad de mAbs específicos de moléculas expresadas selectivamente en diferentes linajes celulares, junto con el desarrollo de las técnicas de citometría de flujo, han supuesto un importante avance en la identificación de los precursores de la serie linfoide T. El empleo de esta tecnología ha conducido durante los últimos años a la caracterización de distintas subpoblaciones celulares en el timo humano, que se correlacionan, conforme a criterios fenotípicos y funcionales, con estadios madurativos secuenciales (Lobach y cols., 1985; Toribio y cols., 1988a; Strominger, 1989). Estos estudios, en asociación con análisis genéticos dirigidos al entendimiento de los mecanismos que regulan la expresión de los genes que codifican para el TCR (Toribio y cols., 1988b), así como para diferentes linfoquinas y sus receptores (Martinez-A, 1990), han permitido vislumbrar la secuencia de acontecimientos madurativos que se suceden en el timo durante el proceso de diferenciación de los linfocitos T humanos.

Por el contrario, existe un menor conocimiento de los procesos madurativos que acontecen en estadios ontogénicos tempranos, previa migración de los precursores linfoides T al timo. Aunque la causa de este desfase radica, parcialmente, en la dificultad en la obtención de muestras fetales humanas en etapas tempranas de la embriogénesis, la carencia de sistemas experimentales capaces de demostrar una secuencia directa precursor-progenie en el proceso de diferenciación de las células T

constituye el mayor problema en el abordaje de tales estudios en el hombre. Por tanto, el estudio de los posibles mecanismos implicados en la diferenciación de las células hematopoyéticas pluripotenciales a células progenitoras comprometidas al linaje T, previa migración al rudimento tímico, constituye un aspecto capital del problema que nos ocupa, sometido a gran controversia en la actualidad.

El abordaje de tales aspectos subyacentes al proceso de maduración de los precursores linfoides T en estadios ontogénicos tempranos en el hombre constituye el objetivo central de nuestro estudio.

1.1. ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS T DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.

El hígado constituye el principal órgano hematopoyético desde la semana 6 a la 22 del desarrollo fetal humano, teniendo lugar en el mismo tanto procesos de eritropoyesis, como de mielopoyesis y linfopoyesis (Kamps y cols, 1989). La disponibilidad de mAbs restringidos y asociados a linaje ha permitido caracterizar las células hematopoyéticas presentes en este órgano en diferentes etapas del desarrollo.

Por centrifugación en Ficoll-Hypaque se seleccionó la fracción de células mononucleares, que constituyen entre el 10-20% del número total de células del hígado. La expresión de marcadores de membrana en esta población se realizó por citometría de flujo utilizando un amplio panel de mAbs (Tabla 1). Los resultados obtenidos mostraron que el porcentaje de células que expresan el Ag común leucocitario, CD45, marcador de células

de origen hematopoyético, excepto eritrocitos y sus progenitores (Clark y cols., 1989; Haynes y cols., 1990), va aumentando con el tiempo de gestación (Tabla 2). Prácticamente en ninguna de las nueve muestras analizadas entre 8-10 semanas se detectaron células positivas para CD45 en membrana. Dicha población constituye un 14% a las 13 semanas de gestación, mientras que a las 20 semanas, un 60% de las células mononucleares (entre un 6-12% del total de células hepáticas) son de origen leucocitario.

El antígeno CD7, uno de los primeros marcadores expresado durante el desarrollo de los linfocitos T (Haynes, 1981; Haynes y cols., 1989), está presente en un 8% de la fracción mononuclear en el hígado de 13 semanas de gestación, lo que representa aproximadamente el 40-50% de las células CD45+, no detectándose su expresión en la membrana en muestras de hígado fetal entre las 8-10 semanas de gestación. Resultados de otros autores obtenidos por determinaciones inmunohistoquímicas, (Kamps y cols, 1989), muestran que el porcentaje de células CD7+ no aumenta de forma paralela a la expresión de CD45 con la edad, lo cual hace suponer que la proliferación de las células T es muy limitada en este órgano. Por el contrario, según estos mismos autores y de acuerdo con nuestros datos (no mostrados), las células IgM+ van incrementándose progresivamente hasta aproximadamente las 25 semanas, cuando el hígado deja de ser el órgano hematopoyético principal.

El resto de los Ags analizados asociados al linaje T, (CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, y CD8) va aumentando progresivamente en el hígado con la edad de gestación (Tabla 2), de manera que a las 20 semanas, el porcentaje de células T maduras que expresan el receptor para el antígeno asociado a CD3 (complejo CD3-TCR)

constituye un 8%. Hay que resaltar que la adquisición en la membrana de los marcadores CD2 y CD3 es anterior a la expresión de CD4 y CD8, siguiendo, en líneas generales, la ruta de diferenciación establecida para precursores intratímicos en cuanto a adquisición secuencial de dichos marcadores asociados al linaje T. De hecho, a las 20 semanas, el timo presenta un perfil fenotípico similar al neonatal, predominando las células maduras α/β (56%) sobre las γ/δ (2%). El porcentaje de precursores T a esta edad es minoritario, considerando que la mayoría de las células expresan marcadores de células T maduras como CD3, CD4 y CD8 (Tabla 2). La aparición de células T maduras en el timo se correlaciona con un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ en los tejidos periféricos tales como ganglios linfáticos, sangre y bazo, detectándose en este último hasta un 30% de células TCR α/β ⁺ a las 20 semanas de gestación (Tabla 2). Es notable resaltar el alto porcentaje de células en este órgano que expresan el Ag CD7 (83%).

En cuanto al porcentaje de células B detectado por la expresión del Ag CD20 y de IgM en la superficie es respectivamente del 4 y 20% en el hígado a las 20 semanas de la embriogénesis, mientras que los niveles de ambos marcadores en bazo se mantienen en un 13%.

En conjunto, nuestros datos fenotípicos de expresión en membrana demuestran que el Ag CD7 es la molécula adscrita al linaje T expresada más tempranamente en la ontogenia. Asimismo, previos estudios realizados por otros autores mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas han demostrado la presencia de precursores CD7⁺ dispersos por el hígado fetal y el mesénquima peritímico ya a la semana 7-8.5 de la embriogénesis, siendo detectables a partir de este momento en el primordio tímico

(Haynes y cols., 1988a). La caracterización de tales precursores intratímicos se ha visto, sin embargo, dificultada por el reducido tamaño del timo y la escasa proporción de los componentes hematopoyéticos en el mismo a estas tempranas edades gestacionales.

No obstante, estudios realizados en nuestro laboratorio han conducido a la identificación y aislamiento de una pequeña subpoblación celular en el timo neonato (menos del 0.5% de la población tímica total), equivalente por criterios fenotípicos a la población de precursores intratímicos más tempranos. Estas células, denominadas células pro-T, constituyen menos del 0.5% de la población total en el timo postnatal y se caracterizan por una morfología blástica y la ausencia de marcadores expresados en las células T maduras (CD1⁻2⁻3⁻4⁻8⁻). El análisis fenotípico de las células pro-T, que se resume en la Tabla 2 y en la Fig.1, mostró la expresión mayoritaria (>95%) del antígeno común leucocitario CD45, indicando su origen hematopoyético. Además, el compromiso al linaje linfoide T de las células pro-T se puso de manifiesto por la expresión del Ag CD7 en más del 85% de la población en estudio (Fig. 1), así como por la baja expresión (<5%) o ausencia de estructuras de superficie adscritas a otros linajes hematopoyéticos (CD13⁻, CD14⁻, CD16⁻, CD19⁻, CD20⁻, PTL-1⁻) (datos no mostrados). Al igual que los precursores intratímicos fetales identificados en el ratón, las células pro-T humanas expresan bajos niveles del antígeno CD5. Por el contrario, se observaron elevados niveles de expresión de Ags MHC de clase I (>95%) y clase II (hasta un 40%), así como de moléculas asociadas a procesos de activación celular tales como 4F2, CD38 y CD71

(receptor de transferrina, TfR ó T9); siendo indetectable (<5%) la cadena α (Tac) del IL-2R (Fig.1).

El perfil fenotípico obtenido sugiere que las células pro-T constituyen el equivalente en el timo postnatal de los inmigrantes más tempranos en el timo embrionario, siendo posible, por tanto, establecer el correspondiente paralelismo a nivel funcional entre ambas poblaciones.

Tabla 2. Expresión de marcadores asociados a linaje T en tejidos fetales humanos y células pro-T de timo neonatal.

Antígenos	Hígado ^a			Timo	Bazo	Pro-T ^b
	8-10 sem	13 sem	20 sem	20 sem	20 sem	
CD45	<0.1	14	62	95	97	90
CD7	<0.1	8	ND ^c	87	83	80
CD1a	<0.1	<0.1	9	88	5	<1
CD2	<0.1	3	14	98	37	<1
CD3	<0.1	2	8	63	34	<1
CD4	<0.1	<0.1	13	70	26	<1
CD5	<0.1	<0.1	3.6	ND	19	12
CD8	<0.1	<0.1	9	76	17	<1
TCR $\alpha\beta$	<0.1	<0.1	2	56	30	<1
TCR $\gamma\delta$	<0.1	<0.1	<0.5	2	0.8	<1

Porcentaje de células positivas para la expresión de antígenos de membrana analizadas por citometría de flujo (Epics-Profile II). Los resultados son representativos de al menos tres experimentos.

^a Células obtenidas por centrifugación en Ficoll-Hypaque a diferentes semanas de desarrollo embrionario. ^b Células obtenidas por inmunoselección con anticuerpos específicos más complemento y posterior purificación con esferas magnéticas (ver materiales y métodos). ^c ND - No determinado.

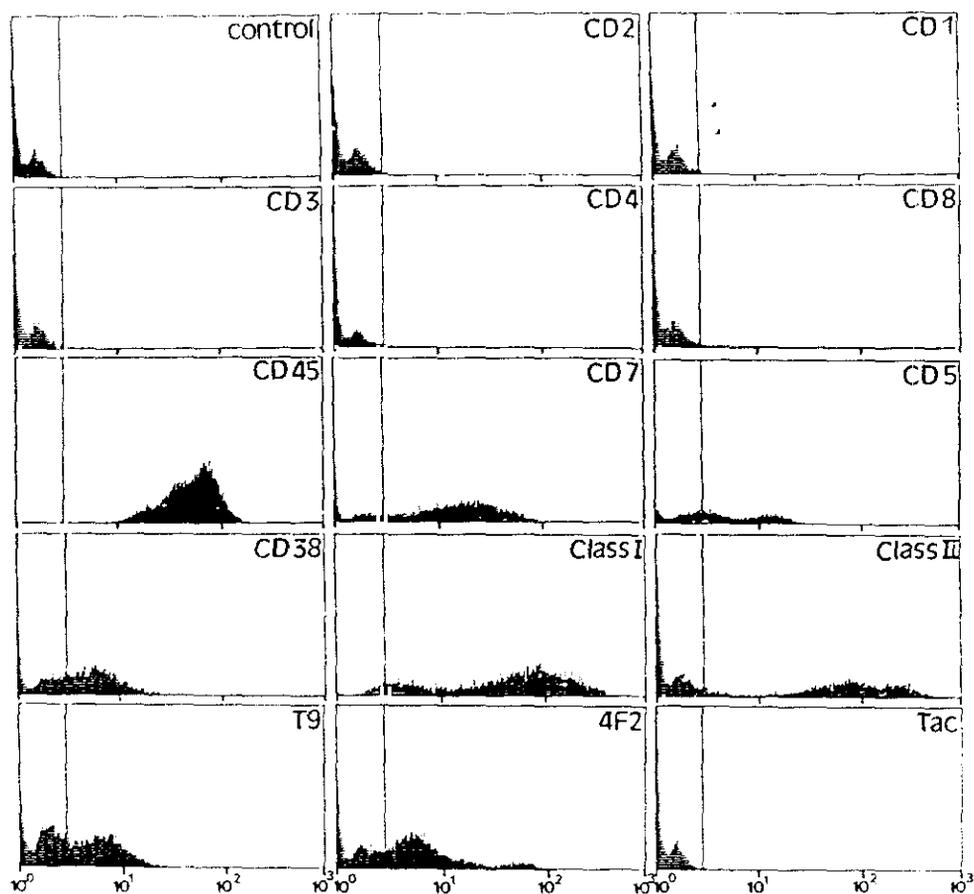


Fig. 1. Análisis fenotípico de las células pro-T de timo neonato. Las células pro-T se seleccionaron mediante incubación con Abs específicos más complemento y posterior purificación con esferas magnéticas como se indica en materiales y métodos. Las células se incubaron con los mAbs indicados seguido de un Ab cabra anti-ratón conjugado con FITC, fracción F(ab)².

La inmunofluorescencia de 2×10^4 células se cuantificó por citometría de flujo en un citómetro EPICS-ProfileII. Como control se empleó un mAb irrelevante.

1.2. CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS LOCALIZADOS EN EL HIGADO FETAL

Los estudios mencionados anteriormente realizados por el grupo de Haynes utilizando técnicas inmunohistoquímicas revelaron que la ventana temporal de colonización tímica en humanos se localiza entre las semanas 8 y 10 del desarrollo fetal (Haynes y cols., 1988a). Por tanto, los eventos madurativos tempranos que preceden a la migración hacia el timo y que determinan la diferenciación de los precursores hematopoyéticos pluripotenciales a células precursoras destinadas al linaje T, han de tener lugar obligatoriamente en dicho periodo de gestación.

Con el fin de analizar tales eventos, centramos nuestro estudio en la caracterización de los precursores hematopoyéticos presentes en el hígado fetal humano entre las semanas 8 y 10 del desarrollo embrionario. En las muestras analizadas no se observó la expresión de Ags asociados a los linajes linfoides T (Tabla 2), B (<1% CD20, CD19), NK (<1% CD16, CD11b, CD57) o al linaje mieloide (<1% CD13, CD14). Igualmente fue indetectable la expresión de Ags MHC de clase I o clase II, así como de los Ags CD34 o CD38 expresados por los precursores hematopoyéticos presentes en la médula osea del adulto (Berenson y cols., 1988; Verfaillie y cols., 1990). Estos datos sugieren la inclusión de las células analizadas en el compartimento de precursores hematopoyéticos no determinados a linaje, bien pluripotenciales (células stem) o en un estadio intermedio entre la célula stem y las células que han adquirido un compromiso de linaje. La diferencia entre ambas

subpoblaciones a nivel de expresión de marcadores en membrana es, por el momento, una cuestión no determinada (Spangrude, 1989)

1.2.1. Expresión de antígenos asociados a procesos de activación-proliferación.

La actividad proliferativa de los precursores hematopoyéticos constituye una característica regulada ontogénicamente. De hecho, en los ensayos de formación de colonias clonogénicas en bazo, estas colonias pluripotenciales tienen una gran capacidad proliferativa, que pierden a medida que la célula va determinando su linaje (Dexter y cols, 1987). Estudios citofluorométricos utilizando ioduro de propidio como indicador del ciclo celular, demostraron que más del 50% de las células de hígado fetal entre 8-10 semanas de gestación estaban en fase S ó G₂+M (Fig.2A). La actividad proliferativa de esta población se correlaciona con la expresión de elevados niveles de Ags asociados a procesos de activación celular, tales como 4F2 y el receptor de transferrina (TfR, CD71) (Haynes y cols, 1981b)(Fig.3). La expresión de ambos marcadores puede observarse asimismo en los precursores intratímicos más tempranos (CD45⁺7⁺1⁻2⁻3⁻4⁻8⁻, células pro-T) (Toribio y cols., 1988a) (Fig.3), que incluyen una considerable proporción (35%) de células en división (Fig.2B), así como en precursores hematopoyéticos obtenidos de médula osea, (CD45⁺7⁻2⁻3⁻4⁻8⁻) (Fig.3). En las tres poblaciones precursoras analizadas la expresión de dichos marcadores es considerablemente mayor que en células maduras periféricas o en la población intratímica total (Fig.3), alcanzando ambos marcadores niveles máximos de expresión en las células procedentes del hígado fetal.

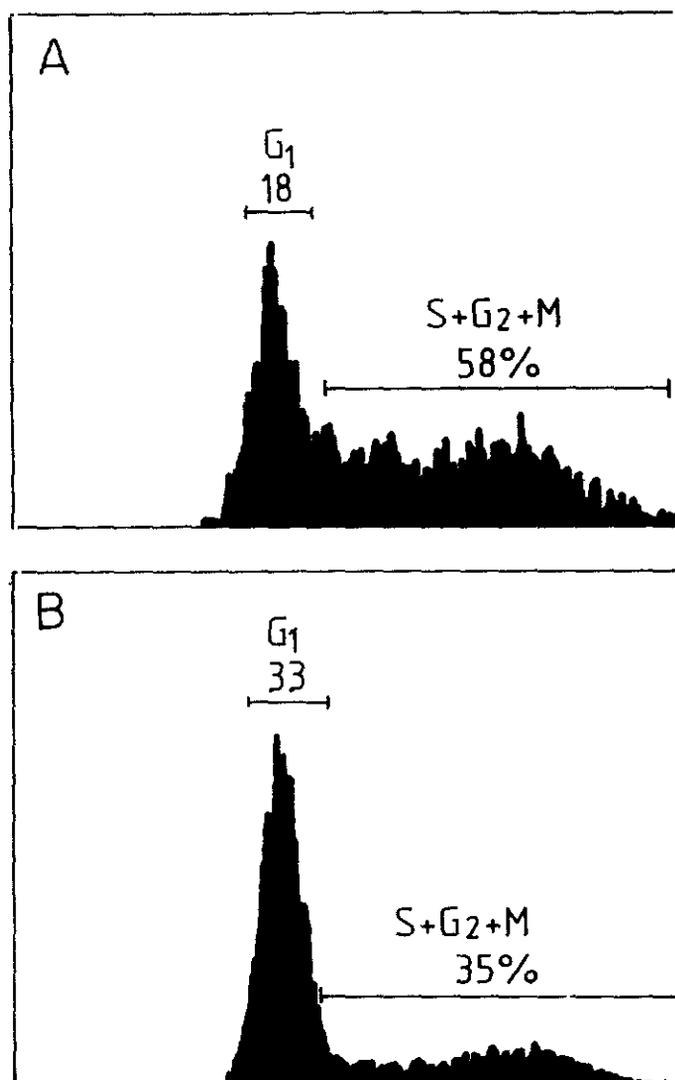


Fig.2. Análisis del ciclo celular en precursores hematopoyéticos.

El contenido en DNA de la fracción mononuclear de células de hígado fetal de 10 semanas de gestación (A) y células pro-T de timo neonato (B), fue determinado por marcaje con yoduro de propidio. 10^4 células fueron analizadas por citometría de flujo en un Epics Profile II. Los datos reflejan el porcentaje de células en las fases del ciclo celular indicadas.

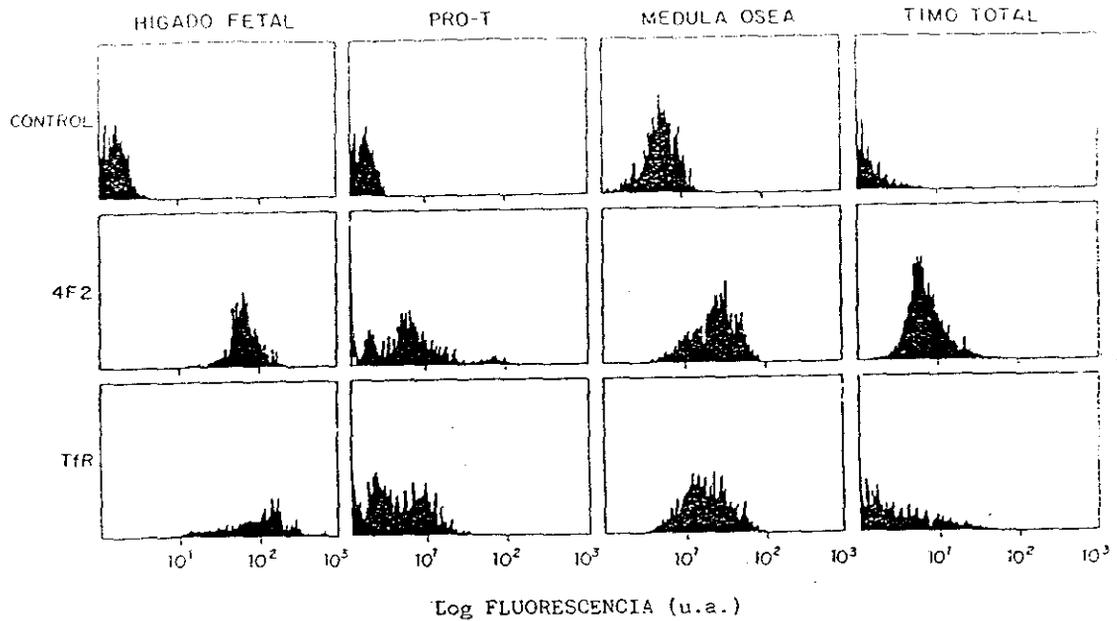


Fig.3 Expresión de antígenos de activación en precursores hematopoyéticos. La expresión de 4F2 y receptores de transferrina (TfR) fué analizada en las siguientes poblaciones celulares: precursores hematopoyéticos de hígado fetal ($CD45^-CD7^-2^-3^-4^-8^-$); células pro-T de timo neonato, ($CD45^+CD7^+2^-3^-4^-8^-$); precursores de médula ósea ($CD45^+CD7^-2^-3^-4^-8^-$) y población total de timo neonato. Las células se incubaron con el mAb indicado, seguido de un mAb cabra anti-ratón conjugado con FITC, fracción F(ab) $'_2$. La inmunofluorescencia de 10^4 células se cuantificó por citometría de flujo. Como control se empleó un mAb irrelevante más un mAb cabra anti-ratón conjugado con FITC, fracción F(ab) $'_2$.

1.2.2. Expresión de moléculas de adhesión en precursores hematopoyéticos.

En los últimos años se han realizado importantes avances en la determinación de las bases moleculares de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular que acontecen en los procesos de migración y funciones efectoras del S.I.. Un amplio número de potenciales moléculas de adhesión ha sido identificado en los componentes celulares del principal órgano hematopoyético en el individuo adulto, la médula osea, donde ambos tipos de interacciones son probablemente esenciales en procesos de expansión, movimiento y maduración de los precursores de células sanguíneas (Campbell y cols., 1987; Thomas y cols., 1988; Gimble y cols., 1989; Hemler, 1990). Diversas moléculas de la superfamilia de las integrinas se han implicado en procesos de desarrollo, hemostasis y respuesta inmune. Aunque la posible implicación de tales moléculas en la linfohematopoyesis no ha sido demostrada de manera directa, diferentes estudios han puesto de manifiesto la expresión de receptores de fibronectina en precursores eritroides y linfoides (Patel y cols., 1985; Savagner y cols., 1986; Bernardi y cols., 1987; Cardelli y cols., 1988). Estos resultados sugieren que las interacciones entre diferentes moléculas de adhesión y sus ligandos contribuyen al reconocimiento mutuo de los precursores hematopoyéticos y los componentes estromales de su microambiente implicados en los procesos de crecimiento y diferenciación (Miyake y cols., 1990).

Considerando estos datos, nos propusimos analizar la expresión de diferentes moléculas de adhesión en los precursores hematopoyéticos presentes en el hígado fetal humano en estadios

tempranos de la ontogenia. El empleo de mAbs específicos y de técnicas de citometría de flujo reveló la expresión de la molécula LFA-3 en la totalidad de la población de hígado fetal (Fig.4). Por el contrario, estructuras tales como el dímero LFA-1, cuya expresión es mayoritaria en precursores T intratímicos (células pro-T), así como en la población total del timo neonato, fueron indetectables en el hígado fetal (Fig.4). Por el contrario, tanto células pro-T como timocitos maduros expresan bajos niveles del antígeno LFA-3, lo cual sugiere una expresión selectiva de ambas moléculas, LFA-3 y LFA-1 en precursores hematopoyéticos tempranos o en progenitores linfoides determinados al linaje T, respectivamente.

Respecto a la expresión de otras moléculas de adhesión, la integrina VLA-4, una de las moléculas más ampliamente distribuidas en células hematopoyéticas, presenta una distribución generalizada entre los precursores hematopoyéticos tanto de hígado fetal (CD45⁻7⁻2⁻3⁻4⁻8⁻), como de médula osea (CD45⁺7⁻2⁻3⁻4⁻8⁻) y timo (CD45⁺7⁺2⁻3⁻4⁻8⁻) (Fig.5). Es significativa la diferencia en cuanto a niveles de densidad de expresión que cada una de estas subpoblaciones presenta. Así, en el hígado fetal más del 98% de las células son positivas con una intensidad de fluorescencia media entre los valores 10^2 - 10^3 ; mientras que la expresión en los precursores de médula osea y timo neonato (células pro-T) es significativamente menor, observándose la media de intensidad de fluorescencia entre los valores 10^1 - 10^2 . En células totales de timo la expresión de VLA-4 no supera el canal 10^1 (Fig.5). El análisis del componente común de las moléculas VLA, la cadena β_1 , muestra en todos los casos un pico de intensidad de fluorescencia desplazado hacia la derecha respecto al componente α_4 , lo que hace suponer que en todas las poblaciones analizadas la

cadena α_4 está asociada al componente común de las moléculas VLA, cadena β_1 (Fig.5). Por otra parte la ausencia de expresión de la molécula VLA-1 (α_1) en todas las poblaciones analizadas sugiere la posible expresión de otros componentes de la subfamilia VLA de las integrinas, tales como VLA α_3 ó VLA α_5 como posibles candidato asociados al componente común β_1 .

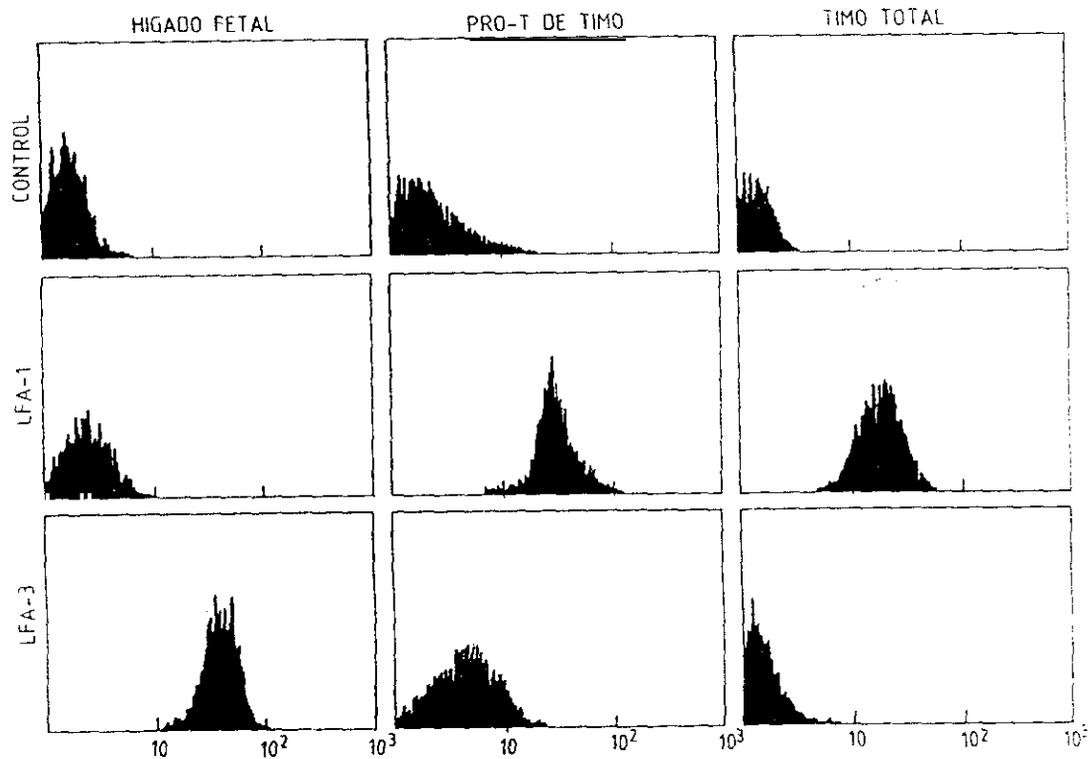


Fig.4. Expresión de las moléculas de adhesión LFA-1 y LFA-3 en precursores hematopoyéticos. La expresión de LFA-1 (CD18), mAb Ts1/18, y LFA-3 (CD58), mAb TS2/9, fué analizada por citometría de flujo en las poblaciones celulares indicadas, (ver leyenda Fig.3). El marcaje se realizó en dos pasos incubando sucesivamente con el mAb indicado y con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con FITC, fracción F(ab) $'_2$. El control se realizó con un mAb irrelevante.

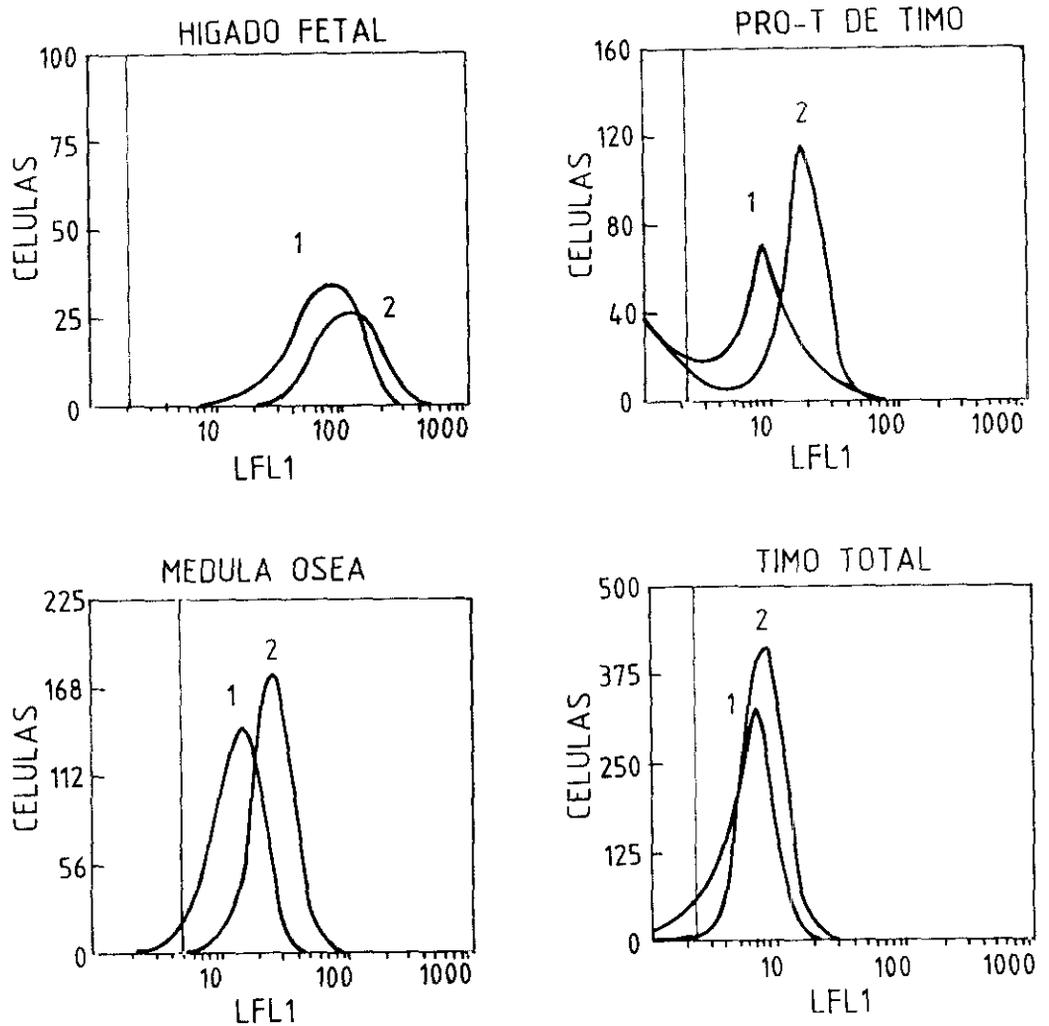
EXPRESION DE VLA β_1/α_4 

Fig.5. Expresión de la integrina VLA-4 en precursores hematopoyéticos. El análisis de la expresión en membrana de VLA α_4 (CDw49d), mAb HP2/1,(1) y VLA β_1 (CD29), mAb Ts2/16 (2) en las células indicadas (ver leyenda Fig.3) se realizó por inmunofluorescencia y citometría de flujo. Las células se incubaron sucesivamente con el mAb indicado y posteriormente con cabra anti-ratón FITC-IgG F(ab) $'_2$. La fluorescencia del control negativo con un mAb irrelevante se indica con el discriminador de la izquierda en cada caso.

1.3. REGULACION ONTOGENICA DE LA EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA EL COMPLEJO CD3-TCR.

El análisis de la expresión de moléculas de membrana nos ha permitido determinar ciertas características de activación y potenciales propiedades adhesivas de los precursores hematopoyéticos localizados en el hígado fetal en etapas tempranas de la ontogenia. Sin embargo, ninguno de los parámetros fenotípicos observados puede adscribirse selectivamente a precursores hematopoyéticos comprometidos a un linaje determinado. En el caso del linaje linfoide T, el proceso madurativo que acontece selectivamente en sus precursores y determina la diferenciación en células T maduras es el reagrupamiento de las regiones génicas que codifican para el receptor del antígeno, (complejo CD3-TCR). Este proceso acontece en momentos tempranos de la ontogenia de los linfocitos T, como describen trabajos en ratón donde a los 12 días del desarrollo embrionario se observa reordenamiento de los genes que codifican para la cadena γ del TCR en el hígado fetal, y a los 14 en el timo (Born y cols., 1986; Hoars y cols., 1986). En humanos, tales estudios se han restringido al compartimento de precursores T intratímicos más tempranos (células pro-T) (Furley y cols., 1986; Toribio y cols., 1988a; Toribio y cols., 1988c), por lo que la posible existencia de mecanismos que garanticen el compromiso de los precursores hematopoyéticos al linaje linfoide T, previamente a la migración al timo, no se ha clarificado por el momento. No obstante, estudios previos realizados por otros autores han demostrado la expresión intracitoplasmática de diferentes componentes del CD3 en una pequeña proporción (0.6-2%) de las células del hígado fetal entre

las semanas 7 y 10 del desarrollo embrionario (Campana y cols., 1989). Nosotros hemos pretendido abordar a nivel genético el estudio de la regulación ontogénica de la expresión de los genes que codifican para el complejo CD3-TCR. En los siguientes puntos se analizará de forma comparativa la expresión de RNA mensajero (mRNA) específico para dichos componentes, así como el reordenamiento de los genes que codifican para el TCR en el compartimento de precursores hematopoyéticos procedentes del hígado fetal y en precursores intratímicos.

1.3.1. La expresión de los genes que codifican para los componentes del complejo CD3 es un acontecimiento temprano en la ontogenia de los linfocitos T.

La detección de mRNA para las cadenas δ , ϵ , γ y ζ del complejo CD3 se realizó inicialmente mediante técnicas de hibridación a RNA utilizando sondas específicas (Northern). En ninguna de las 5 muestras de hígado fetal analizadas, obtenidas entre 8 y 13 semanas de gestación, pudieron detectarse niveles significativos de RNA específico para las cuatro cadenas del complejo CD3. Por el contrario, niveles de RNA específico de las moléculas CD3- γ , CD3- δ y CD3- ϵ similares a las observadas en células T maduras parecen expresarse en precursores intratímicos tempranos, existiendo una menor expresión de mensajero de la molécula CD3 ζ (datos no mostrados). Considerando la posible existencia de bajos niveles de expresión de dichos mensajeros, o su expresión selectiva en una pequeña fracción de la población hematopoyética presente en el hígado fetal, el estudio se completó utilizando técnicas cuantitativas (hibridación "in situ"), así como técnicas altamente

sensibles capaces de detectar y amplificar un número extremadamente bajo de RNAs específicos (PCR de cDNA).

La hibridación "in situ" se realizó en células de hígado fetal de 10 semanas obtenidas por centrifugación en Ficoll-Hypaque mediante el empleo de sondas cDNA marcadas con digoxigenina-11-dUTP, como se describe en materiales y métodos. Como control se emplearon tanto células B de sangre periférica obtenidas mediante selección negativa utilizando los mAbs anti-CD11b, -CD2, -CD3, y -CD16 más complemento y posterior selección negativa con esferas magnéticas, así como células tratadas con RNasa. Paralelamente se realizaron los mismos estudios en la población intratímica neonatal pro-T, que incluye los precursores intratímicos más tempranos, en los que previamente habíamos detectado expresión de mensajeros para las cuatro cadenas del complejo CD3 por técnicas de Northern. Los experimentos de hibridación se realizaron en paralelo para ambos tipos de células, de manera que en todos los casos el tiempo de reacción coloreada fue idéntico, disponiendo así de un control positivo interno en el experimento. El nivel detectado para los mensajeros en estudio es considerablemente mayor en células pro-T, sobre todo en el caso de CD3- ϵ y CD3- δ , (Fig. 6 y 7). La ventana de positividad, especialmente difícil de determinar en las células de hígado fetal, se cuantificó mediante análisis espectrofotométrico computadorizado en un microscopio confocal, de manera que las células que se indican con una flecha en la Fig. 6 se consideraron positivas. Sobre un conteo de 500 células por muestra, el 7 y 10 % de las células de hígado fetal se consideraron positivas respectivamente para CD3- ϵ y CD3- δ , mientras que en la población pro-T el porcentaje de células positivas fue >90%. La expresión de la cadena CD3- γ en hígado fue <5%, mientras que los

niveles alcanzados en timo fueron del 30%. La expresión de la cadena ζ es minoritaria, tanto en células de hígado fetal como en células pro-T, no superando el 1% en las células de hígado fetal y <5% en la población pro-T de timo neonato. Estos datos fueron corroborados posteriormente mediante el empleo combinado de la técnica de PCR, utilizando oligonucleotidos específicos para cada una de las cadenas del complejo CD3, e hibridación del DNA con sondas específicas (datos no mostrados). Los resultados obtenidos demuestran la existencia en el hígado fetal de un pequeño compartimento de precursores hematopoyéticos probablemente comprometidos al linaje linfoide T. Por tanto, se puede sugerir que los mecanismos que determinan el compromiso de los precursores hematopoyéticos al linaje linfoide T se inician en estadios ontogénicos muy tempranos y son independientes del microambiente tímico.

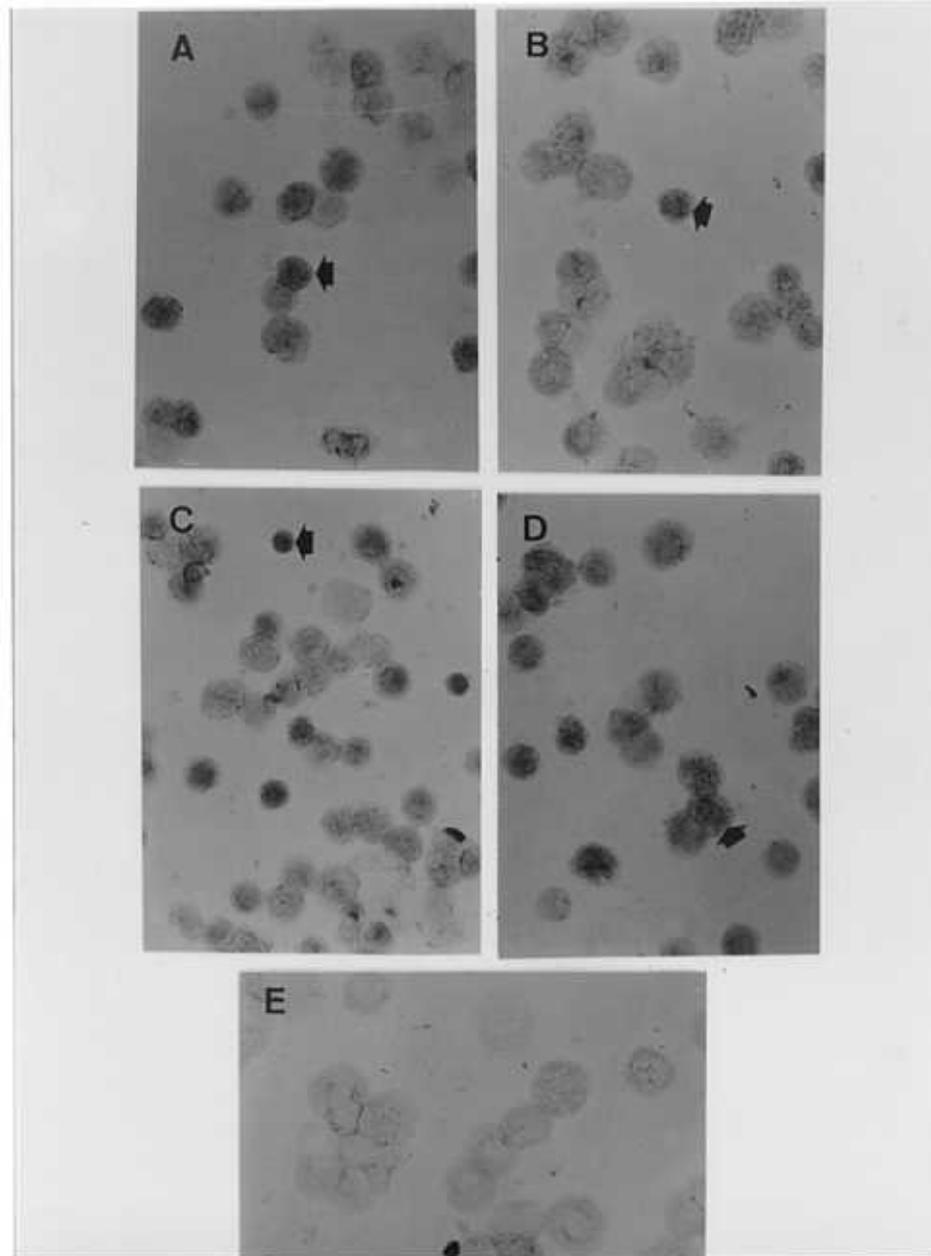


Fig.6 Detección de mRNA para los componentes del complejo CD3 por hibridación "in situ" en células de hígado fetal humano. Citopreparaciones de $5-10 \times 10^4$ células de hígado fetal de 10 semanas de gestación obtenidas por centrifugación en Ficoll-Hypaque, se hibridaron con sondas cDNA marcadas con digoxigenina-11-dUTP específicas para las moléculas CD3 ϵ (A), CD3 ζ (B), CD3 γ (C), CD3 δ (D). La reacción coloreada se desarrolló durante 6h., fotografiándose campos representativos. En el control negativo (E) la hibridación se realizó con la sonda CD3 δ utilizando células de sangre periférica en las que las poblaciones T y macrófagos se eliminaron por tratamiento con mAbs específicos más complemento. Las flechas indican células consideradas positivas sobre el propio fondo de la muestra. Aumento 600X

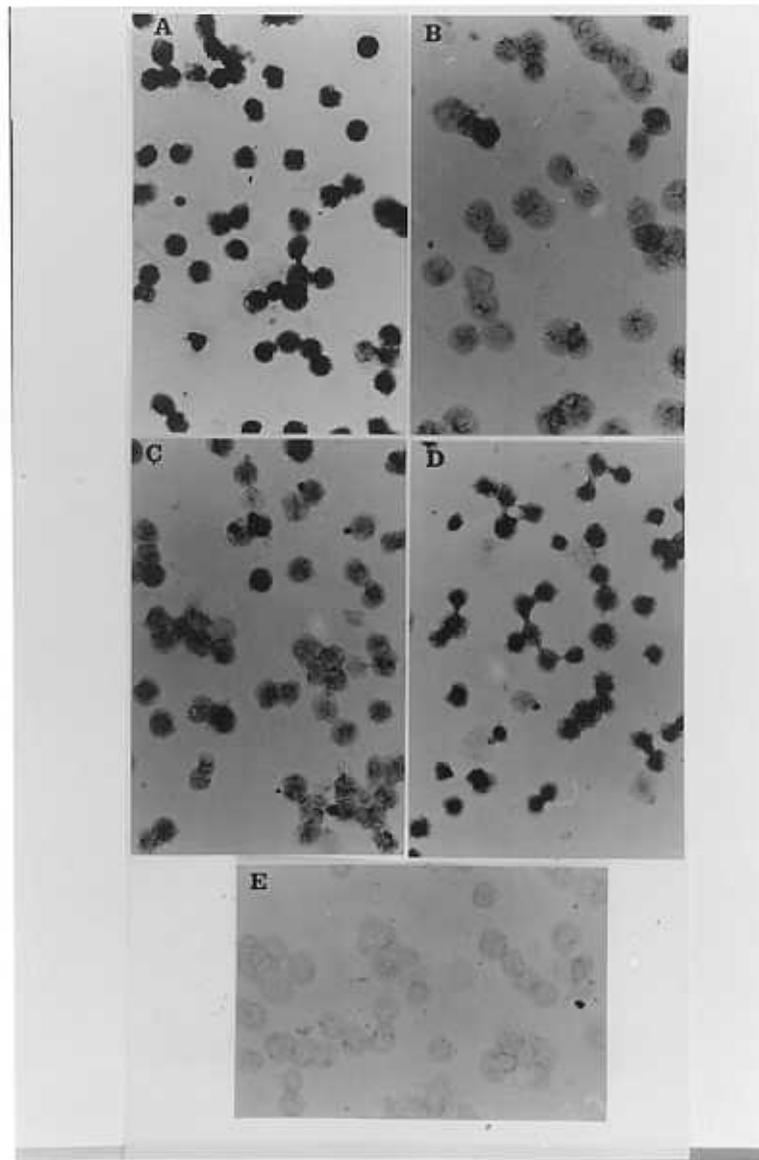


Fig.7 Detección de mRNA para los componentes del complejo CD3 por hibridación "in situ" en células pro-T $CD7^+2^-3^-4^-8^-$ de timo neonato. El ensayo de hibridación "in situ" se realizó en paralelo con las células de hígado fetal como se describe en la Fig.6 $CD3\epsilon$ (A), $CD3\zeta$ (B), $CD3\gamma$ (C), $CD3\delta$ (D) y control negativo (E). Aumento 500X

1.3.2. La expresión de los genes que codifican para el TCR acontece posteriormente a la migración al timo.

La observación de que los precursores hematopoyéticos de la serie linfoide T inician su programa madurativo en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario plantea dos posibilidades alternativas: el inicio de dicho programa garantiza la diferenciación terminal de los precursores T a células T maduras o, por el contrario, existen requerimientos adicionales que provee selectivamente el microambiente tímico. Considerando que la compleja serie de procesos genéticos que subyacen al proceso de diferenciación culminan con el reordenamiento y la expresión de los genes que codifican para el TCR, nuestro siguiente objetivo se centró en el análisis de la configuración de dichos genes en diferentes estadios ontogénicos. Con este fin, se aislaron células de hígado fetal de diferentes muestras obtenidas entre 10 y 20 semanas de gestación, así como timocitos y células esplénicas de 20 semanas. El reordenamiento de los genes que codifican para la cadena β de TCR se analizó por técnicas de Southern utilizando DNA procedente de las muestras en estudio digerido con la enzima EcoRI. La hibridación con la sonda Jur β_2 específica de la región C β_2 (Yoshikay y cols, 1984), mostró el patrón de línea geminal esperado (bandas de 4.2 y 12 Kb) en la línea linfoblastoidea B JY, así como en todas las poblaciones de hígado fetal analizadas (Fig.8A). Por el contrario en la línea linfoide T Jurkat se detectó el reordenamiento de un alelo C β_1 como una banda discreta de 9.1 Kb, permaneciendo

el otro alelo $C\beta_1$ en línea germinal. Asimismo, se detectaron múltiples reordenamientos en células T periféricas activadas con PHA y en las células procedentes del timo fetal de 20 semanas, observándose una marcada reducción en la intensidad de la banda de 12 Kb y la aparición de un continuo de nuevas bandas de menor tamaño. Este patrón no pudo detectarse en la muestra precedente del bazo fetal de 20 semanas, lo cual pudiera deberse al bajo porcentaje de células T presentes en el mismo (Fig.8A). Por tanto, podemos deducir de estos experimentos que la mayoría de los precursores hematopoyéticos presentes en el hígado fetal (sino todos) en diferentes estadios ontogénicos no han iniciado todavía el reordenamiento de los genes que codifican para la cadena β del TCR.

Análisis realizados en paralelo sobre DNA digerido con Hind III utilizando una sonda específica para la región $J\gamma_1$ del TCR (M13H60) (Lefranc y Rabbits, 1985), mostraron la aparición de dos bandas de 2.1 y 4.5 Kb, correspondientes al patrón de línea germinal, en las células B JY (Fig.8B). En las células T maduras activadas con PHA, así como en los timocitos y células de bazo de 20 semanas, la menor intensidad de ambas bandas de línea germinal y la aparición de nuevas bandas demostró la existencia de diversos reordenamientos que afectan a los dos segmentos $J\gamma_1$ y $J\gamma_2$. En el caso de las células Jurkat, ambos alelos $J\gamma_1$ aparecen reordenados, permaneciendo el gen $J\gamma_2$ en línea germinal. Sorprendentemente, sin embargo, en todas las muestras de hígado fetal analizadas, así como en el bazo de 20 semanas se observó la aparición de una única banda correspondiente probablemente a la región $V\gamma_9$ (Fig.8B). Estos datos sugieren la existencia de un único tipo de reordenamiento que afectaría a las regiones $V\gamma_9$ y $J\gamma_1$ o $J\gamma_2$ en la mayoría de las células hematopoyéticas presentes en el hígado fetal, independientemente

de la edad gestacional. La banda de 4.5 Kb presente en línea germinal corresponde a un polimorfismo de Hind III (LeFranc y cols., 1986), por ello no todas las muestra la presentan.

Posteriormente se analizó el estatus transcripcional de los genes que codifican para la cadenas γ y β del TCR en las muestras descritas. Para ello, estudiamos la expresión de mRNA específico para las cadenas γ y β del TCR en las poblaciones fetales de diferentes edades obtenidas de hígado, bazo y timo. El empleo de técnicas de hibridación (Northern) utilizando sondas específicas para la región constante C β , (Jur β 2) (Yoshikay y cols, 1984) del TCR indicó la ausencia de mRNA- β en las tres muestras de hígado fetal analizadas entre las semanas 8 y 10 de gestación (Fig.9). Por el contrario, se observaron altos niveles de ambos tipos de mensajeros, funcional (1.3Kb, regiones V-D-J-C) e inmaduro (1Kb, regiones D-J-C), descritos para el TCR β en células T periféricas de adulto empleadas como control, así como en timocitos fetales obtenidos a la semana 20 de la embriogénesis, donde se detectó expresión en la membrana del TCR α/β en un 56% de la población analizada. Asimismo, bajos niveles de ambos productos transcripcionales fueron detectables en células esplénicas a las 20 semanas de gestación, edad a la cual hasta un 30% de células maduras expresan en membrana el TCR α/β .

La posterior hibridación de la misma membrana de nylon con una sonda específica para la región C γ del TCR (Yoshikay y cols., 1987), reveló la expresión de niveles variables de mRNA funcional (1.7Kb) en las poblaciones fetales de timo y bazo y en células maduras periféricas, donde la expresión del complejo TCR γ/δ se cuantificó en un 0.8%, 3% y 2% de las células analizadas, respectivamente (Fig.9). Por el contrario, no se observaron niveles

detectables de mRNA funcional en ninguna de las poblaciones de hígado fetal analizadas. Estos resultados sugieren la ausencia en la mayoría (sino en todas) las células hematopoyéticas del hígado fetal analizadas de reordenamientos completos en el locus γ del TCR, pudiendo existir reordenamientos parciales V-J no detectados con la sonda C γ .

De los datos obtenidos podemos deducir, por tanto, que en momentos tempranos de la embriogénesis humana y coincidiendo con el periodo crítico de la colonización intratímica, el proceso de activación de los genes que codifican para el TCR no ha sido iniciado eficientemente en el hígado embrionario, no detectándose mensajeros funcionales específicos. La dificultad en la obtención de suficiente material tímico a esta temprana edad gestacional imposibilitó un estudio comparativo de los precursores hematopoyéticos que colonizan el timo en este periodo ontogénico. No obstante, como se ha descrito con anterioridad, el perfil fenotípico de estos precursores (Haynes y cols., 1988a) se correlaciona estrechamente con el observado en la población de células pro-T presentes en el timo neonato (CD45⁺7⁺2⁻3⁻4⁻8⁻). Considerando este paralelismo, analizamos el reordenamiento y la expresión de los genes que codifican para el TCR en la población intratímica de células pro-T. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de múltiples reordenamientos que afectan a ambas regiones J, J γ 1 y J γ 2, en las células pro-T (Fig.10A). Por el contrario, la mayoría de la población presenta el patrón de línea germinal descrito para el gen TCR β (Fig.10B). De acuerdo con estos resultados, se observaron elevados niveles de mRNA funcional (1.7 Kb) para la cadena γ del TCR en las células pro-T, detectándose

unicamente mensajeros incompletos (1.0 Kb) específicos de la cadena β (Fig.9).

En conjunto, nuestros datos sugieren el requerimiento selectivo del microambiente tímico en la inducción del programa genético que conlleva la activación y expresión de los genes que codifican para el TCR.

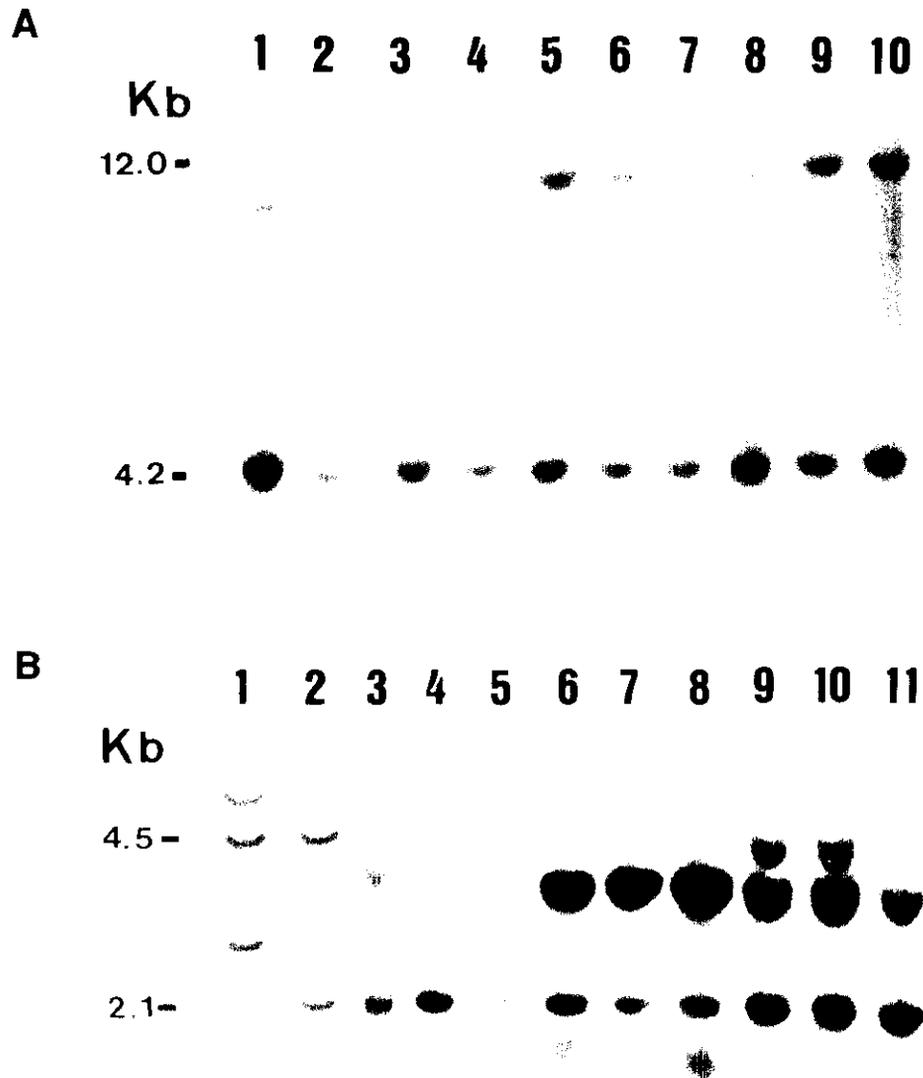


Fig.8. Reordenamiento de los genes que codifican para las cadenas β y γ del TCR en tejidos fetales humanos. El DNA obtenido de diferentes muestras celulares fue digerido con las endonucleasas EcoRI (A) o Hind III (B) y transferido a membranas de nylon para su posterior hibridación con las sondas C β 2 (Jur β 2) y J γ 1 (M13H60) respectivamente marcadas con 32 P. (1) línea T Jurkat, (2) línea linfoblastoidea B JY, (3) células T periféricas activadas con PHA, (4) timo fetal de 20 semanas de gestación, (5) hígado fetal de 20 semanas, (6-8) hígado fetal entre 8-10 semanas, (9) hígado fetal de 20 semanas, (10) bazo fetal de 20 semanas, (11) hígado fetal de 10 semanas.

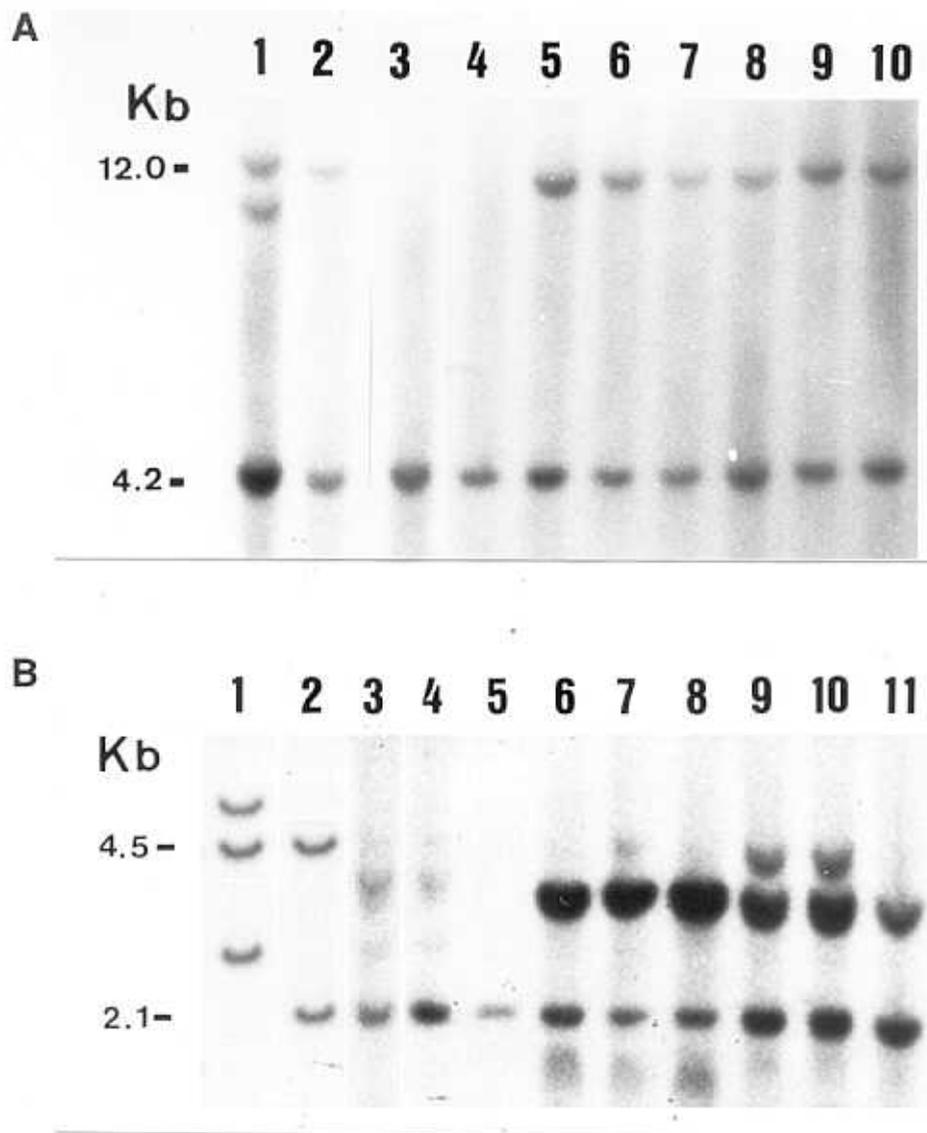


Fig.8. Reordenamiento de los genes que codifican para las cadenas β y γ del TCR en tejidos fetales humanos. El DNA obtenido de diferentes muestras celulares fue digerido con las endonucleasas EcoRI (A) o Hind III (B) y transferido a membranas de nylon para su posterior hibridación con las sondas C β 2 (Jur β 2) y J γ 1 (M13H60) respectivamente marcadas con 32 P. (1) línea T Jurkat, (2) línea linfoblastoidea B JY, (3) células T periféricas activadas con PHA, (4) timo fetal de 20 semanas de gestación, (5) hígado fetal de 20 semanas, (6-8) hígado fetal entre 8-10 semanas, (9) hígado fetal de 20 semanas, (10) bazo fetal de 20 semanas, (11) hígado fetal de 10 semanas.

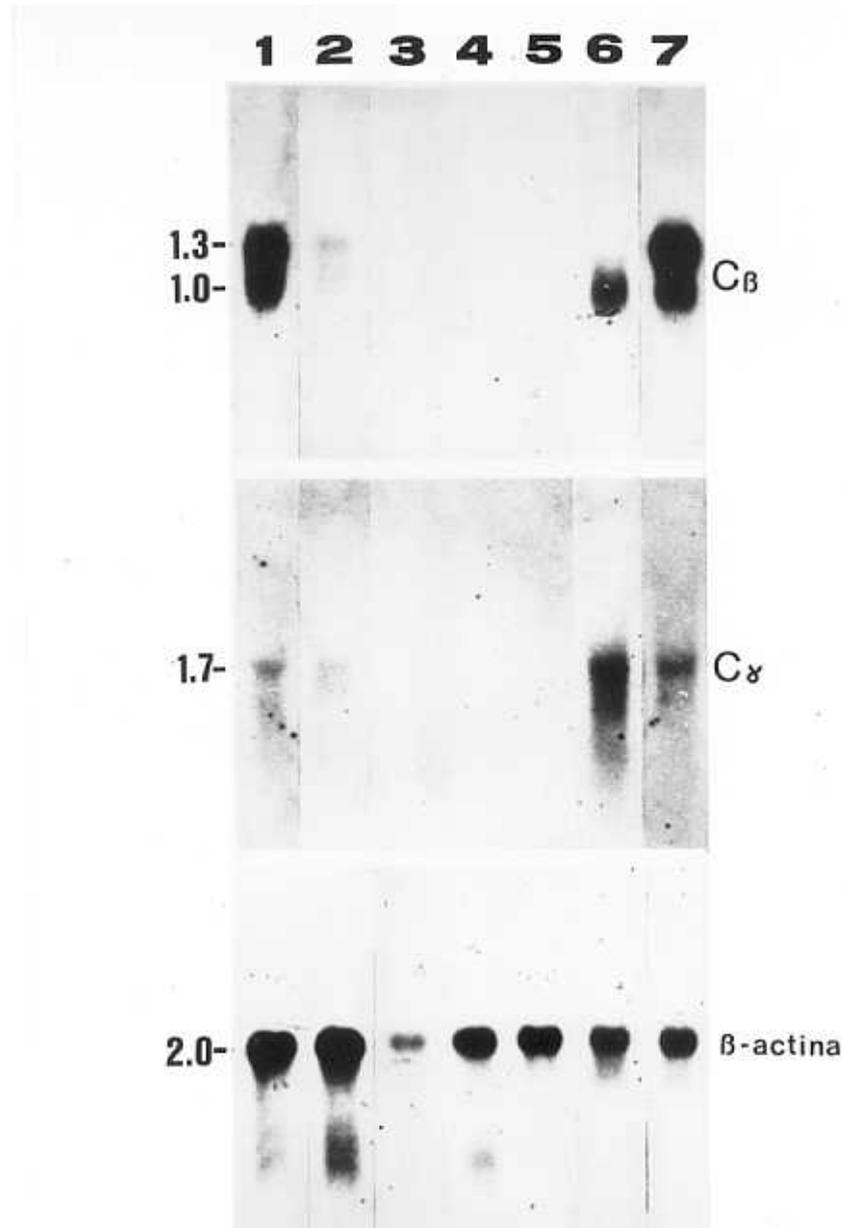


Fig. 9 Análisis de la expresión de los genes que codifican para el TCR β y TCR γ en tejidos linfoides fetales. El RNA fué obtenido de las siguientes fuentes: Timo (1) y bazo (2) de fetos de 20 semanas de gestación; hígado fetal de 8-10 semanas (3-5), células pro-T de timo neonato (6) y células T de periferia activadas con PHA (7). 12 μ g de cada muestra fueron transferidos en membranas de nylon. El mismo blot se hibridó como se describe en materiales y métodos con sondas específicas para el TCR β (C β) y TCR γ (C γ) marcadas con 32 P o con una sonda específica de β -actina utilizada como control.

2. MEDIADORES SOLUBLES IMPLICADOS EN LA ONTOGENIA DE LOS LINFOCITOS T.

Un aspecto central en la ontogenia de los linfocitos T es la identificación de las señales celulares, así como de los mediadores solubles que participan en los procesos de proliferación y diferenciación de las células progenitoras. Tales procesos se ven sometidos a estrictos mecanismos de regulación durante el desarrollo embrionario. Junto con una regulación espacial, determinada por el microambiente celular concreto en el que se localizan los precursores hematopoyéticos, existe una regulación temporal, determinada por la producción selectiva de diferentes factores solubles (citoquinas) y la expresión de sus receptores a lo largo de la ontogenia del individuo.

Dentro de la compleja red de citoquinas implicadas en el programa madurativo de los precursores del linaje T, uno de los ejemplos más documentados es el de la ruta de la IL-2. Tanto en el ratón (Raulet, 1985) como en el hombre (De la Hera y cols., 1985; De la Hera y cols., 1986), los precursores intratímicos más tempranos (CD3⁺4⁺8⁻) expresan en su membrana la cadena α (p55) del receptor de IL-2 (IL-2R α) y son capaces de producir IL-2 (Carding y cols., 1989; Toribio y cols., 1989). En ambos sistemas, la expresión del IL-2R α se induce en estadios ontogénicos concretos. En el ratón, la expresión del gen que codifica para el IL-2R α es detectable en células de timo a día 13 del desarrollo fetal (Carding y cols., 1989) observándose una expresión a nivel proteico en la mayoría de los timocitos (80%) a día 15 de desarrollo (Raulet, 1985). En el timo humano, estudios inmunohistoquímicos han demostrado la existencia de un pequeño porcentaje (0.2%) de

células IL-2R α ⁺, que se localizan mayoritariamente en la región medular tímica a las 12 semanas del desarrollo, llegando a ser de un 10% a las 20 semanas (Hofman y cols., 1985).

Estos datos junto con los diferentes estudios funcionales realizados tanto "in vitro" (Toribio y cols., 1988) como "in vivo" (Zuñiga-Pflücker y cols., 1990), han permitido establecer la relevancia fisiológica de la ruta de la IL-2 en la maduración de los precursores T intratímicos. Sin embargo, se desconoce la funcionalidad de esta vía, o de otras rutas de crecimiento y/o diferenciación alternativas en los momentos más tempranos de la ontogenia. El análisis de este problema constituye el objetivo central del trabajo que se resume en los siguientes apartados.

2.1 EXPRESION DEL RECEPTOR DE AFINIDAD INTERMEDIA PARA LA IL-2 (p75, IL-2R β) EN LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE HIGADO FETAL.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado la expresión transitoria del IL-2R durante la ontogenia de las células T. Si bien la expresión del IL-2R α es indetectable en los precursores intratímicos más tempranos (células pro-T), esta población presenta elevados niveles del componente β del IL-2R (p75, IL-2R β), capaz de unir IL-2 con afinidad intermedia. La producción autocrina de IL-2 en este estadio madurativo se traduce en la interacción IL-2/IL-2R β y en la subsiguiente activación del gen IL-2R α . El resultado final del proceso es la expresión en la membrana del receptor heterodimérico IL-2R α/β de alta afinidad. Con objeto de estudiar la expresión de ambos componentes, IL-2R α y IL-2R β , en la población hematopoyética presente en el hígado

fetal, el status transcripcional de sus respectivos genes se analizó mediante técnicas de hibridación "in situ" en la población de células mononucleares aisladas de muestras de hígado fetal de 10 semanas de edad, obtenidas por centrifugación en Ficoll-Hypaque, utilizando sondas cDNA específicas para IL-2R β y IL-2R α . Estos estudios mostraron la ausencia de mensajeros específicos para el IL-2R α en la población analizada (<1% células positivas) (Fig.11). Por el contrario, se observaron niveles variables de expresión de mRNA específico para el IL-2R β en un 50% de la población en estudio (Fig.11). La ausencia total de productos transcripcionales del IL-2R α , así como la expresión de mensajeros para el IL-2R β , se corroboró posteriormente utilizando técnicas de gran sensibilidad (PCR, datos no mostrados). El carácter cuantitativo de la técnica de hibridación "in situ" nos permitió, además, realizar estudios comparativos utilizando diferentes poblaciones precursoras. Así, el análisis en paralelo de la población intratímica de células pro-T mostró una expresión mayoritaria de mensajeros IL-2R β (>80%) y la ausencia de mRNA para el IL-2R α (Fig.12)

Dado que los elevados niveles de expresión de mRNA específico del IL-2R β en células pro-T se correlaciona con la expresión en la membrana de un gran número de moléculas capaces de unir IL-2 con afinidad intermedia (2320 sitios/célula, Kd=850 pM) (Toribio y cols., 1989), el siguiente paso en nuestro estudio consistió en el análisis a nivel proteico de la expresión del IL-2R β en la población hematopoyética del hígado fetal. Debido a la baja afinidad de los mAbs anti-IL-2R β disponibles, y a la limitación en la sensibilidad de las técnicas de citometría de flujo, el estudio se realizó utilizando ensayos de unión de la IL-2 marcada radiactivamente con ^{125}I y posterior análisis de Scatchard, tal y

como se llevó a cabo en el análisis de la población pro-T (Toribio y cols., 1989). Para ello, células hematopoyéticas obtenidas de una muestra de hígado fetal de 10 semanas de gestación, se incubaron con concentraciones crecientes de ^{125}I -IL-2 (1pM-25nM) incluidas en el rango de afinidad que presentan las tres formas del IL-2R. El análisis de Scatchard de los datos obtenidos demostró la existencia de 1600 sitios de unión de IL-2 por célula (considerando una distribución homogénea), con una constante de afinidad intermedia $K_d=936 \text{ pM}$ (Fig.13). Es importante mencionar que ésta constituye la única forma del IL-2R expresada en la población fetal en estudio, no detectándose receptores de alta (0.1nM) o baja afinidad (10nM).

Por tanto, e independientemente de la relevancia funcional de estos hallazgos, podemos concluir que, al igual que los precursores intratímicos más tempranos, los precursores hematopoyéticos presentes en el hígado fetal expresan el receptor de afinidad intermedia, IL-2R β , y carecen del IL-2R α .

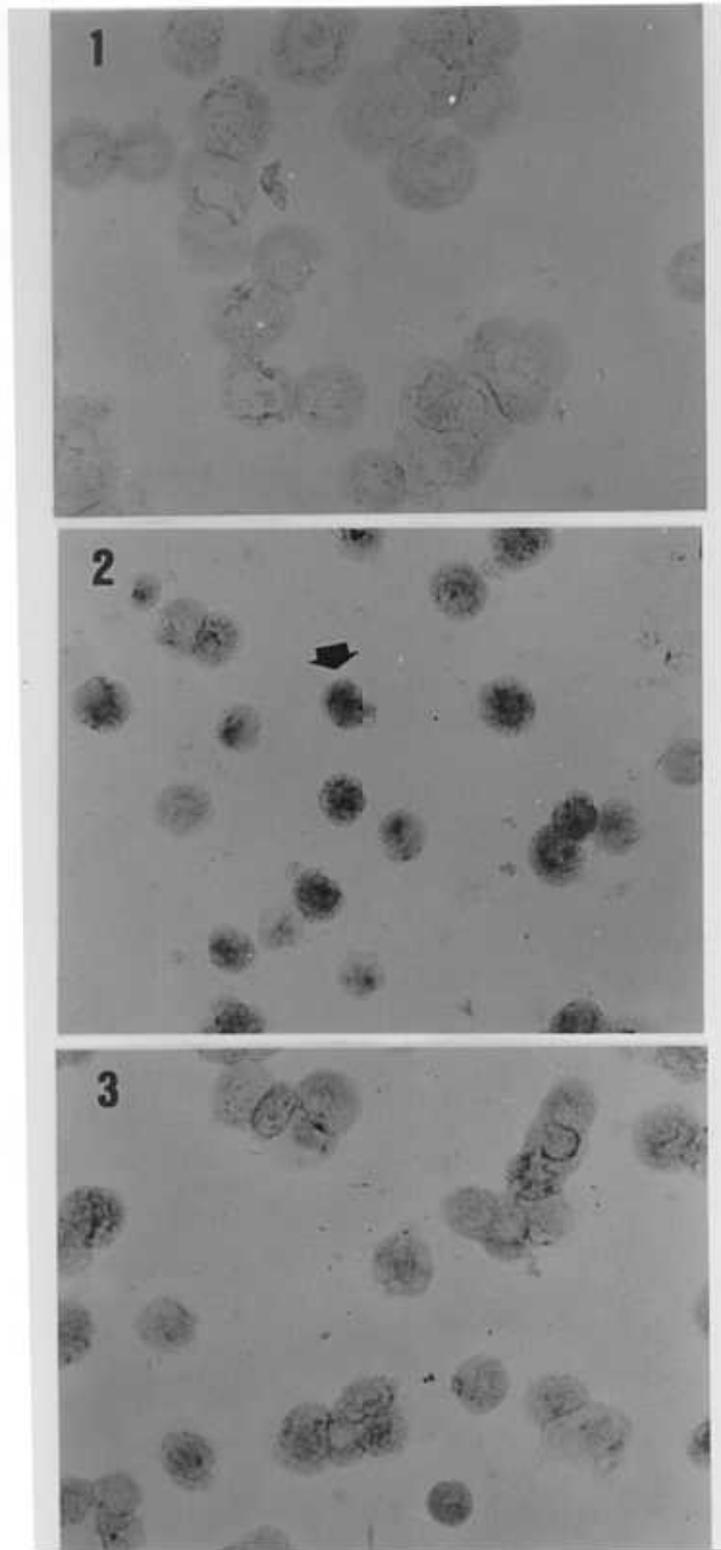


Fig.11. Detección de mRNA específico para el IL-2R β y IL-2R α en células de hígado fetal de 10 semanas mediante técnicas de hibridación "in situ". La expresión de mRNA para los componentes del IL-2R se analizó sobre citopreparaciones de 5×10^4 células por porta utilizando sondas de cDNA marcadas con digoxigenina-11dUTP. El tiempo de la reacción coloreada fue de 6 h., utilizándose como control negativo células procedentes de la misma población tratadas con RNasa. En la figura se muestran campos representativos. (1) IL-2R α , (2) IL-2R β , (3) células tratadas con RNasa, (amplificación 500x).

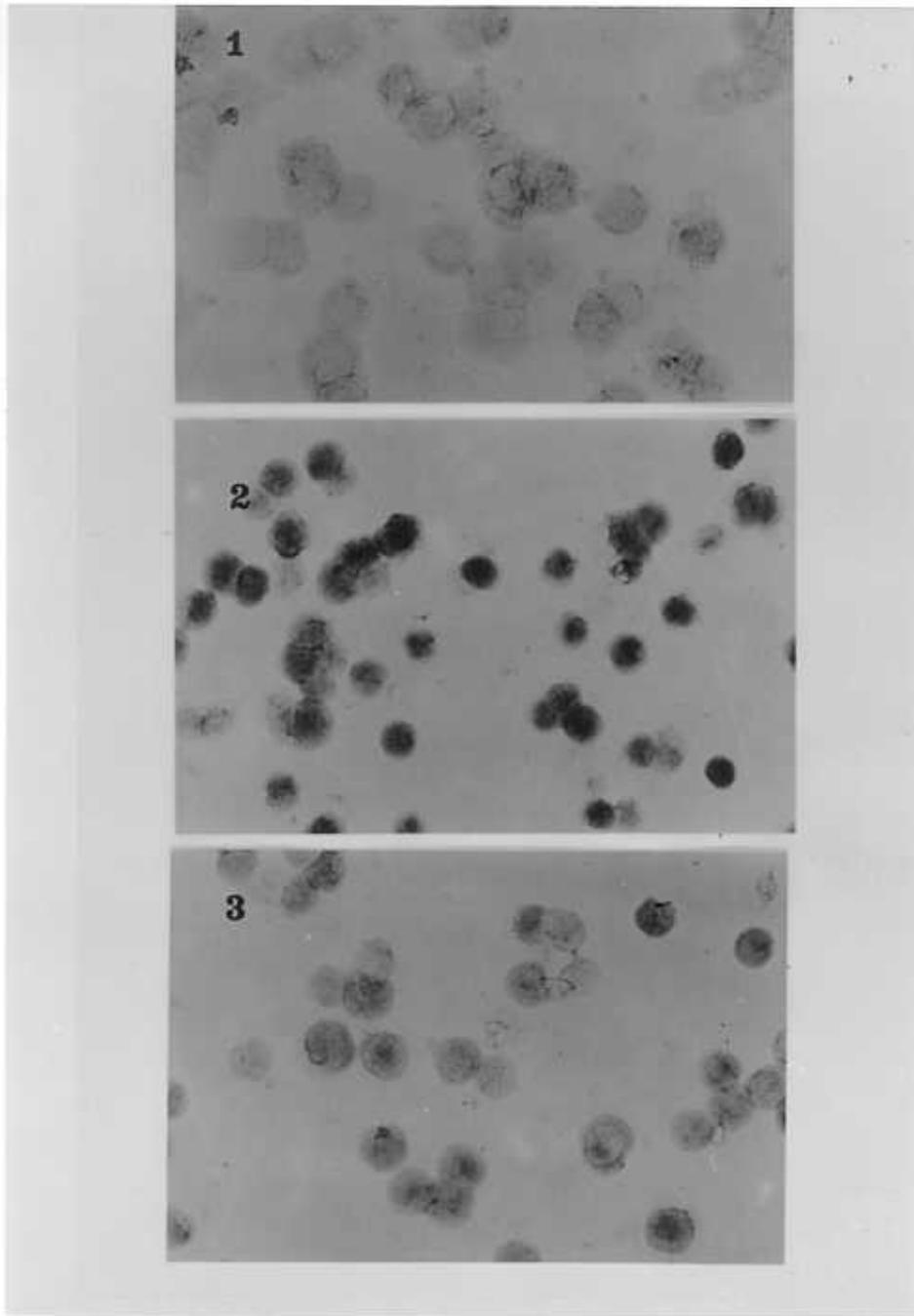


Fig.12. Detección de mRNA específico para el IL-2R β y IL-2R α en células pro-T de timo neonato mediante técnicas de hibridación "in situ". El análisis de expresión de mRNA específico se realizó en paralelo con las células de hígado fetal (Fig 11). (1) IL-2R α , (2) IL-2R β (3) células tratadas con RNasa.

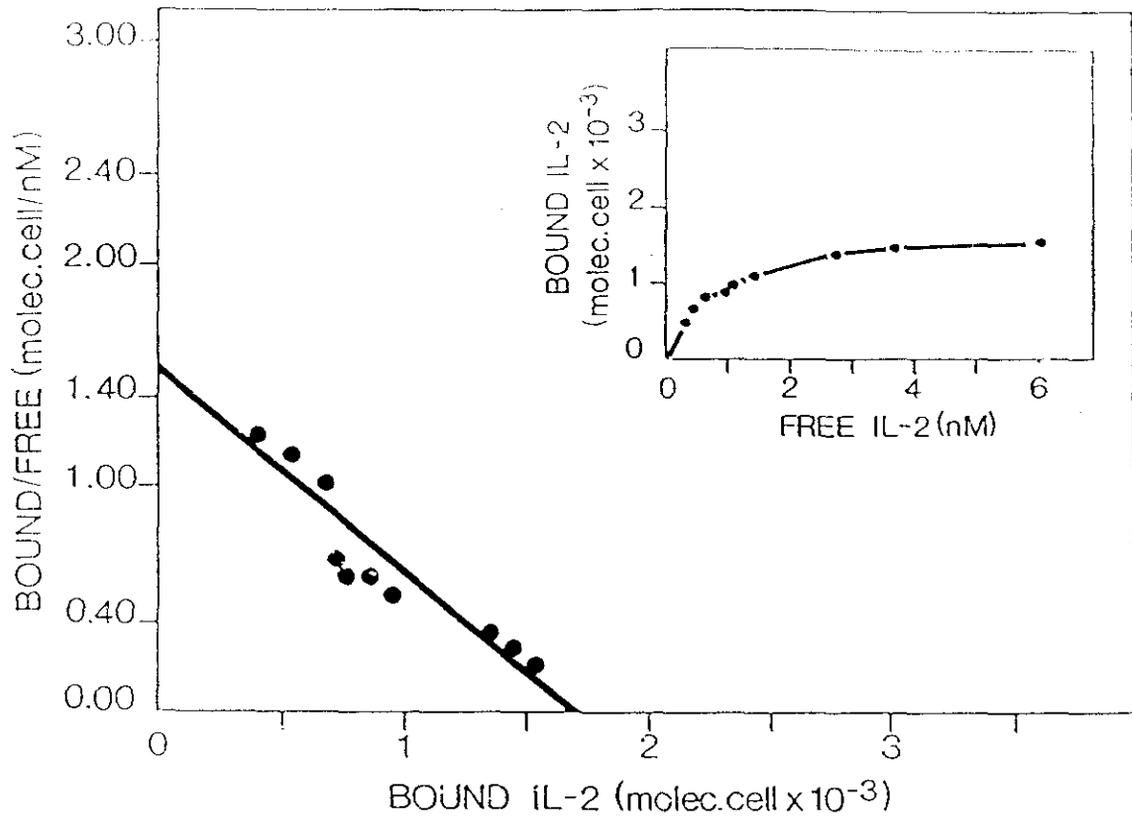


Fig.13 Análisis de Scatchard de la unión de IL-2 a células de hígado fetal. Los ensayos de unión de IL-2 se realizaron sobre células recién obtenidas de hígado fetal de 10 semanas de gestación, por centrifugación en Ficoll-Hypaque. Las células se incubaron con diluciones seriadas de ¹²⁵I-IL-2 (1pM-25nM). Los valores calculados para la constante de disociación y el número de sitios se derivan de un análisis de Scatchard computadorizado para la unión en el equilibrio.

2.2.-REGULACION ONTOGENICA DE LA PRODUCCION DE LINFOQUINAS: ACTIVACION INTRATIMICA DE LA TRANSCRIPCION DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA IL-2.

El hallazgo de que los precursores hematopoyéticos localizados en el hígado fetal expresan en la membrana la cadena β del IL-2R, sugería la implicación funcional de la IL-2 en los procesos de crecimiento y/o diferenciación de dichos precursores en momentos tempranos de la ontogenia. Esta posibilidad demanda la disponibilidad "in situ" de la IL-2. Por tanto, nuestro siguiente objetivo se centró en el estudio de la producción de IL-2 en el hígado fetal en diferentes estadios de la embriogénesis. Para ello, analizamos la producción de mensajeros para la IL-2 mediante PCR. Cantidades similares de cDNA obtenido por transcripción inversa de RNA total tratado con DNAasa procedente de hígado fetal entre 9 y 20 semanas de gestación, se amplificó utilizando oligonucleotidos específicos de los extremos 5' y 3' de la región codificadora de la proteína, de forma que solo los transcritos maduros de 460 bp son amplificados. En ninguna de las muestra de hígado fetal entre 9 y 20 semanas se detectó amplificación (Fig.14). Resultados negativos se obtuvieron asimismo en muestra procedentes de células T maduras periféricas o de timocitos maduros (datos no presentados). Por el contrario, se observó producción de IL-2 en muestras de timo y bazo obtenidas a las 20 semanas de la embriogénesis, así como en precursores intratímicos, células pro-T, procedentes de un timo neonato (Fig.14).

Estos resultados se corroboraron posteriormente mediante técnicas de Southern por hibridación de los productos amplificados utilizando una sonda específica para la IL-2. Por tanto, de los datos

obtenidos podemos concluir que, al igual que en el ratón, la producción de IL-2 en el hombre se ve sometida a estrictos procesos de regulación durante el desarrollo ontogénico. Nuestros datos indican, además, que dichos mecanismos dependen no sólo de la edad gestacional, sino también de la localización de los precursores en estudio, estando restringida la producción de IL-2 a los precursores intratímicos más tempranos.

Sorprendentemente, las señales inductivas requeridas para la producción de otras linfoquinas, en concreto para la IL-4, parecen ser menos estrictas. Aunque el análisis en paralelo de la producción de IL-4 demostró un patrón de amplificación similar al observado para IL-2 (Fig.14), el posterior análisis por Southern demostró la existencia de, aunque bajos, detectables niveles de mRNA específico de IL-4 en todas las muestras de hígado fetal analizadas (datos no mostrados). Similares resultados se obtuvieron empleando técnicas de hibridación "in situ". Por tanto, la IL-4 constituye una de las linfoquinas producidas más tempranamente durante la ontogenia de las células T.

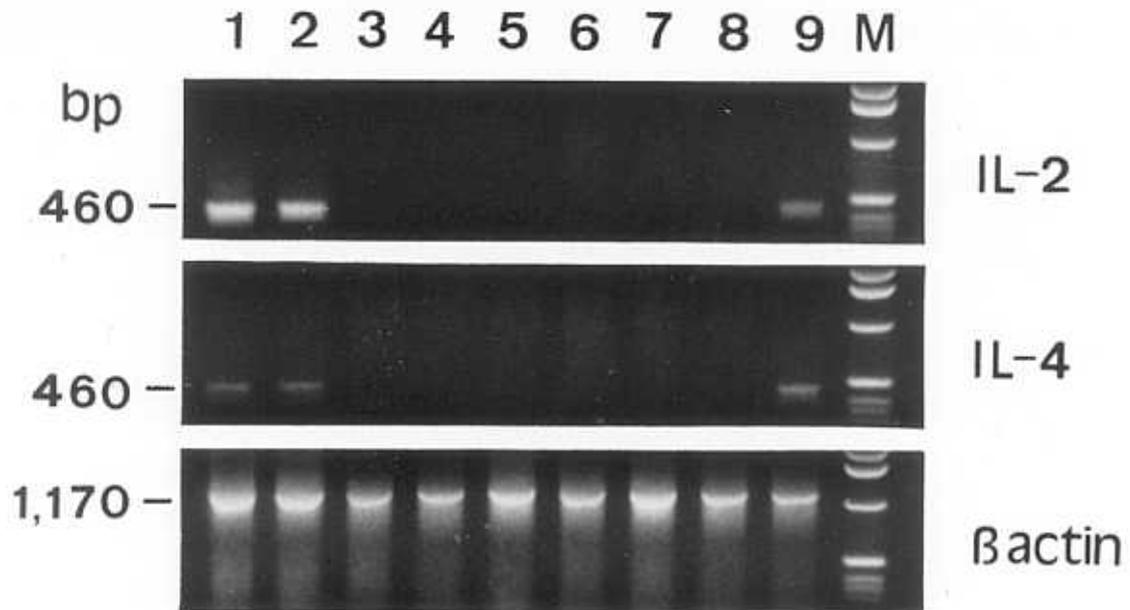


Fig.14 Detección de transcritos de IL-2 y IL-4 por PCR en tejidos linfoides fetales. Cantidades idénticas de cDNA obtenidas por transcripción inversa de RNA total fueron amplificadas por PCR empleando oligonucleotidos específicos de los extremos 5' y 3' de los genes de la IL-2 y IL-4. La amplificación se realizó en las mismas condiciones para todas las muestras (1 min, 94°C, 2 min. 55°C, 3 min. 75°C, 60 ciclos). Cantidades idénticas (10 µl) de cada muestra se corrieron simultaneamente en geles de agarosa al 1.5%. Las bandas se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Las muestras analizadas fueron: timo de 20 semanas de gestación (1), Bazo de 20 semanas (2), hígado de 20 semanas (3), hígado entre 9 y 14 semanas (4-8), células pro-T de timo (9), Marcadores M (2.036, 1636, 1086, 517, 506, 396, 344, 298 bp).

2.3. IMPLICACION DE LA RUTA DE LA IL-2 EN LA MADURACION DE LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE LOS LINFOCITOS T.

La ausencia de producción de IL-2 "in vivo" en el hígado fetal, incluso en estadios embrionarios cuando se detectan niveles considerables de mRNA específico para la IL-2 en el timo, constituye una clara evidencia del requerimiento de señales inductivas específicas proporcionadas por el microambiente tímico en el proceso de activación del gen que codifica para la IL-2. Sin embargo, la ausencia de IL-2 en el hígado fetal no constituye un argumento en contra de la funcionalidad del IL-2R β en los precursores hematopoyéticos presentes en el hígado fetal. Es más, podría especularse con la posibilidad de que dichos precursores, intrínsecamente aptos para responder a la IL-2, constituyen el estadio madurativo pretímico más tardío, dispuesto para migrar al timo y destinado a madurar intratímicamente. Con el fin de abordar esta posibilidad, analizamos seguidamente el efecto funcional de la unión de la IL-2 a sus receptores de afinidad intermedia en los precursores de linaje T en dos situaciones diferentes: previamente y posteriormente a la migración hacia el timo.

2.3.1. Efecto de la IL-2 en la diferenciación de la población precursora pretímica.

La demostración de que la cadena β está implicada en la transducción de señales de activación celular, independientemente de su unión a la cadena α (Hatekeyama, 1989a), podría sugerir la funcionalidad del IL-2R β en la población de precursores presente en el hígado fetal.

Para analizar el efecto fisiológico de la unión de la IL-2 al IL-2R β en el proceso de proliferación de los precursores hematopoyéticos del hígado fetal, células de hígado entre 9-10 semanas, purificadas por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque, se cultivaron en presencia de dosis de IL-2 (1nM) suficientes para saturar los receptores de afinidad intermedia. La cinética de proliferación se evaluó por conteo celular en microscopio analizando la viabilidad por tinción con azul-tripán. Los resultados que se muestran en la Fig.15 indican que el pico máximo en la cinética de proliferación se obtiene entre los días 14-20. A partir de este momento la proliferación celular decrece progresivamente hasta el día 30. De la extrapolación a día 0 de la curva de crecimiento exponencial podemos deducir la existencia de una pequeña población (7-9%, Fig15) en el hígado fetal, capaz de proliferar en respuesta a la IL-2, posiblemente a través del IL-2R β . Aunque la implicación de la ruta IL-2R β /IL-2 en el proceso de proliferación no puede demostrarse directamente debido a la carencia de mAbs que bloqueen eficientemente la unión IL-2R β /IL-2, esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que en ausencia de IL-2, o en presencia de otros factores solubles, tales como IL-4, no se inducen tales respuestas proliferativas en dicha población (datos no presentados).

Sin embargo los datos más consistentes en cuanto a la funcionalidad de la vía IL-2R β /IL-2 en los precursores hematopoyéticos del hígado fetal derivan de estudios fenotípicos realizados mediante citometría de flujo. Estos estudios demostraron que la proliferación de dicha población precursora se acompañaba de cambios moleculares que implican la expresión secuencial de antígenos asociados al linaje linfóide T. Como se

muestra en la Tabla 3, a día 14 de cultivo, e independientemente de los factores presentes en el medio (IL-2, IL-4 o ninguno), las células de hígado fetal adquieren "in vitro" la molécula CD45 y moléculas MHC de clase I (70-98%), lo que demuestra su carácter hematopoyético. La adición de IL-2 al medio de cultivo se traduce, además, en la adquisición del antígeno CD7 en la mayoría (>95%) de la población CD45+, como muestra el análisis biparamétrico representado en la Fig.16. De este porcentaje, un 68% de las células expresan el marcador CD8 y un 12% son CD2+. Por lo tanto en presencia de IL-2 se obtiene una población mayoritaria CD45+7+2-3-4-8+ y otra minoritaria que expresa CD2 .

La adquisición de este fenotipo se observó exclusivamente en los cultivos suplementados con IL-2. Por el contrario, tanto en ausencia de factores exógenos, como tras la adición de IL-4, el programa madurativo iniciado por los precursores hematopoyéticos se reduce a la adquisición de la molécula CD45 y de los antígenos MHC de clase I, no detectándose marcadores específicos del linaje T. No obstante, la aparición en ambos casos de la molécula CD14, así como la expresión de bajos niveles del Ag CD4, sugiere la maduración "in vitro" de precursores hematopoyéticos del linaje mieloide. Por el contrario, los datos obtenidos en presencia de IL-2 sugieren la participación selectiva de esta linfoquina en el inicio del programa madurativo que determina la diferenciación de los linfocitos T. Es importante mencionar, no obstante, que en ninguno de los experimentos realizados en estas condiciones las células llegaron a expresar la cadena α del IL-2R y tampoco se observaron células maduras CD3+, lo cual sugiere el requerimiento de otras señales de activación para la finalización del programa de diferenciación iniciado.

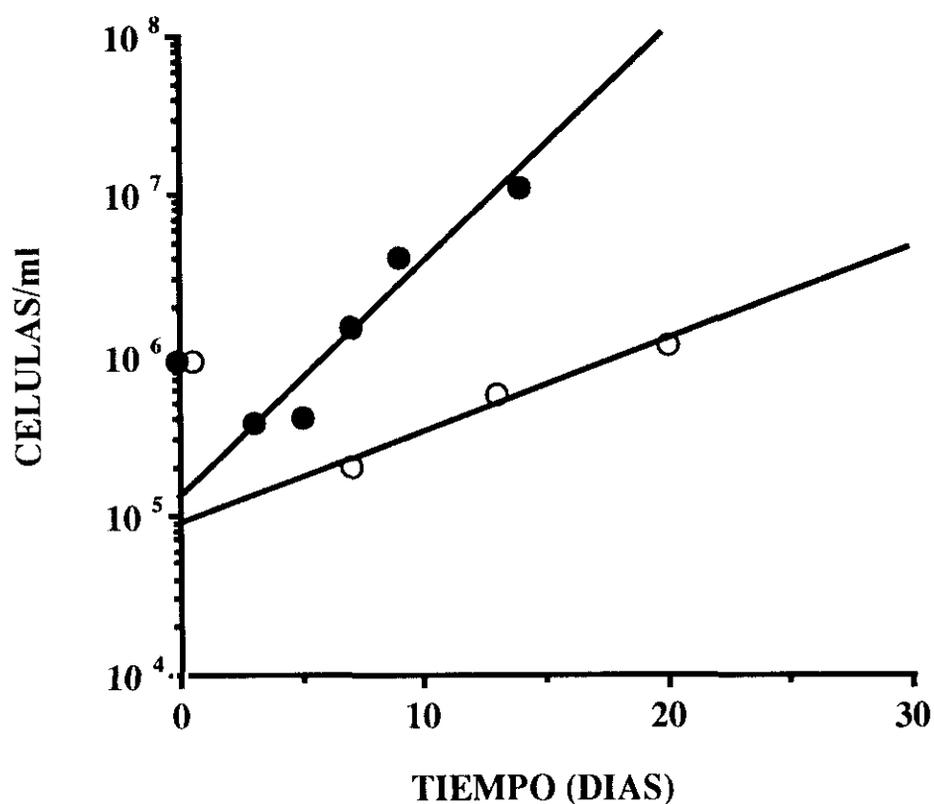


Fig 15. Curva de crecimiento de los cultivos de células de hígado fetal y pro-T de timo en presencia de IL-2. 1×10^6 células/ml se cultivaron en presencia de 100 U/ml de rIL-2. El número de células presentes en los cultivos se cuantificó en los días indicados por tinción con azul de tripán, representándose los correspondientes al intervalo de crecimiento exponencial. El número de células iniciales respondedoras se obtuvo extrapolando a día 0 la recta obtenida por ajuste de mínimos cuadrados. (●) células pro-T de timo, (○) células de hígado fetal entre 9-10 semanas de gestación.

Tabla 3. Implicación de la IL-2 en la inducción de la expresión de marcadores de células T en precursores hematopoyéticos presentes en el hígado fetal humano.

ANTIGENOS	CONDICIONES DE CULTIVO		
	Medio	IL - 2	IL - 4
CD45	98 ^a	97	70
CD7	<0.1	94	5
CD1a	<0.1	<0.1	<0.1
CD2	<0.1	12	<0.1
CD3	<0.1	<0.1	<0.1
CD4	27 ^{debil}	<0.1	25 ^{debil}
CD8	<0.1	63	<0.1
CD14	ND	5	30
IL-2R α	<0.1	1	<0.1

Células obtenidas de hígado fetal entre 9-10 semanas de edad por centrifugación en Ficoll-Hipaque se cultivaron durante 14 días en presencia de IL-2 (100U/ml), IL-4 (300U/ml), o medio solo, a una concentración de 1×10^6 /ml. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

^a Porcentaje de células positivas analizadas por citometria de flujo después de 14 días de cultivo.

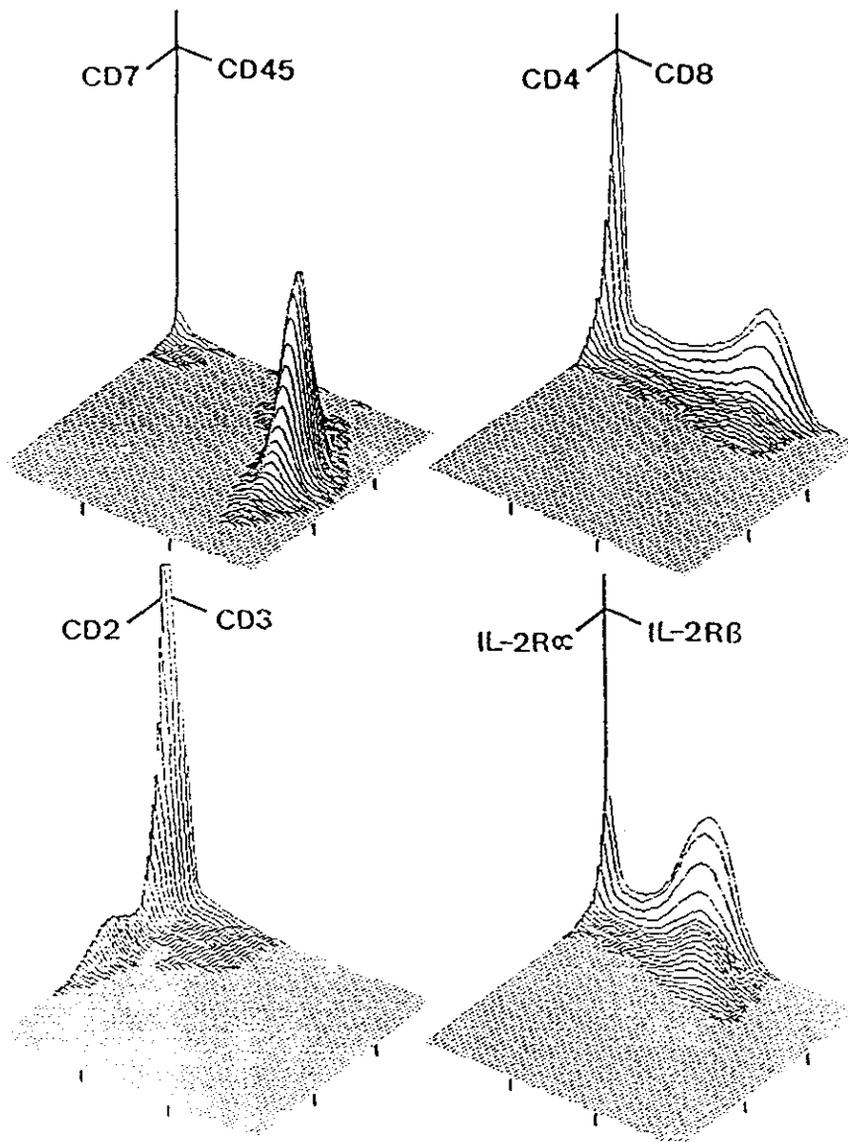


Fig. 16. Expresión de moléculas asociadas a linaje T en precursores de hígado fetal cultivados en presencia de IL-2. Células de hígado fetal se cultivaron en presencia de IL-2 (100U/ml) durante 14 días. Por citometría de flujo se analizó la inmunofluorescencia en dos colores. La combinación de mAbs empleados fueron: FITC-GAP8.3 (anti-CD45) y 3A1-Biotina (anti-CD7) más estreptavidina-PE; FITC-OKT8 (anti-CD8) y PE-Leu3a (anti-CD4); FITC-OKT3 (anti-CD3) y T11-RD1 (anti-CD2); YTA-1 (anti-IL-2R β) más cabra anti raton FITC-IgG F(ab)'2 y Mar.108-Biotina (anti-IL-2R α) más estreptavidina-PE.

2.3.2. Efecto de la IL-2 en la diferenciación de los precursores intratímicos del linaje T.

Con objeto de realizar un estudio comparativo sobre la funcionalidad de la vía IL-2/IL-2R β en los precursores T pretímicos e intratímicos, el efecto de la IL-2 se analizó posteriormente en la población intratímica de células pro-T. Para ello, las células pro-T aisladas de muestras de timo postnatal, se cultivaron en las condiciones descritas para los precursores obtenidos de hígado fetal en presencia de altas dosis de rIL-2. Como se muestra en la Fig.15, la IL-2 indujo una elevada respuesta proliferativa en las células pro-T, observándose la máxima respuesta a día 9-10 de cultivo, cuando la recuperación celular fue del 200%. La diferencia en las cinéticas obtenidas para células de hígado fetal y células pro-T se refleja en el tiempo de duplicación indicado por la pendiente de la curva exponencial, 36 h. para las células pro-T y 106 h. para las células de hígado fetal.

La diferencia en el comportamiento de ambas poblaciones en respuesta a la IL-2 no se reduce, sin embargo, a un problema de cinética proliferativa. De hecho, se observó que la proliferación de las células pro-T conllevaba la adquisición secuencial de diferentes marcadores asociados al linaje T. Al igual que en los precursores de hígado fetal, la proliferación en la población precursora intratímica se tradujo en la expresión mayoritaria del antígeno CD7; observándose, además, la adquisición de la molécula CD2 en la mayoría de las células analizadas (>80%) a día 8 de cultivo. Más importante fue la observación de que un elevado porcentaje (63%) de la población CD2⁺ expresaba el complejo CD3 en la membrana. Aunque la expresión de CD3 no se correlacionaba

estrictamente con la adquisición de las moléculas CD4 o CD8 (25% de las células CD3⁺ mostraban el fenotipo CD4⁻CD8⁻), la población CD3⁺ restante (75%) expresaba además, bien moléculas CD4 ó CD8 características de las células T maduras (Fig.17).

La madurez de la población obtenida a partir de las células pro-T se corroboró posteriormente mediante estudios fenotípicos que indicaron la expresión del TCR α/β en más del 85% de la población CD3⁺, siendo detectable además un 13% de células TCR γ/δ ⁺ (Fig.17). En cuanto a la distribución de los antígenos CD4 y CD8 en las poblaciones maduras TCR⁺ obtenidas, se observaron células tanto CD4⁺ como CD8⁺ en la subpoblación TCR α/β ⁺, existiendo una pequeña población de células TCR α/β ⁺CD4⁻CD8⁻. Por el contrario, la mayoría de la población TCR γ/δ ⁺ presentaba el fenotipo CD4⁻CD8⁻, pudiendo detectarse únicamente un 2.5% de células TCR γ/δ ⁺CD8⁺ (Fig.17). Estos datos indican que, a diferencia de lo que ocurre en la población de precursores presentes en el hígado fetal, la IL-2 participa en la inducción de la adquisición en la membrana del complejo CD3-TCR en los precursores T intratímicos y en su diferenciación terminal en ambos linajes TCR α/β ⁺ y TCR γ/δ ⁺ de células T maduras.

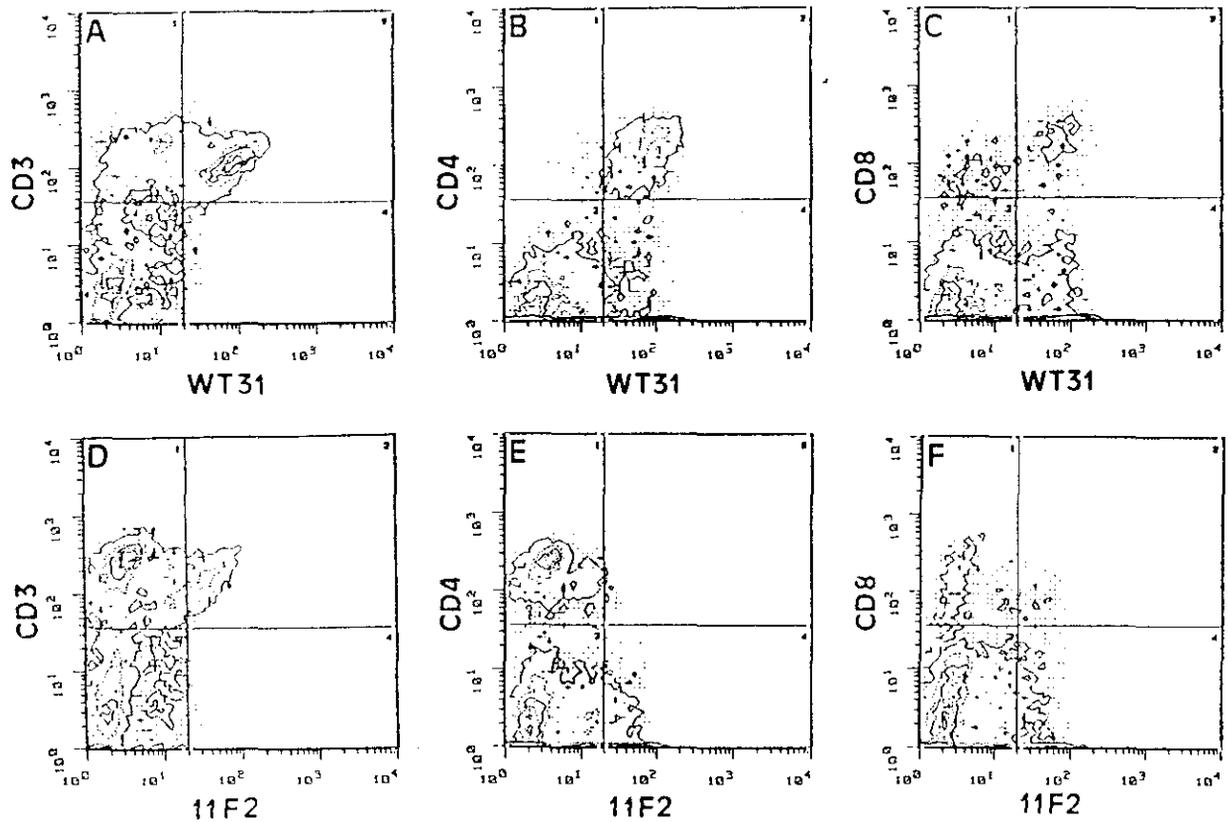


Fig.17. Distribución de células $TCR\alpha/\beta^+$ y $TCR\gamma/\delta^+$ en la progenie de células pro-T generada en presencia de IL-2. Las células pro-T se cultivaron a 10^6 células/ml en presencia de rIL-2 (100 U/ml) durante 9 días. La expresión de los marcadores indicados en dos colores se analizó en un citómetro FACStar. Los anticuerpos empleados en fluorescencia verde fueron WT31 (anti-TCR α/β) y 11F2 (anti-TCR γ/δ) mientras que en fluorescencia roja se emplearon los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8

2.3.3. La IL-2 es una señal necesaria pero no suficiente para la diferenciación de los precursores linfoides del linaje T.

Los resultados obtenidos plantean obligatoriamente una nueva cuestión: ¿la diferenciación de las células pro-T intratímicas en respuesta a la IL-2 refleja la finalización del programa madurativo iniciado previamente en el timo o, por el contrario, es dependiente de señales aditivas a las proporcionadas por la IL-2?. Para abordar este problema, se analizó el efecto de la IL-2 en la diferenciación de las células pro-T a nivel clonal, con el fin de evitar las posibles señales inducidas por las interacciones intercelulares entre precursores linfoides o precursores linfoides-células estromales tímicas que se dan en los cultivos policlonales de la subpoblación pro-T. Las células pro-T, aisladas como se describe en el apartado de materiales y métodos se cultivaron en dilución límite en placas de Terasaki, siendo la eficiencia de clonaje de 1/32 (Fig.18). Después de un semana de cultivo las células clonadas se expandieron en placas de 96 pocillos con fondo en U y posteriormente se analizó su fenotipo mediante técnicas de I.F. y citometría de flujo. El 90% de los clones analizados expresaban el Ag Kp43, molécula asociada a células NK y a células T γ/δ^+ (Aramburo y cols., 1990). De los 22 clones sólo 3 expresaban niveles variables (70-85%) del Ag CD3, coexpresando uno de ellos, el clon 30B4, el Ag Kp43 (análisis biparamétrico no mostrado). La expresión de CD2 presentaba niveles variables, no superando el 10% de expresión en tres clones como se indica en la Tabla 4. Por lo tanto, el 86% de los clones originados a partir de células pro-T en presencia de IL-2 no expresaban el complejo CD3-TCR,

característica de las células T maduras, y expresaban moléculas asociadas al linaje NK. Estos datos sugieren el origen común de ambos linajes linfoides T y NK e indican que en ausencia de estímulos adicionales, la IL-2 sería necesaria pero no suficiente para inducir la diferenciación de los precursores intratímicos a células T maduras, generándose así células relacionadas con la estirpe NK.

**DILUCIÓN LIMITE DE TIMOCITOS
CD2-CD3-CD4⁺-CD8-CD1⁻ EN IL2
UTILIZANDO COMO CEL FEEDER EBV-B+PBL**

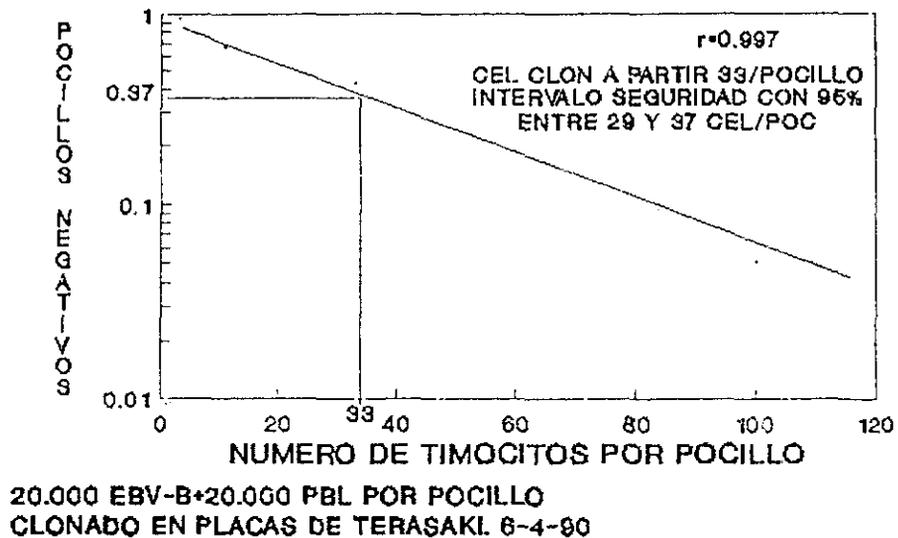


Fig.18. Dilución límite de células pro-T intratímicas CD7⁺2⁻3⁻4⁻8⁻. Diferentes concentraciones celulares se sembraron en placas de Terasaki con una mezcla de células feeder irradiadas, 20.000EBV-B + 20.000 PBL, en presencia de 100U/ml de IL-2. Los resultados se analizaron por el análisis estadístico dado por la distribución de Poisson (ver materiales y métodos)

Tabla 4. Análisis fenotípico de los clones obtenidos por dilución límite a partir de células pro-T, CD7+2-3-4-8-, en presencia de IL-2.

Clones	Porcentaje de células positivas		
	CD2	CD3	Kp43
30E8	27	<1	78
30F8	10	<1	91
30D7	80	80	10
30F7	14	<1	89
30G7	23	2	83
30H7	23	3	63
30B4	86	81	43
30A5	15	7	83
30H5	30	<1	85
30C6	10	<1	85
30B6	4	<1	98
30E7	96	<1	94
30G7	98	<1	68
30H7	41	7	60
30D30	11	<1	75
30F3	5	4	73
10E12	16	<1	91
10A12	70	71	<1
3G12	83	<1	78
3H12	8	<1	90
10D11	10	<1	69
10F11	5	<1	87

El fenotipo de los clones obtenidos después de dos semanas de cultivo fue determinado por inmunofluorescencia, incubando las células con mAb HP3B1 (anti-Kp43) seguido de un Ab de cabra anti-ratón conjugado con FITC, fracción F(ab)², anti-CD3-PE y anti-CD2-PE.

3. REQUERIMIENTO DEL COMPONENTE ESTROMAL TIMICO EN LA DIFERENCIACION DE LOS LINFOCITOS T.

Estudios realizados "in vivo" en animales timectomizados han mostrado que el timo desempeña un papel fundamental en la eficiente generación de los linfocitos T maduros. Además de las células linfoides, el timo contiene componentes estromales tales como células epiteliales, células dendríticas, macrófagos y fibroblastos, que han sido implicados tanto en los procesos de proliferación y diferenciación de los precursores linfoides (Beardsley y cols, 1983; Palacios y cols, 1989; Kurtzberg y cols, 1989), como en los mecanismos de selección del repertorio T maduro (Matsubara y cols 1990). Sin embargo el requerimiento selectivo de cada uno de estos componentes en los procesos descritos constituye un área de investigación sometida a continuo debate.

La reciente caracterización de mAbs específicos de los componentes del estroma tímico, así como el desarrollo de sistemas experimentales de diferenciación "in vitro" han proporcionado las herramientas necesarias para el estudio de la relevancia fisiológica que los diferentes componentes celulares estromales tienen en el proceso de maduración de los linfocitos T (Haynes y cols., 1984; Brekelmans y cols., 1990).

Estudios desarrollados en el ratón, han demostrado la participación específica de distintas poblaciones de células epiteliales, que presentan diferentes perfiles fenotípicos y producen distintos factores solubles, en la generación de ambos linajes T maduros, α/β y γ/δ , así como en la expresión selectiva de las moléculas CD4 y CD8 (Palacios y cols, 1989). En humanos,

recientes estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que el componente epitelial tímico es fundamental en la respuesta madurativa de los precursores intratímicos a la IL-2. Así, la eliminación de las células estromales presentes en las preparaciones de células pro-T (<10%), se traduce en la drástica reducción de las respuestas proliferativas mediadas por la vía de la IL-2, y en la ausencia de diferenciación T en los cultivos, generándose mayoritariamente poblaciones linfoides adscritas al linaje NK (de la Hera y cols., 1989). Estos datos se corroboraron posteriormente a nivel clonal, como se ha descrito en el apartado anterior (Fig. 18, Tabla 4).

En base a estos resultados se consideró la posibilidad de evaluar la capacidad que pueda tener el componente epitelial del estroma tímico como soporte madurativo de los linfocitos T, y comparar sus características fenotípicas y funcionales con las que presentan las células estromales presentes en la médula ósea y el hígado fetal, órganos hematopoyéticos que proporcionan el microambiente de desarrollo de los precursores linfoides T previamente a su migración al timo.

3.1. CARACTERIZACION IN VITRO DEL COMPONENTE CELULAR ESTROMAL DE MEDULA OSEA, HIGADO FETAL Y TIMO.

El análisis comparativo de los componentes estromales presentes en la médula osea, el hígado fetal y el timo se realizó sobre cultivos de células adherentes procedentes de estos órganos y mantenidas en diferentes condiciones dependiendo de su origen. Los cultivos de células adherentes procedentes de explantes de timo neonatal entre 2-6 meses de edad (ETI, ETVII, ETD) y timo

fetal de 20-25 semanas de gestación (EFTI, EFTII) se mantuvieron continuamente en medio esencial mínimo con D-valina (MEM D-Val) para evitar el sobrecrecimiento de fibroblastos (Nieburgs y cols, 1984). Por el contrario, las células adherentes procedentes de explantes de hígado fetal de 10 semanas de gestación (EFL) y médula ósea de adulto (EBMIII, EBMVI), se cultivaron en RPMI 1640. En todos los casos se utilizó un 10% de STF, previamente seleccionado para estos cultivos. Las células linfoides se eliminaron tras una semana de cultivo mediante tratamiento con ácido micofenólico (5ug/ml) durante 48h. En general, una vez alcanzada una confluencia del 70-80%, las células se despegaron de las placas con tripsina en medio Puck-EDTA y se cultivaron de nuevo a una dilución 1/5. Tras dos meses de cultivo en las condiciones descritas, intervalo de tiempo medio transcurrido hasta el análisis fenotípico y de producción de transcritos para citoquinas, las células adherentes de timo neonatal han sufrido entre 4-5 pases y las de timo fetal más de 8, mientras que tanto las células de médula ósea como las de hígado fetal no superan los tres pases, siendo difíciles de mantener a partir del tercer mes. En la Fig.19 se muestran campos representativos de las diferentes fases de un cultivo de células estromales tímicas, donde se observa la morfología típica en empedrado en el primer mes de cultivo (Fig 19) pasando posteriormente a la adquisición de una distribución más desordenada, agrupándose en zonas preferenciales de la placa (cultivos secundarios). Finalmente el cultivo prolongado durante varios meses (más de 10 pases) favorece la obtención de preparaciones celulares estables en cuanto a su crecimiento y fenotípicamente homogéneas atendiendo a la expresión mayoritaria de citoquinas específicas de células epiteliales intratímicas.

Considerando estos criterios, tales preparaciones celulares se denominaron en lo sucesivo líneas celulares. No obstante, es importante mencionar la presencia de diferentes tipos de células no sólo en los cultivos secundarios sino también en las líneas obtenidas, cuya caracterización fenotípica se resume en el siguiente apartado.

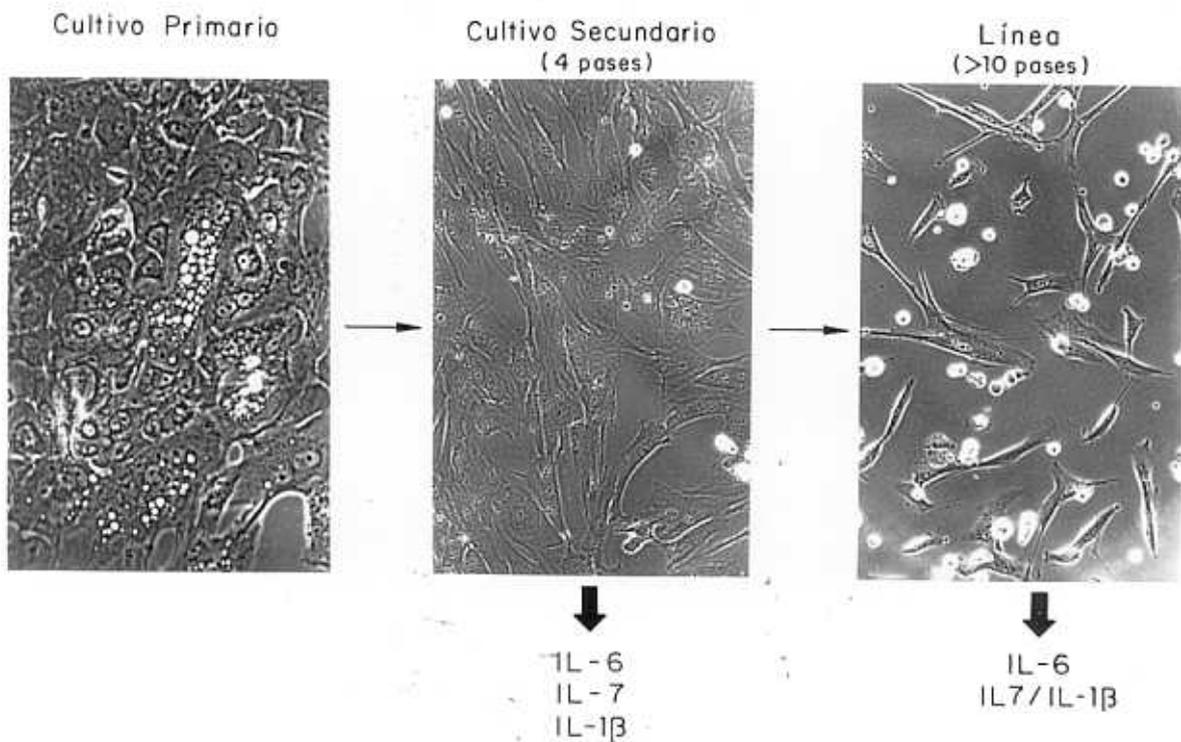


Fig.19. Fases del cultivo de estroma tímico. Cultivos primarios derivados de explantes se mantienen en medio MEM D-val suplementado con un 10% de STF. Cuando las células alcanzan el aspecto confluyente de la figura de la izquierda, se expanden analizándose su fenotipo así como la producción de transcritos para linfoquinas a los dos meses de cultivo (cultivos secundarios). Una vez establecido el cultivo, por diluciones límites sucesivas, se obtienen líneas epitiliales. De forma esquemática se representa la producción de mRNA para alguna de las linfoquinas analizadas en las diferentes fases del cultivo.

3.1.1 *Características fenotípicas de las líneas estromales obtenidas "in vitro".*

La utilización conjunta de técnicas citofluorimétricas e inmunohistoquímicas permitió un análisis fenotípico exhaustivo de las líneas estromales obtenidas. En la Tabla 5 se muestran los marcadores de membrana expresados en estas preparaciones. Todas las células analizadas, independientemente de su origen, expresaban en la membrana el Ag LFA-3 (CD58), ligando de la molécula CD2, y moléculas MHC de clase I. Por el contrario, en ningún caso se observó la expresión de moléculas MHC de clase II y sólo en las líneas derivadas de médula ósea se detectó el Ag MO1 (CD11b), marcador de monocitos/macrófagos. En ningún caso se detectaron Ags específicos de los linajes linfoides T (CD2, CD3) ni B (CD20).

La expresión de Ags intracitoplasmáticos en las líneas celulares procedentes de médula ósea y timo se analizó por técnicas inmunohistoquímicas empleando el complejo avidina-biotina-peroxidasa como se indica en el apartado de materiales y métodos. Fibroblastos de piel humana se utilizaron como control. La mayoría (>90%) de las células tímicas expresan el Ag AE3, marcador de citoqueratinas básicas de alto peso molecular presentes en la subcápsula, la corteza y la médula tímicas, siendo negativas para la molécula TE7, marcador de fibroblastos. Las células de médula ósea no expresaban ni AE3 ni TE7, aunque mostraron reactividad con vimentina, lo cual indica su origen fibroblastoideo.

Las líneas epiteliales tímicas obtenidas "in vitro" se caracterizaron posteriormente analizando la expresión de Ags adscritos a determinadas zonas tímicas mediante técnicas inmunohistoquímicas. La distribución selectiva de estos Ags en el timo y los mAbs empleados para su identificación se muestran en la Tabla 6. El empleo de estos mAbs demostró una gran heterogeneidad en la expresión de estos Ags, detectándose células TE4+ y TE3+ en la mayoría de las líneas epiteliales analizadas, excepto en la línea ETVII, en donde sólo se observó la expresión del Ag TE16 (Tabla 7). Los porcentajes que se indican en la Tabla 7 corresponden a determinaciones realizadas sobre campos representativos de los cultivos. Un ejemplo de estos análisis se muestra en la Fig. 20.

Tabla 5. Expresión de marcadores de superficie en las líneas estromales procedentes de distintos órganos hematopoyéticos.

Celulas	Marcadores			
	LFA3	Clase I	Clase II	MO1
<i>Timo neonato</i>				
ETI	+	+	-	-
ETVII	+	+	-	-
ETD	+	+	-	-
<i>Timo fetal</i>				
EFTI	+	+	-	-
EFTII	+	+	-	-
<i>Médula ósea</i>				
EBM III	+	+	-	+
EBM VI	+	+	-	+
<i>Hígado fetal</i>				
EFL	+	+	ND	ND

Análisis por citometría de flujo de la expresión en membrana de los marcadores indicados en las líneas estromales obtenidas. Entre $2-8 \times 10^3$ células se incubaron con los mAbs indicados más un Ab de cabra anti-ratón conjugado con FITC, fracción F(ab)'2. Excepto en el caso del Ag MO1, cuya expresión se detectó en un 30-50% de las células, los Ags LFA-3 y las moléculas de clase I se expresaron en el 100% de las células analizadas.

Tabla 6. Distribución selectiva de diferentes Ags intracitoplasmáticos en el epitelio tímico humano^a.

Nombre isotipo	EPITELIO TIMICO				CELULAS NO EPITELIALES	
	CSS	C	M	CH	M O	F
TE3-A IgG2	-	+	-	-	+	±
TE4 IgM	+	±	+	+	-	±
TE7 IgG1	-	-	-	-	-	+
RFD4 IgM	+	±	+	+	-	-
TE16 IgG1	-	-	-	+	-	-
CITOQUERATINAS						
AE3	+	+	+	+	-	-
p19 IgG1	+	-	+	+	-	-

^a. Obtenido de Leukocyte typing antigens III, 1987

Determinaciones realizadas mediante estudios inmunohistoquímicos en cortes de tejidos.
 CSS:Corteza subcapsular, C:corteza, M:médula, CH:corpúsculo de Hassal MO:macrófagos,
 F:fibroblasto

Tabla 7 Caracterización fenotípica de las líneas epiteliales tímicas.

líneas epiteliales tímicas

marcador	EFTI	EFTII	ETI	ETVII	ETD
AE3	>90	>90	>90	>90	>90
p19	>90	>90	>90	Neg	>90
TE4	40	60	50	Neg	>90
TE3	40	15	50	Neg	30
RFD4	40	20	Neg	Neg	20
TE16	Neg	20	50	>90	30
TE7	<10	<10	Neg	Neg	<5

Porcentaje de células positivas para los marcadores indicados. Las determinaciones se realizaron sobre $1-2 \times 10^3$ células procedentes de las líneas epiteliales indicadas, mediante tinción intracitoplasmática.

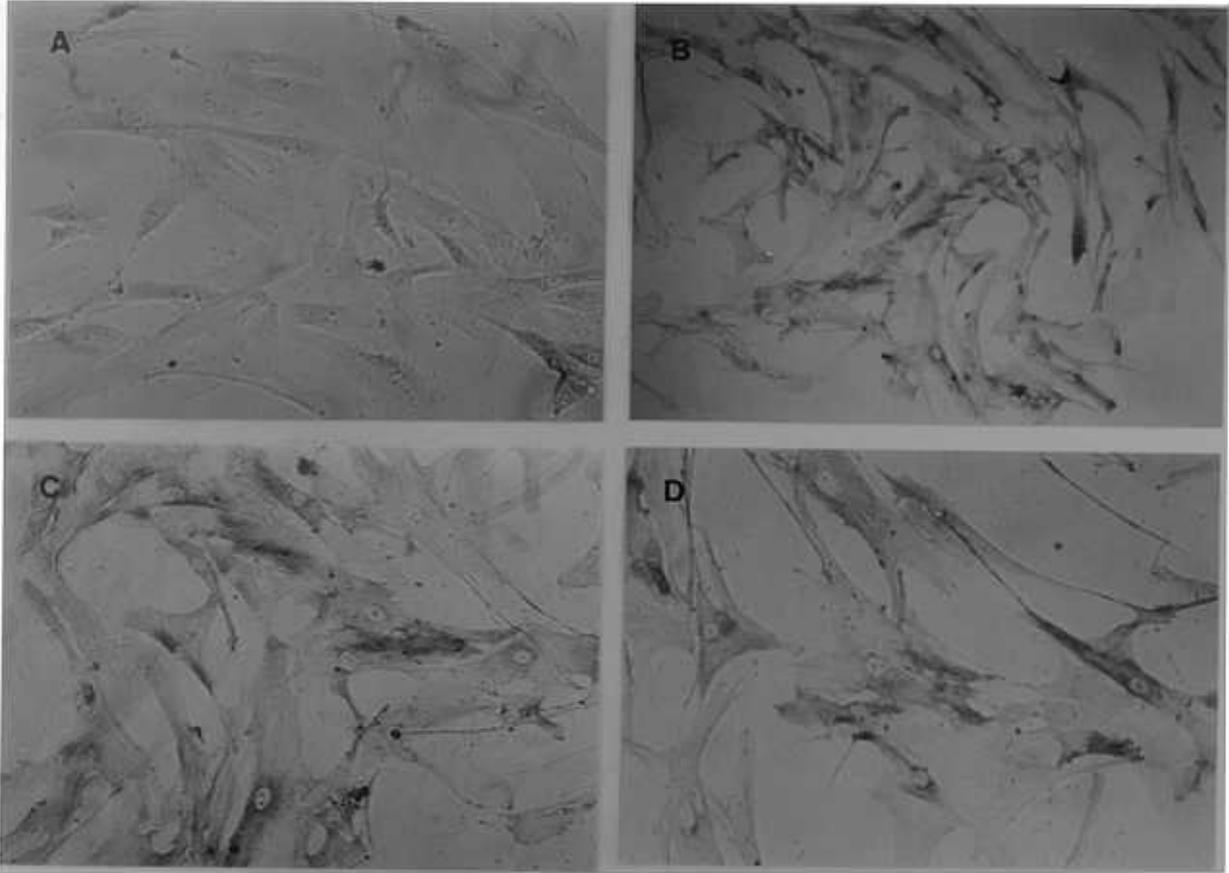


Fig.20. Tinción intracitoplasmática de ETI. $2-3 \times 10^3$ células procedentes de la línea epitelial tímica, ETI se sembraron en la zona central de la placa. Las células se fijaron durante 12h y posteriormente se incubaron con los siguientes Abs: TE7 (A), AE3 (B), TE4 (C) y TE3 (D). La reacción se visualizó tras la incubación con un Ab anti-Igs unido a biotina más el complejo avidina-peroxidasa, revelando con el sustrato DAB (0.5mg/ml más 0.05% H_2O_2). En la figura se muestran campos representativos (500X).

3.1.2.-*Caracterización funcional de las líneas estromales obtenidas "in vitro": Producción de linfoquinas.*

Paralelamente al estudio fenotípico de las líneas estromales obtenidas se evaluó la expresión de genes que codifican para diferentes linfoquinas, cuya implicación en la diferenciación de los precursores hematopoyéticos más tempranos ha sido ampliamente discutida (Toribio y cols., 1990). Estos estudios se realizaron mediante la técnica de PCR utilizando oligonucleotidos específicos de los genes que codifican para IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, y TNF α . El producto amplificado se visualizó en geles de agarosa por tinción con bromuro de etidio, mostrándose un experimento representativo en la Fig 21.. En ninguna de las líneas estromales analizadas, procedentes de timo, hígado o médula ósea se observó la producción de RNA para IL-3 o IL-4 (Tabla 8). Sin embargo, en todos los casos se detectaron altos niveles de IL-6, en comparación con el material amplificado obtenido utilizando oligonucleotidos específicos de β -actina. Es notable resaltar que en las células estromales procedentes del hígado fetal y la médula osea, además de IL-6 (también producido por fibroblastos de piel), se detectó la producción de RNA para IL-7, factor de crecimiento de precursores linfoides y células T maduras (Morrisey y cols., 1988; Watson y cols., 1989). Asimismo, la producción de mensajeros para la IL-7 fue detectable en todas las líneas epiteliales tímicas analizadas, excepto en EFTI, en la que tampoco se observó la expresión de IL-1 β (Tabla 8). Por otra parte la producción de TNF α fue detectada exclusivamente en las líneas estromales de médula ósea. Este dato parece relacionarse con la presencia de células MO1⁺ en estos cultivos, ya que se ha descrito que células fenotípicamente

similares, de estirpe macrofágica serían los principales productores de este factor (Dorshkind, 1990), cuyo efecto sobre los precursores T se desconoce.

Por tanto, de los análisis fenotípicos y de producción de mRNA específico para citoquinas, podemos concluir que las células estromales obtenidas de médula ósea e hígado fetal presentan características fenotípicas fibroblastoideas, con un porcentaje de células de estirpe monocítica importante en el estroma de médula ósea, mientras que, las células estromales de timo son de linaje epitelial, positivas para citoqueratinas. El patrón de producción de mRNA para citoquinas es, sin embargo, similar en los tres tipos de estromas, excepto para IL-1 β que sólo se detecta en timo y TNF γ que sólo se produce por las células estromales cultivadas de médula ósea.

3.1.3. Análisis comparativo de la expresión de marcadores específicos de epitelio tímico y producción de linfoquinas.

La siguiente cuestión que se trató, fue analizar si las subpoblaciones epiteliales tímicas de corteza (TE3⁺) y de médula o corteza subcapsular (TE4⁺) presentaban un patrón de producción específico de mRNA para citoquinas. Sucesivas diluciones de los cultivos epiteliales tímicos, permitieron obtener líneas homogéneas en cuanto a la expresión de ambos marcadores. Los cultivos fueron establecidos a partir de 25-50 células en placas de 24 pocillos (cantidades menores no crecían) en medio suplementado con 20% de STF y 1/5 de sobrenadante de estroma heterogéneo. Aproximadamente a las 4 semanas los cultivos adquirieron una confluencia del 80-90% volviéndose a diluir a 50 células por

Tabla 8. Detección mRNA específico para citoquinas producidas por células estromales de timo, médula ósea e hígado fetal.

citoquinas	Lineas de estroma					
	EFTI	EFTII	ETI	ETD	EBM	EFL
IL-1 β	-	+	+	+	-	-
IL-3	-	-	-	-	-	-
IL-4	ND	ND	-	-	ND	ND
IL-6	+	+	+	+	+	+
IL-7	-	+	+	+	+	+
TNF α	-	-	-	-	+	-

El RNA se extrajo de células a un 70-80% de confluencia, siendo en todos los casos la viabilidad >80%. Por tanscripción inversa de cantidades equivalentes de RNA se obtuvo cDNA, que fue amplificados por PCR con oligonucleotidos específicos para los extremos 5' y 3' de la zona codificante de cada citoquina. La producción de transcritos específicos se visualizo en geles de agorosa al 1.5% por tinción con bromuro de etidio como se muestra en la Fig.22. Los datos de la tabla se obtuvieron simultaneamente en el mismo ensayo de PCR. líneas estromales de timo EFTI, EFTII, ETI, ETD; línea estromal de médula ósea, EBM; línea estromal de hígado fetal, EFL.

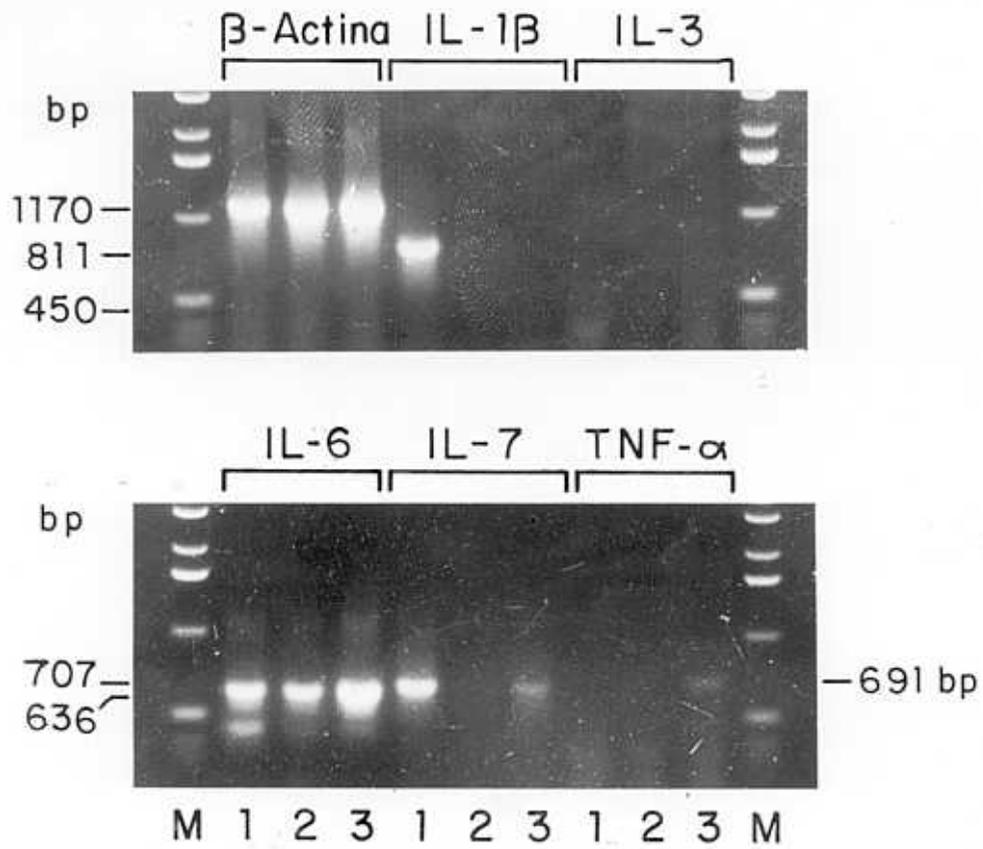


Fig.21. Cantidades equivalentes de cDNA obtenidas de cultivos secundarios de células adherentes procedentes de (1) timo, (2) médula ósea y (3) hígado fetal fue amplificado por PCR con oligonucleotidos específicos para las citoquinas indicadas.

pocillo en 0.5 ml. A partir de aquí se expanden, analizándose la expresión de AE3, TE3 y TE4 y la producción de citoquinas que se muestra en la Tabla 9. Aunque el número de líneas obtenidas no permite establecer estadísticamente una correlación entre fenotipo y producción específica de citoquinas, en líneas generales se observa que la expresión de ambas citoquinas, IL-1 β y IL-7, sólo se detecta en el caso que, tanto células TE3⁺ como TE4⁺ estén presentes. Independientemente de expresar uno u otro de estos macadores producen IL-7. Podría, por tanto, existir algún mecanismo de interacción entre ambos tipos de células que permitiría la regulación de la expresión de IL-1 β .

Tabla 9. Producción de RNA para linfoquinas en líneas epiteliales en base a expresión de TE3 y TE4

<u>líneas</u>	<u>linfoquinas</u>			
	Act	IL - 6	IL-1 β	IL - 7
<i>TE3⁺TE4⁻</i>				
EFT2.100A2	+	+	-	-
EFT2 100C2	+	+	-	-
EFT2.100A3	+	+	-	+
<i>TE3⁻TE4⁺</i>				
EFT1.100A3	+	+	-	+
EFT1 100A1	+	+	-	+
<i>TE3⁺TE4⁺</i>				
ET1.C4	+	+	+	+
ET1.C2	+	+	+	+
<i>TE3⁻TE4⁻</i>				
EFT1.100C1	+	+	-	-

Líneas de epitelio tímico fueron obtenidas por dilución límite y seleccionadas en base a la expresión de TE4 (marcador de epitelio presente en médula y corteza subcapsular tímica) y TE3 (marcador de corteza). La caracterización fenotípica y la producción de transcritos se realizaron simultáneamente.

3.2. LOS PRECURSORES HEMATOPOYETICOS DE HIGADO FETAL EN PRESENCIA DE EPITELIO TIMICO E IL-2 EXPRESAN IL-2R α Y SE DIFERENCIAN EN CELULAS TCR α/β^+ /CD4 $^+$.

En los procesos de maduración "in vitro" de células pro-T inducido por IL-2 tanto en cultivos policlonales (de la Hera y cols, 1989) como en ensayos de dilución límite anteriormente mostrados se ha puesto de manifiesto que las células del estroma tímico constituyen un elemento esencial, cuyo papel funcional a nivel de producción de mRNA para diferentes citoquinas ha sido mostrado en los anteriores apartados. Una cuestión fundamental que se plantea a la vista de estos resultados es si los precursores hematopoyéticos pretímicos presentes en el hígado fetal necesitarían señales, adicionales a la IL-2, proporcionadas por el estroma tímico para completar el programa de diferenciación del linaje T.

La capacidad de las células epiteliales tímicas para promover la diferenciación de los precursores tempranos presentes en el hígado fetal se ensayó "in vitro" cultivando células de hígado fetal de 10 semanas (CD45-7-3-2-4-8-IL-2R β^+ , α^-) en presencia de concentraciones de IL-2 saturantes para el receptor de afinidad intermedia (100U/ml). Para ello se emplearon monocapas de células de estroma tímico procedentes de líneas heterogéneas, de origen epitelial (>90%AE3 $^+$, <5%TE7 $^+$) productoras de IL-1 β , IL-7 e IL-6 (ETD y EFTII). Los ensayos de diferenciación se realizaron en paralelo utilizando una línea no productora ni de IL-1 β ni de IL-7 (EFTI). A los 5-7 días de cultivo se apreciaron células adheridas a ciertas áreas de la monocapa de células epiteliales (Fig.22). En estas condiciones de cultivo, se observó una respuesta proliferativa de las células de hígado fetal mayor a la observada en

los cultivos control suplementados con IL-2 y carente de células estromales apreciándose un incremento en la proliferación a partir del día 7 de cultivo y llegando a ser la recuperación celular del 128% a día 14. A las tres semanas de cultivo se analizaron por citometría de flujo los cambios moleculares asociados a esta proliferación observándose que ni con EFTI (mRNA IL-1-IL-7-) ni EFTII (mRNA IL-1+,IL-7+) se obtenían células que expresaran antígenos asociados a linaje T, de manera que aunque la mayoría de las células eran CD45+ y un 30% expresaban CD4, no se detectaron células positivas para CD7. Sin embargo con la línea de epitelio tímico ETD se observó que un 95% de las células expresaban CD45 de las cuales el 56% eran CD7+, de forma paralela a lo que ocurría con IL-2 sola. Un elevado porcentaje (85%) de estas células CD45+CD7+ expresaban altos niveles de CD2 (45% del total de la muestra). Es interesante destacar que de este 45% de células CD2+, la mayoría expresaban el IL-2R α (80%), constituyendo la población IL-2R α + el 47% de la población total (Tabla10).

La presencia de células T maduras en los cultivos se puso de manifiesto mediante el análisis de la expresión del complejo CD3, observándose un 30% de células CD3+. Estas células en un análisis biparamétrico (Fig.23) expresaban mayoritariamente el TCR α/β siendo prácticamente indetectable la presencia de células TCR γ/δ + De acuerdo con la ruta de diferenciación de células T establecida por otros autores en base a la expresión de CD4 y CD8, estas células CD3-TCR α/β + podrían estar incluidas en el compartimento de células doble positivas, doble negativas o células maduras que expresan de forma excluyente estos marcadores. Para abordar este aspecto se realizaron análisis biparamétricos de la expresión de CD4 frente a CD8, observándose que el 50% de las células

expresaban estos marcadores de forma excluyente e identificándose una población de células CD8⁺ (12%), y otra de células CD4⁺ (39%). Esta última población se subdivide en una población mayoritaria de células que expresan altos niveles de CD4 (30%), y otra minoritaria de expresión débil (9%). Por tanto, la población doble positiva no es detectable en este sistema experimental de diferenciación lo cual viene apoyado por la ausencia de expresión del marcador CD1a. El análisis biparamétrico de la expresión de CD3 frente a CD4 y CD8 mostró que la mayoría (81%) de las células CD3⁺ expresaban altos niveles de CD4⁺ mientras que <2% eran CD8⁺3⁺, no detectándose células doble negativas CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (Fig.23).

En este sistema de cultivo se analizó también la diferenciación de otros linajes hematopoyéticos, observándose que un 9% de las células expresaban el marcador de linaje mieloide CD14. Considerando que la expresión débil de CD4 se ha asociado al linaje monocítico/macrofágico ambos marcadores, CD4 y CD14, podrían expresarse asociados en una población incluida en dicho linaje.

En ausencia de IL-2 los precursores hematopoyéticos de hígado fetal cultivados sobre la monocapa de la línea epitelial ETD de timo no adquieren marcadores asociados a linaje T. El análisis fenotípico a los 7 días de cultivo muestra una población mayoritaria CD45⁺7⁻3⁻4⁻8⁻, presentando una cinética de proliferación dramáticamente reducida respecto a la obtenida en presencia de IL-2. Al no poderse prolongar los cultivo más de dos semanas en ausencia de IL-2, el análisis fenotípico no pudo realizarse en paralelo con los cultivos en presencia de IL-2.

Por lo tanto, estos resultados no sólo son una demostración "in vitro" del papel que las células epiteliales estromales tímicas tienen en el proceso de diferenciación de células T, sino que indican que sobre los precursores pretímicos pesentan la misma acción que sobre los intratímicos en presencia de IL-2, predominando la progenie de linfocitos T α/β .

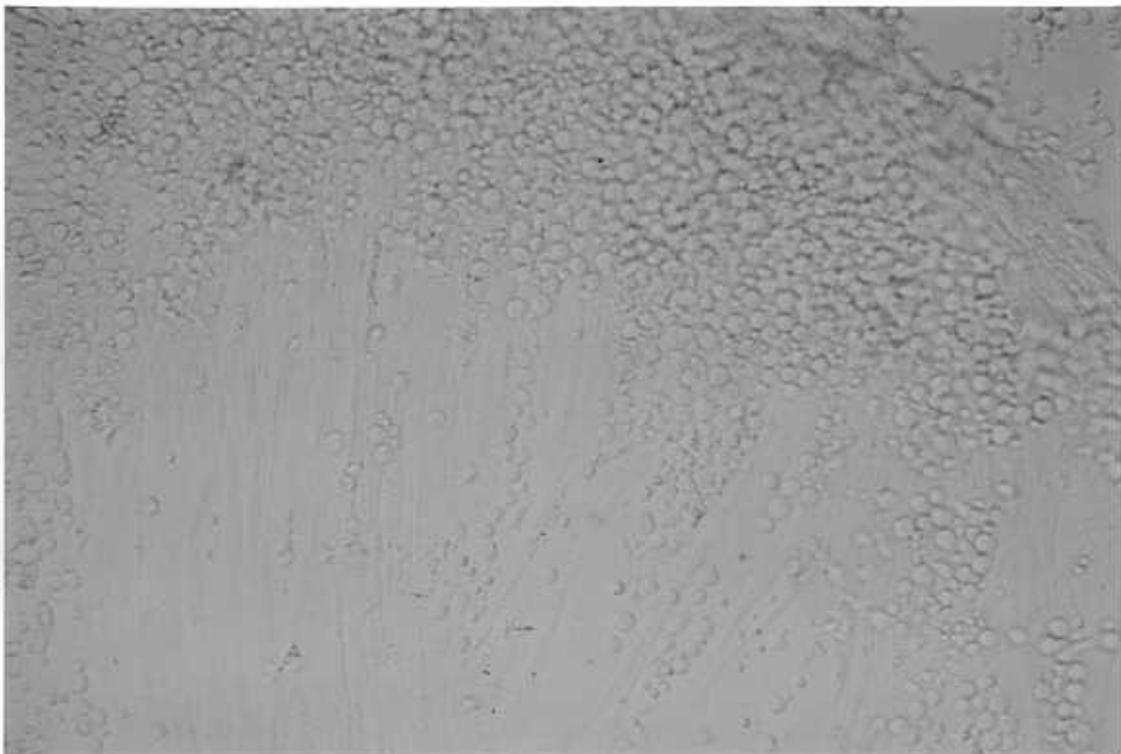


Fig.22 Cultivo de células de hígado fetal en presencia de estroma tímico y rIL-2. Células frescas de hígado fetal de 10 semanas (CD7⁻2⁻3⁻4⁻8⁻IL-2R β ⁺) se cultivaron durante 25 días sobre una monocapa de células de la línea de estroma tímico ETD (30-40% de confluencia), a los dos meses post-explante, en presencia de rIL-2 (100U/ml). La figura muestra células de hígado fetal adheridas a las células epiteliales, después de lavar suavemente con medio a 37°C.

Tabla 10. Generación de células maduras a partir de precursores hematopoyéticos de hígado fetal cultivados en presencia de epitelio tímico e rIL-2.

Marcadores	Porcentaje de células positivas			
	Días de cultivo			
	d7	d10	d15	d25
CD45	49	86	98	94
CD7	<0.1	2	20	52
CD1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
CD2	<0.1	<0.1	15	45
CD3	<0.1	<0.1	12 ^b	34
CD4	<1	20 ^d	8.7 ^b	30 ^{b+9d}
CD8	<1	<0.1	<0.1	12 ^b
α/β	<0.1	ND	ND	30
γ/δ	<0.1	ND	ND	1
Tac	5	9	15	49

Células de hígado fetal entre 9-10 semanas de desarrollo purificadas por centrifugación en Ficoll-Hypaque, se cultivaron sobre una monocapa de células estromales tímicas (ETD) en presencia de 100U/ml de rIL-2. Por inmunofluorescencia y citometría de flujo se analizó la expresión de diferentes marcadores en los días indicados.

^d expresión débil, ^b expresión brillante, ND: no determinado

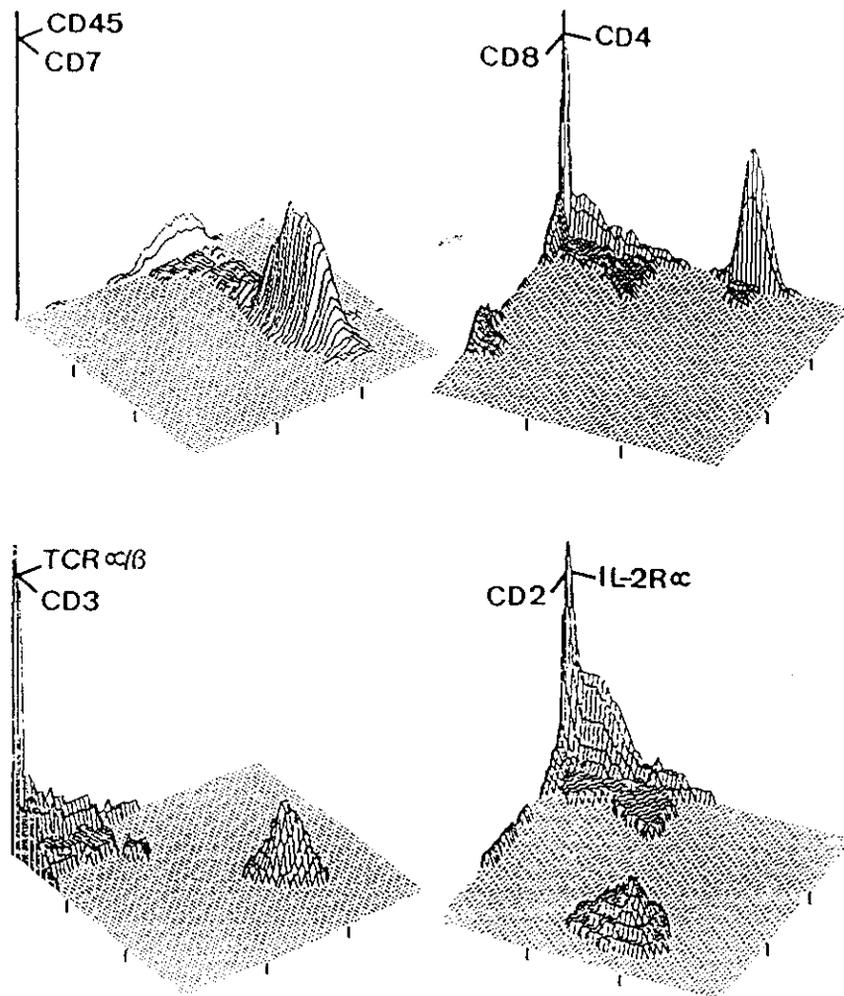


Fig.23. Análisis biparamétrico de la expresión de marcadores en células de hígado fetal sobre estroma tímico en presencia de IL-2 a día 25 de cultivo.

5. DISCUSSION

El momento en el que una célula pluripotencial toma la decisión de linaje específico, los procesos madurativos que ocurren desde el estadio de célula progenitora hasta el de célula funcionalmente madura, y los factores que influyen en este proceso (interacciones celulares, mediadores solubles) son, en líneas generales, cuestiones claves en todo proceso biológico de desarrollo. En cuanto a la linfopoyesis de las células T, el estudio de tales eventos se focaliza en el timo, que ejerce un papel fundamental en el desarrollo de este compartimento celular. Los precursores procedentes del hígado fetal y/o la médula ósea colonizan el timo donde complejos procesos reguladores darán lugar a células T maduras que saldrán al torrente sanguíneo, (Moore y cols, 1967). En el ratón, tanto experimentos de reconstitución "in vivo " como "in vitro" en cultivos de órgano, indican que la población intratímica CD3-4-8⁻ (triple negativa), contiene los precursores de todas las subpoblaciones tímicas, (Scollay y cols, 1988). En humanos, sin embargo, la metodología aplicada al estudio del desarrollo de células T, (relación progenitor-descendencia y factores que intervienen en el proceso), se basa en el empleo de análisis convencionales "in vitro". Estudios fenotípicos centrados en la expresión selectiva de distintos marcadores en los timocitos humanos durante el desarrollo embrionario (Haynes y cols, 1988b) y en la capacidad de generar linfocitos maduros "in vitro" de las diversas subpoblaciones intratímicas (Toribio y cols, 1988a; Haynes y cols, 1988a; Haynes y cols, 1989; Mossalayi, 1990), indican que las células CD7+2-3-4-8⁻ constituyen el estadio más temprano de desarrollo de los linfocitos T. La purificación de estas células y el conocimiento de sus requerimientos funcionales es, por tanto, imprescindible para

el entendimiento de los procesos madurativos que modulan el inicio de su programa genético de diferenciación y la adquisición final de la madurez funcional.

1. CARACTERISTICAS FENOTIPICAS Y MOLECULARES DE LOS PRECURSORES DEL HIGADO FETAL.

El hígado es el principal órgano hematopoyético durante los primeros meses de la embriogénesis en humanos, encontrándose una amplia variedad de subpoblaciones celulares hematopoyéticas en diferentes estadios de diferenciación. En el hombre, la población celular localizada en el hígado entre las 8 y 10 semanas de la embriogénesis, cuando el timo aún no ha adquirido su completa conformación estructural y por tanto la presencia en el hígado de células T recirculantes maduras procedentes del timo se puede considerar nula, está constituida mayoritariamente por células eritroides y sólo el 1-5% se incluye en la serie linfoide, existiendo un reducido porcentaje, no superior al 10% , que incluye otras estirpes hematopoyéticas así como células "blásticas" no adscritas a linaje (Haynes y cols, 1988a). Previos estudios han demostrado que el fraccionamiento de las células de hígado fetal mediante centrifugación en Ficoll-Hypaque, permite enriquecer en células de morfología linfoide y células blásticas (Rosenthal y cols., 1983, Haynes y cols., 1988a). El empleo de esta metodología con las muestras obtenidas de hígado fetal (8-10 semanas de gestación) permite el enriquecimiento de una población celular que presenta unas características de activación (alto contenido en DNA -Fig.1- y elevada expresión de Ags de activación 4F2 y TfR -Fig.2-) y un patrón fenotípico (ausencia de Ags específicos de linaje, así como

de moléculas MHC de clase I y clase II) similares a las que presentan las células definidas por Spangrude (1989) como "células stem determinadas a linaje" y diferentes de las células progenitoras multipotentes (de pequeño tamaño, quiescentes y positivas para el Ag CD34 en humanos). Al igual que en el hígado fetal de ratón donde las células stem constituyen entre el 0.5-1% en un periodo gestacional equivalente (previo a la aparición de precursores en timo) (Jordan y cols, 1990), las células pluripotenciales deben ser minoritarias en la fracción obtenida del hígado fetal humano. Por lo tanto, si comparamos nuestros datos con el esquema de compartimentalización del sistema hematopoyético establecido en el ratón por Spangrude (1989) y consideramos los parámetros comunes como las características físicas, expresión de marcadores de linaje, y la expresión de moléculas MHC de clase I, podríamos decir que la mayoría de las células de hígado fetal obtenidas mediante fraccionamiento en gradiente de Ficoll-Hypaque se encuentran en el estadio intermedio de "células stem determinadas a linaje".

La comparación con otras poblaciones precursoras obtenidas de médula ósea y timo postnatales, también carentes de marcadores adscritos a linajes hematopoyéticos, muestra que son las células procedentes del hígado las que mayor grado de activación presentan, lo cual podría sugerir su inclusión en un estadio de desarrollo más inmaduro, ya que las células de médula ósea expresan la molécula CD45, observándose además otra serie de moléculas entre las que se encuentran CD7 y Ags MHC en los precursores procedentes del timo (Fig. 3).

Aunque ni los Ag de activación ni los de adhesión son discriminatorios de linaje, otros marcadores empleados podrían,

sin embargo, estar dando una idea del grado de determinación a linaje que esta población celular procedente de hígado fetal presenta. Sabemos que un 50% de estas células expresan transcritos para IL-2R β , entre un 2 a 7% transcritos para CD3 y entre un 1 - 2% de las células son positivas para el Ag CD7 detectado por tinción intracitoplasmática mediante análisis inmunohistoquímicos (Datos no mostrados, Haynes y cols, 1988; Campana y cols, 1989). En los siguientes apartados analizaremos que grado de compromiso de linaje T está indicando la expresión de estos marcadores.

1.1. CD7: IMPLICACION DE SU EXPRESION EN LA DETERMINACION DE LINAJE T.

La expresión secuencial de marcadores linfoides en los precursores hematopoyéticos durante el desarrollo embrionario humano (Haynes y cols, 1988a; Campana y cols, 1989; Haynes y cols, 1989) junto con los datos obtenidos utilizando modelos de diferenciación de leucemias de células T y poblaciones precursoras normales (Bettaluga y cols, 1986; Toribio y cols, 1988a, b) indican que uno de los primeros Ag expresados durante la ontogenia de los linfocitos T es la molécula CD7. Aunque en las muestras obtenidas de hígado fetal entre las 8-10 semanas de gestación no se detectan células CD7+, trabajos de otros autores empleando técnicas inmunohistoquímicas en cortes de tejido de saco vitelino e hígado fetal, han localizado un pequeño porcentaje de células que expresan este Ag (<1%) desde la semana 7 del desarrollo embrionario humano (Haynes y cols, 1988a, Campana y cols, 1989; Haynes y cols, 1989). La menor sensibilidad de la citometría de flujo pudiera

dar cuenta de la ausencia de células CD7⁺ en nuestras muestras de hígado fetal en momentos tempranos de gestación. Por otro lado, también hay que considerar que las técnicas inmunohistoquímicas sobre cortes de tejido no pueden discernir entre un marcaje de membrana o intracitoplasmático y podría ocurrir que entre las 9 y 10 semanas de desarrollo este Ag sólo se presentase en el citoplasma.

Aunque la expresión de CD7 se mantiene a lo largo de todo el desarrollo de las células T, la presencia de este Ag en células inmaduras no parece determinar estrictamente linaje T. Así se ha observado que los precursores CD7⁺3⁻4⁻8⁻ pueden originar "in vitro", dependiendo de las condiciones de cultivo, células de linaje eritroide, megacariocítico y mielocítico/macrofágico (Kurtzberg y cols, 1989). Es más, nuestros resultados ponen de manifiesto que células pro-T intratímicas pueden originar mayoritariamente células de linaje NK (Tabla 4) o células de linaje T (Fig. 17), dependiendo de las condiciones de cultivo. Por otro lado, la expresión de CD7 también se ha descrito en células precursoras de linaje B, CD19⁺, procedentes de médula ósea (Grümayer y cols, 1991), lo cual confirma que la expresión de este Ag no está estrictamente adscrita a linaje T como ya habían indicado otros autores (Haynes y cols, 1989).

Aunque la función de CD7 se desconoce, se supone que esta molécula tiene un importante papel en momentos tempranos del desarrollo linfoide, posiblemente relacionado con la migración celular dirigida a órganos específicos. Se ha descrito un caso de inmunodeficiencia severa combinada en el que las células T presentes son deficientes para la expresión de CD7, presentando una respuesta proliferativa y producción de IL-2 marcadamente

reducida (Jung y cols, 1986). Por otro lado, en los ensayos de diferenciación de células de hígado fetal en presencia de IL-2 así como con IL-2 y estroma tímico, se obtiene un importante porcentaje de células CD7⁺ que con el tiempo van adquiriendo marcadores de maduración T (Tablas 3 y 10). Estas células CD7⁺ no se observan en los cultivos en presencia de IL4 (Tabla 3), donde la diferenciación de estirpe monocítica predomina, sugiriendo que la expresión de este marcador es un prerrequisito para la diferenciación T. Por tanto, la presencia de CD7 en membrana pudiera estar relacionada con células que han tomado una decisión de estirpe (linfoide, mieloide, etc) que posteriormente las células T mantienen y otros linajes pierden. Así, el alto porcentaje de células CD7⁺ identificado en el bazo a la 20 semanas de gestación (83%) respecto a un 30% de células T CD3⁺ y 13% de células B IgM⁺ (Tabla 2) podría estar indicando la presencia de precursores de otros linajes. Hay que tener en cuenta que el bazo también presenta actividad hematopoyética durante la vida fetal (Klein, 1989).

1.2. CD3: IMPLICACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA EL COMPLEJO CD3 EN LA DETERMINACION DE LINAJE T.

Las moléculas que forman el complejo CD3 se expresan en la membrana de linfocitos T asociadas a los componentes polimórficos del TCR (cadenas α/β o γ/δ). Sin embargo la expresión individual de cada una de las moléculas del CD3 (CD3 δ , ϵ , γ y ζ) tanto a nivel RNA como proteína se ha observado en linajes celulares distintos de los linfocitos T. Así, las células NK humanas de sangre periférica expresan mRNA específico para las cadenas CD3 ϵ y CD3 ζ

siendo negativas para CD3 γ y CD3 δ . A nivel proteico sólo la cadena CD3 ζ es detectada en membrana asociada a la molécula CD16, adscrita a linaje NK (Anderson y cols, 1989; Lanier y cols, 1989). Aunque la expresión de CD3 ζ , a la vista de estos resultados, no es estricta de linaje T, si parece tener un papel importante en el desarrollo y función de linfocitos T, ya que, la expresión en membrana del complejo TCR-CD3 funcionalmente competente es dependiente del ensamblaje de dicha cadena al heterodímero α/β unido a los componentes δ , ϵ , y γ del CD3, (Sussman y cols, 1988; Sancho y cols, 1989). Por tanto, en base a estos experimentos junto con otros realizados a nivel molecular en un gran número de líneas celulares (Van den Elsen y cols, 1984; Gold y cols, 1986; Krissansen y cols, 1986) se aceptó que la expresión a nivel proteico de CD3 ϵ , CD3 δ o CD3 γ así como a nivel RNA de CD3 γ y CD3 δ , podían ser utilizadas como marcadores específicos de linaje T.

Desde un punto de vista ontogénico la asociación de la expresión de estas moléculas del CD3 con la determinación de linaje T ó NK es aún un punto controvertido. Tanto nuestros datos como los datos de otros autores muestran que, dependiendo de las condiciones de cultivo, la progenie generada a partir de timocitos CD7⁺CD2⁻cCD3⁺mCD3⁻4⁻8⁻LinNK⁻ (c, citoplásmica; m, membrana), puede ser de estirpe NK (CD7⁺mCD3⁻CD56⁺) o de estirpe linfoide T (CD7⁺mCD3⁺CD56⁻). El análisis fenotípico y molecular de las células NK generadas a partir de células CD3⁻4⁻8⁻ muestra que estas células expresan transcritos para CD3 ϵ , CD3 γ y CD3 ζ y no tiene reordenados los genes del TCR (Poggi y cols, 1990). Es más, en condiciones de cultivo diferentes, empleando PHA en vez de PMA + IL-2 en análisis clonal, el grupo de Hori y cols (1991) describe también una progenie maoyoritaria NK y en alguno de los clones

detectan la expresión intracitoplasmática no sólo de CD3 ϵ sino también de CD3 δ . Estos datos apuntan a un precursor común para los dos lineajes celulares; precursor que expresaría todas las cadenas del CD3 o al menos CD3 ϵ y CD3 δ (considerando que por hibridación "in situ" más del 90% de la población pro-T purificada de timo expresa estas moléculas) y cuyo destino dependería del microambiente con el que interaccionase.

Por otra parte es notable resaltar que tanto en nuestros experimentos como en los de Furley y cols (1986) el porcentaje de células que expresan CD3 a nivel de RNA o proteína en el citoplasma es más elevado que el de células CD7 $^{+}$. Si estas subpoblaciones, CD7 $^{+}$ cCD3 $^{-}$ y CD7 $^{-}$ cCD3 $^{+}$, representan linajes separados de células NK o T quedaría pendiente de demostrar mediante ensayos de diferenciación con ambas subpoblaciones.

La expresión, por tanto, de componentes para el CD3 es un acontecimiento muy temprano en la ontogenia de células T, previo a la migración al timo, resultados que a nivel proteico, al menos para CD3 ϵ , habían mostrado otros autores (Furley y cols, 1986; Van Dongen y cols, 1988; Haynes y cols, 1989; Campana y cols, 1989). Otros puntos interesantes que quedan por determinar son la regulación temporal de cada uno de los componentes del CD3, así como la presencia de transcritos inmaduros en precursores, aspectos que darían una idea más completa sobre el mecanismo de regulación de expresión del complejo CD3, con posibles implicaciones en la determinación de linaje T o NK. De los datos obtenidos sólo se puede afirmar que el mRNA específico para CD3 ζ aparece después que los otros componentes, posiblemente una vez que han colonizado el timo. Aunque por los ensayos de northern en la población pro-T (datos no mostrados), sólo se detecta una banda

discreta para cada uno de los elementos del CD3 analizados, trabajos de otros grupos han puesto de manifiesto en ciertas líneas leucémicas de origen T, fenotípicamente similares a las subpoblaciones T inmaduras, la presencia de diferentes segmentos de mRNA. Así se ha descrito que tanto para CD3 γ (Krissansen y cols, 1986), como para CD3 ϵ y CD3 δ (Furley y cols, 1986; Tunnacliffe y cols, 1986) existen al menos dos transcritos, que en el caso de CD3 γ (3.5kb y 0.8kb) y CD3 δ dan proteína. En células T de sangre periférica el único transcrito descrito para CD3 γ es el de 3.5kd y son positivas en membrana, mientras que la línea T leucémica HSB2 sólo presenta el transcrito de 0.8kb, expresándose la proteína en el citoplasma. Por hibridación "in situ" no se puede distinguir la presencia de estos transcritos "inmaduros" y la técnica de northern no es suficientemente sensible para detectar estos bajos niveles de expresión. El clonaje de estas células y el análisis por northern de la expresión de RNA quizás permitiera dar luz sobre esta cuestión.

1.3. MOLECULAS DE ADHESION: SIGNIFICADO FUNCIONAL DE SU EXPRESION EN PRECURSORES DE CELULAS T.

El significado que pueda tener la expresión de LFA3 en hígado fetal y la baja expresión en precursores intratímicos pudiera estar relacionado, en esta etapa del desarrollo, con una potencial capacidad de migración, como ha sido indicado para las células T periféricas de memoria que expresan este Ag (Mackay y cols, 1990). Uno de los ligandos del LFA3 es la molécula CD2 (Dustin y cols, 1987) expresada en la superficie de las células T. Recientemente se ha descrito, además, que la interacción de monocitos por LFA3 con

CD2 purificado e inmovilizado induce la producción de $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$, reguladores de la respuesta inmune (Le P. y cols, 1987b; Webb y cols, 1990). El LFA3 es una molécula ubicua expresada en toda la serie hematopoyética, células epiteliales, endoteliales y fibroblastos. En base a la ausencia de expresión de CD2 en las células de hígado fetal se puede suponer que el ligando en este microambiente es distinto. Se han descrito dos isomorfos para LFA3, derivados de un procesamiento diferencial del mRNA. Ambos pueden unir activamente CD2 pero tanto su significado funcional como la capacidad de unir otro ligando, se desconoce (Springer, 1990).

Por otra parte, es interesante mencionar que las células memoria y en asociación funcional con su dinámica circulatoria, presentan un fenotipo similar a estas células de hígado fetal de 9-10 semanas de edad en cuanto a la expresión de moléculas implicadas en adhesión como LFA-3, CD29 y CD44. Además, las células memoria expresan específicamente CD45RO como los precursores mas inmaduros de médula osea (Lansdorp y cols 1990) pero a diferencia de estos precursores hematopoyéticos, y en similitud con los precursores intratímicos, expresan altos niveles de LFA-1. El LFA-1 es un marcador exclusivo de leucocitos y en precursores en raton se ha asociado a estadios concretos de diferenciación (Shortman y cols, 1988), aunque no se ha determinado si se adquiere en el timo. Se sabe que tiene un papel fundamental en la interacción de timocitos activados con células epiteliales a través de la molécula ICAM-1. De hecho la expresión de ambos marcadores se da en timo fetal desde las 9.5 semanas de desarrollo (Singer y cols, 1990). Sería en este sentido muy interesante determinar si el LFA-3 tiene una regulación negativa

una vez fuera del microambiente hematopoyético hepático y si este tipo de regulación va acompañado de una expresión de LFA-1, que se adquiere en timocitos precursores. Lo que si parece claro es que la expresión de la molécula LFA-1 es más estable en cuanto a que sus niveles no se modifican con el estado de activación celular, mientras que el LFA3 parece estar adscrito a determinadas fases de activación celular .

El papel potencial de la interacción de precursores T con elementos de la matriz extracelular se sugirió por vez primera en el trabajo de Cardelly y cols,1988, donde células CD4-CD8⁻ de timo tenían expresión preferencial de VLA-5 frente a los timocitos maduros. Por otra parte VLA-4, que interacciona tanto con elementos de matriz extracelular (fibronectina) como con receptores específicos celulares (VCAM-1), ha sido directamente implicado en procesos de linfopoyesis en ratón, de manera que Abs contra esta estructura en cultivos de precursores linfoides de hígado fetal sobre estroma de médula ósea, inhiben totalmente la generación de linfocitos y parcialmente la de mielocitos (Miyake y cols, 1991) Teniendo además en cuenta el papel de estas moléculas en la migración específica de linfocitos maduros a organos linfoides y localizaciones de inflamación, cabe pensar que su expresión esté relacionada con funciones similares a las que presentan en otras subpoblaciones linfoides y que la intensidad de expresión en membrana tenga importantes repercusiones funcionales, considerando que algunas de ellas, tales como el LFA-3, están directamente implicadas en la activación de la producción de citoquinas, concretamente en la producción de IL-1 β (Webb y cols, 1990). La distribución "in vivo" de ligandos como ICAM-1/ICAM-2, fibronectina (FN), laminina (LN), CD2 ó ICAM-V, pueden

determinar las funciones efectoras específicas que ocurren en un sitio anatómico concreto. La existencia de múltiples rutas de adhesión, varios ligandos para un solo receptor (VLA4/VCAM1-FN, LFA1/ICAM1-ICAM2), múltiples receptores para un solo ligando (VLA4/FN, VLA5/FN), así como la regulación de la expresión de ligando por diferentes citoquinas (regulación positiva de ICAM-1 por IL-2 y INF γ), proporcionan oportunidades de cooperación, redundancia y diversidad que las células T y sus precursores emplearían para regular de forma muy estricta sus interacciones adhesivas.

1.4. REAGRUPAMIENTO Y EXPRESION DE LOS GENES ESPECIFICOS DEL RECEPTOR DE LAS CELULAS T. LOCALIZACION ESPACIAL Y TEMPORAL DURANTE LA ONTOGENIA

El primer receptor que aparece durante el desarrollo de las células T en el timo es el TCR γ/δ (Havran y Allison, 1988; Pardoll y cols, 1987). El hecho de que en ratón se haya mostrado la expresión de V γ 7 en células de hígado fetal en periodos previos a la colonización tímica (Carding y cols, 1990), así como el aislamiento de clones TCR γ/δ^+ CD4 $^+$ de hígado fetal humano de 20 semanas con características propias no detectadas en los clones de timo (Aparicio y cols, 1989), ha llevado a la conclusión de que, aunque en bajos niveles, el reordenamiento de los genes para el TCR γ/δ y su expresión ocurren durante el desarrollo sin el requerimiento del microambiente tímico. El reordenamiento y expresión de estos genes extratímicamente podría reflejar la contribución endodérmica común al proceso en hígado y timo fetal, así como la implicación en el mismo de la IL-4, dada su disponibilidad en el

microambiente hepático, ya que esta linfoquina está implicada en la diferenciación selectiva de células T γ/δ^+ a partir de precursores intratímicos CD7+2+3-4-8- "in vitro" (Bárcena y cols, 1990).

Nuestros datos ponen de manifiesto que el reordenamiento de los genes que codifican para la cadena γ se produce en periodos muy tempranos de la ontogenia, previamente a la colonización tímica, y que este tipo de reordenamiento prevalece en las células de hígado fetal independientemente de la edad de gestación (Fig.8). Por su tamaño en el análisis por southern, estos reordenamientos detectados por la sonda específica para el segmento J γ 1 podrían corresponder a un reordenamiento del segmento V γ 9 (su confirmación queda pendiente de la hibridación con sondas específicas) (LeFranc y cols, 1986). Este reordenamiento limitado de segmentos no solo es una característica de la localización extratímica de los precursores T, sino que también está regulado ontogénicamente, ya que, aunque a las 20 semanas de gestación en el timo se observan reordenamientos que afectan a diferentes segmentos V γ (V γ 4, V γ 9, V γ 3 y V γ 8) así como en los precursores pro-T de timo neonato (Fig.10) (LeFranc y cols, 1986), en clones γ/δ de timo fetal de 8.5 semanas de gestación se ha determinado que el reordenamiento V γ 9 junto con V γ 1 son preferenciales (Kranzel y cols, 1990). En conclusión podríamos decir que en la regulación de los reordenamientos de los segmentos génicos que codifican para la cadena γ hay un componente local, de manera que en las células de hígado fetal de 20 semanas sigue predominando un solo reordenamiento, mientras que en el timo se produciría la diversificación de dichos reordenamientos, ampliando el número de segmentos V γ empleados. Por otra parte, el reordenamiento de la cadena β del TCR parece tener un control más estricto en cuanto a

su localización, de forma que solamente una pequeña fracción de los precursores intratímicos, células pro-T, presentan reordenamientos que afectan al segmento C β .

Igualmente, la producción de transcritos maduros parece estar regulada intratímicamente ya que, mientras en los precursores intratímicos, células pro-T, se detectan transcritos maduros para TCR γ e inmaduro para TCR β (Fig.10), en la población de hígado fetal, incluso a las 20 semanas de edad, no se producen transcritos detectables por sondas C β y C γ . Bien la falta de sensibilidad de la técnica o que los transcritos presentes no incluyan el segmento C, podrían dar cuenta de estos resultados.

2 EL HIGADO FETAL COMO LOCALIZACION EXTRATIMICA DE MADURACION T.

El progresivo aumento de las células con características fenotípicas maduras en el hígado fetal se analizó mediante la expresión del complejo CD3., llegando a observarse un 8% de células CD3⁺a las 20 semanas de desarrollo embrionario. Estos datos planteaban la posibilidad de que el microambiente hepático pudiese ser capaz de proporcionar las señales adecuadas para la diferenciación de linaje T durante los primeros meses del desarrollo fetal humano como otros autores han propuesto (Kamps y cols, 1989). Desde nuestro punto de vista, considerando que el timo presenta un perfil celular y estructural similar al neonato a partir de las 15 semanas de desarrollo, estas células T maduras presentes en el hígado fetal a partir de la semana 12-13 de la embriogénesis, podrían representar una subpoblación recirculante.

Sin embargo, existe un dato que podría apoyar la idea de que el hígado puede ser un órgano generativo de células T maduras. Por una parte el 9% de las células de hígado fetal de 20 semanas de gestación expresan el Ag CD1, porcentaje similar a CD8 y ligeramente menor a CD4, lo cual pudiera estar relacionado con la presencia de células CD4⁺8⁺, estadio intermedio en la ruta de diferenciación T intratímica, que expresan el Ag CD1 (de la Hera y cols, 1991). En sangre periférica las células positivas para este marcador no superan el 1% (Reinherz y cols, 1980; Blue y cols., 1985). También hay que considerar que la expresión de CD1 se ha descrito en células dendríticas (Landry y cols, 1989), con lo que existe la posibilidad de que en vez de adscribirse a células CD4⁺8⁺ pudiera estar identificando este otro tipo de células estromales.

3. RUTAS DE MADURACION T: IMPLICACION DEL ESTROMA TIMICO Y FACTORES SOLUBLES.

Nuestros datos han puesto de manifiesto que tanto la IL-2 como la presencia de estroma tímico constituyen elementos fundamentales en el establecimiento de la ruta de maduración T. Así, las células precursoras del linaje T presentes en el hígado fetal cultivadas en presencia de cantidades suficientes de rIL-2 para saturar el receptor de afinidad intermedia, IL-2R β , adquieren un fenotipo inmaduro CD7⁺8⁺2[±] que pudiera estar incluido en la ruta de diferenciación del linaje T, ya que experimentos de diferenciación "in vitro" en ratón con una población tímica fenotípicamente similar (CD3⁺4⁺8⁺) han puesto de manifiesto su capacidad como células precursoras de las poblaciones CD4⁺8⁺ y células maduras CD4⁺8⁻/CD4⁻8⁺ (Tatsumi y cols,1990). De

cualquier forma los intentos de diferenciación de esta población $CD7+8+2^{\pm}$ sobre células de estroma en presencia de rIL-2 han resultado infructuosos quedando pendiente la demostración como progenitor de células T maduras. Sin embargo, cuando las células de hígado fetal son cultivadas desde el principio en presencia de estroma tímico e IL-2, estas células pueden completar la ruta de maduración de linaje T, obteniéndose células $TCR\alpha/\beta+CD4^{+}$. Estos precursores T presentes en el hígado fetal presentan un comportamiento similar a los precursores pro-T intratímicos, los cuales en ausencia del componente celular estromal no proliferan ni se diferencian hacia células T maduras en respuesta a IL-2 (De la Hera y cols, 1989), predominando las células con características fenotípicas de linaje NK, parte de las cuales expresan incluso el marcador CD8. En base a estos datos una de las primeras cuestiones que se plantean es saber a través de qué mecanismos el estroma tímico está modulando la ruta de maduración linaje T frente a linaje NK, así como la de células $T\alpha/\beta$ frente a células $T\gamma/\delta$. Es, por tanto, importante conocer qué factores está produciendo el estroma y qué papel representa las interacciones celulares con dicho estroma tímico. Estas cuestiones se tratarán desde dos puntos de vista: desde los sistema de diferenciación "in vitro" así como desde la perspectiva ontogénica, ya que hay una secuencia temporal durante el desarrollo en la aparición de células $T\gamma/\delta$ frente a células $T\alpha/\beta$.

3.1 PARTICIPACION DEL ESTROMA TIMICO EN EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T.

El papel fundamental del estroma tímico en el proceso de maduración de los precursores de diferentes linajes hematopoyéticos ha sido demostrado previamente en numerosos trabajos (Beardsley y cols, 1983; Singer y cols, 1986; Papiernik y cols, 1987; Wiranowska y cols, 1987; Palacios y cols, 1989; Tatsumi y cols, 1990). Muchos esfuerzos se han dirigido a la asignación de papeles específicos de subpoblaciones estromales tímicas en el proceso de desarrollo de células T, no sólo para células epiteliales (Palacios y cols, 1989; Gutierrez y cols, 1991), sino también con macrófagos y células dendríticas (Papiernik y cols, 1987). A nivel mRNA hemos puesto de manifiesto la capacidad que tienen estas células estromales cultivadas, procedentes de diferentes órganos hematopoyéticos, para producir diferentes citoquinas en ausencia de estímulos externos. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por otros autores, tanto en ratón (Palacios y cols, 1989; Gutierrez y cols, 1991) como en humanos (Le y cols, 1987a; Dorshkind, 1990). Aunque en los cultivos de células epiteliales de timo no hemos detectado producción de transcritos para IL-3, parece que estas células sí tienen la potencialidad de producir dicha linfoquina, ya que cuando se cultivan en presencia del factor de crecimiento epidermal, la producción de IL-3 es detectable tanto a nivel RNA como proteína (Dalloul y cols, 1991). Por tanto, las células epiteliales de timo si son capaces de producir IL-3 aunque no de forma intrínseca, como ocurre con el resto de las de las citoquinas analizadas. Discernir el papel que cada uno de los factores solubles que producen estas

células epiteliales tímicas (IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, GM-CSF, G-CSF y M-CSF (Le y cols, 1987a; Le y cols, 1988, Dalloul y cols, 1991), pueda tener en la diferenciación T α/β - γ/δ intratímica, así como en la determinación de otros linajes es una cuestión sencilla. En nuestras manos la única linfoquina que se produce en timo y no por otros estromas de órganos hematopoyéticos, como son el de médula osea e hígado fetal, es la IL-1 β ., lo cual induce a pensar que esta linfoquina pudiera jugar un papel esencial en la ruta de maduración T.

Antes de proseguir con el papel de los factores solubles en la diferenciación T, hay que considerar que las interacciones con el estroma pueden constituir un elemento importante en los procesos de maduración intratímicos. De hecho, el cultivo sólo con sobrenadante de estos estromas permite una ruta de diferenciación principal mieloide o eritroide pero no T (Kurzberg y cols, 1989), lo cual indica que no sólo la disponibilidad de factores, sino la regulación de su disponibilidad y concentración en un momento determinado, puede tener un papel crítico en la decisión y proceso de maduración del linaje T. Se ha descrito que células epiteliales tímicas se unen a timocitos quiescentes via CD2/LFA-3 (Volleger y cols, 1987) y que esta interacción no sólo induce la activación de timocitos inmaduros CD3⁺4⁻8⁻ sino que, también, induce la producción de IL-1 (Le y cols, 1987b). Esto podría, por una parte, explicar por qué, aún utilizando dos tipos de líneas celulares estromales tímicas que producen mRNA específico para IL-7 y IL-1 β (ETD y EFTII) en los ensayos de diferenciación de precursores hematopoyéticos de hígado fetal, presentan efectos diferentes, pudiendo ser muy distintas las interacciones celulares que se establecen. Para abordar esta cuestión habría que realizar no sólo

un detallado análisis del nivel de producción de linfoquinas a nivel mRNA y proteína, sino que, también, la relación de células de corteza/médula tímica podría tener repercusiones en el establecimiento de las interacciones específicas. Así, en ratón, se ha puesto de manifiesto que el tipo de célula tímica epitelial empleado en los ensayos de diferenciación, no solo determina la capacidad de maduración de los precursores, sino que, también modula la subpoblación T madura obtenida en función de la expresión del TCR y de las moléculas CD4 y CD8 (Palacios y cols, 1989).

3.2. DIFERENCIACION DE LINAJE T FRENTE A LINAJE NK. DIFERENCIACION DE CELULAS T α/β FRENTE A CELULAS T γ/δ .

Uno de los aspectos más sobresalientes en la caracterización de los precursores hematopoyéticos de hígado fetal es la expresión del receptor de afinidad intermedia de la IL-2, IL-2R β y su implicación funcional en la ruta de diferenciación a linaje T. Sin embargo la funcionalidad de la ruta IL-2/IL-2R no sólo está implicado en en procesos de diferenciación y proliferación de linfocitos T ya que, la expresión del IL-2R también se ha descrito en células B (Tigges y cols, 1989), (Muraguchi y cols, 1985), monocito/macrófagos (Espinoza-Delgado y cols, 1990) y células NK (Siegel y cols, 1987) lo cual podría estar indicando que esta ruta presenta una función generalizada modulada por el microambiente de desarrollo. Así, y como previamente fue discutido, la determinación de linaje T o NK bajo la presión selectiva de la IL-2 parece estar modulada por la presencia de estroma tímico. Estas células estromales pudieran estar ejerciendo una regulación

positiva sobre la expresión a nivel proteico de los componentes del CD3-TCR promoviendo la ruta de maduración T. Por otro lado experimentos del grupo de Hogg y Spits, 1991, muestran que en cultivos policlonales de timocitos CD3-4-8⁻ (sin depleccionar de células estromales) en presencia sólo de de PHA predomina una progenie celular de estirpe NK. Por lo tanto sólo la combinación de los dos factores, IL-2 más estroma tímico determina una ruta de maduración T. No sólo nuestros datos muestran que en cultivos en dilución límite de precursores intratímicos en presencia de IL-2 se obtiene diferenciación preferencial de linaje NK, datos de otros autores en condiciones de cultivo similares o en presencia de coestimulantes como PMA, PHA o mAbs anti-CD2 obtienen células NK (Denning y cols, 1989; Groh y cols, 1990; Poggio y cols, 1990; Hogg y cols, 1991).

Recientemente se ha descrito que las células pro-T cultivadas en presencia de IL-4 proliferan y se diferencian hacia células T γ/β funcionalmente competentes. Esta respuesta es independiente tanto de la ruta madurativa inducida por el IL-2/IL-2R, como de la presencia de estroma tímico, ya que, tanto los cultivos policlonales de células seleccionadas en base a la expresión de CD7 como los ensayos de diferenciación en dilución límite en presencia de esta linfoquina promueven la diferenciación de células T $\gamma\delta$ (Barcena y cols, en prensa, 1991). Hay que tener en cuenta que la población de partida, células pro-T, tienen reordenados los loci para la cadena γ y δ presentando en configuración germinal los loci para las cadenas α y β . El reordenamiento y expresión de α y β , parece, por lo tanto, depender de señales específicas proporcionadas por el componente estromal tímico, entre las cuales podría encontrarse la IL-1 β , producida específicamente por estas células estromales. La IL-1 no

sólo se ha descrito que induce la producción de IL-2 y IL-2R (Falk y cols, 1989; Rothemberg y cols, 1990), sino que también se ha descrito recientemente que induce la transcripción de mRNA para la cadena α del TCR en timocitos CD3⁺4⁺8⁻ de ratón (Takashi y cols, 1991). Los mecanismos que intervienen en el proceso de regulación de esta cadena α a través de la IL-1 se desconocen, pero pudieran también estar implicado de forma simultánea la activación de las secuencias silenciadoras de la cadena δ , inhibiéndose la expresión del receptor γ/δ previamente reordenado en la población precursora, a la vez que se activa el α/β , lo cual podría explicar por qué las células pro-T en presencia de IL-2+IL-4 predomina la progenie T α/β .

¿Qué características se dan durante la ontogenia de las células T para que aparezcan primeramente las células T γ/δ ? Hay que considerar que el reordenamiento de los componentes del receptor γ/δ se produce incluso antes de la colonización tímica lo cual da ya idea de la independencia que tienen estas células del microambiente tímico, al menos algunas de las familias V γ . El pico máximo de células γ/δ en el timo humano se produce a la semana 9.5 de desarrollo (Haynes y cols, 1988b) y aunque en humanos no se conoce con exactitud, por los datos en ratón (Carding y cols, 1989), que indican la existencia de un pico máximo de producción de IL-4 anterior al de IL-2 en momentos muy tempranos del desarrollo tímico (día 14-15), podría suponerse que esa aparición temprana de células γ/δ en humanos podría estar determinada por la disponibilidad en el medio de IL-4 que pudiera también estar implicada en el reordenamiento extratímico, en precursores de hígado fetal, de la cadena γ del TCR. También hay que tener en cuenta que la completa configuración del estroma tímico no se produce hasta la semana 12 de desarrollo embrionario, momento en el

cual, la disponibilidad de IL-1 junto con IL-2 pudieran estar modulando la expansión de las células α/β .

6. CONCLUSIONES

1.- Los precursores hematopoyéticos presentes en el hígado fetal humano entre las 9 y 10 semanas del desarrollo embrionario, no expresan en membrana antígenos asociados a linaje T, B, mielocítico o NK. Tampoco se detectan los antígenos CD34 y CD38, expresados por precursores aislados de médula osea y timo, ni antígenos MHC de clase I y II. Son células activadas con un alto contenido en DNA y una elevada densidad de expresión de antígenos de activación 4F2 y TfR.

2.- La expresión de las moléculas de adhesión LFA-3 y VLA-4 en los precursores hematopoyéticos presentes en el hígado fetal sugieren que las interacciones que establecen estos precursores con el microambiente hepático podrían estar mediadas, al menos, por dichas moléculas, mientras que los precursores intratímicos pierden la expresión de LFA-3 y mediarían estas interacciones por diversas estructuras de membrana entre las que se encuentran CD45, CD7, LFA1, VLA4 y moléculas del MHC de clase I y II.

3.- La activación de la expresión de mRNA específico para CD3 δ , CD3 γ , CD3 ϵ y CD3 ζ es un acontecimiento temprano en la ontogenia de linfocitos T e independiente del microambiente tímico.

4.- La mayoría de los precursores hematopoyéticos del linaje T presentes en el hígado fetal entre las 9 y 20 semanas de gestación no han iniciado el reordenamiento de los genes que codifican para la cadena β del TCR. Sin embargo, el reordenamiento de los genes que codifican para la cadena γ , al menos los que implican al segmento V γ 9, se inician en el hígado fetal independientemente del microambiente tímico. Por su parte los precursores T intratímicos

presentan reordenamientos múltiples que afectan a diversas regiones V γ .

5.- En el hígado fetal no se detectan transcritos específicos para C β ni C γ del TCR que si son expresados por las células precursoras pro-T intratímicas. Por tanto, la activación de la expresión de genes que codifican para el TCR, al menos los que incluyen los segmentos génicos C β , C α y C γ es dependiente del microambiente tímico.

6.- Tanto las células pro-T intratímicas como las células de hígado fetal expresan la cadena β del IL-2R y unen IL-2 con afinidad intermedia. La expresión de receptores de baja, IL-2R α , y alta afinidad, IL-2R α/β , en los precursores hematopoyéticos de hígado fetal es inducida en presencia de células estromales tímicas.

7.- La activación de los genes que codifican para la IL-2 requiere el microambiente tímico, mientras que las señales inductoras para la producción de IL-4 son menos estrictas, ya que esta linfoquina, aunque en bajos niveles, es producida por los precursores del hígado fetal en momentos tempranos de la embriogénesis.

8.- La IL-2 es capaz de iniciar un programa genético de diferenciación en las células de hígado fetal induciendo la expresión de los antígenos CD7 y CD8, generando así una subpoblación posiblemente intercalada en la ruta de diferenciación T. Este programa inicial de maduración necesita la presencia de estroma tímico para su finalización y obtención de células T maduras TCR $^+$ 8.-

9.- Las células del estroma tímico obtenidas "in vitro", mayoritariamente de origen epitelial, producen transcritos para IL-1 β , -6, -7 y TNF α . La producción de IL-1 β es específica de células estromales procedentes de timo, no detectándose transcritos específicos en células estromales procedentes de médula ósea e hígado fetal.

10.- La producción de IL-7 es intrínseca en la mayoría de las líneas celulares epiteliales obtenidas de timo independiente de su fenotipo, mientras que la producción de IL-1 β parece depender de la presencia simultánea de poblaciones TE4 $^{+}$ y TE3 $^{+}$

7. BIBLIOGRAFIA

- Abo, T. & Balch, C. M. (1981). A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J. Immunol.* 127, 1024.
- Adkins, B., Mueller, C., Okada, C. Y., Reichert, R. A., Weissman, I. & Spangrude, G. (1987). *Early events in T cell maturation.* *Ann. Rev. Immunol.* 5, 325.
- Allison, J. P. & Lanier, L. L. (1987). Structure, function and serology of the T-cell antigen receptor complex. *Ann. Rev. Immunol.* 5, 503.
- Anderson, P., Caligiuri, M., Rotz, J. & Schlossman, S. (1989). CD3-negative natural killer cells express ζ TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 341, 159.
- Aparicio, P., Alonso, J. M., Toribio, M. L., Gutierrez, J. C., Pezzi, L. & Martinez-A, C. (1989). Differential growth requirement and effector function of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ human T cell. *Immunol. Rev.* 111, 5.
- Aramburo, J., Balboa, M. A., Ramirez, A., Silva, A., Acevedo, A., Sánchez-Madrid, F., De Landázuri, M. O. & Lopez-Botet, M. (1990). A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor- $\gamma\delta^+$ T lymphocytes. *J. Immunol.* 144, 3238.
- Band, H. F., Hochstenbach, F., McLean, J., Hata, D., Krangel, M. S. & Brenner, M. B. (1987). Immunochemical proof that a novel rearranging gene encode the T cell receptor δ subunit. *Science* 238, 682.
- Barcena, A., Toribio, M. L., Pezzi, L. & Martinez-A, C. (1990). A role for interleukin 4 in the differentiation of mature T cell receptor $\gamma\delta^+$ cells from human intrathymic cell precursors. *J. Exp. Med.* 172, 439.
- Barnstable, C. J., Bodmer, C. J., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F. & Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetical analysis. *Cell* 14, 9.
- Beardsley, T. R., Pierschbacher, M., Wetzel, G. D. & Hays, E. (1983). Induction of T-cell maturation by a clones line of thymic epithelium (TEPI). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 6005.
- Ben Slimane, G., Houillier, F., Tucker, G. & Thiery, J. P. (1983). In vitro migration of avian haemopoietic cells to the thymus: preliminary characterization of a chemotactic mechanism. *Cell. Diff.* 13, 1.
- Berenson, R. J., Bensiger, W. I., Kalamasz, D., Knitter, G., Buckner, C. D. & Berstein, I. D. (1988). Antigen CD34⁺ marrow elements engraft lethally irradiated baboons. *J. Clin. Invest.* 106, 2183.
- Berger, A. E., Davis, J. E. & Cresswell, P. (1981). A human leukocyte antigen identified by a monoclonal antibody. *Human Immunol.* 3, 231.
- Berger, C. N. & Epstein, C. J. (1989). Delayed thymocyte maturation in the trisomy 16 mouse fetus. *J. Immunol.* 143, 389.
- Bernardi, P., Patel, V. P. & Lodish, H. F. (1987). Lymphoid precursor cells adhere to two different sites on fibronectine. *J. Cell. Biol.* 105, 489.

- Bettaluga, S., Raffed, M., Lipford, E. H. & Cossman, J. (1986). 3A1 (CD7) expression precedes T gene rearrangements in precursor T (lymphoblastic) neoplasma. *Blood* 68, 134.
- Bierer, B. E., Sleckmann, B. P., Rotnofsky, S. E. & Burakoff, S. S. (1989). The biologic roles of CD2, CD4 and CD8 in T-cell activation. *Ann.Rev.Immunol.* 7, 579.
- Blackman, M. A., Kappler, J. W. & Marrack, P. (1988). T-cell specificity and repertoire. *Immunol.Rev.* 101, 5.
- Blue, M. L., Daley, J. F., Levine, H. & Schollossman, S. F. (1985). Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two color fluorescence flow cytometry. *J.Immunol* 134, 2281.
- Boersma, W. (1981). Prothymocytes in mouse fetal liver. *Thymus* 5, 419.
- Born, W., Rathbun, G., Tucker, P., Marrack, P. & Kappler, J. (1986). Synchronized rearrangement of T-cell γ and β chain in fetal thymocyte development. *Science* 234, 479.
- Born, W., White, J., O'Brien, R. & Kubo, R. J. (1988). Development of T cell receptor expression: studies using T cell hybridomas. *Immunol Res* 7, 279.
- Brekelmans, P. & van Ewijk, W. (1990). Phenotypic characterization of murine thymic microenvironments. *Seminars in Immunol* 2, 13.
- Campana, D., Janossy, G., Coustan-Smith, E., Amlot, P. T., Tian, W., Ip, S. & Wong, L. (1989). The expression of T cell receptor-associated proteins during T cell ontogeny in man. *J.Immunol* 142, 57.
- Campbell, A. D., Long, M. W. & Wicha, M. S. (1987). Haemonectin, a bone marrow adhesion molecule specific for cells of granulocyte lineage. *Nature* 329, 744.
- Cardelli, P. M. (1988). Preferential expression of fibronectin receptors on immature thymocytes. *J.Cell.Biol.* 106, 2183.
- Carding, S. R., Jenkinson, E. J., Kingston, R., Hayday, A. C., Botmmly, K. & Owen, J. J. T. (1989). Developmental control of lymphokine gene expression in fetal thymocytes during T-cell ontogeny. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 86, 3342.
- Carrera, A. C., Sánchez-Madrid, F., López-Botet, M., Bernabeu, C. & O.de Landázuri, M. (1987). Involvement of the CD4 molecule in a post-activation event on T cell proliferation. *Eur.J.Immunol.* 17, 179.
- Cederig, R., Lowenthal, J. W., Nabholz, M. & McDonald, R. (1985). Expression of IL-2R as a differentiation marker on intrathymic stem cells. *Nature* 314, 98.
- Cederig, R. (1986). Prolifetation in vitro and interleukin production by 14 day fetal and adult $\text{Lyt}2^-/\text{L3T}4^-$ mouse thymocytes. *J.Immunol* 137, 2260.
- Chirwing, J. M., Pryzbyla, A. E., Mac Donald, R. J. & Rutter, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 18, 5294.
- Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Flackler, M. J., Schwartz, J. F. & Shaper, J. H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell

- surface antigen defined by monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J.Immunol.* 133, 157.
- Clark, E. A. & Ledbetter, J. A. (1989). Leukocyte cell surface enzymology: CD45 (LCA, T200) in a protein tyrosine phosphatase. *Immunol.Today* 10, 225.
- Dalloul, A. H., Arick, M., Fourcade, C., Hatzfeld, A., Bertho, A. M., Debre, P. & Mossalayi, M. D. (1991). Human thymic epithelial cells produce interleukin-3. *Blood* 77, 69.
- De la Hera, A. M., Toribio, M. L., Márquez, C. & Martínez-A, C. (1985). Interleukin 2 promotes growth and cytolytic activity in human T3⁺4⁻8⁻ thymocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 82, 6268.
- De la Hera, A., Toribio, M. L., Márquez, C., Marcos, M. A. R., Cabrero, E. & Martínez-A, C. (1986). Differentiation of human mature thymocytes: existence of a T3⁺4⁻8⁻ intermediate stage. *Eur.J.Immunol.* 16, 653.
- De la Hera, A., Toribio, M. L. & Martínez-A, C. (1989a). Delineation of human thymocytes with or without functional potential by CD1-specific antibodies. *International Immunol* 1, 496.
- De la Hera, A., Martson, W., Aranda, C., Toribio, M. L. & Martínez, C. (1989b). Thymic stroma is required for the development of human T cell lineages in vitro. *International Immunol.* 1, 471.
- Denning, S. M., Tuck, D. T., Singer, K. H. & Haynes, B. F. (1987a). Human thymic epithelial cells function as accessory cells for autologous mature thymocytes activation. *J.Immunol.* 125, 680.
- Denning, S. M., Tuck, D. T., Vollger, L. W., Springer, T. A., Haynes, B. F. & Singer, K. H. (1987b). Thymocyte binding to human thymic epithelial cells is inhibited by monoclonal antibodies to CD2 and LF3 antigens. *J.Immunol.* 138, 358.
- Denning, S. M., Kurtzberg, J., Le, P. T., Tuck, D. T., Singer, K. H. & Haynes, B. F. (1988). Human thymic epithelial cells directly induce activation of autologous immature thymocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 85, 3125.
- Denning, S. M., Kurtzberg, J., Leslie, D. S. & Haynes, B. (1989). Human postnatal CD4-CD8-CD3- thymic T cell precursors differentiate in vitro into T cell receptor d-bearing cells. *J.Immunol.* 142, 2988.
- Dexter, T. M. & Spooner, E. (1987). Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 3, 423.
- Dorshkind, K. (1990). Regulation of haemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Ann.Rev.Immunol.* 8, 111.
- Dukovich, M., Wano, Y., Thuy, L., Katz, P., Cullens, B. R., Kehrl, J. H. & Green, W. C. (1987). A second human IL-2 binding protein that may be a component of high-affinity IL-2 receptor. *Nature* 327, 518.
- Dunon, D., Kaufman, J., Salomonsen, G., Skoedt, K., Vainio, O., Thiery, J. & Imhof, B. A. (1990). T cell precursor migration towards β 2-microglobulin is involved in thymus colonization of chicken embryos. *EMBO J.* 9, 3315.

- Dustin, M. L., Sanders, M. E., Shaw, S. & Springer, T. A. (1987). Purified lymphocyte function associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J.Exp.Med.* 165, 677.
- Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowsky, S., Hemler, M. B. & Lobb, R. R. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interact with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60, 577.
- Engleman, E. G., Warnke, R., Fox, R. I., Dilly, J., Benike, C. J. & Levy, R. (1981). Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 78, 1791.
- Espinoza-Delgado, I., Ortaldo, J. R., Winkler-Pickett, W., Sugamura, K., Varesio, L. & Longo, D. L. (1990). Expression and role of p75 interleukine 2 receptor on human monocytes. *J.Exp.Med.* 171, 1821.
- Evans, R. L., Wall, D. W., Platsoucas, C. D., Siegal, F. P., Fikrig, S. M., Testa, C. M. & Good, R. A. (1981). Thymus-dependent membrane antigens in man: Inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to Th2 antigen. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 78, 544.
- Falk, W., Mannel, D. N., Darjes, H. & Kramer, P. H. (1989). IL-1 induces high affinity IL-2 receptors expression of CD4⁺8⁻ thymocytes. *J.Immunol* 143, 513.
- Fink, P. M. & Bevan. (1978). H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J.Exp.Med.* 149, 766.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W. & O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J.Immunol.* 146, 3444.
- Fowlkes, B. J. & Pardoll, D. M. (1989). Molecular and cellular events of T cell development. *Adv.Immunol.* 44, 207.
- Furley, A. J., Mizutany, S., Weilbaecher, K., Dhaliwal, A. S., Ford, A. M., Chan, L. C., Molgaard, H. V., Toyonaga, B., Mak, T., van den Elsen, P., Gold, D., Terhost, C. & Greaves, M. F. (1986). Developmentally regulated rearrangement and expression of genes encoding the T-cell receptor-T3 complex. *Cell* 46, 75.
- Gale, R. P. (1987). Development of the immune system in human fetal liver. *Thymus* 10, 45.
- Geaves, M. G., Chan, C. L., Furley, W. L., Watt, M. S. & Molgaard, V. H. (1986). Lineage promiscuity in haemopoietic differentiation and leukaemia. *Blood* 67, 1.
- Gimble, J. M., Pietrangeli, C. E., Henley, A., Dorheim, M. A., Silver, J., Namen, A. E., Takeichi, M., Goridis, C. & Kincade, P. W. (1989). Characterization of murine bone marrow and spleen derived stromal cells: Analysis of leukocyte marker and growth factor mRNA transcript levels. *Blood* 74, 303.
- Gold, D. P., Puck, J. M., Petty, C. L., Cho, M., Coligan, J. E., Woody, J. N. & Terhost, C. (1986). Isolation of cDNA clones encoding the 20K non-glycosylated polypeptide chain of the human T-cell receptor/T3 complex. *Nature* 321, 431.
- Griffin, J. D., Ritz, J., Beveridge, R. P., Lipton, J. M., Daley, J. F. & Schlossman, S. F. (1981). Expression of My7 antigen on myeloid precursor cells. *Int.J.Cell. Cloning* 1, 33.

- Haynes, B. F., Denning, S. M., Le, P. T. & Singer, K. (1990). Human intrathymic T cell differentiation. *Seminars in Immunol.* 2, 67.
- Hemeler, M. E., Sánchez-Madrid, F., Flotte, T. J., Krensky, A. M., Burakoff, S. J., Bhan, A. K., Springer, T. S. & Strominger, J. L. (1984). Glucoproteins of 210,000 and 130,000 M.W. on activated T cells: Cell distribution and antigenic relation to components on resting cells and T cell lines. *J. Immunol.* 132, 3011.
- Hemler, M. E., Elices, M. J., Parker, C. & Takada, Y. (1990). Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell matrix adhesion function. *Immunol. Rev.* 114, 45.
- Hemler, H. (1990). VLA proteins in the integrin family: structure, function and their role on leukocytes. *Anna. Rev. Immunol.* 8, 365.
- Hermans, M., Hartsuiker, H. & Opstelten, D. (1989). An in situ study of B-lymphocytopoiesis in rat bone marrow. Topographical arrangement of terminal deoxynucleotidil transferase-positive cells and pre-B cells. *J. Immunol.* 142, 67.
- Heywoth, C. M., Vallance, S. J., Whetton, A. D. & Dexter, T. M. (1990). The biochemistry and biology of the myeloid haemopoietic cell growth factors. *J. Cell. Sci. Suppl.* 13, 57.
- Hoars, R., Kroneneberg, M., Gallatin, W. M., Weissman, I. L., Owen, F. L. & Hood, L. (1986). Rearrangement and expression of T cell antigen receptor γ gene during thymic development. *J. Exp. Med.* 164, 1.
- Hofman, F. M., Bhoopat, L. & Taylor, C. (1985). Distribution of cells bearing the TAC antigen during ontogeny of human lymphoid tissues. *J. Immunol.* 134, 3751.
- Hori, T. & Spits, H. (1991). Clonal analysis of human CD4⁺8⁻3⁻ thymocytes highly purified from postnatal thymus. *J. Immunol.* 146, 2116.
- Howard, F. D., Ledbetter, J. A., Wong, J., Bieber, C. P., Stinson, E. B. & Herzenberg, L. A. (1981). A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation. *J. Immunol.* 126, 2117.
- Howed, R. C., Lowental, J. W. & MacDonald, H. R. (1986). Role of IL-1 in early T cell development: Lyt-2⁺L3T4⁻ thymocytes bind and respond in vitro to recombinant IL-1. *J. Immunol.* 137, 3195.
- Janossy, G., Bofill, M., Trejdosiewicz, L. H., Wilcox, H. N. A. & Chilosi, M. (1986). *Curr. Top. Pathol.* 75, 89.
- Jordan, C. T., McKearn, J. P. & Lemischka, I. R. (1990). Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. *Cell* 61, 953.
- Jung, L., Fu, S. M., Hara, T., Kapoor, N. & Good, R. A. (1986). Defective expression of T cell-associated glycoprotein in severe combined immunodeficiency. *J. Clin. Invest.* 77, 940.
- Kabelitz, D. & Conrad, T. R. (1988). Identification of CD2⁻/CD3⁺ T cells in fetal human tissues. *J. Exp. Med.* 168, 1941.
- Kamps, W. A., De Boer, G. J., Spanjer, H. H. & Poppema, S. (1989). In situ study of haemopoiesis in human fetal liver. *Scand. J. Immunol.* 30, 399.

- Kaneoka, H., Perez-Rojas, G., Sasasaki, T., Benike, C. J. & Engleman, E. G. (1983). Human T lymphocyte proliferation induced by a pan-T monoclonal antibody (anti-Leu-4): Heterogeneity of response is a function of monocytes. *J.Immunol.* 131, 158.
- Kappler, J., Wade, T., Kushnir, E., Blackman, M., Bill, S., Roehm, N. & Marrack, P. (1987). A T cell receptor V β segment that imparts reactivity to a class II major histocompatibility complex product. *Cell* 49, 263.
- Kelemen, E. (1979). Atlas of human hemopoietic development. Springer-Verlag. New York ,
- Kishimoto, T. & Hirano, T. (1988). Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annu.Rev.Immunol.* 6, 485.
- Klein, J. (1989). Ontogeny of the immune system. Immunology Blackwell Scientific Publication ED, pag. 8.
- Krissansen, G. W., Owen, M. J., Verbi, W. & Crumpton, M. J. (1986). Primary structure of the T3/T cell antigen receptor complex from cDNA sequences: evolution of the T3 γ and δ subunits. *EMBO J.* 5, 1799.
- Kung, P. C., Goldstein, G., Reinherz, E. L. & Schlossman, S. F. (1979). Monoclonal antibodies defining distinctive T cell surface antigens. *Science* 206, 347.
- Kurtzberg, J., Denning, S. M., Nycum, L., Singer, K. H. & Haynes, B. (1989). Immature human thymocytes can be driven to differentiate into nonlymphoid lineages by cytokines from thymic epithelial cells. *Pros.Natl.Acad.Sci.* 86, 7575.
- Kyewski, B. A., Jenkinson, E. J., Kingston, R., Altevogt, P., Owen, M. J. & Owen, J. J. T. (1989a). The effects of anti-CD2 antibodies on the differentiation of mouse thymocytes. *Eur.J.Immunol.* 19, 951.
- Kyewski, B. A., Schirzmaier, V. & Allison, J. P. (1989b). Antibodies against the T cell receptor/CD3 complex interfere with distinct intra-thymic cell-cell interactions in vitro: correlation with arrest of T cell differentiation. *Eur.J.Immunol.* 19, 857.
- Lampson, L. A. & Levy, R. (1980). Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J.Immunol.* 125, 393.
- Landry, D., Lafontaine, M., Barthelemy, H., Paquette, N., Chartrand, C., Pelletier, M. & Montplaisir, S. (1989). Human thymic dendritic cell-thymocyte association: ultrastructural cell phenotype analysis. *Eur.J.Immunol.* 19(1855-1860),
- Lanier, L. L., Allison, J. P. & Phillips, J. H. (1986a). Correlation of cell surface antigen expression on human thymocytes by multicolor flow cytometric analysis. Implications for differentiation. *J.Immunol* 137, 2501.
- Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C., Loken, M. & Phillip, J. H. J. (1986b). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu 19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic lymphocytes. *J.Immunol* 136, 4480.
- Lanier, L. L., Yu, G. & Phillips, J. H. (1989). Co-association of CD3 ζ with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342, 803.

- Lansdorp, P. M., Sutherland, H. J. & Eaves, C. J. (1990). Selective Expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34⁺ hemopoietic cells from human bone marrow. *J.Exp.Med.* 172, 363.
- Le, J., Fredericson, G., Reis, L. F. L., Diamanstein, T., Hirano, T., Kishimoto, T. & Vilceck, J. (1988). Interleukin 2-dependant and interleukin 2-independent pathways of regulation of thymocyte function by interleukin 6. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85, 8643.
- Le, P. T., Tuck, D. T., Dinarello, C. A., Haynes, B. F. & Singer, K. H. (1987a). Human thymic epithelial cells produce interleukin 1. *J.Immunol* 138, 2520.
- Le, P., Springer, T., Haynes, B. F. & Singer, K. (1987b). Anti-LFA3 monoclonal antibody induces IL-1 release by thymic epithelial (TE) cells and monocytes. *Fed.Proc.* 46, 4471.
- Le, P. T., Kurtzberg, J., Brandt, S. J., Niedel, J. E., Haynes, B. F. & Singer, K. H. (1988). Human thymic epithelial cells produce granulocyte and macrophage colony-stimulating factors. *J.Immunol.* 141, 1211.
- Le Douarin, N. & Jotereau, F. (1975). Tracing of cells of avian thymus through embryonic life on interspecific chimeras. *J.Exp.Med.* 142, 17.
- Le Douarin, N. M., Dieterlen-Lievre, F. & Oliver, P. D. (1984). Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am.J.Anat.* 170, 261.
- Lefkowitz, I. & Waldman, H. (1979). Limiting dilution analysis of cells in the immune system. Cambridge University Press (1979) ,
- Lefranc, M. & Rabbitts, T. H. (1985). Two tandemly organized human genes encoding the T-cell γ constant-region sequences show multiple rearrangements in different T-cell types. *Nature* 316, 464.
- Lefranc, M. P., Forster, A., Baer, R., Stinson, M. A. & Rabbitts, T., H., (1986). Diversity and rearrangement of the human T cell rearranging γ Genes: Nine germ-line variable genes belonging to two subgroups. *Cell* 45, 237.
- Lemischka, I. R., Raulet, D. H. & Mulligan, R. C. (1986). Developmental potential and dynamic behaviour of hematopoietic stem cells. *Cell* 45, 917.
- Lepault, F. & Weissman, I. L. (1981). An "in vivo" assay for thymus homing bone marrow cells. *Nature* 293, 151.
- Lepesant, H., Reggio, H., Pierres, M. & Naquet, P. (1990). Mouse thymic epithelial cell lines interact with and select a CD3^{low}CD4⁺CD8⁺ thymocyte subset through an LFA-1 dependant adhesion-deadhesion mechanism. *International Immunol* 2, 1021.
- Lobach, D. F., Hensley, L. L., Ho, W. & Haynes, B. F. (1985). Human T cell antigen expression during the early stages of fetal thymic maturation. *J.Immunol* 135, 1752.
- Lobach, D. F. & Haynes, B. F. (1987). Ontogeny of the human thymus during fetal development. *J.Clin.Immunol* 7, 81.
- Longo, D. & Schwartz, R. M. (1980). T cell specificity for H-2 and Ia gene phenotype correlation with the phenotype of thymic antigen presenting cells. *Nature* 287, 44.

- Loughnan, M. S. & Nossal, G. J. (1989). IL-4 and 5 control expression of IL-2 receptor on murine cells through independent induction of its two chains. *Nature* 340, 76.
- Lowenthal, J. W., Howe, R. C., Cederig, R. & McDonald, H. R. (1986). Functional status of IL-2 receptors expressed by immature (Lyt-2⁻/L3T4⁺) thymocytes. *J. Immunol.* 137, 2579.
- Lowenthal, J. W., Ransom, J., Howrrd, M. & Zlotnik, A. (1988). Up-regulation of interleukin 4 receptor expression on immature (Lyt2⁻/L3T4⁺) thymocytes. *J. Immunol.* 140, 474.
- Lu, L., Walker, D., Broxmeyer, H. E., Hoffman, R., Hu, W. & Walker, E. (1987). Characterization of adult human marrow hematopoietic progenitors highly enriched by two color cell sorting with MY10 and major histocompatibility class II monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 139, 1823.
- MacDonald, H. R., Rosemary, K. L., Claude, B., Bernard, S. & Miesher, G. (1987). T cell antigen receptor expression in athymic nu/nu mice: evidence for an oligoclonal beta chain repertoire. *J. Exp. Med.* 166, 195.
- MacFarland, E. J., Scearce, R. M. & Haynes, B. F. (1984). The human thymic microenvironment: cortical thymic epithelium is an antigenically distinct region of the thymic microenvironment. *J. Immunol.* 133, 1241.
- Mackay, C. R., Marston, W. & Dudler, L. (1990). Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171, 801.
- MacNeil, I., Suda, T., Moore, K. W., Mosmann, T. R. & Zlotnik, A. (1990). IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J. Immunol.* 145, 4167.
- Malissen, B., Rebai, N., Liabeuf, A. & Mawas, C. (1982). Human cytotoxic T cell structures associated with expression of cytolysis. I. Analysis at the clonal cell level of the cytolysis-inhibiting effect of 7 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 12, 739.
- Martinez-A, C. (1990). 31st Forum in Immunology: "Interleukins and T-cell development". *Research in Immunol.* 141, 263.
- Matsubara, H., Koska, H., Sogo, S., Maruo, S., Sugihara, S., Asano, Y., Kohno, Y., Kimoto, M., Suzuki, G., Ishimura, K., Fujita, H., Hamaoka, T. & Fujiwara, H. (1990). T cell clones are killed by a thymic stromal cell monolayer following stimulation of T cell receptor with antigen and/or H-2 molecules on the monolayer. *International Immunol* 2, 755.
- McCulloch, E. A. & Till, J. E. (1964). Proliferation of haemopoietic colony-forming cells transplanted into irradiated mice. *Radiation Res.* 22, 383.
- McMichael, A. J., Pilch, J. R., Galfre, G., Mason, D. Y., Fabre, J. W. & Milstein, C. (1979). A human thymocyte antigen defined by hybrid myeloma monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 9, 205.
- Metcalf, A. (1966). The structure of the thymus. in "the thymus". Recent results in cancer research. D. Metcalf. Ed 5, 17.
- Miller, J. F. A. P. & Osoba, D. (1967). Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol. Rev.* 47, 437.

- Mishell, B. B. & Shügi, S. M. (1980). En "selected Methods in Cellular Immunology" Freeman. San Francisco. , 23.
- Miyake, K., Underhill, C. B., Lesley, J. & Kinkade, P. W. (1990). Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J.Exp.Med.* 172, 69.
- Mizutani, S., Watt, S. M., Robertson, D., Hussein, S., Healy, L. E., Furley, A. J. & Greaves, M. F. (1987). Cloning of human thymic subcapsular cortex epithelial cells with T-lymphocyte binding sites and hemopoietic growth factor activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 84, 4999.
- Moingeon, P., Chang, H., Sayre, P. H., Clayton, L. K., Alcover, A., Gadner, P. & Reinherz, E. L. (1989). The structural biology of CD2. *Immunol.Rev.* 111, 111.
- Montovani, A. & Dejana, E. (1989). Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol. Today* 10, 370.
- Moore, M. A. S. & Owen, J. T. (1967a). Stem-cell migration in developing myeloid and lymphoid systems. *Lancet* II, 658.
- Moore, M. A. & Owen, J. J. T. (1967b). Experimental studies on development of the thymus. *J. Exp. Med.* 126, 715.
- Moore, M. A. & Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of "in vitro" colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br.J.Haematol.* 18, 279.
- Moore, K., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A. & Mosmann, T. R. (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248, 1230.
- Morrysey, P., Goodwin, R., Cosman, D., Acres, B., Reed, S., Conlon, P. & Namen, A. (1988). Recombinant IL-7, pre-B growth factor has a coestimulatory activity on purified mature T-cells. *J.Exp.Med.* 169, 707.
- Mossalayi, M. D., Dalloul, A. H., Bertho, J. M., Lecron, J. C., Delaforest, P. & Debré, P. (1990). In vitro differentiation and proliferation of purified thymic and bone marrow CD7⁺2⁻ T cell precursors. *Exp.Hematol.* 18, 326.
- Munson, P. J. & Rodbard, D. (1980). LIGAND. A versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. *Analyt.Biochem.* 107, 220.
- Muraguchi, J. H., Kevil, J. H., Longo, D., Volkman, D. J., Smith, K. A. & Fauci, A. S. (1985). IL-2 receptor on human B cells. Implication for the role of IL-2 in B cell function. *J.Exp.Med* 161, 181.
- Murray, R., Suda, T., Wrighton, N., Lee, F. & Zlotnik, A. (1989). IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. *International Immunol.* 1, 526.
- Nadler, L. M., Anderson, K. C., Marti, G., Bates, M., Park, E., Daley, J. F. & Schlossman, S. F. (1983). B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated and malignant B lymphocytes. *J.Immunol.* 131, 244.
- Nakamura, Y., Inamoto, T., Sugie, K., Masutani, H., Shindo, T., Tagaya, Y., Yamauchi, A., Ozawa, K. & Jodoi, J. (1989). Mitogenic and downregulation of high-affinity

- interleukin 2 receptor by YTA-1 and YTA-2 monoclonal antibodies that recognize 75-KDa molecules on human large granular lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 86, 1318.
- Namen, A. E., Schierer, A. E., March, C. J., Overell, R. W., Park, L. S., Urdal, D. L. & Mochizuki, D. Y. (1988). B-cell precursor growth promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *J.Exp.Med.* 167, 988.
- Nieburgs, A. C., Picciano, P. T., Korn, J. H., McCalister, T., Allred, C. & Cohen, S. (1984). In vitro growth and maintenance of two morphologically distinct populations of thymic epithelial cells. *Cellular Immunol.* 90, 439.
- Nikaido, T., Shimizu, A., Ishida, N., Sabe, H., Tesshigawara, K., Maeda, M., Uchiyama, T., Yodoi, J. & Honjo, T. (1984). Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature* 311, 631.
- Ogawa, M., Nishikawa, M., Ikuta, K., Yamamura, K., Naito, N. & Nishikawa, S. (1988). B-cell ontogeny in murine embryo studies by a culture system with a monolayer of stromal cell clone, ST2: B-cell progenitor develops first in the embryonal body rather than in the yolk sac. *EMBO J.* 7, 1337.
- Oosterom, R., Kater, L. & Rademakers, L. H. P. (1981). How Unique is the thymus? Conditioned media from thymus and tonsil epithelial cultures share biological activities in T-cell maturation. *Clin.Immunol. Immunopathol.* 19, 428.
- Osmond, D. G. & Batten, S. J. (1984). Genesis of B lymphocytes in the bone marrow: extravascular and intravascular localization of surface IgM-bearing cells in mouse bone marrow detected by electron microscope radioautography after "in vivo" perfusion of ¹²⁵I anti-IgM antibody. *Am.J.Anat.* 170, 349.
- Osmond, D. G. & Park, Y. H. (1987). B lymphocyte progenitors in mouse bone marrow. *Int. Rev.Immunol* 2, 241.
- Palacios, R. & Boehmer, v. (1986). Requirements for growth of immature thymocytes from fetal and adult mice in vitro. *Eur.J.Immunol* 16, 12.
- Palacios, R., Sideras, P. & Von Boehmer, H. (1987). Recombinant IL-4/BSF-1 promotes growth and differentiation of intrathymic T cell precursors from fetal mice in vitro. *EMBO J.* 6, 91.
- Palacios, R., Studer, S., Samaridis, J. & Pelkonen, J. (1989). Thymic epithelial cells induce in vitro differentiation of PRO-T lymphocyte clones into TCR α,β /T3⁺ and TCR γ,δ /T3⁺ cells. *EMBO J* 8, 4053.
- Papiernik, M. (1970). Correlation of lymphocyte transformation and morphology in the human fetal thymus. *Blood* 36, 470.
- Papiernik, M., Penit, C. & el Rouby, S. (1987). Control of prothymocyte proliferation by thymic accessory cells. *Eur.J.Immunol* 17, 1303.
- Pardoll, D. M., Foulkes, B. J., Bluesone, J. A., Kruisbeek, A., Maly, W. I., Coligan, J. E. & Schwartz, R. H. (1987). Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 326, 79.
- Patel, V. P., Ciechanover, A., Platt, O. & Lodish, H. F. (1985). Mammalian reticulocytes lose adhesion to fibronectin during maturation to erythrocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 82, 440.

- Paterson, D. J. & Williams, A. F. (1987). An intermediate cell in thymocytes differentiation that expresses CD8 but no CD4 antigen. *J.Exp.Med* 166, 1603.
- Paul, W. (1989). Pleiotropy and redundancy: T-cell derived lymphokines in the immune response. *Cell* 57, 521.
- Perussia, B., Starr, S., Abraham, S., Fanning, V. & Trinchieri, G. (1983). Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J.Immunol.* 130, 2133.
- Picciano, P. T., Johnson, B., Walwnga, R. W., Donovan, M., Borman, B. J., Douglas, W. H. J. & Kreuzer, D. L. (1984). Effects of D-valine on pulmonary artery endothelial cell morphology and function in cell culture. *Exp.Cell.Res.* 151, 134.
- Pilarski, L. M., Gillitzer, R., Zola, H., Shortman, K. & Scollay, K. (1989). Definition of the thymic generative lineage by selective expression of high molecular weight isomorphs of CD45 (T200). *Eur.J.Immunol* 19, 589.
- Ploegh, H. L., Orr, T. H. & Strominger, J. L. (1981). Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A,-B,-C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* 24, 287.
- Plum, J. & Smith, M. D. (1988). Differentiation of thymocytes in fetal organ culture: lack of evidence for the functional role of the IL-2 receptor expressed by prothymocytes. *Eur.J.Immunol.* 18, 795.
- Poggi, A., Biassoni, R., Pella, N., Paolieri, F., Brllomo, R., Bertolini, A., Moretta, L. & Mingari, M. D. (1990). In vitro expansion of CD3/TCR-human thymocyte populations that selectively lack CD3d gene expression: A phenotypic and functional analysis. *J.Exp.Med.* 172, 1409.
- Porcelli, S., Brenner, M. B., Greenstein, J. L., Balk, S. P., Terhost, C. & Bleicher, P. A. (1989). Recognition of cluster of differentiation I antigens by human CD4-CD8⁻ cytolytic T lymphocytes. *Nature* 341, 447.
- Ramsdell, F. & Fowlkes, B. J. (1989). Engagement of CD4 and CD8 accessory molecules is required for T cell maturation. *J.Immunol.* 143, 1467.
- Raulet, D. H. (1985). Expression and function of IL-2 receptors on immature thymocytes. *Nature* 314, 101.
- Raulet, D. H., Garman, R. D., Saito, H. & Tonegawa, S. (1985). Development regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314, 103.
- Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. & Schlossman, S. F. (1979a). Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 76, 4061.
- Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G. & Schlossman, S. F. (1979b). A monoclonal antibody with selective reactivity with functional mature human thymocytes and all peripheral T cells. *J.Immunol.* 123, 1312.
- Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Levey, R. H. & Scholossman, S. F. (1980). Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 77, 1588.

- Robb, R. J., Greene, W. C. & Rusk, C. M. (1984). Low and high affinity cellular receptors for interleukin 2. Implications for the level of Tac antigen. *J.Exp.Med.* 160, 1126.
- Robey, E. A., Fowlkes, B. J. & Pardoll, D. M. (1990). *Molecular mechanisms for lineage commitment in T cell development.* Seminars in Immunol. 2, 25.
- Rothenberg, E. V., Diamond, R. A., Pepper, K. A. & Yang, J. A. (1989). IL-2 gene inducibility in T cells before T cell receptor expression. *J.Immunol.* 144, 1614.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of cDNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487.
- Samoszuk, M. & Nansen, L. (1990). Detection of interleukin-5 messenger RNA in reed-stenberg cells of Hodkin's disease with eosinophilia. *Blood* 75, 13.
- Sancho, J., Chatila, T., Wong, R. K. C., Hall, C., Blumberg, R., Alarcón, B., Geha, R. & Terhost, C. (1989). T-cell antigen receptor (TCR)- α/β heterodimer formation is a prerequisite for association of CD3- ζ into functionally competent TCR-CD3 complexes. *J.Biol.Chem.* 264, 20760.
- Savagner, P., Yamada, K. M. & Thiery, J. P. (1986). Homing of hemopoietic precursors cells to the embrionic thymus: characterization of an invasive mechanism induced by chemotactic peptides. *J.Cell Biol.* 103, 2715.
- Sánchez-Madrid, F., Krensky, A. M., Ware, C. F., Robbins, E., Strominger, J. L., Burakoff, S. J. & Springer, T. (1982). Three distinct antigens associated with human T lymphocyte mediated cytolysis: LFA1, LFA2 and LFA3. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 79, 7489.
- Sánchez-Madrid, F., Landázuri, M., Morago, G., Cebrian, M., Acevedo, A. & Bernabeu, C. (1986). VLA-3: a novel polypeptide associated with the VLA molecular complex: cell distribution and biochemical characterization. *Eur.J.Immunol* 16, 1343.
- Scheider, E., Lorentz, I., Leopold, I., Zischer, H. & Clark, S. C. (1988). Generation of mature CD3⁺ and T cell receptor (TCR)⁺T cells from leukemic analogue of the putative human stem cell by T cell conditioned medium containing IL-3, IL-2, and GM-CSF. *Leikemia* 2, 282.
- Scollay, R., Smith, J. & Stauffer, V. (1986). Dynamic of early T cells: prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus. *Immunol.Rev.* 91, 129.
- Scollay, R., Wilson, A., D'Amico, A., Kelley, K., Egerton, M., Pearse, M., Wu, L. & Shortman, K. (1988). Development status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. *Immunol.Rev* 104, 81.
- Shortman, K. & Jackson, H. (1974). The differentiation of T lymphocytes. Proliferation kinetics and interrelationships betwin subpopulations of mouse thymus cells. *Cell.immunol.* 12, 230.
- Sideras, P. & Palacios, R. (1987). Bone marrow pro-T and pro-B lymphocytes clones express functional receptors for IL-3 and IL-4 and nonfunctional receptors for IL-2. *Eur.J.Immunol.* 17, 217.

- Siegel, J. P., Sharon, M., Smith, P. L. & Leonhard, W. J. (1987). The IL-2 receptor β chain (p75): Role in mediating signals for LAK, NK and proliferative activities. *Science* 238, 75.
- Singer, K. H., Harden, E. A., Robertson, A. L., Lobach, D. F. & Haynes, B. F. (1985). *In vitro* growth and phenotypic characterization of mesodermally-derived and epithelial components of normal and abnormal human Thymus. *Hum Immunol* 13, 161.
- Singer, K. H., Wolf, L. S., Lobach, D. F., Denning, S., Tuck, D., Robertson, A. & Haynes, B. F. (1986). Human thymocytes bind to autologous and allogeneic thymic epithelial cells *in vitro*. *Proc.Natl.Acad.Sci* 83, 6588.
- Singer, K. H., Denning, S. M., Whichard, L. P. & Haynes, B. F. (1990). Thymocyte LFA1 and thymic epithelial cell ICAM-1 molecules mediate binding of activated human thymocytes to thymic epithelial cells. *J.Immunol.* 144, 2931.
- Smith, K. A. (1988). The bimolecular structure of the IL-2 receptor. *Immunol.Today* 9, 36.
- Snodgrass, H. R., Dembic, Z., Steinmetz, M. & Von Boehmer, H. (1985). Expression of T cell antigen receptor genes during fetal development in the thymus. *Nature* 315, 232.
- Spangrude, G. L. (1989). Enrichment of murine haemopoietic stem cell : diverging road. *Immunol.Today* 10, 344.
- Spits, H., Yssel, H., Leenwenberg, J. & Vries, J. E. (1985). Antigen-specific cytotoxic T cells and antigen-specific proliferating T cell clones can be induced to cytolytic activity by monoclonal antibodies against T3. *Eur.J.Immunol.* 15, 88.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M. & Crombrughe, B. (1987). Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J.Cell.Biol.* 105, 1039.
- Sprent, J. & S.R., W. (1987). Function and specificity of T cells subsets in the mouse. *Adv.Immunol* 41, 39.
- Sprent, J., Lo, D., Gao, E. K. & Ron, Y. (1988). T cell selection in the thymus. *Immunol.Rew.* 101, 173.
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425.
- Stachenko, P., Nadler, L. M., Hardey, R. & Schlossman, S. F. (1980). Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J.Immunol.* 125, 1678.
- Strominger, J. L. (1989). Developmental biology of T cell receptors. *Science* 244, 943.
- Stutman, O. (1978). Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol.Rev.* 42, 138.
- Sussman, J. J., Bonifacio, J. S., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A. M., Saito, T., Klausner, R. D. & Ashwell, J. D. (1988). Failure to synthesize the T cell CD3- ζ chain: Structure and function of a partial T-cell receptor complex. *Cell* 52, 85.
- Sutherland, H. J., Eaves, C. J., Eaves, A. J., Dragowska, W. & Landsdorp, P. M. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis *in vitro*. *Blood* 75, 1563.

- Takashi, T., Gause, W. C., Wilkinson, M., MacLeod, C. L. & Steimberg, A. D. (1991). Interleukin-1-induced maturation of progenitor thymocytes. *Eur.J.Immunol.* 21, 1385.
- Takeshita, S., Toda, M. & Yamagishi, H. (1989). Excision products of the T cells receptor gene support a progressive rearrangement model of the α/β locus. *EMBO J.* 8, 3261.
- Tatsumi, Y., Kumanogoh, A., Saith, M., Mizushima, Y., Kimura, K., Suzuki, S., Yagi, H., Horiuchi, A., Ogata, M., Hamaoka, T. & Fujiwara, H. (1990). Differentiation of thymocytes from CD3⁻CD4⁻CD8⁻ through CD3⁻CD4⁻CD8⁺ into more mature stages induced by a thymic stromal cell clone. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 87, 2750.
- Tautz, D. & Pfeifle, C. (1989). A non-reactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translocational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98, 81.
- Teshigawara, K., Wang, H., Kato, K. & Smith, K. A. (1986). Interleukin-2 high affinity receptor expression requires two distinct binding proteins. *J.Exp.Med.* 165, 223.
- Thomas, P. S., Pietrangeli, C. E., Hayashi, S. I., Schachner, M., Goridis, C., Low, M. G. & Kincade, P. W. (1988). Demonstration of neural cell adhesion molecules on stromal cells which support lymphopoiesis. *Leukemia* 2, 171.
- Tigges, M. A., Cesay, L. S. & Kashland, M. E. (1989). Mechanisms of IL-2 signaling: mediation of different outcomes by a single receptor and transduction pathway. *Science* 243, 781.
- Todd, R. F. I., Nadler, L. M. & Schlossman, S. F. (1981). Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies. *J.Immunol.* 126, 1435.
- Toribio, M. L., Martinez, C., Marcos, M. A. R., Marquez, C., Cabrero, E. & De la Hera, A. (1986). Differentiation of mature and functional T-cells from human prothymocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83, 6985.
- Toribio, M. L., De la Hera, A., Borst, J., Marcos, M. A. R., Marquez, C., Alonso, J. M., Bárcena, A. & Martínez, C. (1988a). Involvement of the interleukin-2 pathway in the rearrangement and expression of both α/β and γ/δ T-cell receptor genes in human T-cell precursors. *J.Exp.Med.* 168, 2231.
- Toribio, M. L., Alonso, J. M., Bárcena, A., Gutiérrez, J. C., de la Hera, A., Marcos, M. A. R., Márquez, C. & Martínez-A, C. (1988b). Human T cell precursors: involvement of the IL-2 pathway in the generation of mature T cells. *Immunol.Rev.* 104, 55.
- Toribio, M. L., De la Hera, A., Regueiro, J. R., Márquez, C., Marcos, M. A. R., Bragado, R., Arnaiz-Villena, A. & Martínez-A, C. (1988c). α/β heterodimeric T-cell receptor expression early in thymocyte differentiation. *J.Mol.Cell Immunol.* 3, 347.
- Toribio, M. L., Gutierrez, J. C., Pezzi, L., Marcos, M. A. R. & Martinez, C. (1989). Interleukin-2-dependant autocrine proliferation in T-cell development. *Nature* 342, 82.
- Toribio, M. L., Sánchez, M. J., Gutierrez, J. C., De la Pompa, J. L., Leonardo, E., Barcena, A. & Martinez, C. (1990). The original sin of T cells: constitutive activation of the IL-2/IL-2R pathway early in intrathymic development. *Research in Immunol.* 141, 298.

- Traunecker, a., Oliveri, F., Allen, N.& Kerjalainen, K. (1986). Normal T cell development is possible without "functional" γ chain genes. *EMBO J.* 5, 1589.
- Tsuda, M., Kozak, R., Goldman, C. K.& Waldman, T. H. (1986). Demonstration of a non-Tac peptide that binds IL-2: a potential participant in a multichain IL-2 receptor complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83, 9694.
- Tunncliffe, A.& Rabbits, T. H. (1986). T3 δ pre-mRNA is transcribed from a non-TATA promoter and is alternatively spliced in human T cells. *EMBO J.* 5, 1245.
- Van den Elsen, P., Shepley, B., Borst, J., Coligan, J. E., Markham, A. F., Orkin, S.& Terhost, C. (1984). Isolation of cDNA clones encoding the 20K T3 glycoprotein of human T-cell receptor complex. *Nature* 312, 413.
- Van Dongen, J. J. M., Krissansen, G. W., Wolvers-Tettero, I. L. M., Comans-Bitter, W. M., Adriaansen, H. J., Hooijkaas, H., Van Wering, E. R.& Terhost, C. (1988). Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood* 71, 603.
- Verbi, W., Greaves, M. F., Schneider, C., Koubek, K., Janossy, G., Stein, H., Kung, P.& Goldstein, G. (1982). Monoclonal antibodies OKT11 and OKT11A have pan-T reactivity and block sheep erythrocytes "receptors". *Eur.J.Immunol.* 12, 81.
- Verfaillie, C., Blakormer, K.& McGlave, P. (1990). Purified primitive human hemaopoietic progenitors cells with long-term in vitro repopulation capacity adhere selectively to irradiated bone marrow stroma. *J.Exp.Med.* 172, 509.
- Volleger, L. W., Tuck, D. T., Springer, T. A., Haynes, B. F.& Sing, K. H. (1987). Thymocyte binding to human thymic epithelial cell is inhibited by monoclonal antibodies to CD2 and LFA3 antigens. *J.Immunol* 138, 358.
- Von Boehmer, H. (1988). The developmental biology of T lymphocytes. *Ann,Rev.Immunol.* 6, 309.
- Von Boehmer, h., Bonneville, M., Ishida, I., Ryser, S., Lincoln, G., Smith, G., Khisi, H., Scott, B., Kisielow, P.& Tonegawa, S. (1988). Early expression of a T cell receptor β chain transgene suppresses rearrangements of the Vd4 gene segment. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 85, 9729.
- Watson, J. D., Morrissey, P. J., Namen, A. E., Conlon, P. J.& Widmer, M. B. (1989). Effect of IL-7 on the growth of fetal thymocytes in culture. *J.Immunol* 143, 1212.
- Webb, D. S. A., Shimizu, Y., Van Severter, G. A., Shaw, S.& Gerrard, T. L. (1990). LFA-3, CD44, and CD45: Physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science* 249, 1295.
- Weiss, A.& Stobo, J. D. (1984). Requirements for the coexpression of the T3 and the T cell antigen receptor in malignant human T cell lines. *J.Exp.Med.* 160, 1284.
- Weissman, A. M., Hou, D., Orloff, D. D., Modi, W. S., Seunanez, H., O'Brien, S. J.& Klausner, R. D. (1988). Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor ζ chain: Distinction from the molecular CD3 complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 85(9709),
- Winoto, A.& Baltimore, D. (1989). Separate lineages of T cells expressing the $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ receptors. *Nature* 338, 430.

Yoshikai, Y., Anagnostou, D., Clark, S. P., Yanagi, Y., Sangster, R., Van den Elsen, P., Terhost, C. & Mak, T. W. (1984). Sequence and expression of transcripts of the human T cell receptor b-chain genes. *Nature* 312, 521.

Yoshikai, Y., Toyonaga, B., Koga, Y., Kimura, N., Griessen, H. & Mak, T. W. (1987). Repertoire of the human T cell gamma genes: High frequency of nonfunctional transcripts in thymus and mature T cells. *Eur.J.Immunol.* 17, 119.

Zinkernagel, R., Callahan, G., Althage, A., Cooper, S. & Klein, J. (1978). The thymus in the differentiation of H-2 self-recognition by T cell: Evidence for dual recognition? *J.Exp.Med.* 147, 882.

Zlotnik, A., Ramson, J., Frank, G., Fisher, M. & Howard, M. (1987). IL-4 is a growth factor for activated thymocyte: possible role in T-cell ontogeny. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84, 3856.

Zuñiga-Pflucker, J. C., McCarthy, S. A., Wester, M., Longo, D. L., Singer, A. & Kruisbeek, A. M. (1989). Role of CD4 in thymocyte selection and maturation. *J.Exp.Med.* 169, 2085.

Zuñiga-Pflucker, J. C. & Kruisbeek, A. M. (1990). Precursor thymocytes follow an IL-2/IL-2 receptor-dependent pathway of differentiation. *Research in Immunol.* 141, 293.

8. ANEXOS

- TORIBIO, M.L., DE LA HERA, A., MARCOS, M.A.R., MARQUEZ, C. & MARTINEZ-A., C. (1989), *Europ. J. Immunol.*, **19**, 9.
- VON BOEHMER, H., CRISANTI, A., KIESLOW, P. & HAAS, W. (1985), *Nature (Lond.)*, **324**, 539.
- ZUNIGA-PELUECKER, J.C. *et al.* (1989), *J. exp. Med.*, **169**, 2085.
- ZUNIGA-PELUECKER, J.C. & KRUISBEEK, A.M. (1990), *J. Immunol.*, **144** (in press).
- ZUNIGA-PELUECKER, J.C. *et al.* (1990), *Develop. Immunol.*, **1** (in press).

THE ORIGINAL SIN OF T CELLS: CONSTITUTIVE ACTIVATION OF THE IL-2/IL-2R PATHWAY EARLY IN INTRATHYMIC DEVELOPMENT

M.L. Toribio, M.J. Sánchez, J.C. Gutiérrez-Ramos, J.L. de la Pompa, E. Leonardo, A. Bárcena and C. Martínez-A.

Centro de Biología Molecular (CSIC), Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid

Since 1985, when the discovery of interleukin-2 receptor (IL-2R) expression on intrathymic stem cells (Ceredig *et al.*, 1985; Raulat, 1985; de la Hera *et al.*, 1985) turned out to be a large step towards the understanding of T-cell development, considerable insight into this process has been achieved. However, after five years of intensive research in the field, the whole picture of maturational events leading to generation of mature T cells seems to be more complicated than expected. This may be due to the fact that intrathymic proliferation and differentiation are regulated, on the one hand, by a complex network of different cytokines which display multiple overlapping cell functions, and, on the other, by cell-to-cell interactions involving different thymic stromal components.

This review will focus on what we have learnt about the functional role played by activation of genes coding for different lymphokines (notably IL-2 and IL-4) and their specific receptors, in the development of human intrathymic T-cell precursors.

Developmental control of IL-2/IL-2R gene activation.

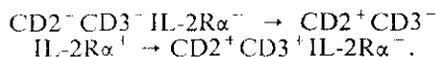
Despite conflicting reports, mainly in mice, on the physiological relevance of the IL-2 pathway in T-cell differentiation, the view that IL-2R gene activation is a transient developmental event (de la Hera *et al.*, 1985) is now widely accepted. However, the basis for IL-2R expression by immature thymocytes has for a long time been poorly understood. The IL-2R consist of at least two non-covalently-linked polypeptides, the p55/IL-2R α (defined by the anti-Tac mAb) and the p75/IL-2R β (Sharon *et al.*, 1986; Tsudo *et al.*, 1986; Teshigawara *et al.*, 1986). Both molecules bind IL-2 independently with low and intermediate affinity, respectively (Wang and Smith, 1987; Dukovich *et al.*, 1987; Robb *et al.*, 1987), but only IL-2R β is thought to mediate IL-2 signal transduction (Wang and Smith, 1987; Robb and Greene, 1987; Smith, 1988). Whereas low levels of IL-2R β appear to be constitutively expressed on resting mature T lym-

phocytes (Dukovich *et al.*, 1987; Bich-Thuy *et al.*, 1987), expression of both IL-2 and IL-2R genes is specifically induced in response to antigenic stimulation triggered by the CD3-T-cell receptor (TCR) complex (Smith, 1980). By contrast, activation of the IL-2/IL-2R pathway in the thymus seems to precede the appearance of the TCR. In both mice and humans, expression of IL-2R α appears to be restricted *in vivo* to the subset of CD4⁻CD8⁻ "double-negative" (DN) thymocytes which comprises the precursors of CD4⁺CD8⁺ "double-positive" (DP) and CD4⁺ or CD8⁺ "single-positive" (SP) mature T cells.

Understanding of the basic rules governing IL-2R expression by immature thymocytes has been elusive due to the intrinsic heterogeneity of the DN subpopulation regarding the expression of different T-cell markers, the state of activation of the T-cell receptor (TCR) genes or their precursor potential in different *in vivo* and *in vitro* assays (reviewed by Möller, 1988). Based on these criteria, we have tried to identify developmental stages within the DN compartment of the neonatal human thymus and to define their ontogenic relationships, in order to establish the intrathymic signals underlying IL-2/IL-2R gene activation.

Indeed, both CD3⁺ (expressing either TCR α/β or TCR γ/δ) and CD3⁻ cells can be observed within the DN subset in the adult thymus (Toribio *et al.*, 1988a), although precursors of CD3⁺ TCR⁺ mature thymocytes appear to be largely confined to the latter (Toribio *et al.*, 1986). Interestingly, it is on these CD3⁻ DN thymocytes (referred to as pre-T cells) that IL-2R α are preferentially expressed (up to 50%), whereas a moderate-to-negative expression is observed among their putative CD3⁺ DN, DP and SP progeny (Toribio *et al.*, 1988b; 1989a). More important, considering the intrathymic signals required to induce IL-2R α gene activation, is the observation that IL-2R α expression is virtually absent from the earliest CD2⁻CD3⁻ DN subset of T-cell precursors (referred to as pro-T cells) (Lobach and

Haynes, 1987), which have been shown to be the immediate progenitors of CD3⁻ DN IL-2R α ⁻ thymocytes (Toribio *et al.*, 1988c). In the light of these data, the sequence of maturational events underlying the transitional expression of the IL-2R α at early developmental stages can be summarized as follows:



The main question arising from this scheme concerns the specific regulatory signals involved in the developmental program of IL-2R α expression before acquisition of the CD3-TCR complex. Current candidates include polyclonal activation mediated by the interaction of CD2 molecules on thymocytes with their LFA3 ligand expressed on thymic epithelium (Wolf *et al.*, 1986). In fact, both IL-2 production and IL-2R α expression appear to be selectively induced through this pathway in pre-T cells (Toribio *et al.*, 1989a). Before CD2 molecules are acquired, however, alternative pathways of activation involving very early expressed molecules, or alternative mechanisms controlling IL-2R α gene expression might be operative. In this regard, functional and molecular studies have recently shown that CD2⁻CD3⁻ DN pro-T cells, although lacking IL-2R α molecules, constitutively display a 5- to 10-fold higher number of IL-2R β structures as compared to CD3⁺ mature thymocytes or peripheral T cells. The physiological relevance of this finding is suggested by experiments showing that binding of IL-2 to individual IL-2R β molecules leads to the activation of the IL-2R α gene, and results in high-affinity IL-2R α/β display and cellular proliferation or early T-cell precursors. More importantly, this IL-2-dependent pathway of growth may function in an autocrine way before acquisition of the CD3-TCR complex, since both CD2⁻ and CD2⁺CD3⁻ DN thymocytes, in contrast to CD3⁺ mature thymocytes, are able to produce constitutively their own IL-2 (de la Hera *et al.*, 1987; Toribio *et al.*, 1989b). Therefore, as observed for the IL-2R α

gene, activation of IL-2R β and IL-2 genes appears to be developmentally controlled as follows:

$$\begin{array}{l} \text{CD2}^+ \text{CD3}^+ \text{IL-2R}\alpha^+ \text{IL-2R}\beta^+ \text{IL-2}^+ \rightarrow \\ \text{CD2}^+ \text{CD3}^+ \text{IL-2R}\alpha/\beta^+ \text{IL-2}^+ \rightarrow \\ \text{CD2}^+ \text{CD3}^+ \text{IL-2R}\alpha^+ \text{IL-2R}\beta^{-/-} \text{IL-2}^+ \end{array}$$

In agreement with this model, recent results in mice indicate that activation of the IL-2R α gene in the embryonic thymus closely parallels IL-2-gene induction (already evident at day 13) (Carding *et al.*, 1989), suggesting that coordinate activation of both genes may be a critical maturation event to promote growth and differentiation of T-cell precursors.

Towards a role for the IL-2/IL-2R pathway in T-cell development.

The latter hypothesis is difficult to reconcile with controversial reports in mice on the capability of adult or foetal DN thymocytes to respond to IL-2 *in vitro* (von Boehmer *et al.*, 1985; Ceredig, 1986; Lowenthal *et al.*, 1986; Raullet, 1985; Hardt *et al.*, 1985; Palacios and Pelkonen, 1988). In contrast, similar studies performed in humans provide ample evidence that IL-2 is able to promote proliferation of intrathymic T-cell precursors (de la Hera *et al.*, 1985; Piantelli *et al.*, 1986; Toribio *et al.*, 1988b; Denning *et al.*, 1989). We must also emphasize that, in the human thymus, IL-2R α expression and IL-2-induced proliferation can be correlated with the cellular size and with the proportion of cycling cells (Toribio *et al.*, 1988b). This is in agreement with the observation that expression of IL-2R α occurs during the G₁ phase of the cell cycle and precedes DNA synthesis in mature T cells (Cantrell and Smith, 1983). In addition, cycling cells are also observed within the IL-2R α IL-2R β ⁺ pro-T cells which have been shown to proliferate in an IL-2-dependent way even without exogenous IL-2 supplementation. Therefore, before acquisition of high-affinity IL-2R α / β , interaction of IL-2 with intermediate affinity IL-2R β may be sufficient to trigger autocrine proliferation at early stages of T-

cell development (Toribio *et al.*, 1989).

Whether the lack of IL-2-induced growth observed in mice (von Boehmer *et al.*, 1985; Ceredig, 1985; Lowenthal *et al.*, 1986) reflects either the functional status of IL-2 receptors expressed by DN thymocytes, the heterogeneity displayed by the DN subset or the requirement of additional signals provided by the thymic microenvironment remains to be established. Nonetheless, recent studies performed in thymic organ cultures indicate that IL-2R are indeed involved in the proliferation of mouse intrathymic T-cell precursors (Jenkinson *et al.*, 1987).

Even more elusive has been the demonstration of a physiological role for IL-2 in the differentiation of T-cell precursors into mature T cells. Molecular studies devised to analyse the ontogeny of TCR expression indicate that CD3⁺ IL-2R α ⁺ pro-T cells contain the α and β TCR genes in germline configuration, although some γ gene rearrangements can be observed. In contrast, γ and β , but not α , gene rearrangements are already evident in CD3⁺ IL-2R α ⁺ pre-T cells (Toribio *et al.*, 1988c). Therefore, IL-2R expression and IL-2-induced proliferation precede in ontogeny the activation of the TCR genes, suggesting the involvement of the IL-2/IL-2R pathway in this process. Experimental support for this notion has been provided by "*in vitro*" studies showing that IL-2 induces the differentiation of intrathymic T-cell precursors into both α/β (Toribio *et al.*, 1986; 1988c) and γ/δ (Toribio *et al.*, 1988c; Denning *et al.*, 1989) T-cell lineages. However, it was not until recently that direct evidence for such a role has been presented *in vivo* (Shimonkevitz *et al.*, 1987; Tentori *et al.*, 1988).

Lymphokines other than IL-2 are involved in T-cell development. Role of thymic stromal components.

Despite the available information on the physiological relevance of the IL-2/IL-2R pathway in T-cell develop-

ment, a role for other lymphokines in this process may be envisaged. Among them, IL-4 stands out as a physiological growth factor for immature DN thymocytes which, in turn, express high-affinity IL-4 receptors (Lowental *et al.*, 1988) and proliferate in response to IL-4 via an IL-2-independent pathway (Zlotnik *et al.*, 1987; Palacios *et al.*, 1989; Bárcena *et al.*, 1990). *In situ* hybridization studies have also shown that most foetal (Sideras *et al.*, 1988; Carding *et al.*, 1989) and adult (de la Pompa *et al.*, 1990) DN thymocytes are also able to produce IL-4. Interestingly, production of and responsiveness to both IL-2 and IL-4 can be ascribed to the same intrathymic subset (Bárcena *et al.*, 1990; de la Pompa *et al.*, 1990), even at the single cell level (Pelkonen *et al.*, 1987). These data suggest that a definite subset, rather than different intrathymic subpopulations, would be able to respond to different growth factors. The alternative use by a given T-cell precursor of either lymphokine may thus be driven by their availability within different thymic microenvironments, or at different developmental stages (Carding *et al.*, 1989). In any event, the decision would be critical in determining commitment to the T-cell lineage and, even more important, differentiation into either α/β or γ/δ mature T cells. Supporting this view, we have observed that IL-4 preferentially drives differentiation into TCR γ/δ -bearing T cells (Bárcena *et al.*, 1990), whereas rearrangement and expression of TCR α/β genes may be selectively induced by IL-2 (Toribio *et al.*, 1988c).

The autocrine behaviour of both IL-2/IL-2R and IL-4/IL-4R pathways does not preclude the involvement of other growth pathways throughout T-cell development. Rather, several other cytokines, including IL-1, IL-3, IL-6, IL-7, G-CSF and M-CSF appear to be produced intrathymically (R. Ceredig, Le *et al.*, 1987, 1988; Denning *et al.*, 1988; Goodwin *et al.*, 1989; de la Pompa *et al.*, 1990). Most of them, although displaying pleiotropic effects on different cellular components of the immune system, have been shown to affect the proliferation of immature

thymocytes. Thus, intrathymic T-cell precursors are able to bind and respond to IL-1 (Howe *et al.*, 1986; Le *et al.*, 1987), IL-3 (Ceredig, 1986; Denning *et al.*, 1988) and IL-7 (Watson *et al.*, 1989; Toribio *et al.*, unpublished results), mainly through an IL-2-dependent pathway. Existence of an IL-2-dependent mechanism is also likely to be responsible for the synergistic action of IL-6 with IL-2 and IL-1 in stimulating thymocyte proliferation, although a direct role of IL-6 in promoting thymocyte growth cannot be excluded (Le *et al.*, 1988). In addition, the effects of IL-1, IL-3, IL-4, G-CSF and M-CSF on the proliferation and differentiation of non-lymphoid cell lineages have also been suggested (Denning *et al.*, 1988; Kurtzberg *et al.*, 1989; Toribio *et al.*, unpublished results).

The implications of these findings in T-cell development should be analysed considering the potential role that different soluble factors could play in regulating the activation of genes coding for other lymphokines and their receptors. Such regulatory functions have been demonstrated for IL-1, which is able to induce short waves of IL-2 production in immature DN thymocytes (Rothenberg *et al.*, 1989). Production of IL-2 can also be induced by IL-6 in mature thymocytes (Le *et al.*, 1988). In addition, IL-1 (Falk *et al.*, 1989), IL-3 (Birchenal-Sparks *et al.*, 1986) and IL-6 (Le *et al.*, 1988) appear to upregulate the expression of IL-2R α on thymocytes, whereas IL-2R α down-regulation can be induced by IL-4 both in thymocytes (Bárcena *et al.*, 1990) and B cells (Loughnan and Nossal, 1989). Activation of IL-2R β expression has also been observed in B cells in response to IL-5 (Loughnan and Nossal, 1989).

Finally, we have to consider that thymic stromal components, mainly epithelial cells, appear to be the main source of cytokine production in the thymus. *In vitro* studies suggest that, in addition to soluble factors, direct contact between T-cell precursors and stromal components must also be required to induce effective intrathymic differentiation of T cells (de la Hera *et*

et al., 1989; Palacios *et al.*, 1989). These data indicate that both the developmental control of cytokine production and the interaction with appropriate thymic stromal components may be critical in determining cell-lineage commitments from multipotential precursors. Although the activation signals deriv-

ed from these interactions are as yet unknown, it seems likely that they are directly involved in regulating the inducibility of IL-2 and IL-2R genes in T-cell precursors. This would allow the acquisition of an IL-2-responsive state which, in turn, will ensure polyclonal expansion and T-cell lineage commitment.

References.

- BARCENA, A., TORIBIO, M.I., PLZZI, L. & MARTINEZ-A, C. (1990), *J. exp. Med.*, (in press).
- BICH-THUY, L.T., DUKOVICH, M., PEEFER, N.J., FAUCI, A.S., KEHRL, J.H. & GREENE, W.C. (1987), *J. Immunol.*, **139**, 1550.
- BIRCHENALL-SPARKS, M., FARRAK, W., RENNICK, D., KILLIAN, P. & RUSCETTI, F.W. (1983), *Science*, **233**, 455.
- CANTRELL, D.A. & SMITH, K.A. (1983), *J. exp. Med.*, **158**, 1895.
- CARDING, S.R., JENKINSON, E.J., KINGSTON, R., HAYDAY, A.C., BOTTOMLEY, K. & OWEN, J.J.T. (1989), *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **86**, 3342.
- CEREDIG, R., LOWENTAL, J.W., NABHOLZ, M. & MACDONALD, H.R. (1985), *Nature (Lond.)*, **314**, 98.
- CEREDIG, R. (1986), *J. Immunol.*, **137**, 2260.
- DENNING, S.M., KURTZBERG, J., LESLIE, D.S. & HAYNES, B.F. (1989), *J. Immunol.*, **142**, 2988.
- DENNING, S.M., KURTZBERG, J., LE, P.T., TUCK, D.T., SINGER, K.H. & HAYNES, B.F. (1988), *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **85**, 3125.
- DUKOVICH, M., WANO, Y., THUY, L.B., KATZ, P., CULLEN, B.R., KEHRL, J.H. & GREENE, W.C. (1987), *Nature (Lond.)*, **327**, 518.
- FAK, W., MANNEL, D.N., DARJES, H. & KRAMEK, P.H. (1989), *J. Immunol.*, **143**, 513.
- GOODWIN, R.G., LYPTON, S., SCHMIERER, A., HJERRILD, K.J., JERZY, R., CLEVENGEN, W., GILLIS, S., COSMAN, D. & NAMEN, A.E. (1988), *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **86**, 302.
- HARDI, C., DIAMANSTEIN, T. & WAGNER, H. (1985), *J. Immunol.*, **134**, 3891.
- DE LA HERA, A., TORIBIO, M.I., MAROULZ, C. & MARTINEZ-A., C. (1985), *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **82**, 6268.
- DE LA HERA, A., TORIBIO, M.L., MARCOS, M.A.R., MARQUEZ, C. & MARTINEZ-A., C. (1987), *Europ. J. Immunol.*, **17**, 683.
- DE LA HERA, A., MARTISON, W., ARANDA, C., TORIBIO, M.L. & MARTINEZ-A., C. (1989), *International Immunol.*, **1**, 471.
- HOWE, R.C., LOWENTAL, J.W. & MACDONALD, H.R. (1986), *J. Immunol.*, **137**, 3195.
- JENKINSON, E.J., KINGSTON, R. & OWEN, J.J.T. (1987), *Nature (Lond.)*, **329**, 160.
- KURTZBERG, J., DENNING, S.M., NYUM, L.M., SINGER, K.H. & HAYNES, B.F. (1989), *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **86**, 7575.
- LE, P.T., TUCK, D.T., DINARELLO, Ch. A., HAYNES, B.F. & SINGER, K.H. (1987), *J. Immunol.*, **138**, 2520.
- LE, J., FREDERICKSON, G., REIS, L.F.L., DIAMANSTEIN, T., HIRANO, T., KISHIMOTO, T. & VILCECK, J. (1988), *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **85**, 8643.
- LE, P.T., KURTZBERG, J., BRANDT, S.J., NIEDEL, J.E., HAYNES, B.F. & SINGER, K.H. (1988), *J. Immunol.*, **141**, 1211.
- LOBACH, D.F. & HAYNES, B.F. (1987), *J. clin. Immunol.*, **7**, 81.
- LOUGHNAN, M.S. & NOSSAL, G.J. (1989), *Nature (Lond.)*, **340**, 76.
- LOWENTAL, J.W., HOWE, R.C., CEREDIG, R. & MACDONALD, H.R. (1986), *J. Immunol.*, **137**, 2579.
- LOWENTAL, J.W., RANSOM, J., HOWARD, M. & ZLOTNIK, A. (1988), *J. Immunol.*, **140**, 474.
- MOLLER, G. (1978), *Immunol. Rev.*, **104**.
- PALACIOS, R. & PELKONEN, J. (1988), *Immunol. Rev.*, **104**, 5.
- PALACIOS, R., STUDER, S., SAMARIDIS, J. & MARTINEZ-A., C. (1989), *EMBO J.*, **8**, 4053.
- PELKONEN, J., SIDERAS, P., RAMMENSEE, H.-G., KARIJALAINEN, K. & PALACIOS, R. (1987), *J. exp. Med.*, **166**, 1245.

Immunology

**INVOLVEMENT OF THE INTERLEUKIN 4 PATHWAY
IN THE GENERATION OF FUNCTIONAL $\gamma\delta$ T CELLS
FROM HUMAN PRO-T CELLS**

(CD3-complex/ $\gamma\delta$ T cells/Interleukin 4/T cell development)

**Alicia Bárcena, María José Sánchez, José Luis de la Pompa,
María Luisa Toribio, Guido Kroemer, and Carlos Martínez-A.**

Centro de Biología Molecular (CSIC)

Universidad Autónoma de Madrid.

Campus de Cantoblanco, 28049 - Madrid

Correspondence to:

Dr. C. Martínez-A
Centro de Biología Molecular (CSIC)
Universidad Autónoma
Campus de Cantoblanco
28049 Madrid, Spain
Tel. 34-1-397-4252

Fax. 34-1-397-4799

Abbreviations: IL-2, interleukin 2; IL 4, interleukin 4; mAb, monoclonal antibody,
TCR, T-cell receptor

ABSTRACT

We have used the technique of *in situ* hybridization to investigate the transcription of genes encoding the CD3-complex and the lymphokine IL-4 by human pro-T cells, i.e. cells that phenotypically resemble those T cell precursors that colonize the thymus during early intrathymic development. CD1-2-3-4-7+8-45⁺ pro-T cells isolated from postnatal thymi via immunoselection with a pannel of specific mAbs are already committed to the T cell lineage since most of them transcribe the genes encoding the δ and ϵ chains of the CD3 complex. About half of such pro-T cells synthesize IL-4 mRNA in the absence of any exogenous stimulation. Upon culture in the presence of IL 4, pro-T cells extensively proliferate and differentiate into functionally competent, mature $\gamma\delta$ T cells expressing a T cell receptor repertoire similar to that of $\gamma\delta$ T cells that can be found in postnatal thymus. The IL-4 response of pro-T cells is not mediated by induction of the IL-2/IL-2R pathway and, unlike IL-2 driven T cell differentiation, does not require the presence of stromal cells. Taken altogether, these findings suggest that an autocrine IL-4 mediated pathway might be implicated in early thymocyte differentiation, namely in the generation of T cells bearing the $\gamma\delta$ T cell receptor.

INTRODUCTION

Hematopoietic precursors arise in the fetal yolk sack and migrate to the fetal liver. From there, T cell precursors colonize the thymic rudiment where they give rise to two major cell populations defined by the expression of the γ/δ and α/β T cell receptor heterodimers. Developmental studies in mice support the notion that γ/δ TCR⁺ cells predominate early in fetal development, whereas α/β TCRs account for the majority of mature peripheral T cells in the adult. The mechanisms that control the developmental expression of these genes during intrathymic T cell precursor proliferation and differentiation remain largely unknown. In humans, the characterization of hematopoietic precursors that colonize the fetal thymus at 7 weeks of gestation has allowed to define the phenotype of the earliest intrathymic precursors. These progenitor cells display the pan-leukocyte common antigen CD45 and CD7, the earliest T cell marker, but lack surface expression of other differentiation antigens of the T cell lineage, such as CD2, components of the CD3-T cell receptor (TCR) complex, CD4 and CD8 (1-2). This population, referred to as pro-T cells (3), has also been isolated from post-natal thymus. Pro-T cells, which constitutively express the β chain of the interleukin 2 receptor (IL-2R) (4), respond to IL-2 by proliferation and differentiation, provided they are co-cultured with thymic stroma cells (5, 6).

Recently, it has been shown that mouse fetal thymocytes constitutively express interleukin 4 (IL-4) at the mRNA level (6). Mouse Thy-1⁺ CD4⁻CD8⁻ thymocytes grow and differentiate into CD8⁺ cytolytic mature T cells after prolonged culture with IL-4 (7) and adult double negative thymocytes proliferate in response to IL-4 (8). In humans, it has been shown that IL-4 displays growth factor activity for bone marrow cells (9), total thymocytes (10) and CD2⁺3⁻4⁻8⁻ immature thymocytes (pre-T cells) (11, 12). These data, together with our previous results showing that IL-4 is a growth and differentiation factor for immature CD45⁺7⁺2⁺1⁻3⁻4⁻8⁻ thymocytes (pre-T cells) (11), prompted us to investigate the effect of IL-4 on human pro-T cells. The results

presented in this communication indicate that pro-T cells ($CD45^{+7^{+1-2}3^{-4}8^{-}$) transcribe in majority the genes encoding the δ and ϵ chains of the CD3 complex, supporting their commitment to the T cell lineage. In addition, up to 50% of pro-T cells constitutively transcribe the IL-4 gene. Exogenous IL-4 promotes both the *in vitro* proliferation and differentiation of these cells via an IL-2/IL-2R-independent pathway. Most of the surface CD3⁺ T-cells generated *in vitro* with IL-4 express the $\gamma\delta$ -TCR, and only a minor population of $\alpha\beta$ -TCR⁺ mature T cells are obtained. The mature $\gamma\delta$ T cells generated cease transcription of the IL-4 gene and display cytotoxic activity in a redirected lysis assay system. These findings support the involvement of the IL-4 pathway in the intrathymic differentiation of T cell precursors into $\gamma\delta$ T-cells.

MATERIALS AND METHODS

Monoclonal antibodies (mAbs)

The following mAbs were employed: Na1/34, anti-CD1a (13); Leu 5b, anti-CD2, from Becton Dickinson (Mountain View, CA); SPV-T3b or Leu 4b, anti-CD3 (ref. 14 and Becton Dickinson, respectively); HP2/6, anti-CD4 (15), B9.4 or Leu 2a, anti-CD8 (ref 16 and Becton Dickinson, respectively); 3A1, anti-CD7 (17); Mo1, anti-CD11b, from Coulter Clone (Coulter, Hialeah, FL, USA); Mo2, anti-CD14 (Coulter Clone); anti-CD16, Leu11 (Becton Dickinson); anti-HNK-1 (18); GAP 8.3, anti-CD45 (15); W6/32, anti-HLA class I (19); Edu-1, anti-HLA class II DR (20); MAR108, anti- α chain of IL-2R (21); YTA-1, anti-p75 protein (22); TCR-delta-1, anti- δ TCR (23); WT31, anti- $\alpha\beta$ TCR, from Sanbio (Uden, Holland); δ -TCS-1, anti-V δ 1 related determinant TCR, from T cell Sciences (Cambridge, MA); BB3, anti-V δ 2 TCR (24); TigA TCR (25).

Quantitative flow cytometry

Quantitation of the surface staining of $5-10 \times 10^4$ viable cells was performed with an EPICS-Profile II (Coulter Electronics, Hialeah, FL) flow cytometer. Cellular staining was performed by indirect immunofluorescence at 4°C for 30 min with saturating amounts of the corresponding mAbs, followed by incubation with FITC-conjugated F(ab')₂ goat-anti-mouse IgG (Kallestad, Austin, TX) used as second-step reagent in single stainings, as previously described (3). For two color analysis, cells were further incubated with PE-conjugated or biotin-conjugated mAbs. Irrelevant isotype-matched mAbs from Becton Dickinson were used as negative controls. The data were analyzed for representation using the Flowsys program (26)

Isolation of thymocyte populations

Normal human thymocyte suspensions were obtained from thymus fragments removed during corrective cardiac surgery from 1 month to 3 year old patients. Viable thymocytes were isolated by Ficoll-Hypaque® (Pharmacia, Uppsala, Sweden) centrifugation. Pro-T cells were immunoselected by treatment with mAbs for 30 min at 4°C, followed by 45 min incubation at 37°C with a 1:4 dilution of non-cytotoxic baby rabbit complement (Sera-lab, Sussex, UK). The mAbs used in the immunoselection were directed against CD1a, CD4, and CD8. Viable cells were recovered by centrifugation on Ficoll-Hypaque®, treated again with the corresponding mAbs, and incubated 30 min at 4°C with magnetic beads coated with affinity-purified anti-mouse IgG (Dynabeads M-450, Dynal, Oslo, Norway), according to the manufacturer's recommendations. In a subsequent purification step, cells were incubated with anti-CD2 and anti-CD3 and separated with magnetic beads. Using this procedure, the separation allowed for the routine isolation of highly purified cell preparations (>99% pure).

Cell cultures

Pro-T cells were cultured in 24-well macroplates (Costar, Cambridge, MA) at 1.5×10^6 cells ml^{-1} in RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Scotland) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 mM Hepes, 10% decomplexed pooled human AB serum and antibiotics, in the presence of the indicated concentrations of IL-4 (Sandoz, Basel, Switzerland) or IL-2 (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland). Proliferative responses were measured by 5-(methyl-[^3H])-thymidine (Amersham Corp, Amersham, UK) incorporation. Cells were cultured in flat-bottomed 96-well microtiter plates (Costar) in 0.2 ml (10^6 cells ml^{-1}) of complete medium or supplemented with lymphokines as indicated in each assay. The proliferation was measured after addition of 1 μCi /well of [^3H]-thymidine for the last 18 hours of culture. Each value represents the mean of triplicate cultures. Standard deviations were $<10\%$.

Limiting dilution analysis

Purified human pro-T cells were cloned as described (11). Briefly, pro-T cells were diluted in IL-4 (160 U/ml) and PMA (0.02 ng/ml) supplemented medium containing irradiated (4000 rad) peripheral blood leukocytes ($1 \times 10^6/\text{ml}$) and EBV-transformed B cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$). Cells were cultured at a density of 10, 3, or 1 cell/well in Terasaki microwell plates (25 μl /well) during 7 to 10 days. The growing cells were expanded in the same conditions in round bottom 96-well microtiter plates (200 μl /well) and restimulated once per week. After three weeks in culture, cells were phenotypically characterized by FACS analysis.

Labeling of cDNA probes

All probes used for *in situ* hybridization were cDNA fragments labeled according to the protocol supplied with the Boehringer Mannheim kit for random primed DNA labeling with digoxigenin-11-dUTP (Boehringer, Mannheim, FRG). DNA fragments were purified by electroelution, followed by deionization on Elutip[®] columns (Schleicher and Schuell, FRG). The labelling reaction was stopped by adding

10 mM EDTA, and the solution was used without further purification. The cDNA probes encoding CD3 δ (27) and CD3 ϵ (28) were kindly provided by C. Terhorst. The cDNA probes encoding CD3 γ (29) and CD3 ζ were gifts from M.J. Crumpton and the cDNA probe specific for IL 4 was kindly provided by K.Arai (30).

In situ hybridization

Freshly isolated pro-T cells ($5-10 \times 10^4$ cells/slide) were applied to poly-L-lysine coated glass slides. Paraformaldehyde fixed slides were parafined and stored. After deproteination with 0.1M ClH, prehybridization and hybridization steps were carried out according to the protocol described by J.L. de la Pompa et al. (manuscript in preparation) based on the method described by Tautz and Pfeifle (31). Digoxigenin labeled probes were used at a concentration of 0.8 $\mu\text{g/ml}$, 100 μl per slide and incubated overnight at 42°C. Slides were incubated for 2 hours with anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline phosphatase at a 1:1000 dilution in PBT (0.1% Tween 20 in PBS), preabsorbed with fresh thymocytes and washed extensively in PBT. The reaction was developed by incubating for 6 h at room temperature in a solution of nitroblue tetrazolium and X-phosphate solution, in the presence of 1mM levamisole. The colour reaction was stopped with Tris-EDTA and slides were dehydrated before mounting in DPX for microscopic examination.

^{51}Cr release assay

Human pro-T cells, either freshly isolated or cultured in 24-well macroplates (1.5×10^6 cells ml^{-1}) were tested for cytotoxicity against 5×10^3 ^{51}Cr -labeled target cells at various effector-to-target ratios in a 4 hr ^{51}Cr -release assay (6). Results show the mean specific ^{51}Cr -release (%) in triplicate wells.

RESULTS AND DISCUSSION

Human intrathymic pro-T cells are committed to the T cell lineage and transcribe the IL-4 gene

Pro-T cells (CD45⁺7⁺1-2-3-4-8⁻) (6) can be defined as the most immature T cell subpopulation up to now identified in postnatal human thymus. The early T cell precursor nature of this population is supported by its antigenic make-up, which resembles that of early embryonic thymocytes (2), and their capacity to differentiate into mature T cells after *in vitro* culture with IL-2 (3,6). Enrichment of thymic pro-T cells was achieved by a four-step immunoselection method using mAbs (specific for CD1a, CD2, CD3, CD4, CD8) plus non-cytotoxic complement. Highly purified pro-T cells (>99% pure as measured by flow cytometry), representing 0.15-0.3% of total thymocytes, express CD45 (99%) and variable amounts of CD7 (50-75% in 12 different experiments). This population lacks the expression of differentiation antigens specific for T cells such as CD1, CD2, CD3, CD4, CD8, $\alpha\beta$ -TCR or $\gamma\delta$ -TCR, IL2R α (tac), markers specific for myelomonocytic cells (CD11b, CD14), and the NK surface molecules CD16 and HNK-1. It expresses IL-2R β (6-15%, as assessed by the mAb YTA-1), HLA class I (80-95%) and class II (21-40%) (ref. 3 and not shown). Pro-T cells incubated 36 hours with medium devoid of lymphokines did not reexpress markers characteristic for mature T cells.

Pro-T cells were subjected to *in situ* hybridization with probes specific for the genes encoding the monomorphic CD3- γ ,- δ ,- ϵ and ζ chains of the CD3-TCR complex. Expression of CD3 encoding genes is restricted to cells of the T-lymphocyte lineage (13) - with the exception of the ζ chain which is also present in CD3⁻ natural killer cells (32) - and is thought to be one of the first events that commits to the T cell lineage, preceding the expression of TCR genes (28, 33-35). As shown in Fig.1, most freshly isolated pro-T cells synthesize mRNA for the δ and ϵ CD3 genes (>90%, Figure 1). In contrast, the transcription of the γ and ζ genes is limited to 30 \pm 5% and 15 \pm 5% of total

pro-T cells, respectively. These data, together with our previous findings that pro-T cells have rearranged and transcribe the TCR- γ gene but the TCR- α and- β genes still in germ-line configuration (3-6), hint to the irreversible, although early T cell lineage commitment of this thymic subpopulation.

The ability of mouse fetal thymocytes at day 15 of gestation and newborn thymocytes to constitutively produce IL-4 has recently been described (7). We have now investigated whether neonatal human pro-T cells are able to produce IL-4 mRNA. As shown in Figure 1, 50% of pro-T cells express IL-4 mRNA, whereas IL-4 production is restricted to 1-2% of polyclonally activated peripheral T cells (36), total thymocytes (not shown), or mature T cells generated from pro-T cells by culture with IL-4.

IL-4 promotes the growth and differentiation of human pro-T cells via a pathway independent of IL-2

Freshly isolated pro-T cells were cultured in the presence of optimal concentrations of IL-4 (160 ng/ml) (11), and the proliferative response was measured by assessing [3 H]-thymidine incorporation after several days of culture (Figure 2). IL-2, which is known to stimulate the growth of this cell population (6), was used as a positive control. As shown in Fig. 2, IL-4 is capable of inducing significant proliferation of pro-T cells in the absence of additional costimulatory signals that would be necessary to render mature peripheral T cells IL-4 responsive (37).

We have previously shown that an autocrine IL-2 pathway (constitutive IL-2 production and IL-2R expression) participates in the expansion of thymic pro-T cells (3, 4). However, IL-2 is not implicated in the proliferative response to IL-4, since the growth-promoting effect of IL-4 on pro-T cells was not affected by addition of saturating amounts of mAb directed against the IL-2R α chain (Tac) (Fig 2). The ability

of IL-2 to promote the growth and differentiation of pro-T cells into mature, TCR-bearing lymphocytes prompted us to investigate the differentiation inducing potential of IL-4. To this end, CD45⁺7⁺1-2-3-4-8⁻ pro-T cells were cultured in the presence of 160 ng/ml of IL-4. The acquisition of CD2, CD3, CD4, CD8, $\alpha\beta$ -TCR and $\gamma\delta$ -TCR, was analyzed after 3, 5, 9, and 14 days of culture by flow cytometry (Table I). CD2 was consistently found to precede other markers, thus giving rise to the *in vitro* counterpart of the intrathymic pre-T cell subpopulation (CD2⁺1-3-4-8⁻, day 3). The acquisition of CD2 was followed by the expression of the CD3/TCR complex on double negative thymocytes (CD2⁺1-3-4-8⁻) and, ultimately, by the appearance of the accessory molecules CD4⁺ and CD8⁺. Interestingly, a preferential differentiation into cells bearing $\gamma\delta$ -TCR and CD8 at the expense of $\alpha\beta$ TCR and CD4 was consistently observed in the presence of IL-4. The T cell marker CD7 and the YTA-1 antigen were gradually expressed on most of the cultured cells. Maximal expression of the IL-2 α chain was detected at day 5 of culture and decreased thereafter, perhaps modulated by the autocrine production of IL-2 in culture (4). The levels of surface HLA class II molecules do not change significantly throughout the culture period.

To characterize the lymphocytes generated from pro-T cells cultured in the presence of IL-4, two-color flow cytometry analysis was carried out after 18 days when the cultured cells display a stable phenotype and only a small population (3%) remains undifferentiated. As shown in Figure 3, 96% of the IL-4-cultured pro-T cells co-express CD45 and CD7. The vast majority of the progeny expresses CD2 (90%) and the CD3/TCR complex (80%). With regard to the acquisition of CD4 and CD8, a preferential differentiation into CD8⁺ T cells (40%) vs. CD4⁺ cells (6%) was a consistent finding. The observation that IL-4 promotes the expression of CD8 in human mature CD4⁺ clones (38), as well as in mouse fetal pro-T cells (39), is in line with this finding. A high proportion of cells exhibit a double-negative CD4⁻CD8⁻ phenotype (38%), and a small subpopulation (4%) displays a double-positive

(CD4⁺CD8⁺) phenotype. This low level of double-positive T cells (2 to 7% of total cells) was repeatedly observed in six independent experiments.

Two findings exclude that the acquisition of T cell markers we observe with IL-4 is due to overgrowth of mature contaminant T cells: (i) in the absence of costimulatory signals, mature $\gamma\delta$ T cells do not grow in IL-4 containing medium (11); (ii) as much as 10-20% of pro-T cells proliferate in response to IL-4 as estimated by extrapolation of the growth curve or limiting dilution analysis (11); (iii) in the presence of IL-4, pro-T cells acquire cytotoxic activity after only 5 days of in vitro culture (data not shown).

IL-4 promotes differentiation into CD8⁺CD4⁻ or CD4⁻CD8⁻ $\gamma\delta$ T cells

Most CD3⁺ T cells generated in the presence of IL-4 (55-90% in six independent experiments) express the $\gamma\delta$ -TCR (as defined by the mAb anti-C δ TCR delta-1) and only a minor population (5-20%) bears the $\alpha\beta$ -TCR. These $\gamma\delta$ -TCR⁺ T cells exhibit a low (0-10%) expression of CD5 (not shown). This is in contrast with the CD5 expression normally found on a large majority of peripheral blood T cells (40) and on the $\alpha\beta$ ⁺ subset generated in our cultures (6). Interestingly, the reciprocal distribution of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ -TCR bearing T cells was found in the CD3⁺ progeny of IL-2-supported pro-T cell cultures, where the $\alpha\beta$ -TCR predominates (6) and a preferential expression of CD4 vs CD8 T cell surface markers is detected (11). These observations led us to study the distribution of CD4 and CD8 antigens in the $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ -TCR bearing subset generated after 18 days of culture of pro-T cells in the presence of IL-4. As shown in Figure 3, the $\gamma\delta$ T cell population is composed of CD8⁺ (25%) and CD4⁻CD8⁻ cells (30%). No $\gamma\delta$ CD4⁺ cells were detected in five independent experiments. TCR $\alpha\beta$ ⁺ cells obtained in the same conditions preferentially express CD8 (15%),

although double-negative (9%) and α/β CD4⁺ T cells (5%) were encountered (data not shown).

In response to IL-2, pro-T cells only proliferate or differentiate when they are co-cultivated with stroma cells (5). To address the question as to whether IL-4 responsiveness depends on similar requirements, CD7⁺ and CD7⁻ subsets were purified by incubation of the total pro-T cells with anti-CD7 mAb and subsequent separation with anti-mouse-Ig-coated magnetic beads. Freshly isolated CD7⁺ pro-T cells express CD45 (99%) and CD7 (98%), while among the CD7⁻ subset (mostly stromal cells) a rather small percentage (3.1%) expresses CD45. Upon culture in the presence of 160 ng/ml of IL-4, CD7⁻ cells rapidly die, and, after 6 days of culture, no viable cells are recovered. In contrast, the CD7⁺ population, which is practically devoid of stromal elements, proliferates and differentiates into mature T cells. The phenotypic characterization of the CD7⁺ pro-T cell progeny after 18 days in culture (Table IB) revealed an antigenic profile similar to cultured total pro-T cells (Table IA and Fig. 3), indicating that IL-4 *per se* provides the growth and differentiation signals required for the *in vitro* differentiation of pro-T cells into $\gamma\delta$ T cells.

Analysis of the $\gamma\delta$ T cell repertoire generated with IL-4

Domain-specific mAbs allowed detailed analysis of the variable gene usage by $\gamma\delta$ TCR-bearing lymphocytes. The mAb T γ A is specific for an epitope of V γ 9 (20); BB3 reacts with the product of the V δ 2 gene (24,41), and δ TCS-1 recognizes V δ 1 in combination with J δ 1 and J δ 2 (42,43). As shown in Figure 3, the V γ repertoire expressed by *in vitro* generated $\gamma\delta$ T cells is characterized by a dominant expression of V δ 1 in comparison with V δ 2. This pattern of expression differs from that observed in adult peripheral blood lymphocytes where anti-V δ 2 and anti-V δ 1 recognize two-thirds and one-third of TCR- $\gamma\delta$ ⁺ lymphocytes, respectively, (44). However, it correlates with

the predominance of $V_{\delta 1}^+$ cells among $\gamma\delta$ thymocytes (45) and neonatal PBL (46). Interestingly, the number of $V_{\delta 1}^+$ and $V_{\delta 2}^+$ cells ($36 \pm 4\%$) is superated by the cells reacting with the anti-C δ mAb (55%), suggesting the existence of extra V_{δ} products among T cells generated *in vitro* with IL-4. In contrast, it has recently been reported that the sum of $V_{\delta 1}^+$ and $V_{\delta 2}^+$ cells roughly corresponds to the percentage of TCR- δ - 1^+ cells in different lymphoid organs (44).

The phenotypes of clones generated from human pro-T cells in the presence of IL-4 are listed in Table 2. After a 6 week culture period, 49 clones developed from 520 seeded wells. The large majority (93%) express $\gamma\delta$ TCR on the surface, whereas only 4 % bear $\alpha\beta$ TCR. Two thirds of the clones expresses $V_{\delta 1}$, only one clone $V_{\delta 2}$ and nearly one third are negative for both $V_{\delta 1}$ and $V_{\delta 2}$. Interestingly, the expression of CD8 is unevenly distributed among clones differing in the expression of $V_{\delta 1}$ and $V_{\delta 9}$. Whereas the majority of $V_{\gamma 1}^+V_{\delta 9}^-$ cells are CD4 $^-$ CD8 $^-$ (18 clones among a total of 43), half of the $V_{\gamma 1}^+V_{\delta 9}^+$ cells are CD4 $^-$ CD8 $^+$. A small percentage of $\gamma\delta^+$ clones coexpressing CD4 and CD8 was detected in all experiments; these cells die in culture whereas all other phenotypes are stable. Cells expressing the phenotype of progenitor pro-T cells (1 clone) or pre T cells (2 clones) were rarely encountered. In summary, the overall distribution of $\gamma\delta$ T cells generated under limiting dilution conditions resembles that observed in bulk cultures.

Acquisition of immunocompetence by pro-T cell progeny

Fresh pro-T cells do not lyse K562 and P815 cells either in the presence or in the absence of anti-CD3 antibodies (ref. 7 and not shown). Upon culture in the presence of IL-4, these cells acquire strong cytolytic activity detectable in the presence of anti-CD3 mAbs (Figure 4). The acquisition of lytic capacity correlates with

differentiation into mature T cells and peaks after 4-5 days in culture. In contrast to the pro-T cell progeny generated in IL-2-driven cultures, cells harvested from IL-4-driven cultures do not display any (or minimal) NK activity. These results demonstrate the immunocompetence of lymphocytes generated by *in vitro* exposure of pro-T cells to lymphokines and reveal the distinct functional behaviour of the pro-T cell progeny recovered from IL-4 and IL-2-supported cultures.

CONCLUDING REMARKS

In the present report, we provide evidence for the involvement of IL-4 in the development of human T cell precursors. In response to IL-4, human pro-T cells undergo several rounds of cell division and differentiate into functionally competent mature $\gamma\delta$ TCR⁺ lymphocytes *in vitro*, a process which does not involve the IL-2 pathway previously implicated in the generation of $\alpha\beta$ T cells. The independence of IL-4 triggered proliferation from the IL-2 pathway is suggested by the fact that blocking of high affinity IL-2-receptors with an anti-IL-2R α mAb does not abrogate IL-4 induced pro-T cell proliferation. In addition, IL-4, not IL-2 driven maturation of pro-T cells takes place in the absence of stromal cells. The constitutive transcription of the IL-4 gene by up to 45% of pro-T cells and their IL-4 responsiveness suggest the existence of an auto- or paracrine IL-4/IL-4R pathway which could be involved in the *in vivo* generation of $\gamma\delta^+$ T lymphocytes. At least a fraction of pro-T cells might utilize such an IL-4-triggered pathway or, alternatively, all pro-T cells could employ it at a circumscribed differentiation stage. Recently, it has been described that CD3⁻TCR⁻CD4⁻CD8⁻ human thymocytes may give rise to $\gamma\delta$ T cells when cultured in the presence of IL-7 (47). The initial population used in that study was not depleted from CD2⁺ cells and contained CD3/TCR $\gamma\delta^{\text{dull}}$ cells. It was postulated that the lymphokine just favored the realization of a pre-established cell maturation program (e.g. transition from the $\gamma\delta^+$ stage to the $\gamma\delta^{\text{bright}}$ stage). In contrast, the data shown here are based on

a pro-T cell population lacking CD2 or CD3/TCR $\gamma\delta$ expression as assessed by flow cytometry and by the inability of anti-CD3 or anti- γ antibodies to induce elevations of intracellular calcium levels (data not shown). By consequence, the expression of CD3/TCR $\gamma\delta$ and additional surface markers (CD2, CD4 and/or CD8, IL-2R α) observed in our *in vitro* system possibly reflects true cell differentiation, i.e. *de novo* expression of surface components as a result of irreversible commitment to successive developmental stages.

The different quantitative outcome of pro-T cell cultures set up with IL-2 and IL-4, as well as the distinct lytic activity displayed by the pro-T cell progeny obtained in the presence of IL-2 and IL-4, suggest that either different subpopulations of pro-T cells utilize distinct growth factors or, alternatively, that the same cell responds to different lymphokines at different stages of intrathymic development. At present, we cannot distinguish between these two alternatives, although experiments performed under limiting dilution conditions favor the latter interpretation (unpublished results). The alternative use by a given T cell precursor of either lymphokine pathway may be a consequence of the availability of IL-2 and IL-4 in different thymic microenvironments. Irrespective of these possibilities, the IL-2 and IL-4 pathways may skew differentiation of T cell precursors towards a preponderance of either $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ T cells. These results are intriguing in view of the developmental control of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ TCR expression. Cells bearing the $\gamma\delta$ TCR precede the $\alpha\beta$ TCR in the murine, and avian system during fetal development. In humans, the developmental expression of the two TCR types has been approached by trying to correlate different intrathymic subpopulations with distinct ontogenetic states. The early expression of the IL-4 gene may be implicated in the differentiation and maturation events leading to the acquisition of T cell-specific surface molecules after the first thymic colonization.

Although growth factors may be crucial for *in vivo* proliferation and differentiation of pro-T cells, additional signals might be required, e.g. for the

induction of T cell receptor gene rearrangement. Molecular analysis of the T cell receptor loci of pro-T cells has shown that the α and β loci are in germ line configuration, whereas the γ and δ loci are already rearranged (ref. 6 and our unpublished results). Furthermore, Northern blot hybridization of total cytoplasmic RNA has revealed the presence of functional γ transcripts and the absence of α chain mRNA (3). Whereas the *in vitro* rearrangement of α and β TCR genes and the generation of $\alpha\beta$ TCR bearing lymphocytes may require direct interaction with thymic epithelial components (5 and this report), the development of $\gamma\delta$ T cells is independent of non-lymphoid (i.e CD7⁻) cells, possibly because the γ and δ TCR genes are already rearranged in this cell population. These findings may be integrated into a model according to which, upon migration from the bone marrow to the thymus, pro-T cells face a series of developmental choices. Upon contact with stromal cells a sequential TCR rearrangement, as well as lymphokine production and growth factor receptor expression, take place. Since interleukin production and lymphokine receptor expression are tightly controlled during development, the timing of such stimuli may be critical in determining whether cells expressing the $\gamma\delta$ or $\alpha\beta$ TCR will be preferentially expanded.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Drs. C. Mawas, M. Brenner, J. Jodoi, J. de Vries, F. Sánchez-Madrid, A. Moretta and M. López-Botet for the kind gift of mAbs, C. Terhost for the CD3 δ , ϵ , γ , ζ probes, M Crumpton for the IL-4 probe and A. de la Hera for critical reading of the manuscript. Thanks are also given to E. Leonardo and J.A. Gonzalo for technical assistance and to K.M. Sweeting for editorial assistance. We are also indebted to the Paediatric Cardiosurgery Unit (C.E. Ramón y Cajal, Madrid) for the thymus samples, and to Hoffman-La Roche and Sandoz for recombinant IL-2 and IL-4, respectively. This work was supported in part by grants from CICyT, EC and FISS. A. Bárcena is recipient of a Research Award from the Comunidad Autónoma de Madrid.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Analysis of CD3 and IL-4 transcription in intrathymic pro-T cells.

Freshly purified pro-T cells (10^5 cells per slide) were hybridized *in situ* with cDNA digoxigenin-11-dUTP-labeled probes corresponding to the genes encoding the monomorphic chains of CD3 complex (a) γ , (b) δ , (c) ϵ , (d) ζ , (e) IL 2R α (Tac) and (f) IL-4. Human pro-T cells cultivated *in vitro* for 18 days in the presence of exogenous IL-4 hybridized *in situ* with an IL-4 probe (g) or fresh pro-T cells hybridized with a mouse immunoglobulin probe (J11) (h) served as controls. Representative fields were photographed (600 fold magnification).

Figure 2. IL-4 promotes the growth of human pro-T cells.

Pro-T cells (10^6 cells ml⁻¹) were cultured in the absence of lymphokines (squares) or in the presence of 160 ng/ml of IL-4 (triangles) or 50 u/ml of IL-2 (circles). Triplicate cultures were performed in the absence (A) or in the presence (B) of 1:200 dilution of anti-Tac mAb (H108). Proliferation was quantitated by [³H]-thymidine uptake at the indicated days of culture.

Figure 3. IL-4 induces the differentiation of human pro-T cells into mature T-cells.

Pro-T cells immunoselected from fresh adult human thymus were cultured at a concentration of 1.5×10^6 cells ml⁻¹ in medium containing 160 ng/ml of IL-4. Two-color immunofluorescence analysis was performed as described in Materials and Methods at day 18 of culture with the indicated mAbs.

Figure 4. Induction of cytotoxic activity in human pro-T cells cultured in the presence of IL-4.

The cytotoxic activity of human pro-T cells after 14 days in culture (1.5×10^6 cells ml^{-1}) with 160 ng/ml of IL-4 (A) or 50 u/ml of IL-2 (B) was tested in a 4 hr ^{51}Cr -release assay, either in the presence (closed symbols) or in the absence (open symbols) of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-CD3, using P815 (circles) and K562 (triangles) tumor cells as targets. The phenotypes of the effector cells upon in vitro differentiation in the presence of IL-4 was 95.6% CD2^+ , 95% CD3^+ , 90% TCR-delta-1^+ , 2% WT31^+ , 40% CD8^+ , 3% CD4 , 72% TCS-1^+ and in the presence of IL-2 97% CD2^+ , 87% CD3^+ , 23% TCR-delta-2^+ , 70% WT31^+ , 28% CD8^+ , 42% CD4^+ , 13.5% TCS-1^+ .

REFERENCES

- 1.-Lobach, D.F. and Haynes, B.F. (1987). *J. Clin. Immunol.* 7, 81-97.
- 2.-Haynes, B.F., Martín, M.E., Kay, H.H. and Kurtzberg, J. (1988). *J. Exp. Med.* 168, 1061-1080.
- 3.-Toribio, M.L., Alonso, J.M., Bárcena, A., Gutiérrez, J.C., de la Hera, A., Marcos, M.A.R., Márquez, C. and Martínez-A., C. (1988). *Immunol. Rev.* 104, 55-79.
- 4.-Toribio, M.L., Gutiérrez-Ramos, J.C., Pezzi, L., Marcos, M.A.R. and Martínez-A., C. (1989). *Nature* 342, 82-85.
- 5.-de la Hera, A., Marston, W., Aranda, C., Toribio, M.L. and Martínez-A., C. (1989). *International Immunol.* 1, 471-478.
- 6.-Toribio, M.L., de la Hera, A., Borst, J., Marcos, M.A.R., Márquez, C., Alonso, J.M., Bárcena, A. and Martínez-A., C. (1988). *J. Exp. Med.* 168, 2231-2249.
- 7.-Carding, S.R., Jenkinson, E.J., Kingston, R., Hayday, A.C., Bottomly, K. and Owen, J.J.T. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3342-3345.
- 8.-Zlotnik, A., Ransom, J., Frank, G., Fischer, M. and Howard, M. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3856-3860.
- 9.-Saito, H., Hatake, K., Dvorak, A.M. et al. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2288-2292.
10. Palacios, R., Sideras, P. and von Boehmer, H. (1987). *EMBO J.* 6, 91-95
- 11.-Bárcena, A., Toribio, M.L., Pezzi, L. and Martínez-A., C. (1990) *J. Exp. Med.*, 172, 439-446.
- 12.-Dalloul, A.H., Djavad Mossalayi, M., Dellagi, K., Bertho, J.M. and Debré, P. (1989). *Eur. J. Immunol.* 19, 1985-1990.
- 13.-McMichael, A.J., Pilch, J.R., Galfre, G., Mason, D.Y., Fabre, J.W. and Milstein, C. (1979). *Eur. J. Immunol.* 9, 205-210.
- 14.-Spits, H., Yssel, H., Leeuwenberg, J. and de Vries, J.E. (1985). *Eur. J. Immunol.* 15, 88-91.
- 15.-Carrera, A.C., Sánchez-Madrid, F., López-Botet, M., Bernabeu, C. and de Landázuri, M.O. (1987), *Eur. J. Immunol.* 17, 179-186.
- 16.-Malissen, B., Rebai, N., Liabeuf, A. and Mawas, C. (1982). *Eur. J. Immunol.* 12, 739-747.
- 17.-Eisenbarth, G.S., Haynes, B.F., Schroer, J.A. and Fauci, A.S. (1980). *J. Immunol.* 124, 1237-1244.

- 18.-Abo, T. and Balch, C.M. (1981). *J. Immunol.* 127, 1024-1029.
- 19.-Berger, A.E., Davis, J.E. and Cresswell, P. (1981). *Hum. Immunol.* 3, 231-245.
- 20.-Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F. and Zieger, A. (1978). *Cell* 14, 9-20.
- 21.-Colombani, J., Lepaje, V. and Calil, J. (1983). *Tissue Antigens* 22, 97-107.
- 22.-Nakamura, Y.T., Inamoto, K., Sugie, H., Masutani, T., Shindo, Y., Tagaya, A., Yamauchi, K., Ozawa, and Yodoi, J. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1318-1322.
- 23.-Band, H., Hochstenbach, F., McLean, J., Hata, S., Krangel, M.S. and Brenner, M.B. (1987). *Science* 238, 682-684.
- 24.-Ciccone, E., Ferrini, S., Bottino, C., Viale, O., Prigione, I., Pantaleo, G., Tambussi, G., Moretta, A. and Moretta, L. (1988). *J. Exp. Med.* 168, 1-11.
- 25.-Jitsukawa, S., Faure, F., Lipinski, M., Triebel, F. and Hercend, T. (1987). *J. Exp. Med.* 166, 1192-1197.
- 26.-Aparicio, P. Alonso, J.M., Toribio, M.L., Marcos, M.A.R., Pezzi, L., and Martinez-A.,C. (1989) *J.Exp.Med.*170,1009-1014.
- 27.-Van der Elsen, P., Shepley, B.A., Borst, J., Cooligan, J.E. et al. (1984).*Nature* 312,413-418.
- 28.-Gold, D.P., Puck, J.M., Pettey, C.L., Cho, M., Coligan, J., Woody, J.N. and Terhosh C. (1986). *Nature* 321, 431-434.
- 29.-Krissansen, G.W., Owen, M.J., Verbi, W., and Crumpton, M.J.,(1986), *EMBO J.*,5,1799-1808.
- 30.-Weissman, A.M., Hou, D., Orloff, D.G., Modi, W.S., Sevanez, H., O'Brien, S.J., and Klausner R.D. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9709-9713
- 31.-Tautz, D., and Pfeifle, C. (1989). *Chromosoma*,98,81-85.
- 32.-Anderson, P., Caligiuri, M., Ritz, J. and Schlossman, S.F. (1989). *Nature* 341, 159-162.
- 33.-Furley, A.J., Mizutani, S., Weilbaecher, K., Dhaliwal, H.S., Ford, A.M., Chan, C., Molgaard, H.V., Toyonaga, B., Mark, T., van den Elsen, P., Gold, D., Terhos, C. and Greaves, M.F. (1986). *Cell* 46, 75-87.
- 34.-Van Dongen, J.J.M., Quertermous, T., Bartram, C.R., Gold, D.P., Wolvers-Tettero, I.L., Comans-Bitter, M., Hooijkaas, H., Adriaansen, H.J., de Klein, A., Raghawachar, A., Ganser, A.,

- Duby, A.D., Sejdman, J.G., van den Eslen, P. and Terhost, C. (1987). *J. Immunol.* 138, 1260-1269.
- 35.-Georgopoulos, K., van den Elsen, P., Bier, E., Maxam, A. and Terhost, C. (1988). *EMBO J.* 7, 2401-2407.
- 36.-Lewis, D.B., Prickett, K., Larsen, A., Grabstein, K., Weaver, M. and Wilson, C.B. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9743-9747.
- 37.-Mitchell, L.C., Davis, L.S., and Lipsky, R.E., (1989), *J. Immunol.* 142, 1548-1557.
- 38.-Paliard, X., de Waal Malefijt, R., de Vries, J.E. and Spits, H. (1988). *Nature* 335, 642-644.
- 39.-Palacios, R., Studer, S., Samaridis, J., and Pelkonen, J. (1989), *EMBO J.* 8, 4053-4063.
- 40.-Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G. and Schlossman, S. (1979). *J. Immunol.* 123, 1312.
- 41.-Triebel, F. and Hercend, T. (1989). *Immunol. Today* 10, 186-188.
- 42.-Wu, Y.-J., Tian, W.-T., Snider, R.M., Rittershaus, C., Rogers, P., LaManna, L. and Ip, S.H. (1988). *J. Immunol.* 141, 1476-1479.
- 43.-Koning, F., Knot, M., Waseenaar, F. and van den Elsen, P. (1989). *Eur. J. Immunol.* 19, 2099-2105.
- 44.-Falini, B., Flenghi, L., Pileri, S., Pelicci, P., Fagioli, M., Martelli, M.F., Moretta, L. and Ciccone, E. (1989). *J. Immunol.* 143, 2480-2488.
- 45.-Casorati, G., de Libero, G., Lanzavecchia, A. and Migone, N. (1989). *J. Exp. Med.* 170, 1521-1535.
- 46.-Parker, C.M., Groh, V., Band, H. et al (1990), *J. Exp. Med.* 171, 1597-1612.
47. Groh, V., Fabbì, M., and Strominger, J. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87. 5973-5977

Table I. Acquisition of T cell markers on pro-T cells cultured in the presence of rIL-4

		Percentage of cells expressing								
Day of culture		CD7	CD2	CD3	$\alpha\beta$ -TCR	$\gamma\delta$ -TCR	CD4	CD8	YTA-1	tac
A	3	69	10	3	1	3	0.1	0.5	35	5
	5	75	41	13	5	10	3	6	28	24
	9	81	82	57	20	36	12	32	55	22
	14	89	85	78	25	56	7	44	98	11
B	15	96	92	85	18	68	7	45	95	10

Pro-T cells (A) and CD7⁺ pro-T cells (B) were cultured at a density of 1.5×10^6 cells ml⁻¹ in medium containing 160 ng/ml of human rIL-4. Quantitative flow cytometry of 2×10^4 viable cells was performed as described in Materials and Methods at the indicated days of culture.

Table 2: Phenotype of clones derived from human pro-T cells cultured with IL-4

Group	Phenotyp	No of clones isolated
I	CD2 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ ⁺ V δ 1/J δ 1/2 ⁺ V δ 2 ⁻ V γ 9 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻	18
	CD2 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ ⁺ V δ 1/J δ 1/2 ⁺ V δ 2 ⁻ V γ 9 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁺	3
II	CD2 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ ⁺ V δ 1/J δ 1/2 ⁺ V δ 2 ⁻ V γ 9 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	4
	CD2 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ ⁺ V δ 1/J δ 1/2 ⁺ V δ 2 ⁻ V γ 9 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	4
	CD2 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ ⁺ V δ 1/J δ 1/2 ⁺ V δ 2 ⁻ V γ 9 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	1
III	CD2 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ ⁺ V δ 1/J δ 1/2 ⁻ V δ 2 ⁻ V γ 9 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	1
IV	CD2 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ ⁺ V δ 1/J δ 1/2 ⁻ V δ 2 ⁺ V γ 9 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁺	1
V	CD2 ⁺ CD3 ⁺ $\gamma\delta$ ⁺ V δ 1/J δ 1/2 ⁻ V δ 2 ⁻ V γ 9 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻	13
VI	CD2 ⁻ CD3 ⁻ TCR ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻	1
	CD2 ⁺ CD3 ⁻ TCR ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻	1
	CD2 ⁻ CD3 ⁺ $\alpha\beta$ ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	1
	CD2 ⁺ CD3 ⁺ $\alpha\beta$ ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	1

Pro-T cells were seeded as described in the Materials and Methods section, giving rise to 0.3 clones/ culture. After 6 weeks of propagation in IL-4 containing medium, cells were subjected to fluorocytometric analysis. Clones bearing a comparable $\gamma\delta$ repertoire (I-V) or lacking $\gamma\delta$ TCR (VI) were grouped. Within groups I-V cells only differ in the expression of accessory molecules (CD4, CD8). In group VI, one clone exhibits a pro-T cell phenotype (negative for CD2, CD3, CD4 and CD8), one resembles pre-T cells (positive only for CD2), and two express $\alpha\beta$ TCR.

DEVELOPMENTAL REGULATION AND TISSUE-SPECIFIC
EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN HUMAN T-CELL ONTOGENY.

Running title: **Gene regulation in human T-cell ontogeny**

María José Sánchez, José Carlos Gutiérrez-Ramos, José Luis de la Pompa,
Juanjo Lozano, Carlos Martínez-A., and María Luisa Toribio.

Centro de Biología Molecular. (CSIC). Universidad Autónoma de Madrid.
Campus de Cantoblanco. 28049 Madrid. Spain.

Address correspondence to:

Dr. M.L. Toribio

Centro de Biología Molecular, CSIC.

Universidad Autónoma de Madrid .

Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid. Spain.

Tfno. 34-1-3974252

Fax 34-1-3974799

SUMMARY

Hematopoietic stem cells expressing VLA-4 and LFA-3 cell adhesion receptors, as well as Tfr and 4F2 activation molecules, are identified in the human fetal liver before acquisition of lineage-specific markers. T-cell commitment events involving the transcription of genes encoding the δ -, ϵ -, γ - and ζ -chains of the CD3 complex and the expression of IL-2R β , but not IL-2R α molecules, take place in hematopoietic precursors before migration to the embryonic thymus, whereas activation of genes coding for IL-2 and IL-4 is induced only intrathymically. Availability of IL-2 allows initial differentiation of fetal liver T-cell precursors into CD8⁺ CD3⁻ IL-2R α ⁻ immature T cells. After interaction with thymic epithelial cells, however, IL-2-responsiveness results in IL-2R α gene activation and terminal differentiation into CD3⁺ TCR- α/β ⁺ mature T cells. Therefore, acquisition of competence to transcribe IL-2 and IL-2R α genes appears to be a critical intrathymic maturation event in T-cell lineage commitment.

INTRODUCTION

The thymus is the primary organ for the differentiation of T-cell precursors into immunocompetent T lymphocytes (Miller and Osoba, 1967; Cantor and Weissman, 1976; Stutman, 1978). Early on during fetal gestation, hematopoietic precursors migrating from the fetal liver colonize the thymic rudiment (Moore and Owen, 1967; Le Douarin and Jotereau, 1975; Lobach and Haynes, 1987), where they undergo a complex series of maturational events encompassing extensive cell proliferation, changes in the regulation of several genes and expression of the T-cell receptor (TCR)-CD3 complex (reviewed in Adkins et al., 1987; Möller, 1988; Fowlkes and Pardoll, 1989; Strominger, 1989).

Efficient performance of this developmental program is mostly dependent upon cellular interactions between developing thymocytes and thymic stromal components (i.e. epithelial cells, macrophages and dendritic cells) (Cantor and Weissman, 1976; Zinkernagel, 1978; Stutman, 1978; Haynes, 1984; Palacios et al., 1989). Although very little is known about the nature of stromal-hematopoietic cell associations, accumulating evidence supports that such interactions provide the signals required for the production of multiple soluble mediators displaying widely diverse maturation effects. Indeed, developmental regulation of cytokine and cytokine receptor gene expression appears to affect several steps throughout T-cell ontogeny (reviewed in Möller, 1988; Strominger, 1989; Martínez-A., 1990; Haynes et al., 1990). Particularly, the transient activation of both interleukin 2 (IL-2) and IL-2 receptor (IL-2R) genes at early intrathymic differentiation stages (Raulet, 1985; Ceredig et al., 1985; de la Hera et al., 1985; Toribio et al., 1988a; 1989; Rothenberg et al., 1988; Carding et al., 1989) has proved critical for the autocrine proliferation and further differentiation of T-cell precursors into TCR-bearing mature T cells (Jenkinson et al., 1987; Shimonkewitz et al., 1987; Toribio et al., 1988b; 1989; Tentori et al., 1988).

To date, however, less is known on the developmental programs operating very early in fetal T-cell ontogeny. Different studies have shown that hematopoietic stem cells arising from yolk sac, and possibly from other sources, migrate to the fetal liver at 5-6 wk of human gestation (reviewed in Gale, 1987; Haynes et al., 1989). Immunofluorescence assays performed on frozen sections of early human fetal tissues have demonstrated that hematopoietic precursors first colonize the human thymus at 8- to 10-wk of fetal gestation (Lobach et al., 1985; Lobach and Haynes, 1987). From these studies, T-cell precursors scattered throughout the fetal liver and perithymic mesenchyme were identified by the expression of CD7 molecules in 7-8.5-wk-old fetuses (Haynes et al., 1988), supporting that T-cell commitment events may

occur very early in human ontogeny, before the time of precursor cell homing into the thymus. Nonetheless, our knowledge on the specific maturation signals that drive hematopoietic stem cell differentiation toward the T-cell lineage remains hazy. On the other hand, the observation that CD7⁺ fetal liver cells can give rise to both lymphoid and myeloerythroid progenies (Haynes et al., 1988; 1989) poses the central question of whether prethymic maturation programs ensure thymic seeding by committed T-cell precursors or, alternatively, events subsequent to homing into the thymus determine terminal commitment of multipotent progenitors to the T-cell lineage.

The present study was undertaken to analyze prethymic and intrathymic maturation events underlying T-cell differentiation during human ontogeny. Our results indicate that inducible antigens involved in cell activation and growth, as well as leukocyte adhesion molecules, are expressed in human fetal liver hematopoietic precursors before acquisition of lineage-specific surface markers. At this early ontogenic stage, T-cell maturation events involving the expression of mRNA encoding the CD3 components, as well as IL-2R β , but not IL-2R α , gene expression are shown to take place in the fetal liver before the time of intrathymic colonization. Moreover, we show that interaction of fetal liver T-cell precursors with the thymic epithelium induces the activation of IL-2 and IL-2R α genes and results in T-cell differentiation.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenotypic characterization of hematopoietic stem cells in human fetal liver.

To address the sequential expression of lineage-specific cell surface markers on fetal liver hematopoietic precursors, cytofluorometric analyses were performed in fresh Ficoll-Hypaque-isolated cells from 15 different 8- to 20-wk-old fetal liver samples, using the panel of monoclonal antibodies (MAbs) listed in Table 1. These studies revealed that none of the 9 samples of fetal liver

analyzed from 8 to 10 wk of gestation expressed T-lineage specific markers on the cell surface, as assessed by staining with MAbs specific for CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 (Table 2), CD25 or CD28 (not shown) molecules. Neither did we observe reactivity of fetal liver cells with MAbs against pan-leukocyte molecules (CD45) (Table 2), nor with antibodies specific for myeloid (CD13, CD14), NK (CD11b, CD16, CD57) or B-lymphoid (CD19, CD20) differentiation antigens (data not shown). Similarly, surface molecules normally expressed on hematopoietic precursors, such as CD34 or CD38 (not shown), as well as class I or class II Major Histocompatibility Complex (MHC) molecules, could not be detected in fetal liver cells before 10 wk of gestation (Table 2). At later embryonic stages, however, a gradual increase in the expression of leukocyte- (CD45) and T-lineage (CD7) specific markers was observed in fetal liver samples obtained from 13- to 20-wk-old fetuses (Table 2). According to the sequence of appearance of T-cell precursors in fetal liver, mature T cells progressively increased in fetal spleen and thymus. As shown in Table 2, a phenotypic distribution similar to that of the neonatal thymus (Toribio et al., 1988a) was observed in fetal thymuses at wk 20, while at this gestational age both mature B and T cells were observed in the spleen.

Our results, therefore, indicate that at early gestational stages conventional leukocyte markers cannot be detected on the membrane of fetal liver cells. In contrast, high levels of 4F2 and transferrin receptor (TfR, CD71) molecules were expressed on most cells (>98%) from those fetal liver samples (Figure 1). Both molecules belong to a family of cell-surface inducible antigens currently believed to play a role in cell activation and growth (Haynes et al., 1981; Hercend et al., 1981). These data, together with the observation that up to 50% of 8- to 10-wk fetal liver cells are in S or G₂ + M phase of the cell cycle (not shown), and more than 85% react with the Ki67 MAb (specific for a nuclear antigen expressed during the G₁, S, G₂ and M cell cycle phases) (Campana et

al., 1989), can be taken as evidence for the proliferative activity of these putative hematopoietic precursors in the fetal liver at early ontogenic stages.

More important for understanding the functional capabilities of hematopoietic stem cells during leukocyte development was the observation of high levels of expression of a variety of cell adhesion receptors on fetal liver cells. As shown in Figure 1, reactivity with a MAb specific for the LFA-3 (CD58) member of the immunoglobulin superfamily, as well as with a MAb recognizing the β_1 subunit of integrins (VLA- β , CD29), was observed in most fetal liver cells. Interestingly, high levels of expression of the VLA-4 (CDw49d) member of the β_1 integrin subfamily were also detected on virtually all fetal liver cells (Figure 1), whereas the expression of other members of the same subfamily such as VLA-1 was undetectable (not shown). Therefore, although expression of these antigens cannot be selectively ascribed to hematopoietic stem cells, most, if not all, hematopoietic precursors present in the fetal liver must express such molecules before acquisition of lineage-specific surface markers. These findings, together with the recent observation that VLA-4 acts as a Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor (Holzmann et al., 1989), allows predictions about the role that cell-cell interactions, as well as integrin-extracellular matrix interactions, could play in the proliferation, maturation and migration of fetal liver leukocyte precursors.

Lastly, it must be stressed that, although the phenotypic pattern displayed by liver cells from 8- to 10-wk-old fetuses support their multiprogenitor hematopoietic potential, a minor population of T-cell precursors was identified in 10-wk fetal liver samples after digitonin permeabilization by means of intracytoplasmic expression of CD45, CD7 and CD3- ϵ molecules (data not shown). In agreement, rare CD7⁺ CD3- ϵ ⁺ cells (0.6 to 2%) have been observed in 7- to 10- wk fetal liver samples by immunohistochemical studies which cannot distinguish between cytoplasmic and surface staining (Lobach and Haynes, 1987; Haynes et al., 1988; Campana

et al., 1989). Moreover, cells showing a similar phenotypic distribution have been identified in the neonatal human thymus as the earliest intrathymic T-cell precursors (Furley et al., 1986; Toribio et al., 1988b). These data suggest that T-cell lineage commitment decisions are taken very early in ontogeny, before colonization of the embryonic thymus.

Prethymic maturation events in human T-cell development. Expression of genes coding for the ϵ , δ , γ and ζ chains of the TCR-associated CD3 complex.

In the light of these data, we further analyzed early T-cell commitment events taking place in human T-cell ontogeny by looking at the transcriptional status of the genes encoding the ϵ , δ , γ and ζ protein subunits of the CD3 complex. To this end, "*in situ*" hybridization studies were performed on fixed cytocentrifuge preparations of 10-wk fetal liver cells, by using CD3-chain specific cDNA probes. As shown in Figure 2, specific messages for the ϵ - (Figure 2A), δ - (Figure 2B) and γ -chains (Figure 2C) of the CD3 complex were expressed in up to 47, 43 and 30% of cells, respectively, whereas less than 10% of cells in those samples had already transcribed the CD3- ζ gene (Figure 2D). The specificity of hybridization was confirmed in parallel studies performed on purified peripheral blood B cells by using the same probes (data not shown). Given that expression of CD3 mRNA appears to be T-cell specific (van Dongen et al., 1987), these data indicate that CD3 gene transcription may be one of the earliest events taking place in T-cell development. Supporting this view, high levels of expression of CD3- ϵ and CD3- δ transcripts have been detected in T-cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALL) arrested at very early stages of T-cell differentiation, in which both TCR- β and TCR- γ chain genes remained in germ-line configuration (van Dongen et al., 1987).

Although the precise order of transcription of individual CD3-chain genes cannot be inferred from our studies, transcription of CD3- ϵ , - δ and - γ genes seems to precede gene expression of CD3- ζ during ontogeny. In this regard,

recent results showing that expression of functionally competent TCR-CD3 complexes is dependent on the assembly of CD3- ζ to the disulfide-linked TCR- α/β heterodimer bound to CD3 (γ , δ , ϵ) (Sussman et al., 1988; Sancho et al., 1989) suggest that a delayed activation and expression of CD3- ζ genes may play a crucial role in the regulation of TCR expression during T-cell development. Supporting this view, it has been recently shown that, even though TCR- β chain proteins can be first detected intracytoplasmically (cTCR- β) at 10.5 wk of gestation in rare cCD3- ϵ^+ fetal liver T-cell precursors (0.14%), membrane expression of CD3 on cTCR- β^+ cells is a gradual process which peaks at wk 17-20 (Campana et al., 1989).

In the light of these data, what remains to be determined is whether cTCR- β^+ cells represent recirculating thymocytes seeding the liver or whether maturation events involving TCR gene rearrangements might also take place prethymically. To address this question, the transcriptional status of genes coding for both α/β and γ/δ TCR heterodimers was analyzed by Northern blotting on total cytoplasmic RNA from three different 10-wk fetal liver samples. As shown in Figure 3, no β -chain RNA transcripts were detected in the fetal liver samples analyzed by using a cDNA C β_2 specific probe (Jur β_2 , Yoshikai et al., 1984). In contrast, a high expression of both nonfunctional (1.0 Kb) and mature (1.3 Kb) TCR- β messages was observed in phytohaemagglutinin (PHA)-activated adult peripheral T cells, as well as in a thymus sample obtained from a 20-wk-old fetus in which 56% of thymocytes expressed surface TCR- α/β molecules. Low amounts of both β -chain transcripts were also detectable in spleen cells obtained from the same fetus, while only immature TCR- β messages were expressed in neonatal intrathymic pro-T cells lacking surface TCR- α/β .

Hybridization of the same blot with a C γ specific probe (Yoshikai et al., 1987) revealed that, as observed for the TCR- β chain, functional TCR- γ transcripts (1.7 Kb) were totally absent in 10-wk fetal liver cells (Figure 3). TCR- γ gene transcripts were weakly expressed in 20-wk fetal thymus and

spleen, as well as in adult activated peripheral T cells, where cell-surface expression of TCR- γ/δ was detected in 0.8, 3 and 2 % of cells, respectively. In addition, higher levels of TCR- γ RNA were observed in neonatal pro-T cells (Figure 3), which still do not express TCR- γ/δ on the cell surface (Toribio et al., 1988b).

The lack of expression of both TCR- β and TCR- γ gene transcripts in liver samples from 10-wk-old fetuses suggests that limited, if any, TCR gene rearrangements have occurred in the fetal liver at the critical embryonic age of hematopoietic intrathymic colonization. Alternatively, it is possible that the level of TCR- β and - γ mRNA is below the detection limit of the Northern blotting technique. This possibility appears unlikely in the light of previous studies performed on neonatal pro-T cells showing that, even when most cells (>95%) within this intrathymic precursor subset display TCR- β gene germ-line patterns, high levels of expression of immature TCR- β transcripts can be detected (Figure 3 and Toribio et al., 1988b). In addition, β and γ constant region germ-line transcripts have been detected in the mouse embryonic thymus early in development, prior to TCR gene rearrangement (reviewed in Palacios et al., 1988; Fowlkes and Pardoll, 1989). As proposed for the Ig heavy chain loci (Yancopoulos and Alt, 1985), such transcripts could reflect the "opening" of chromatin in the TCR loci. Therefore, it is tempting to speculate that accessibility of TCR loci to recombinases is tightly regulated during T-cell development, and selectively induced intrathymically.

Expression of the intermediate-affinity IL-2R β in fetal liver cells.

A major question in T-cell development centers on the role that soluble factors produced in the early embryo have on the proliferation and differentiation of T-cell precursors. The past two years have clarified the physiological relevance of the IL-2/IL-2R pathway in the intrathymic development of human mature T cells (reviewed in Toribio et al., 1988a; 1990; Strominger, 1989; Haynes, 1990).

We have shown that expression of the intermediate-affinity IL-2R β on intrathymic T-cell precursors mediates IL-2-responsiveness and results in IL-2R α gene activation and high-affinity IL-2R α/β expression (Toribio et al., 1989).

To characterize the transcriptional status of the IL-2R genes in hematopoietic precursors present in the fetal liver, *in situ* hybridization studies were performed in 10-wk fetal liver cells, using specific IL-2R α (Nikaido et al., 1984) and IL-2R β (Hatakeyama et al., 1989) cDNA probes. As shown for intrathymic pro-T cells, fetal liver progenitors contained virtually no detectable IL-2R α messenger RNA (<1% positive cells, Figure 2E). However, high levels of IL-2R β transcripts were detected in up to 70% of cells (Figure 2F).

The functional relevance of IL-2R β gene expression in the fetal liver was confirmed at the protein level by IL-2-binding assays performed in freshly-isolated 10-wk fetal liver cells. As shown in Figure 4, Scatchard analysis of equilibrium binding studies performed by using serial dilutions of ¹²⁵I-labelled human recombinant IL-2 (rIL-2) (1pM-25nM final concentration) indicated that fetal liver cells displayed 1,605 intermediate-affinity (K_d=936pM) IL-2-binding sites per cell (assuming an uniform distribution of sites), whereas low- and high-affinity IL-2R were not detected (Figure 4). Therefore, as shown previously on intrathymic T-cell precursors (Toribio et al., 1989), IL-2R β is expressed on fetal liver cells independently of the IL-2R α molecule. Interestingly, the number of IL-2R β molecules detected on fetal liver cells and intrathymic T-cell precursors is similar to that described for activated T lymphocytes (1,500-2,000 sites/cell), while only about 600 IL-2R β molecules are expressed on resting mature T cells (reviewed in Waldmann, 1989). These data suggest that mechanisms involved in IL-2R β expression must be developmentally controlled during ontogeny. Since IL-2R β is also expressed independently of IL-2R α on resting B lymphocytes and NK cells (reviewed in Smith, 1988; Waldman, 1989), what remains to be determined is whether the observed expression of IL-2R β in fetal liver reflects a common feature of

multipotent hematopoietic stem cells or, alternatively, IL-2R β is restricted to T-cell lineage precursors. Although further studies will be required to distinguish between these two possibilities, our findings showing that CD3 transcripts are expressed in a significant fraction of fetal liver cells suggest that most, if not all, fetal liver T-cell precursors may express IL-2R β molecules. Therefore, IL-2R β gene expression can be regarded as one of the earliest maturation events taking place in fetal liver hematopoietic stem cells committed to the T-cell lineage.

IL-2 gene activation is selectively induced intrathymically in human T-cell development.

The expression of IL-2R β on fetal liver progenitors, together with the observation that the IL-2R β molecule by itself can mediate growth signal transduction (Hatakeyama et al., 1989), suggested a possible physiological role for the IL-2 pathway in the proliferation and differentiation of prethymic T-cell precursors. Therefore, we next investigated whether IL-2 was produced *in vivo* in the fetal liver. We used the polymerase chain reaction (PCR) method (Saiki et al., 1988) to determine the transcriptional status of the IL-2 gene in 6 different fetal liver samples obtained from 9- to 20-wk-old fetuses. Aliquots of single-strand cDNAs synthesized from total RNA obtained from freshly-isolated fetal liver cells were amplified using IL-2-specific oligonucleotide primers. As shown in Figure 5, no IL-2 RNA messages were produced in fetal liver cells isolated from 9- to 20-wk-old fetuses (Figure 5, lanes 3-8). In contrast, high levels of IL-2 transcripts must be produced in thymic (lane 1) and spleen (lane 2) cells isolated from the same 20-wk-old fetus, as in lane 3. Since both immature and mature T cells can be phenotypically identified in the thymus and spleen at wk 20 of gestation, the possibility existed that IL-2 gene activation was selectively induced in the subset of mature T cells. This can be ruled out by similar studies performed in neonatal thymocytes and mature T cells,

showing that *in vivo* IL-2 mRNA expression was restricted to intrathymic T-cell precursors (pro-T cells) (Figure 5, lane 9 and Toribio et al., 1989). Supporting these data, recent results in mice have shown that IL-2 mRNA is produced at early ontogenic stages by immature thymocytes, whereas IL-2 transcripts decrease dramatically when mature T cells arise in embryonic thymus (Carding et al., 1989). Therefore, in both mice and humans IL-2 gene expression must be developmentally controlled. Moreover, our results showing that IL-2 transcripts are selectively expressed *in vivo* in intrathymic, but not in prethymic T-cell precursors, further provide evidence for the requirement of a thymic inductive microenvironment in IL-2 gene activation.

That common developmental strategies may regulate the activation kinetic of genes coding for lymphokines other than IL-2 throughout fetal ontogeny is supported by the observation that patterns of gene expression similar to those obtained for IL-2 were detected in parallel studies when IL-4-specific primers were used (Figure 5). However, as previously observed in mice (Carding et al., 1989), our results indicate that levels of IL-4 mRNA produced in the fetal thymus may be lower than those of IL-2 (Figure 5), suggesting that the frequency of IL-2 mRNA-expressing thymocytes is higher. Whether different subpopulations of human T-cell precursors may produce distinct lymphokines or, alternatively, the same intrathymic subset is able to produce both IL-2 and IL-4, remains to be clarified. Another open question concerns the intrathymic inductive signals involved in lymphokine gene activation during T-cell development. In this regard, it has been recently shown that interactions between developing thymocytes and thymic stromal cells mediated by adhesion molecules provide the signals for the production of multiple cytokines (including IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, G-CSF, M-CSF, GM-CSF and LIF) which, in turn, can regulate gene activation of each other and their receptors (reviewed in Martínez-A., 1990). In view of these data, it is possible that availability of different soluble mediators at distinct ontogenic stages

and/or within discrete intrathymic microenvironments may be critical in determining signalling pathways for cytokine and cytokine receptor gene expression during T-cell development.

Involvement of the IL-2 pathway in the initial differentiation of fetal liver hematopoietic precursors along the T-lymphocyte lineage. Generation of CD8⁺ CD3⁻ immature T cells.

A fundamental question posed by the previous results is whether functional competence of IL-2R β expressed on fetal liver T-cell precursors is acquired before migration to the embryonic thymus or, alternatively, it is induced intrathymically. Our IL-2-binding studies demonstrated that IL-2R β -expressing fetal liver cells efficiently bound IL-2. Thus, the functional relevance of the IL-2/IL-2R β interaction was analyzed *in vitro* by culturing freshly-isolated 10-wk fetal liver cells with concentrations of rIL-2 (100 U/ml) able to bind to the intermediate-affinity IL-2R β . Low proliferation rates were detected in these cultures during the initial 7-10 days. However, although functional responses varied between different fetal liver samples, the initial decrease in cell viability was consistently followed by the induction of high proliferative responses. Maximal proliferation was reached around day 15-20, when cellular yield was up to 120% and a significant fraction of blastic cells was observed (cell viability >95%) and, thereafter, cultures declined steadily. In contrast, low, if any, proliferation was detected in cultures set up in the presence of rIL-4 (300 ng/ml) and was totally absent unless exogenous lymphokines were added.

Molecular changes encompassing IL-2-promoted proliferation were further analyzed in cultured fetal liver cells by immunofluorescence studies using T-cell-specific MAbs. As shown in Table 3, representative results obtained from these studies indicated that, independently of culture conditions, a large majority (70-98%) of fetal liver cells *in vitro* acquired the CD45

common-leukocyte antigen, as well as MHC class I molecules (not shown), after 20 days of culture, suggesting that either genetic programs for CD45 and MHC class I induction in hematopoietic progenitors were already initiated in the fetal liver, or soluble factors influencing such a process were spontaneously produced *in vitro*. More importantly, expression of CD7 molecules was selectively observed on most CD45⁺ cells (94% of the whole cell sample) cultured with IL-2 (Table 3 and Figure 6), demonstrating that hematopoietic precursors within 10-wk fetal liver can give rise to cells of the T-cell lineage.

In contrast, no CD7 expression was detected in the absence of exogenous IL-2, and rare (5%) CD7⁺ cells were observed after supplementation with IL-4. Under these culture conditions, however, lack of CD7 expression correlated with the acquisition of low levels of CD4 molecules (CD4^{low}) on a significant proportion (25-27%) of CD45⁺ CD7⁻ cells (Table 3). These cells also expressed variable levels of CD14 molecules (Table 3), classically adscribed to the myeloid lineage, suggesting that myeloid differentiation of fetal liver hematopoietic precursors was also driven *in vitro*. In agreement, recent results have shown that fetal liver cells are capable of giving rise to CFU-GM colonies under appropriate culture conditions (Haynes et al., 1988). Therefore, specific cytokines promoting myeloid differentiation might be spontaneously produced by fetal liver cells cultured *in vitro*.

Although our results did not address the question of whether acquisition of CD7 molecules determines irreversible commitment to the T-cell lineage, recent results indicate that CD45⁺ CD7⁺ cells in both fetal liver and neonatal thymus include myeloerythroid precursors (Haynes et al., 1988; Kurzberg et al., 1989; de la Hera et al., 1989). We have observed, however, that increase in CD7⁺ cells paralleled a quantitative similar decrease in CD14⁺ cells along IL-2-driven cultures. In the light of these data, it is tempting to speculate that availability of IL-2 within the thymic microenvironment may be critical in

tilting the T-cell- *vs* myeloid-differentiation balance. This is further supported by phenotypic studies showing that acquisition of CD7 molecules was followed by the expression of low levels of CD2 and high levels of CD8 T-cell antigens on 12% and 63%, respectively, of IL-2-cultured fetal liver cells, whereas CD4⁺ cells were not detected (Figure 6). It must be stressed, however, that the CD8⁺ T-cell subset comprised large-sized blastic cells which did not include mature T cells, since no expression of the CD3-TCR complex was detectable (Table 3 and Figure 6). These data are particularly relevant given that similar immature CD8⁺ single positive cells have been characterized in the mouse thymus as the immediate precursors of CD4⁺CD8⁺ double-positive cortical thymocytes (reviewed in Möller, 1988).

Whether immature CD8⁺ cells emerging from human fetal liver T-cell precursors define a T-cell differentiation stage equivalent to that described for their mouse intrathymic counterparts must await the demonstration of direct precursor-product relationships, since we have been as yet unable to induce further differentiation of this subset (Table 3). However, this possibility seems very likely taking into account the common functional behavior displayed by both mouse and human CD8⁺ immature blasts. As previously reported in mice (Möller, 1988), human CD8⁺ CD3⁻ cells lack expression of IL-2R α (Table 3), suggesting that the proliferative signals acting upon these cells are mediated by a mechanism independent of the conventional high-affinity IL-2R α/β . That such a mechanism may involve IL-2/IL-2R β interactions is supported by the finding that most CD8⁺ CD3⁻ fetal liver-derived cells (79% of the culture sample) were reactive with a recently available anti-IL-2R β MAb (Nakamura et al., 1989) (Figure 6). However, in contrast to what has been shown for intrathymic double negative T-cell precursors, binding of IL-2 to individual IL-2R β molecules did not lead to the induction of IL-2R α on immature CD8⁺ cells (Figure 6). This result is consistent with the possibility that IL-2R α inducibility is selectively impaired in the CD8⁺ CD3⁻ human

subset, as has been shown by Rothenberg et al. (1988) in both CD8⁺ single positive and CD4⁺ CD8⁺ double positive murine immature thymocytes.

Taken together, our results indicate that signals provided by IL-2 either directly, by interacting with the IL-2R β , or indirectly, by inducing *in vitro* production of cytokines derived from hematopoietic or stromal fetal liver cells, may be held responsible for the observed T-cell maturation pathway.

Interaction of fetal liver T-cell precursors with thymic epithelium induces IL-2R α gene activation and drives differentiation into TCR- α/β ⁺ mature T cells.

The relevance of our results has to be analyzed considering current data supporting that mature T cells differentiate from double negative IL-2R α ⁺ T-cell precursors (Shimonkevitz et al., 1987; Tentori et al., 1988) through the double positive transitional stage (reviewed in Möller, 1988). Thus, as proposed by Rothenberg et al. (1988), loss of IL-2R α inducibility must be a necessary but reversible aspect of normal T-cell maturation. Alternatively, a permanent block of IL-2R α inducibility in double negative precursors and their CD8⁺ immature progeny may be correlated to commitment to death as a double positive immature thymocyte. Although our results showing that IL-2R α was never expressed on fetal liver-derived CD8⁺ immature T cells along their differentiation pathway would favour the last possibility, IL-2R α gene activation has to be analyzed in the context of signalling pathways operating within the thymic microenvironment. Thus, the effect of the thymic epithelium on the differentiation potential of fetal liver T-cell precursors was explored *in vitro*.

Fetal liver cells were co-cultured with monolayers of a thymic epithelial cell line (TEC, >95% positive for cytokeratine AE3 MAb, <5% reactive with an anti-fibroblast MAb TE-7), derived from neonatal thymus, in medium containing 100 U/ml rIL-2. Cells grown under these culture conditions showed proliferation kinetics similar to those observed in the presence of IL-2 alone,

although higher proliferative responses were consistently displayed. As observed for IL-2-driven cultures, cellular proliferation paralleled a sequential acquisition of CD45 and CD7 molecules, which were expressed on 94% and 53% of cells, respectively, after 20 days (Table 3 and Figure 7). A great majority of CD45⁺ CD7⁺ cells (85%, 45% of the whole sample), also acquired CD2 molecules (Table 3) but, in contrast to IL-2-driven cultures, most CD7⁺ CD2⁺ cells (89%) were within the CD2 bright subset, while low levels of CD2 were observed in a small cell fraction (11%) (Figure 7). Interestingly, interaction of IL-2-cultured fetal liver T-cell precursors with the TEC epithelial cells also resulted in the expression of IL-2R α molecules on a large (47%) cell fraction (Table 3), shown to coexpress high CD2 levels (Figure 7). More importantly, acquisition of IL-2R α molecules was detected in early culture times (7-10 days, not shown) and strictly correlated with the appearance of CD3⁺ mature T cells (Table 3). In the light of these data, expression of CD3-associated TCR molecules was assessed on the fetal liver-derived CD3⁺ progeny by two-color cytofluorometric studies using MAbs specific for the α/β - (BMA031, Lanier et al., 1987) or γ/δ - (TCR- δ 1, Band et al., 1987) TCR complex. Few, if any, TCR- γ/δ ⁺ cells were detected throughout culture (not shown), while TCR- α/β molecules were expressed on most CD3⁺ cells (Figure 7). Since acquisition of the CD3-associated TCR- α/β complex correlated with the differentiation of fetal liver cells into CD4⁺ single positive cells (Table 3), the correlated distribution of CD3 *vs* CD4 molecules was assessed by two-color flow cytometry. These studies demonstrated that CD3 was expressed on most (81%) CD4⁺ cells, displaying high levels of CD4 expression. In contrast, no CD3 expression was observed on the small fraction of CD4^{low} cells (Table 3) detected in these cultures (not shown). These data, together with the observation that CD14 molecules were acquired by a small subset (9%) of fetal liver cells, further support that, in addition to T-cell differentiation, myeloid differentiation was also driven in cultures where epithelial cells were present. Neither T-lymphoid nor myeloid

differentiation were observed when only TEC cells were cultured in the presence of IL-2, without fetal liver cells, (not shown), ruling out possible overgrowth of contaminating mature T cells from the TEC cultures.

According to the observed CD3 *vs* CD4 distribution, few CD8⁺ cells (<2%) were detected within the CD3⁺ subset (not shown), suggesting that CD4⁺ CD8⁺ double positive cells were not generated in the culture. This was confirmed by two-color flow cytometric analyses showing a mutually exclusive distribution of both CD4 and CD8 differentiation antigens (Figure 7). In agreement, CD1a expression, currently associated with the double positive phenotype, was not detected under all tested culture conditions (Table 3). These data suggest that CD1a⁺ CD4⁺ CD8⁺ cells do not significantly contribute to the generation of TCR- α/β -expressing mature T cells from fetal liver precursors. However, the possibility that a small double positive subset does serve as T-cell progenitor cannot be excluded, considering that most cells within this subset die rapidly in culture, as they do *in vivo* (reviewed in Scollay et al., 1988). In addition, it is noteworthy that, in contrast to IL-2-driven cultures, expansion of CD8⁺ immature T cells was not observed throughout culture in the presence of epithelial cells, although a small cell fraction (12%) displaying this phenotype was observed at day 20 (Table 3). Whether CD8⁺ CD3⁻ fetal liver cells comprise the precursors of mature T cells remains unanswered, since we have been as yet unable to induce differentiation of mature T cells when an enriched preparation of CD8⁺ CD3⁻ cells was co-cultured with the TEC epithelial cell line plus IL-2.

Another important question is whether requirements for the generation of either CD4⁺ or CD8⁺ mature T cells are different. This seems very likely regarding our results showing that differentiation of CD4⁺ cells is preferentially driven in our culture conditions. As previously proposed by Palacios et al. (1989), this could reflect the existence of functionally distinct types of epithelial cells within the thymic microenvironment, influencing the

differentiation of T-cell precursors into a given subset. Such functional differences could involve either production of different cytokines and/or expression of distinct surface molecules on thymic epithelial cells. Although the answer to this question requires more extensive phenotypic and functional studies, it is noteworthy that IL-1 β , IL-6 and IL-7 were produced by the TEC cell line (not shown). Finally, it has to be stressed that T-cell differentiation was never observed when IL-2R α molecules were not induced on the fetal liver progeny, nor in the absence of IL-2. Therefore, these results provide evidence that, after interaction with the thymic epithelium, IL-2/IL-2R β -mediated induction of IL-2R α expression on T-cell precursors may be a critical intrathymic maturation event preceding TCR gene rearrangement and ultimately determining T-cell lineage commitment.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Samples

Human fetal tissues were obtained after legal termination of pregnancy. Gestational age determined by crown/rump length, foot length and menstrual records (Kelemen et al., 1979), ranged from 8 to 20 wk. Infant thymus samples were obtained from 1 month- to 3 year-old patients undergoing corrective cardiac surgery. Cell suspensions were teased from thymus, spleen and liver samples, separated on Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and washed three times in RPMI 1640 medium (Gibco, Paisley, Scotland) containing 2mM L-glutamine, 10mM HEPES, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Gibco) (complete medium).

Intrathymic T-cell precursors, referred to as pro-T cells, were isolated by consecutive treatments with anti-CD1a (Na1.34), -CD4 (HP2/6), -CD8 (B9.4), -CD3 (PSV-T3b) and -CD2 (Leu5b) MAbs plus rabbit complement (Sera Lab. Ltd.,

Sussex, UK), as described previously (Toribio et al., 1988b). After Ficoll-Hypaque centrifugation, recovered viable cells were treated again, in one step, with a cocktail of the indicated MAbs and incubated 30 min. at 4°C with magnetic beads coated with affinity-purified sheep anti-mouse IgG (Dynabeads M-450; Dynal, Oslo, Norway) following manufacturer's recommendations. This procedure allowed the isolation of a highly-purified preparation of pro-T cells (>99% CD45⁺, 50-95% CD7⁺, CD1a⁻ 2⁻ 3⁻ 4⁻ 8⁻; Toribio et al., 1988b; 1989).

B cells were isolated from peripheral blood samples obtained from healthy volunteers after Ficoll-Hypaque centrifugation, followed by immunoselection performed by treatment with anti-CD19 and anti-CD20 B-cell-specific MAbs and incubation with magnetic beads. Cells obtained after this treatment lacked expression of CD2 and CD3 T-cell markers.

Activated peripheral T cells were obtained after culture of peripheral blood mononuclear cells in complete medium containing 1% PHA (Difco, Detroit, MI) for 7 days.

Fetal Liver Cultures

Freshly-isolated fetal liver cells (2×10^6) were cultured in 24-well macroplates (Costar, Cambridge, MA) at 10^6 cells/ml in complete medium alone, or in complete medium containing either rIL-2 (100 U/ml) (Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland) or optimal mitogenic doses (300ng/ml) of rIL-4 (Sandoz, Basel, Switzerland); or were co-cultured with monolayers of the TEC thymic epithelial cell line (2×10^4 cells/well) in complete medium containing 100 U/ml rIL-2.

Monolayers of thymic epithelial cells were prepared from neonatal thymuses according to Palacios et al. (1989). The cultures were initiated in D-valine-supplemented MEM medium (Gibco) containing 2mM L-glutamine, 10mM Hepes, 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 10% FCS (D-

valine medium). After 5-7 days, cells were incubated at 37°C for 2 days in D-valine medium containing 5µg/ml mycophenolyc acid (Sigma, St. Louis, MO.) to further eliminate hematopoietic cells. The cell monolayers were subsequently removed from the wells every 7 days by treatment with Puck's modified solution containing trypsin and EDTA (Gibco) and cells were propagated in D-valine medium. The TEC epithelial cell line was maintained under these culture conditions for 3 months, and thereafter epithelial cells were co-cultured with fetal liver cells. At this time, immunofluorescence analyses performed after membrane permeabilization by treatment with digitonin (0.005%) during 3 min at room temperature, showed that TEC cells were >95% reactive with the anti-Keratin antibody AE3 (Woodcok-Mitchell et al., 1982) and with an anti-LFA-3 MAb (Sánchez-Madrid et al., 1982) and <5% reactive with the anti-fibroblast MAb TE-7 (Haynes, 1984) (Sera Lab Ltd, Sussex, UK).

Quantitative Flow Cytometry

Cytofluorometric studies were performed by indirect immunofluorescence. Cells were incubated with saturating amounts of the corresponding MAb (Table 1) at 4°C for 30 min., followed by two washes. Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated F(ab)'₂ goat anti-mouse IgG (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) was used as a second step reagent, as previously described (Toribio et al., 1988b). For dual parameter analyses, cells stained following the described procedure, or directly labeled with available FITC-coupled MAbs (FITC-GAP8.3 and FITC-OKT3, -OKT4, -OKT8, Ortho Diagnostic, Raritan, NJ), were further incubated either with biotin-conjugated MAbs (3A1, MAR-108) followed by phycoerythrin (PE)-coupled streptavidin (Southern Biotechnology) or with available PE-coupled MAbs (T11-RD1, Coulter Clone, Hialeah, FL; PE-Leu4, PE-Leu2a, PE-Leu3a, Becton Dickinson Corp.,

Mountain View, CA). Irrelevant isotype-matched MAbs (Becton Dickinson) were used as negative controls.

Quantitation of the surface staining of 1×10^4 viable cells was performed using an EPICS Profile flow cytometer (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Cells were considered positive for the tested antigen when fluorescence intensity was above the upper limit of the negative control. The data were computed for graphic display using a program developed in our laboratory.

***In situ* Hybridization**

In situ hybridization studies were performed following a modification of the original technique described by Samoszuk and Nansen (1990), by using cDNA probes labeled by random priming with digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim, FRG), according to the manufacturer's recommendations. The CD3- ϵ (Gold et al., 1986) and CD3- δ (van den Elsen et al., 1984) probes were the kind gift of Dr. C. Terhorst. CD3- γ (Krissansen et al., 1986) and CD3- ζ (Weissman et al., 1988) probes were kindly provided by Drs M.J. Crumpton and R.D. Klausner, respectively. The IL-2R α (Nikaido et al., 1984) and IL-2R β (Hatakeyama et al., 1989) probes were generously provided by Dr. T. Honjo and T. Taniguchi, respectively. *In situ* hybridization was carried out on cytocentrifuge preparations of 10-wk freshly-isolated fetal liver cells ($5-10 \times 10^4$ cells/slide). Paraformaldehyde-fixed slides were dehydrated, paraffin-wax embedded and stored until used. Pretreatment steps were performed according to the supplier's instructions. Prehybridization was performed for 1h at 42°C in 50% formamide, 5xSSC, 50 $\mu\text{g/ml}$ heparin, 0.1% Tween 20 and 100 $\mu\text{g/ml}$ denatured salmon sperm DNA, as previously described by Tautz and Pfeiflec (1989). Hybridization was carried out using 80ng of digoxigenin-labeled DNA in 100 μl of hybridization solution at 42°C overnight. For the immunological detection, slides were incubated for 2 h at room temperature with 200 μl of a 1:1000 dilution of an anti-digoxigenin antibody conjugated to alkaline

phosphatase (Boehringer Mannheim). Slides were then washed and developed by incubation for 6 h at room temperature in a solution of nitroblue tetrazolium and X-phosphate in 100mM ClH, 50mM MgCl₂, 100mM Tris pH9.5, 1mM levamisole and 0.1% Tween 20. Color reaction was stopped with Tris-EDTA and slides were dehydrated in ethanol series before mounting in DPX solution for microscopic examination. The number of positive cells was determined over background labeling detected after hybridization of purified peripheral B cells with the described probes.

Northern Blot Hybridization

Total cellular RNA was isolated using the guanidinium isothiocyanate procedure (Chirwing et al., 1979). Samples (12 µg) were subjected to electrophoresis on 1% agarose-formaldehyde gels, transferred to nylon membranes and hybridized as previously described (Toribio et al., 1988b) with the ³²P-labelled C β (Yoshikai et al., 1984) and C γ (Yoshikai et al., 1987) cDNA probes, kindly provided by Dr. T. Mak. A β actin probe was used as positive control to compare the amount of RNA loaded in each track.

IL-2-binding Assays

Aliquots of freshly-isolated fetal liver cells (2×10^7) were extensively washed and treated for 3 min at 4°C with 0.15M NaCl, 0.1M glycine (pH4) and washed again for three times. Cells (10^6) were then incubated with serial dilutions (1pM-25nM final concentration) of ¹²⁵I-labeled IL-2 (Amersham Corp., Amersham, UK) for 1h at 4°C, as previously described (Robb et al., 1984). Specifically bound and free ¹²⁵I-labeled IL-2 were determined by solid scintillation counting. The calculated values for the dissociation constant (Kd) and the number of binding sites per cell were derived by Scatchard computer analysis of equilibrium binding data, according to Munson et al. (1980). The data were corrected for nonspecific binding of IL-2, determined in the presence

of a 250-fold molar excess of unlabeled rIL-2 (Hoffman-La Roche), and for the loss of ligand binding activity incurred during the IL-2 binding procedure.

PCR Analysis

The polymerase chain reaction (PCR) method (Saiki et al., 1988) was used to determine cytokine transcription by the MAPPING™ technique (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), using IL-2- and IL-4-specific oligonucleotide primers. β actin primers were used as controls to compare and monitor for efficient cDNA synthesis among different samples. Reverse transcription of total RNA (2 μ g) into single-strand cDNA was performed using AMV reverse transcriptase (Boehringer Mannheim), according to the manufacturer's recommendations. One-twentieth of each cDNA sample was amplified in 100 μ l PCR reaction containing 2.5 U of Taq polymerase (Perkin-Elmer-Cetus) and specific primers (Clontech). DNA was amplified by 60 cycles of 94°C for 1min, 55°C for 1min and 72°C for 3 min, in a Perkin-Elmer Thermal Cycler. Amplification products (10 μ l) were run on a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. The 1Kb ladder (Gibco/BRL, Bethesda, ML) was used to measure for DNA fragment size.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Ronald Palacios for his continuous support and helpful discussions; Dr. Agustín Zapata for experimental advice; Dr. Tomasso Meo for introducing us into the PCR technique; Dr. Guido Kroemer for the critical reading of the manuscript; Drs. Jan de Vries, Claude Mawas, Francisco Sánchez-Madrid, Miguel López-Botet, Barton Haynes, Jannie Borst, Michael Brenner and Junji Yodoi for the kind gift of MAbs; and Drs. Cox Terhorst, Michael Crumpton, Richard Klausner, Tasuku Honjo, Tak Mak and Tadatsugu Taniguchi for providing cDNA probes used in this study. The

authors are grateful to Esther Leonardo, Consuelo Martín and José Angel Gonzalo for excellent technical assistance, and to Kathleen Sweeting for editorial assistance. We are also indebted to the Pediatric Cardiosurgery Unit (C. E. Ramón y Cajal, Madrid) for the adult thymus samples, to the Obstetrics and Gynecology Unit (Hospital de Móstoles and Hospital Severo Ochoa, Madrid) for the fetal samples, to Hoffman-La Roche for the rIL-2 and to Sandoz for the rIL-4. This work was supported in part by grants from Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social and North Atlantic Treaty Organization RG(30) 0954/88.

REFERENCES

- Abo, T., and Balch, C.M. (1981). A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *J. Immunol.* 127, 1024-1029.
- Adkins, B., Mueller, Ch., Okada, C.Y., Reichert, R.A., Weissman, I.L., and Spangrude, G.J. (1987). Early events in T-cell maturation. *Ann. Rev. Immunol.* 5, 325-365.
- Band, H., Hochstenbach, F., McLean, J., Hata, S., Krangel, M S., and Brenner, M.B. (1987). Immunochemical proof that a novel rearranging gene encodes the T cell receptor δ subunit. *Science* 238, 682-684.
- Barnstable, C.J., Bodmer, C.J., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F., and Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis. *Cell* 14, 9-20.

Berger, A.E., Davis, J.E., and Cresswell, P. (1981). A human leukocyte antigen identified by a monoclonal antibody. *Human Immunol.* 3, 231-245.

Campana, D., Janossy, G., Constan-Smith, E., Amlot, P.L., Tian, W-T., Ip, S., and Wong, L. (1989). The expression of T-cell receptor-associated proteins during T-cell ontogeny in man. *J. Immunol.* 142, 57-66.

Cantor, H., and Weissman, I. (1976). Development and function of subpopulations of thymocytes and T lymphocytes. *Prog. Allergy.* 20, 1-64.

Carding, S.R., Jenkinson, E.J., Kingston, R., Hayday, A.C., Bottomly, K., and Owen, J.J.T. (1989). Developmental control of lymphokine gene expression in fetal thymocytes during T-cell ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 3342-3345.

Carrera, A.C., Sánchez-Madrid, F., López-Botet, M., Bernabeu, C., and O. de Landázuri, M. (1987). Involvement of the CD4 molecule in a post-activation event on T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* 17, 179-186.

Ceredig, R., Lowenthal, J.W., Nabholz, M., and MacDonald, R. (1985). Expression of interleukin-2 receptors as a differentiation marker on intrathymic stem cells. *Nature* 314, 98-100.

Chirwing, J.M., Pryzbyla, A.E., Mac Donald, R.J., and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonucleases. *Biochemistry* 18, 5294-5299.

Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., and Shaper, J.H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol* 133, 157-165.

de la Hera, A., Toribio, M.L., Márquez, C., and Martínez-A., C. (1985). Interleukin-2 promotes growth and cytolytic activity in human T3+4-8-thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82, 6268-6271.

de la Hera, A., Martson, W., Aranda, C., Toribio, M.L., and Martínez-A., C. (1989). Thymic stroma is required for the development of human T cell lineages. *International Immunol.* 1, 471-478.

Engleman, E.G., Warnke, R., Fox, R.I., Dilly, J., Benike, C.J., and Levy, R. (1981). Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78, 1791-1795.

Evans, R.L., Wall, D.W., Platsoucas, C.D., Siegal, F.P., Fikrig, S.M., Testa, C.M., and Good, R.A. (1981). Thymus-dependent membrane antigens in man: Inhibition of cell-mediated lympholysis by monoclonal antibodies to T_H2 antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78, 544-548.

Fowlkes, B.J., and Pardoll, D. (1989). Molecular and cellular events of T cell development. *Adv. Immunol.* 44, 207-264.

Furley, A.J., Mizutani, S., Weilbaecher, K., Dhaliwal, A.S., Ford, A.M., Chan, L.C., Molgaard, H.V., Toyonaga, B., Mak, T., van den Elsen, P., Gold, D., Terhost, C., and Greaves, M.F. (1986). Developmentally regulated rearrangement and expression of genes encoding the T-cell receptor-T3 complex. *Cell* 46, 75-87.

Gale, R.P. (1987). Development of the immune system in human fetal liver. *Thymus* 10, 45-56.

Griffin, J.D., Ritz, J., Beveridge, R.P., Lipton, J.M., Daley, J.F., and Schlossman, S.F. (1983). Expression of My7 antigen on myeloid precursor cells. *Int. J. Cell Cloning* 1, 33-48.

Gold, D.P., Puck, J.M., Pettey, C.L., Cho, M., Coligan, J.E., Woody, J.N., and Terhorst, C. (1986). Isolation of cDNA clones encoding the 20k non-glycosylated polypeptide chain of the human T-cell receptor/T3 complex. *Nature* 321, 431-434.

Hansen, J.A., Martin, P.J., and Nowinski, R.C. (1980). Monoclonal antibodies identifying a novel T cell antigen and Ia antigens of human leukocytes. *Immunogenetics* 10, 247-260.

Hatakeyama, M., Tsudo, M., Minamoto, S., Kono, T., Doi, T., Miyata, T., Miyasaka, M., and Taniguchi, T. (1989). Interleukin-2 receptor β chain gene: generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNAs. *Science* 244, 551-556.

Hatakeyama, M., Mori, H., Doi, T., and Taniguchi, T. (1989). A restricted cytoplasmic region of the IL-2 receptor β chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization. *Cell* 59, 837-845.

Haynes, B.F., Eisenbarth, G.S., and Fauci, A.S. (1979). Human lymphocyte antigens: Production of a monoclonal antibody that defines functional thymus-derived lymphocyte subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 5829-5833.

Haynes, B.F., Hemler, M.E., Mann, D.L., Eisenbarth, G.S., Hamer, J., Mostowski, H.S., Thomas, C.A., Strominger, J.L., and Fauci, A.S. (1981). Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J. Immunol.* 126, 1409-1414.

Haynes, B.F. (1984). The human thymic microenvironment. *Adv. Immunol.* 36, 87-141.

Haynes, B.F., Martin, M.E., Kay, H.H., and Kurtzberg, J. (1988). Early events in human T cell ontogeny. Phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early fetal tissues. *J. Exp. Med.* 168, 1061-1080.

Haynes, B.F., Denning, S.M., Singer, K.H., and Kurtzberg, J. (1989). Ontogeny of T-cell precursors: a model for the initial stages of human T-cell development. *Immunol. Today* 10, 87-91.

Haynes, B.F., Denning, S.M., Le, Ph.T., and Singer, K.H. (1990). Human intrathymic T-cell differentiation. *Seminars in Immunol.* 2, 67-77.

Hemler, M.E., Sánchez-Madrid, F., Flotte, T.J., Krensky, A.M., Burakoff, S.J., Bhan, A.K., Springer, T.S., and Strominger, J.L. (1984). Glycoproteins of 210.000 and 130.000 M.W. on activated T cells: Cell distribution and antigenic relation to components on resting cells and T cell lines. *J. Immunol.* 132, 3011-3018.

Hercend, T., Ritz, J., Schlossman, S.F., and Reinherz, E.L. (1981). Comparative expression of T9, T10, and Ia antigens on activated human T cell subsets. *Human Immunol.* 3, 247-259.

Holzmann, B., Mc Intyre, B.W., and Weissman, I.L. (1989). Identification of a murine peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an α chain homologous to human VLA-4 α . *Cell* 56, 37-46.

Howard, F.D., Ledbetter, J.A., Wong, J., Bieber, C.P., Stinson, E.B., and Herzenberg, L.A. (1981). A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation. *J. Immunol.* 126, 2117-2122.

Jenkinson, E.J., Kingston, R., and Owen, J.J.T. (1987). Importance of IL-2 receptors in intra-thymic generation of cells expressing T-cell receptors. *Nature* 329, 160-162.

Kaneoka, H., Perz-Rojas, G., Sasasuki, T., Benike, C.J., and Engleman, E.G. (1983). Human T lymphocyte proliferation induced by a pan-T monoclonal antibody (anti-Leu 4): heterogeneity of response is a function of monocytes. *J. Immunol.* 131, 158-164.

Knapp, W., Rieber, P., Dörken, B., Schmidt, R.E., Stein, H., and Borne, A.E.G. Kr. v. d. (1989). Towards a better definition of human leukocyte surface molecules. *Immunol. Today* 10, 253-258.

Kelemen, E., Calvo, W., and Fliedner, T.M. (1979). Atlas of human hemopoietic development. Springer-Verlag. New York.

Krissansen, G.W., Owen, M.J., Verbi, W., and Crumpton, M.J. (1986). Primary structure of the T3 γ subunit of the T3/T cell antigen receptor complex from cDNA sequences: evolution of the T3 γ and δ subunits. *EMBO J.* 5, 1799-1808.

Kung, P.C., Goldstein, G., Reinherz, E.L., and Schlossman, S.F. (1979). Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* 206, 347-349.

Kurtzberg, J., Denning, S.M., Nycum, L.H., Singer, K.H., and Haynes, B.F. (1989). Immature thymocytes can be driven to differentiate into nonlymphoid lineages by cytokines from thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 7575-7579.

Lampson, L.A., and Levy, R. (1980). Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* 125, 393-398.

Lanier, L.L., Ruitenberg, J.J., Allison, J.P., and Weiss, A. (1987). Biochemical and flow cytometry analysis of CD3 and Ti expression on normal and malignant T cells. In *Leukocyte Typing III*, edited by A.J. McMichael. Oxford: Oxford University Press, pp175-179.

Le Douarin, N.M., and Jotereau, F. (1975). Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras. *J. Exp. Med.* 142, 17-40.

Lobach, D.F., Hensley, L.L., Ho, W., and Haynes, B.F. (1985). Human T cell antigen expression during the early stages of fetal thymic maturation. *J. Immunol.* 135, 1752-1759.

Lobach, D.F., and Haynes, B.F. (1987). Ontogeny of the human thymus during fetal development. *J. Clin. Immunol.* 7, 81-97.

Malissen, B., Rebai, N., Liabeuf, A., and Mawas, C. (1982). Human cytotoxic T cell structures associated with expression of cytolysis. I. Analysis at the clonal cell level of the cytolysis-inhibiting effect of 7 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 12, 739-747.

Martínez-A., C. (organizer). (1990). Interleukins and T-cell development. 31st Forum in Immunology. *Res. Immunol.* 141, 263-312.

McMichael, A.J., Pilch, J.R., Galfre, G., Mason, D.Y., Fabre, J.W., and Milstein, C. (1979). A human thymocyte antigen defined by a hybrid myeloma monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 9, 205-210.

Miller, J.F.A.P., and Osoba, D. (1967). Current concepts of the immunological function of the thymus. *Physiol. Rev.* 47, 437-452.

Möller, G. (ed.) (1988). T-cell precursors. *Immunol.Rev.* 104.

Moore, M.A.S., and Owen, J.J.T. (1967). Experimental studies on the development of the thymus. *J. Exp. Med.* 126, 715-723.

Munson, P.J., and Rodbard, D. (1980). LIGAND: A versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. *Analyt. Biochem.* 107, 220-239.

Nadler, L.M., Anderson, K.C., Marti, G., Bates, M., Park, E., Daley, J.F., and Schlossman, S.F. (1983). B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated and malignant B lymphocytes. *J. Immunol.* 131, 244-250.

Nakamura, Y., Inamoto, T., Sugie, K., Masutani, H., Shindo, T., Tagaya, Y., Yamauchi, A., Ozawa, K., and Yodoi, J. (1989). Mitogenicity and down-regulation of high-affinity interleukin 2 receptor by YTA-1 and YTA-2 monoclonal antibodies that recognize 75-KDa molecules on human large granular lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 1318-1322.

Nikaido, T., Shimizu, A., Ishida, N., Sabe, H., Teshigawara, K., Maeda, M., Uchiyama, T., Yodoi, J., and Honjo, T. (1984). Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature* 311, 631-635.

Palacios, R., and Pelkonen, J. (1988). Prethymic and intrathymic mouse progenitors. Growth requirements and analysis of the expression of genes encoding TCR/T3 components and other T-cell-specific molecules. *Immunol. Rev.* 104, 5-27.

Palacios, R., Studer, S., Samaridis, J., and Pelkonen, J. (1989). Thymic epithelial cells induce in vitro differentiation of pro-T lymphocytes into TCR α , β /T3⁺ and TCR γ , δ /T3⁺ cells. *EMBO J.* 8, 4053-4063.

Perussia, B., Starr, S., Abraham, S., Fanning, V., and Trinchieri, G. (1983). Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J. Immunol.* 130, 2133-2141.

Raulet, D.H. (1985). Expression and function of interleukin-2 receptors on immature thymocytes. *Nature* 314, 101-103.

Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., and Schlossman, S.F. (1979a). Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 4061-4065.

Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., and Schlossman, S.F. (1979b). A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral T cells. *J. Immunol.* 123, 1312-1317.

Reinherz, E.L., Kung, P.C., Goldstein, G., and Schlossman, S.F. (1980). Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 1588-1592.

Robb, R.J., Greene, W.C., and Rusk, C.M. (1984). Low and high affinity cellular receptors for interleukin 2. Implications for the level of Tac antigen. *J. Exp. Med.* 160, 1126-1146.

Rothenberg, E.V., McGuire, K.L., and Boyer, P.D. (1988). Molecular indices of functional competence in developing T cells. *Immunol. Rev.* 104, 29-53.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of cDNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Samoszuk, M., and Nansen, L. (1990). Detection of interleukin-5 messenger RNA in reed-sternberg cells of Hodgkin's disease with eosinophilia. *Blood* 75, 13-16.

Sánchez-Madrid, F., Krensky, A.M., Ware, C., Robbins, E., Strominger, J.L., Burakoff, S.J., and Springer, T.A. (1982). Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2 and LFA-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7489-7493.

Sánchez-Madrid, F., de Landázuri, M.O., Morago, G., Cebrián, M., Acevedo, A., and Bernabeu, C. (1986). VLA-3: a novel polypeptide association with the VLA molecular complex: cell distribution and biochemical characterization. *Eur. J. Immunol.* 16, 1343-1349.

Sancho, J., Chatila, T., Wong, R.C.K., Hall, C., Blumberg, P., Alarcón, B., Geha, R., and Terhost, C. (1989). T-cell antigen receptor (TCR)- α/β heterodimer formation is a prerequisite for association of CD3- ζ_2 into functionally competent TCR-CD3 complexes. *J. Biol. Chem.* 264, 20760-20769.

Scollay, R., Wilson, A., D'Amico, A., Kelly, K., Egerton, M., Pearse, M., and Shortman, K. (1988). Developmental status and reconstitution potential of subpopulations of murine thymocytes. *Immunol. Rev.* 104, 81-120.

Shimonkevitz, R.P., Husmann, L.A., Bevan, M.J., and Crispe, I.N. (1987). Transient expression of IL-2 receptor precedes the differentiation of immature thymocytes. *Nature* 329, 157-159.

Smith, K.A. (1988). The bimolecular structure of the interleukin 2 receptor. *Immunol. Today* 9, 36-37.

Spits, H., Yssel, H., Leenwenberg, J., and de Vries, J.E. (1985). Antigen-specific cytotoxic T cells and antigen-specific proliferating T cell clones can be induced to cytolytic activity by monoclonal antibodies against T3. *Eur. J. Immunol.* 15, 88-91.

Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardey, R., and Sclossman, S.F. (1980). Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J. Immunol.* 125, 1678-1685.

Strominger, J.L. (1989). Developmental biology of T cell receptors. *Science* 244, 943-950.

Stutman, O. (1978). Intrathymic and extrathymic T cell maturation. *Immunol. Rev.* 42, 138-184.

Sussman, J.J., Bonifacino, J.S., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A.M., Saito, T., Klausner, R.D., and Ashwell, J.D. (1988). Failure to synthesize the T cell CD3- ζ chain: Structure and function of a partial T-cell receptor complex. *Cell* 52, 85-95.

Tautz, D., and Pfeifle, Ch. (1989). A non-reactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translocational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98, 81-85.

Tentori, L., Longo, D.L., Zuñiga-Pflucker, J.C., Wing, Ch., and Kruisbeek, A. (1988). Essential role of the interleukin 2-interleukin 2 receptor pathway in thymocyte maturation in vivo. *J. Exp. Med.* 168, 1741-1747.

Todd, R.F.III, Nadler, L.M., and Schlossman, S.F. (1981). Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 126, 1435-1442.

Toribio, M.L., Alonso, J.M., Bárcena, A., Gutiérrez, J.C., de la Hera, A., Marcos, M.A.R., Márquez, C., and Martínez-A., C. (1988a). Human T-cell precursors: involvement of the IL-2 pathway in the generation of mature T cells. *Immunol. Rev.* 104, 55-79.

Toribio, M.L., de la Hera, A., Borst, J., Marcos, M.A.R., Márquez, C., Bárcena, A., Alonso, J.M., and Martínez-A., C. (1988b). Involvement of the IL-2 pathway in the rearrangement and expression of both α/β and γ/δ TCR genes in human T-cell precursors. *J. Exp. Med.* 168, 2231-2249.

Toribio, M.L., Gutiérrez-Ramos, J.C., Pezzi, L., Marcos, M.A.R., and Martínez-A., C. (1989). Interleukin-2-dependent autocrine proliferation in T-cell development. *Nature* 342, 82-85.

Toribio, M.L., Sánchez, M.J., Gutiérrez-Ramos, J.C., de la Pompa, J.L., Leonardo, E., Bárcena, A., and Martínez-A., C. (1990). The original sin of T cells: constitutive activation of the IL-2/IL-2R pathway early in intrathymic development. *Res. Immunol.* 141, 298-303.

Van den Elsen, P., Shepley, B., Borst, J., Coligan, J.E., Markham, A.F., Orkin, S., and Terhorst, C. (1984). Isolation of cDNA clones encoding the 20K T3 glycoprotein of human T-cell receptor complex. *Nature* 312, 413-418.

Van Dongen, J.J.M., Quertermous, Th., Bartram, C.R., Gold, D.P., Wolwers-Tettero, I.L.M., Comans-Bitter, W.M., Hooijkaas, H., Adriaansen, H.J., De Klein, A., Raghavachar, A., Gansen, A., Duby, A.D., Seidman, J.G., van den Elsen, P., and Terhorst, C. (1987). T-cell receptor-CD3 complex during early T-cell differentiation. Analysis of immature T cell acute lymphoblastic leukemias (T-ALL) at DNA, RNA and cell membrane level. *J. Immunol.* 138, 1260-1269.

Verbi, W., Greaves, M.F., Schneider, C., Koubek, K., Janossy, G., Stein, H., Kung, P., and Goldstein, G. (1982). Monoclonal antibodies OKT11 and OKT11A have pan-T reactivity and block sheep erythrocyte "receptors". *Eur. J. Immunol.* 12, 81-86.

Waldmann, T.A. (1989). The multisubunit interleukin-2 receptor. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 875-911.

Weissman, A.M., Hou, D., Orloff, D.D., Modi, W.S., Seunanz, H., O'Brien, S.J., and Klausner, R.D. (1988). Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor ζ chain: Distinction from the molecular CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 9709-9713.

Yancopoulos, G., and Alt, F. (1985). Developmentally-controlled and tissue-specific expression of unrearranged V_H gene segments. *Cell* 40, 271-281.

Woodcock-Mitchell, J., Eichner, R., Nelson, W.G., and Sun, T-T. (1982). Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 95, 580-588.

Yoshikai, Y., Anatoniou, D., Clark, S.P., Yanagi, Y., Sangster, R., van den Elsen, P., Terhost, C., and Mak, T.W. (1984). Sequence and expression of transcripts of the human T cell receptor β -chain genes. *Nature* 312, 521-524.

Yoshikai, Y., Toyonaga, B., Koga, Y., Kimura, N., Griessen, H., and Mak, T.W. (1987). Repertoire of the human T cell gamma genes: High frequency of nonfunctional transcripts in thymus and mature T cells. *Eur. J. Immunol.* 17, 119-126.

Zinkernagel, R.M. (1978). Thymus and lymphohemopoietic cells: their role in T cell maturation in selection of T cells H2 linked Ir gene control. *Immunol. Rev.* 42, 224-270.