

Estudio de la infección de macrófagos peritoneales de ratón por leishmania

Analysis of *leishmania* infection in mouse peritoneal macrophages

CARRILLO, G.; MORALES, G., y ALONSO, C.

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". CSIC-UAM. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco. 28049 Madrid.

RESUMEN

En la infección de monocitos por parásitos del género *Leishmania* se pueden distinguir varias etapas tempranas, que abarcan desde el momento en el que el parásito entra en el hospedador mamífero hasta que se establece la infección. En estas etapas iniciales se encuentran las claves que determinan el éxito en el establecimiento de la infección. Uno de los puntos susceptibles para la contención de la infección es el bloqueo de la interacción del parásito con la célula que infectará. En todas las etapas iniciales están involucradas las moléculas de superficie de *Leishmania*. Se considera a la glicoproteína gp63 como uno de los ligandos que utilizan los parásitos para la unión a sus células hospedadoras. Con el objetivo de inhibir la infección de macrófagos se llevaron a cabo experimentos utilizando diferentes métodos. Como inhibidores se utilizaron anticuerpos policlonales de conejos inmunizados tanto con fragmentos como con la proteína gp63 completa y péptidos sintéticos derivados de su secuencia de aminoácidos. En ambos casos se obtuvo un porcentaje de inhibición que varía del 30% al 65%. Cuando se usan distintos anticuerpos policlonales se observa una cinética de inhibición distinta, lo que estaría indicando la presencia de más de un sitio de interacción con los receptores presentes en la superficie de la célula hospedadora.

Palabras clave: Leishmanolisina. Gp63. kinetoplastidos. Leishmaniasis. Infección.

ABSTRACT

Mononuclear phagocytes are target cells for parasites of the genus *Leishmania*. From the entry into a vertebrate host until establishment of the infection, several crucial phases can be distinguished. These phases may represent the crucial point in the successful establishing of a *Leishmania* infection. The interaction between mononuclear phagocytes and the parasite plays a central role and may constitute a breakpoint in the infection process. One of the surface molecules of these parasites, gp63, a glycoprotein, has been described as ligand for attachment to host cell receptors. In order to inhibit the infection, polyclonal antibodies against gp63 and its fragments as well as specific peptides were used to block the interaction with host cell receptors. In both cases, either with peptides or with antibodies, significant inhibition ranging from 30-65% was obtained. The kinetic of the inhibition with different polyclonal antibodies suggests that gp63 must contain more than one single binding site.

Key words: Leishmanolysin. Gp63. Kinetoplastids. Leishmaniasis. Infection.

Recibido: 15-01-97.

Aceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 259-271]

INTRODUCCIÓN

Los parásitos del género *Leishmania* tienen un ciclo de vida dimórfico, una de las formas es flagelada y vive en intestino del insecto vector, la otra, morfológica y bioquímicamente distinta se desarrolla intracelularmente en mamíferos. Se transmite al hombre como flagelado promastigote, a través de la picadura del insecto, se internaliza en las células de linaje monocítico donde se diferencian a amastigotes y se reproducen dentro de los fagolisosomas de la célula infectada (1).

En la infección por *Leishmania* se pueden distinguir cuatro etapas tempranas, que abarcan desde el momento en el que el parásito entra en el hospedador mamífero hasta que se establece la infección, considerando como establecimiento el momento en el que el parásito es capaz de sobrevivir y reproducirse en el interior de la célula (Fig. 1). La primera etapa, previa al encuentro con la célula hospedadora, el parásito tiene que evadir los mecanismos de defensa que constituyen la primera barrera de contención de cualquier infección, el sistema de complemento. La segunda es la de unión a la célula hospedadora y comprende las interacciones entre receptores y ligandos, unos en la superficie de la célula susceptible de ser infectada y otros en la del parásito. La tercera etapa es la de internalización, donde gran cantidad de señales son transmitidas al interior celular conduciendo a la fagocitosis del parásito unido. En la cuarta y última etapa, la supervivencia y establecimiento de la infección, están involucrados mecanismos tanto del parásito, necesarios para la resistencia a factores lisosomales como el bajo pH y enzimas hidrolíticas, como de la célula que es infectada en la que se modulan señales por parte del mismo parásito y que evitan su eliminación. Las dos últimas etapas pueden englobarse en una misma ya que desde el momento de la internalización o invasión se ponen en marcha los mecanismos que conducen a la supervivencia y establecimiento de la infección.

Para comprender cómo el parásito supera cada una de las etapas tempranas de la infección, es necesario conocer la superficie de *Leishmania* ya que en todas ellas están involucradas las moléculas de superficie.

SUPERFICIE DE *Leishmania*

La superficie de los parásitos del género *Leishmania* es compleja. La molécula más abundante, 10^6 moléculas por célula, que recubre la totalidad

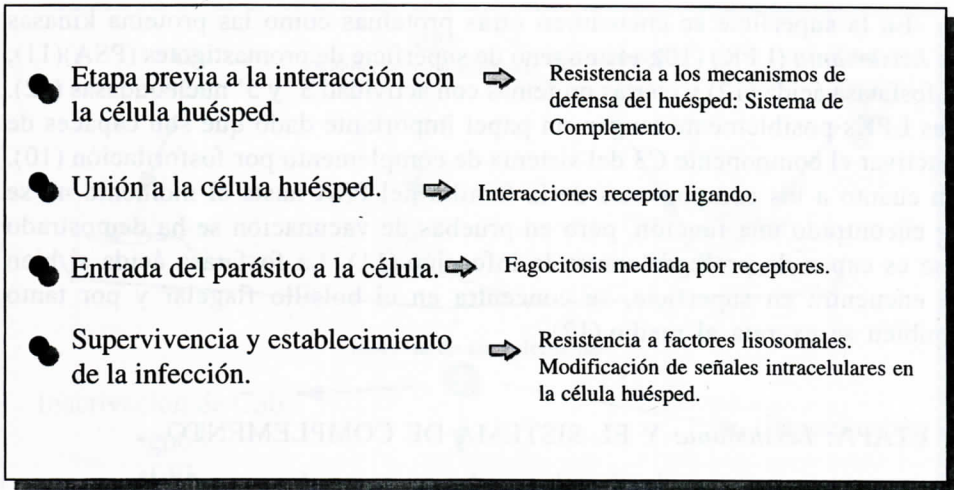


Fig. 1.—Etapas tempranas en la infección por *Leishmania*.

del parásito incluido el flagelo es el lipofosfoglicano (LPG) (2). Está compuesto por una estructura terminal de disacáridos de manosa, un polímero repetido de unidades alternas de manosa y galactosa fosforilados, un núcleo de fosfodisacáridos y un anclaje a la membrana por glicofosfatidil inositol (GPI) (2). Los promastigotes en estado procíclico, en el que no son infectivos y que residen en el intestino del insecto vector, producen una forma corta de LPG con α -galactosa como residuo terminal que se une a una lectina presente en la superficie de las células del epitelio intestinal. En cambio, los metacíclicos, que son infectivos, producen una forma más larga de LPG con más unidades repetidas de disacáridos y α -arabinosa como residuo terminal que no se une a la lectina del insecto lo que permite que se desprenda del intestino pudiendo llegar al huésped mamífero (3). Estas modificaciones, además, hacen al parásito resistente a las condiciones adversas del nuevo ambiente. Al purificar el LPG se encuentra una proteína asociada llamada KMP-11, que esta en relación molar 1:1 con este aunque no esta claro si esta asociación sucede *in vivo* o solo se copurifican (4).

Otra molécula abundante en la superficie de *Leishmania* es una glicoproteína de 63 kd (gp63) anclada a la membrana por una estructura GPI. Hay aproximadamente 5×10^5 moléculas por célula (5). Es una metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} , y aunque hasta el momento no se sabe con certeza cuál es su sustrato natural, es capaz de degradar, hidrolizar, desnaturalizar, catabolizar *in vitro* varias proteínas del hospedador como la molécula CD4 de superficie de linfocitos T y componentes del sistema de complemento (6, 7, 8). Se la relaciona con infectividad, ya que las cepas defectivas en su expresión son menos infectivas (9).

En la superficie se encuentran otras proteínas como las proteína kinasas de *Leishmania* (LPK) (10), el antígeno de superficie de promastigotes (PSA)(11), la fosfatasa ácida (12) y ciertas proteínas con actividad 3' y 5' nucleotidasas (12). Las LPKs posiblemente tengan un papel importante dado que son capaces de inactivar el componente C3 del sistema de complemento por fosforilación (10). En cuanto a los componentes de la familia del PSA hasta el momento no se ha encontrado una función, pero en pruebas de vacunación se ha demostrado que es capaz de proteger contra la infección (11). La fosfatasa ácida si bien se encuentra en superficie, se concentra en el bolsillo flagelar y por tanto también se excreta al medio (12).

1º ETAPA: *Leishmania* Y EL SISTEMA DE COMPLEMENTO

En esta primera etapa el parásito tiene que evadir el sistema de complemento para no ser lisado. El mecanismo de acción del sistema de complemento se basa en tres mecanismos: la deposición y activación secuencial, en la superficie de los organismos a eliminar, que conducen a la lisis por la formación de un complejo llamado de ataque o MAC que se inserta en la membrana formando un poro; la opsonización por recubrimiento con dos componentes del complemento, el C3b y el iC3b (forma inactivada de C3b), que actúan como ligandos para receptores presentes en células con capacidad fagocítica; y la liberación de moléculas que activan y atraen fagocitos.

Leishmania puede activar el sistema de complemento por las tres vías conocidas: La clásica, con presencia de anticuerpos, la alternativa o en ausencia de anticuerpos y más recientemente se implica la activación por la vía mediada por una lectina, la proteína de unión a manosa (6) (Fig.2).

Dos de las moléculas de superficie más abundantes están implicadas en la activación del complemento, el LPG y la gp63 (13), ambas macromoléculas pueden unir y fijar C3b, contienen manosa (las glicosilaciones de la gp63 incluyen manosas) y también son inmunogénicas por lo que pueden inducir la producción de anticuerpos específicos. La forma elongada del LPG que es producida por los promastigotes infectivos (2) y no sólo actúa como barrera física que impide la inserción del complejo final de ataque sino que provoca también su eliminación de la superficie celular. La elongación y modificación del LPG no es el único cambio observado en el paso de promastigotes no infectivos a infectivos, y sabemos que la expresión de la gp63 aumenta (14). Esta proteína también ha sido implicada en la resistencia a la lisis por el complemento. El componente C3b depositado sobre la superficie es rápidamente convertido a iC3b, la forma inactiva (6). Para esta transformación es imprescindible que los parásitos expresen gp63 enzimáticamente activa. La inactivación del C3b se produce por dos mecanismos, proteólisis o fosforilación.

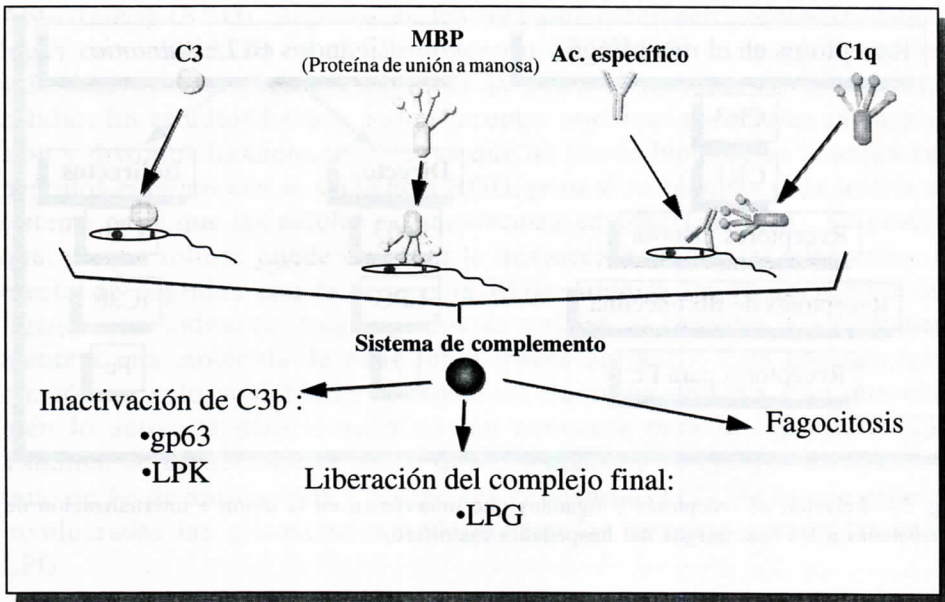


Fig. 2.—Relación de los parásitos del género *Leishmania* con el sistema de complemento. C3: componentes C3b y iC3b del complemento. MBP: proteína de unión a manosa. Ac. específico: Anticuerpos presentes en el hospedador que reconocen específicamente proteínas de la superficie. C1q: componente del complemento que se une a las regiones Fc (fracciones constantes de inmunoglobulinas) de los anticuerpos unidos a los parásitos. Estas moléculas del hospedador activarían al sistema de complemento conduciendo a la lisis por la formación de un complejo de ataque que se inserta en la membrana; pero esto no ocurre debido a los mecanismos de defensa que poseen estos parásitos.

En este último mecanismo intervendrían las LPKs (10). El iC3b aunque mantiene su capacidad de opsonizar interrumpe la cascada que conduce a la formación del MAC. Los parásitos recubiertos de iC3b pueden ser fagocitados más fácilmente por células que tengan receptores específicos para esta molécula.

2º ETAPA: UNIÓN DEL PARÁSITO A LA CÉLULA HUÉSPED.

La unión del parásito a la célula huésped parece estar mediada por interacciones específicas entre receptores del macrófago y ligandos de *Leishmania* ya que puede ser bloqueada con anticuerpos (15). Varios factores presentes en el suero del huésped, receptores de macrófagos y moléculas de superficie del parásito han sido implicados (Fig. 3).

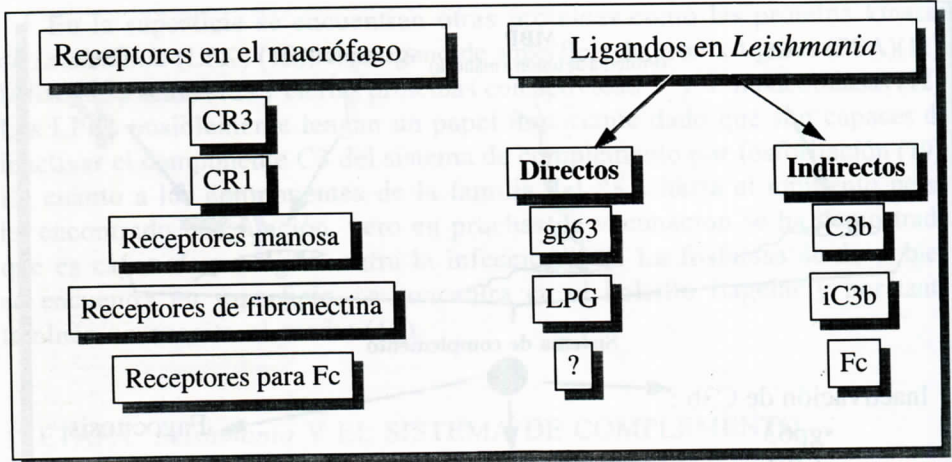


Fig. 3.—Relación de receptores y ligandos que intervienen en la unión e internalización de *Leishmania* a los macrófagos del hospedador mamífero.

Los receptores identificados en el macrófago como involucrados en la unión de *Leishmania* son: el receptor de complemento de tipo III (CR3, CD11b/CD18) (16), el de tipo I (CR1, p150,95) (16), receptores de manosa (17), de fibronectinas (18) y de regiones constantes de anticuerpos (Fc) (19). Como ligandos se pueden distinguir de dos tipos, directos e indirectos. Como directos se pueden considerar aquellos aportados por el propio parásito. Los que han sido identificados hasta el momento son el LPG (20) y la gp63 (15, 21, 13). Dentro de los ligandos indirectos se engloban las moléculas que pueden recubrir la superficie de *Leishmania*, para los que existen receptores en el macrófago, pero que son aportados por el huésped. Indirectos se consideran el C3b, el iC3b y los anticuerpos a través de sus regiones Fc.

Los receptores CR3 y CR1 cooperan en la adhesión de partículas opsonizadas (22, 13). El de tipo III une iC3b mientras que el de tipo I une C3b. La unión al CR1 es transitoria ya que el mismo receptor tiene la capacidad de inactivar a su ligando, por otra parte mientras se deposita sobre la superficie del parásito se va inactivando por acción de las LPKs y la gp63. La forma inactiva se une establemente al CR3 (22) que es el principal responsable de la fagocitosis de partículas opsonizadas, en este caso un parásito.

El CR3 une una gran variedad de moléculas entre las que se encuentran el LPG y la gp63 (13). Muchos de los ligandos proteicos contienen una secuencia típica, que se considera relacionada con la unión al receptor, que es

Arg-Gly-Asp (RGD). Algunos de los ligandos contienen secuencias homólogas como KQAGD en el fibrinógeno o SRYD (18) en la gp63 que han sido descritas como responsables de la unión al receptor en la superficie celular. En estudios hechos con el receptor purificado o células en suspensión y distintos ligandos se observa que no puede bloquearse la unión con péptidos conteniendo la secuencia RGD, pero sí se bloquea si se utiliza un sistema en el que las células se transforman en adherentes (23). Se postula que, ya que solo se puede bloquear la interacción en células adherentes, el efecto de péptidos con la secuencia RGD sobre la unión del CR3 a sus ligandos es indirecto. Los ligandos se unirían al receptor y simultáneamente a una molécula de adhesión a través del RGD. Esta segunda interacción no solo aumentaría la capacidad de unión de CR3 sino que también lo activaría para la señalización necesaria para la fagocitosis (23). También se ha descrito la unión de *Leishmania* y receptores de fibronectina, de Fc de anticuerpos y receptores de manosas (17), en lo que estarían involucradas las glicosilaciones de gp63 y las manosas contenidas en el LPG.

3° Y 4° ETAPAS: ENTRADA Y SUPERVIVENCIA DEL PARÁSITO, ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN EN LA CÉLULA HUÉSPED.

Desde el momento de la unión a la célula se inicia una cascada de señales que preparan a la célula para el proceso de fagocitosis. Normalmente las señales son iniciadas por el contacto del receptor con un ligando y están mediadas por Ca^{2+} . Se ha observado un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} posteriormente a la unión del parásito a la célula. Este aumento no solo conduce a la señalización para la fagocitosis del complejo formado por el receptor y la partícula unida sino que además altera la capacidad de la célula para responder a estímulos externos. La infección de monocitos por *Leishmania* provoca la atenuación de varias señales mediadas por fosforilaciones dependientes de Ca^{2+} entre las que cabe mencionar la inhibición de la expresión de c-fos, la desfosforilación de la quinasa JANUS y STAT (24, 25, 2, 26). Estas modificaciones se atribuyen a un aumento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , que después de 16 horas de infección se mantienen de dos a tres veces por encima de los normales (27).

La proteína gp63 se considera como factor de protección dentro del lisosoma, ya que seroalbúmina bovina incluida dentro de liposomas construidos *in vitro* no es degradada por las enzimas lisosomales si estos llevan gp63 activa en su superficie (28, 14)

IMPLICACIÓN DE LA GP63 EN LA INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS *in vitro*.

La familia de las glicoproteínas gp63 o de las metaloproteasas de superficie es de las más estudiadas y se sabe que la expresan todas las especies de *Leishmania*. En su mayoría tienen un peso molecular de 63 kD, por lo que genéricamente se conocen como gp63. Para ser activa enzimáticamente requiere Zn^{2+} para el que tiene un sitio de unión altamente conservado entre todas las metaloproteasas conocidas. Aproximadamente el 1% de las proteínas totales del parásito está representado por gp63. En el estado promastigote virtualmente toda la gp63 está expuesta en la superficie de la célula y en estado maduro, es decir activa y glicosilada. La proteína se sintetiza como un precursor inmaduro que contiene en su extremo N-terminal una región llamada "péptido señal" y a continuación otra región llamada propéptido". Ambas son removidas, la primera tiene la función de señalar su transporte a membrana y la segunda tiene que ser eliminada para que sea enzimáticamente activa. Algunos autores aseguran que el proteólisis del propéptido es el resultado de un proceso autocatalítico. La proteína además, se modifica postranscripcionalmente por la adición de un glicosilfosfatidilinositol, para su anclaje a la membrana plasmática, y de cadenas glicosídicas (revisado en 5). Se ha relacionado claramente la expresión o no de determinados miembros de la familia con diferentes estadios de diferenciación así como con la pérdida de infectividad (9).

Nuestro interés, se centró en el estudio de la implicación en la unión del parásito a la célula huésped de la glicoproteína de superficie gp63. El primer paso necesario para este estudio era la obtención de anticuerpos que reconocieran zonas específicas de la proteína para poder identificar claramente las regiones de interacción con los receptores de macrófagos. Localizar regiones de la gp63 que al ser bloqueadas con anticuerpos impidiesen la infección, nos permitiría usar esos epítopos para generar una respuesta inmune protectora capaz de inhibir la infección en un estadio temprano.

Tanto el gen de la proteína madura como fragmentos solapantes se amplificaron por PCR y se clonaron en plásmidos que permitieran tanto su secuenciación como su expresión en sistemas bacterianos. La proteína madura no incluye el propéptido ni el péptido señal. Estas siete proteínas fueron purificadas y utilizadas para la inmunización de conejos. Una vez obtenidos los sueros policlonales se hizo un mapeo con péptidos sintéticos para localizar los determinantes antigénicos reconocidos por cada uno de estos sueros (fig. 4). Los péptidos tienen una extensión de 20 aminoácidos y solapan en cinco con el siguiente.

En la secuencia de esta proteína existen cuatro aminoácidos serina-arginina-tirosina-aspartato (SRYD) que posiblemente mimeticen una secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD) (18), presente en la gran mayoría de las moléculas de

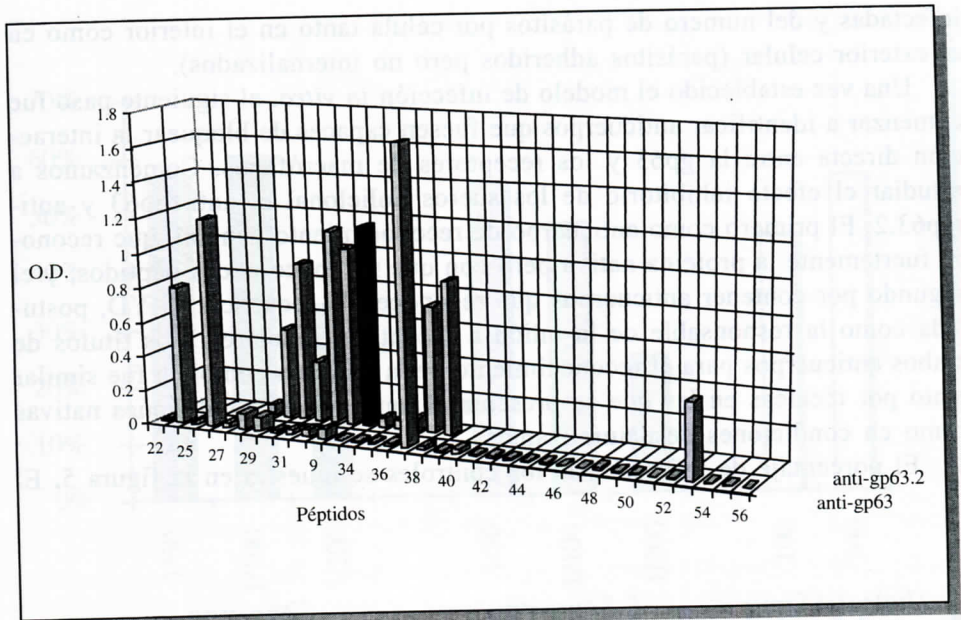


Fig. 4.—Mapeo de epítopes reconocidos por sueros de conejos previamente inmunizados con gp63 (anti-gp63) o con gp63.2 (anti-gp63.2) mediante el uso de péptidos sintéticos. La reactividad se representa como la densidad óptica medida a 450 nm en ensayos de FAST-ELISA. Los sueros fueron utilizados en ambos casos a una dilución de 1/1000. El título del anticuerpo anti-gp63 frente a la proteína nativa fue de 1/16000 y el título del anticuerpo anti-gp63.2 fue de 1/16200. La columna resaltada corresponde a la reactividad del suero anti-gp63.2 frente al péptido 33 que contiene la secuencia SRYD.

adhesión. La secuencia SRYD está altamente conservada en todas las secuencias de la gp63 conocidas hasta el momento. En nuestro caso esta presente en el fragmento gp63.2 y corresponde al péptido 33. El mapeo con péptidos del suero policlonal obtenido de la inmunización con este fragmento indica la existencia de anticuerpos específicos que reconocen el péptido que contiene la secuencia SRYD. En el caso del suero obtenido con la proteína madura no se detectó alto título de anticuerpos que reconocieran esta secuencia.

Para el estudio de las interacciones entre gp63 y receptores de macrófagos se eligió un modelo *in vitro* utilizando macrófagos peritoneales de ratón de una cepa, Balb/c, susceptible a la infección por *Leishmania*. La elección se basó en que existen datos en la bibliografía que indican que ciertas líneas celulares de linaje monocítico no son infectadas, muy posiblemente debido a que no expresan determinados receptores o lo hacen a menores niveles. La cuantificación de la infección es por recuento directo del número de células

infectadas y del número de parásitos por célula tanto en el interior como en el exterior celular (parásitos adheridos pero no internalizados).

Una vez establecido el modelo de infección *in vitro*, el siguiente paso fue comenzar a identificar anticuerpos que fuesen capaces de bloquear la interacción directa entre la gp63 y los receptores de macrófagos. Comenzamos a estudiar el efecto inhibitorio de los sueros policlonal el anti-rgp63 y anti-rgp63.2. El primero como anticuerpo de reconocimiento general, que reconoce fuertemente la proteína nativa pero con que reconoce pocos péptidos; y el segundo por contener anticuerpos que reconocen la secuencia SRYD, postulada como la responsable de la unión a receptores celulares. Los títulos de ambos anticuerpos para el reconocimiento de la proteína completa fue similar tanto por técnicas en las que se presenta el antígeno en condiciones nativas como en condiciones desnaturalizantes.

El porcentaje de infección de los controles se muestra en la figura 5. El

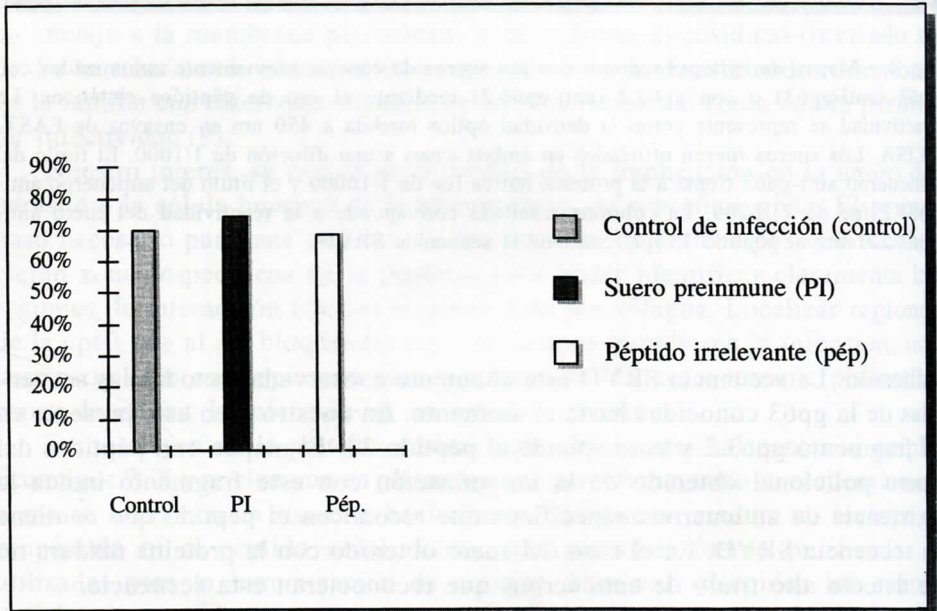


Fig. 5.—Porcentajes de infección de macrófagos peritoneales infectados con *Leishmania infantum*. Control de infección: macrófagos infectados sin agregar inhibidores. Suero preinmune: macrófagos infectados con parásitos previamente incubados con suero preinmune de conejo en una dilución 1/50. Péptido irrelevante: macrófagos previamente incubados con 300 μ g/ml de un péptido sintético que tiene una secuencia que no está presente en la gp63 y luego infectados con parásitos. En todos los casos la relación parásito: macrófagos fue de 10:1 y el tiempo de incubación de los parásitos con los macrófagos fue de 60 minutos.

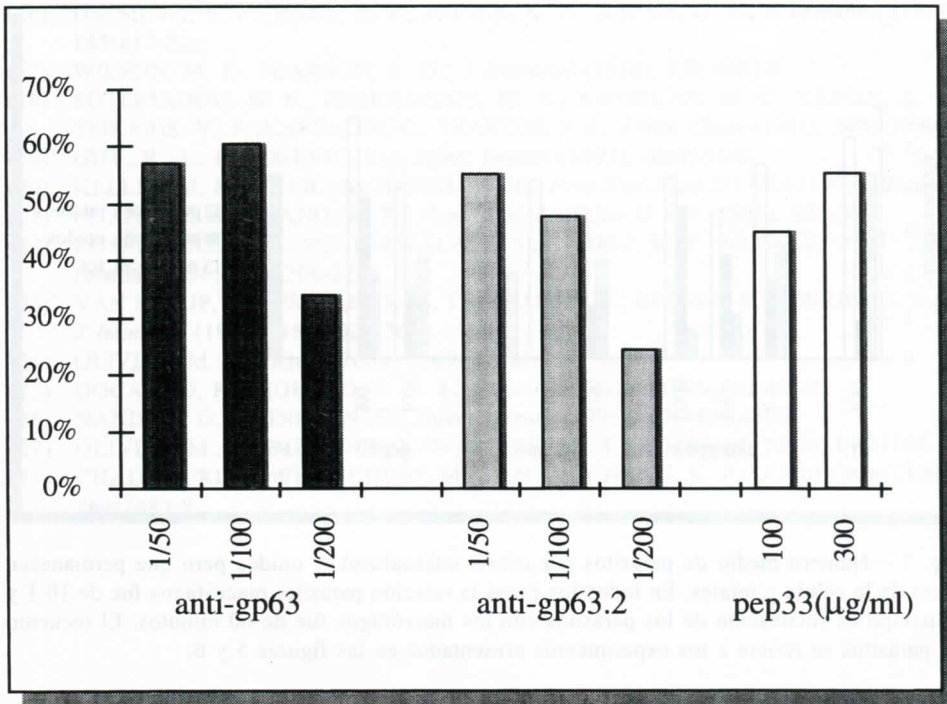


Fig. 6.—Porcentajes de inhibición de la infección en macrófagos peritoneales utilizando anticuerpos policlonales o péptidos como inhibidores. Los anticuerpos se utilizaron en diluciones desde 1/50 hasta 1/200 y el péptido 33 a concentraciones de 100 y 300 $\mu\text{g/ml}$. En todos los casos la relación parásito: macrófagos fue de 10:1 y el tiempo de incubación de los parásitos con los macrófagos fue de 60 minutos.

resultado obtenido con estos dos anticuerpos fue un 30-65 % de inhibición específica de la infección dependiendo de la concentración de anticuerpo utilizada (fig. 6). Un porcentaje similar fue obtenido inhibiendo la infección con péptidos (fig. 6). Si bien en ambos casos se observa un menor porcentaje de células infectadas con igual número de parásitos por célula que en los controles, la relación entre parásitos dentro y fuera de la célula se invierte con respecto a los controles con sueros preinmunes o péptidos irrelevantes (fig. 7). Se observa un claro aumento del número de parásitos que permanecen en el exterior de la célula. Además la relación, entre parásitos unidos pero que permanecen fuera de la célula y los que se internalizan, es diferente (fig. 7) cuando se utilizan el anticuerpo que solo reconoce un fragmento o el que reconoce la proteína completa, esto está indicando la presencia de más de un sitio de interacción con los receptores celulares.

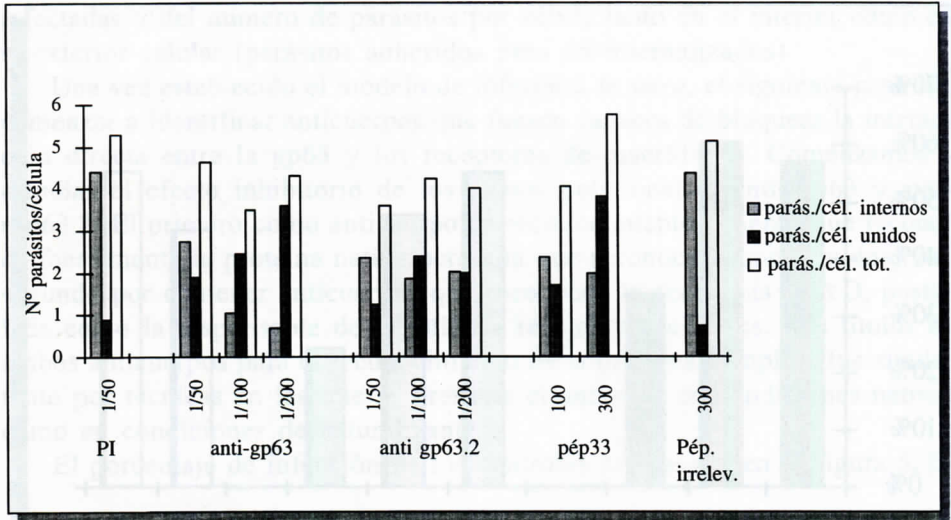


Fig. 7.—Número medio de parásitos por célula internalizados, unidos pero que permanecen fuera de la célula y totales. En todos los casos la relación parásito: macrófagos fue de 10:1 y el tiempo de incubación de los parásitos con los macrófagos fue de 60 minutos. El recuento de parásitos se refiere a los experimentos presentados en las figuras 5 y 6.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) BEHIN, R., LOUIS, J. A.: *In Critical Reviews in Tropical Medicine* (1984), **2**, 141-188, (R. K. Chandrs. ed), Plenum Publishing Corporation, New York.
- (2) TURCO, S. J., DESCOTEAUX, A.: *Annu Rev Microbiol* (1992), **46**:65-94.
- (3) PIMENTA, P. F., TURCO, S. J., MCCONVILLE, M. J., LAWYER, P. G., PERKINS, P. V., SACKS, D. L.: *Science* (1992), **256**:1812-1815.
- (4) JARDIM, A., FUNK, V., CAPRIOLI, R. M., OLAFSON, R. W.: *Biochem J* (1995), **305**:307-313.
- (5) RUSSELL, D. G.: *Protoplasma* (1994), **181**:191-201.
- (6) BRITTINGHAM, A., MOSSER, D. M.: *Parasitol Today* (1996), **12**:444-447.
- (7) CHAUDHURI, G., CHANG, K. P.: *Mol Biochem Parasitol* (1988), **27**:43-52.
- (8) HEY, A. S., THEANDER, T. G., HVIID, L., HAZRATI, S. M., KEMP, M., KHARAZMI, A.: *J Immunol* (1994), **152**:4542-8.
- (9) REY, L. J., REINER, N. E.: *Infect Immun* (1993), **61**:3265-72.
- (10) HERMOSO, T., FISELSON, Z., BECKER, S. I., HIRSCHBERG, K., JAFFE, C. L.: *EMBO J* (1991), **10**:4061-4067.
- (11) HANDMAN, E., SYMONS, F. M., BALDWIN, T. M., CURTIS, J. M. SCHEERLINCK, J. P.: *Infect Immun* (1995), **63**:4261-4267.
- (12) SCHNEIDER, A., BORDIER, C., ETGES, R.: *Subcell Biochemistry* (1992), **18**:39-72.
- (13) BRITTINGHAM, A., MORRISON, C. J., MCMASTER, W. R., MCGWIRE, B. S., CHANG, K. P., MOSSER, D. M.: *J Immunol*, (1995), **155**:3102-3111.
- (14) SEAY, M. B., HEARD, P. L., CHAUDHURI, G.: *Infect Immun* (1996), **64**:5129-5137.
- (15) RUSSELL, D. G., WILHELM, H.: *J Immunol* (1986), **136**:2613-20.