

ESTUDI D'ANTIGENS DE SUPERFICIE DELS LEUCOCITS HUMANS
MITJANÇANT ANTICOSSOS MONOCLONALS MURINS.

R.Vilella, J.Milà, L.Borche i J.Vives

Servei d'Immunologia. Hospital Clínic i Provincial.

Villarroel, 170. 08036 Barcelona.

STUDY OF HUMAN LEUCOCYTE SURFACE ANTIGENS WITH MURINE
MONOCLONAL ANTIBODIES.

ABSTRACT

In the present paper we describe twenty six monoclonal antibodies (Mab) produced against PBL, T(E+)PBL, non-T spleen cells, MLR cells, T cell clones and cells from lymphoproliferative disorders. The Mab characterization was made by indirect immunofluorescence (microscopy: Leitz Ortholux II or citofluorimetry: Becton Dickinson) on normal cells and cell lines. The molecular weight of the antigens recognized by Mab was determined by immunoprecipitation or Western blot. Eleven Mab had a restricted pattern of reactivity: two of them recognized T cell subpopulations, another two B cell subpopulation and seven were specific for platelets. Fifteen Mab had a more broad specificity: twelve of them reacted with T cells, B cells, monocytes and granulocytes, another recognized T cells and B cell lines, and the other two had specificity for T and B cells.

INTRODUCCIO

En els 2 Workshops celebrats fins ara: París(1982)(1) i Boston (1984)(2), sobre antigens de diferenciació leucocitaria humans, s'estudiaren 3 grups d'antigens: els propis dels limfòcits T, els dels B i els de la serie mieloide. Com a resultat de l'estudi conjunt de la reactivitat per immunofluorescència indirecta (IFI) (i també amb l'ajut d'altres tècniques) de tots els anticossos monoclonals (Acm) específics per a cadascun dels 3 grups abans esmentats enviats per tots els laboratoris que hi participarem, sobre cél.lules normals, línies cél.lulars i cél.lules provinents de síndromes limfoproliferatius, s'establiren 26 clusters de diferenciació així com tota una serie de grups provisionals formats per tots aquells patrons de reactivitat rars que no encaixaben dins d'algun dels 26 clusters establerts.

En el proper Workshop a celebrar durant el mes de Setembre de 1986 a Oxford, si ha inclòs en el estudi un nou grup d'antigens: els comuns a tots (ó gairebé tots) els leucòcits.

En el present treball descriurem els Acm que ja hem enviat al proper Workshop d'Oxford. No parlarem de les tècniques utilitzades que ja van ser descrites anteriorment (3,4,5) i que fan referència bàsicament a: l'obtenció dels Acm, tècniques d'escreening, clonació dels hibridomas, isoelectroenfoc (per determinar la monoclonalitat), l'IFI (caracterització de l'especificitat) i determinació del p.m. de l'antigen reconegut per l'Acm (SDS-PAGE i Western blot) i ens limitarem a parlar de l'estratègia seguida en la determinació de la seva especificitat, mitjançant l'IFI, bé per microscopia, bé per citofluorimetria i a l'immunoprecipitació dels Acs de superfície reconeguts per SDS-PAGE ó per Western blot.

RESULTATS

Obtenció dels Acm:

Taula 1:

<u>Cél.lula immunitzant</u>	<u>nombre de fusions</u>	<u>nombre d'Acm</u>
T(E+) de sang periférica(SP)	2	2
Fracció mononuclear de SP	4	5
no T de melsa humana	1	2
Cultiu mixte	1	2
Clones de cél.lules T	1	1
Síndromes limfoproliferatius	<u>5</u>	<u>14</u>
	14	26

La distribució per isotips d'immunoglobulines d'aquests 26 Acm es la següent:

Taula 2:

<u>Isotip</u>	<u>%</u>
IgG 1	15(58%)
IgG 2a	6(23%)
IgG 2b	1(4%)
IgG 3	1(4%)
IgM	3(11%)

Els isotips dels Acm van ésser determinats per la tècnica d'Outchterlony utilitzant anti-immunoglobulines de ratolí (Nordic), obtingudes en la cabra contra els diferents isotips d'immunoglobulines de ratolí purificats.

S'estudia la reactivitat dels 26 Acm per IFI sobre les següents cèl.lules:

Limfòcits T(E+) i no-T(E-) separats per roseteix amb eritròcits de bé, monòcits marcats amb partícules de làtex, granulòcits separats mitjançant plasmagel, plaquetes (contaminants de les cèl.lules no-T(E-) i eritròcits contaminants de no-T(E-), totes aquestes cèl.lules provinents de sang perifèrica d'individus sans.

Timòcits provinents de timus de nens sotmesos a cirurgia cardíaca (Sant Pau)

Cèl.lules de moll d'os: residus de les cèl.lules utilitzades en el trasplantament de moll d'os.

Esplenòcits: provinents de melsas de malalts sotmesos a trasplantament renal (afectats d'insuficiència renal crònica).

Línies cel.lulars en cultiu:

Línies T: Molt-4, 8402, CEM, Jurkat, HSB2, HPB-ALL

Línies B: Raji, Raji mutant, Daudi

L'agrupació dels Acm segons la seva reactivitat per IFI sobre les cèl.lules adalt esmentades i per molècules de l'antigen reconegut (SDS-PAGE ó Western blot) es dona en les taules 3 i 4

Taula 3

Anticossos monoclonals amb especificitat restringida a un tipus cel.lular

	<u>pes molecular</u>	<u>especificitat</u>
Subpoblació T(SP):		
100-3C6	5,34,38,41,58(W.B)	Timòcits i L.T.
109-2D4	-	25% dels PBL.

Subpoblació B(SP):

93-1B3	-	30%no-T(SP)i L.B
109-3C2	-	30%no-T(SP)i L.B

Plaquetes (SP):

7 Acm	-	Plaquetes (SP)
-------	---	----------------

S.P = Sang periférica

L.T = Línies T

L.B = Línies B

Taula 4

Anticossos monoclonals amb especificitat sobre diferents tipus cel.lulars

T+B+monòcits+granulòcits(SP)

	<u>pes molecular</u>	<u>reactivitat amb línies</u>
4 Acm	80KD	Jurkat-,Raji-,Daudi+
2 Acm	80KD	Jurkat-,Raji-,Daudi+
111-4D3	87KD	Jurkat-,Raji-,Daudi+/-
72-5D3	150KD	Línies T+,Línies B+
84-3C1	-	Jurkat+, Línies B-
68-5A5	110+170KD	HSB2+, Daudi+
101-1D2	150KD	HSB2-, Raji-,
63-5A3	-	Molt4-, 8402-

T(SP)+ Línies B

52-2B6	-	Limfòcits T(SP) i L.B.
--------	---	------------------------

Subp.de T i B (SP)

111-1C5	200KD	50% T(SP)+ 50% B(SP)
111-4C3	-	5% T(SP)+ 10% B(SP)

S.P.= Sang perifèrica

Els Acm presentats a la Taula 4 definiran conjuntament amb els Acm aportats per d'altres grups, nous clusters de diferenciació, comuns a tots (ó a la majoria) de leucòcits en el proper Workshop d'Oxford.

PERSPECTIVES

El treball que estem portant a terme en aquests moments, és el d'estudiar l'associació o no, entre els diferents antigens de superfície reconeguts per els nostres Acm, mitjançant la seva modulació produïda per l'incubació amb l'Acm i un segon anticòs (anti-Igs de ratolí obtingudes en el conill i purificades per cromatografia d'afinitat), aquests experiments de modulació antigènica ens seran especialment útils per aclarir si els diferents Acm que immunoprecipiten molècules del mateix pm estan reconeguen a un mateix antigen de superfície (ó al menys a antigens intimament relacionats) i també ens informaran d'aquells antigens de superfície de diferent pm que es troben intimament associats i que son reconeguts per Acm diferents.

Per altre banda i mitjançant una tècnica d'Elisa i utilitzant Acm purificats per cromatografia d'afinitat (amb proteïna A-sepharosa o bé amb anti-Igs de ratolí-sepharosa), determinarem el nombre de determinants antigènics reconeguts a la superfície cel.lular per cada un dels nostres Acm.

L'estudi de les variacions quantitatives dels antigens de superfície reconeguts durant la diferenciació cel.lular i també durant l'activació cel.lular, pot tindre un gran interès, ja que fins ara s'han descrit només variacions qualitatives durant la diferenciació i activació cel.lular.

BIBLIOGRAFIA

1.- Bernard A., Boumsell L., Dausset J., Milstein C. and Schlossman S.F.:1984 Leucocyte Typing. Springer-Verlag. Berlin

2.- Bernard A., Boumsell L., Dausset J., Evans R.L., Haynes B.F., Knapp W., McMichel A., Milstein C. and Schlossman S.F. Leucocyte Typing II. Springer-Verlag (in press).

3.- Vilella R., Yague J., Gallart T., Vives J.: Eficacia de los hibridomas en la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie linfocitaria. Inmunología 1:58-64, 1982

4.- Vilella R., Yague J., Vives J.: Monoclonal antibody against HLA-Aw32-A25: Is HLA-Aw32 an allele with no unique antigenic determinant?. Hum.Immunol. 6:53-62, 1983

5.- Vilella R., Lozano F., Milà J., Borche LL., Ercilla G., Ordinas A., Vives J.: Antiplatelet monoclonal antibody that inhibits ADP and epinephrine induced aggregation. Thromb.Haemostas.(Stuttgart) 51: 93-96, 1984