

Estudi de la maduració intratímica mitjançant anticòssos monoclonals

L. Borche, F. Lozano, R. Vilella, J. Vives

Servei d'Immunologia, Hospital Clinic i Provincial, Villarroel 170,
08036-Barcelona

Abstract

A population of thymic cells are negatively selected by monoclonal antibodies and complement. The monoclonal antibodies used are 332A3 (T3), 332C1 (T1), 725A4 (T4) and 1092D4 (T8). The population alive after treatment is $T1^-T3^-T4^-T8^-$ as assessed by cytophluorimetry. More than fifteen monoclonal antibodies are used to characterize these cells. Only four of them are systematically elevated in relation to the pretreated population. Two of these, 333B3 and 994D5, are differentiation "mature" markers (medullary located). The remaining two monoclonal antibodies are 421B5 and 843C1, directed against a class I related molecule and a 106 kD membrane protein. The presence of "mature" marker in an immature population are discussed in relation to conventional schemes of intrathymic differentiation.

Introducció

La població limfocitària tímica és fenotípicament heterogènea. Aquesta heterogeneïtat es demostrable en el ratolí per aloantisèrums (Cantor et al, 1975) o per anticòssos monoclonals (AcMo) tan en el home (Reinherz et al, 1980; Hsu et al, 1985) com en el ratolí (Van Ewijk et al, 1981; Scollay et al 1983). A partir d'aquesta heterogeneïtat s'han proposat esquemes de maduració (Reinherz et al, 1980; Scollay et al, 1985). No n'hi han proves definitives a favor d'un o altre esquema. En el esquema de Reinherz és proposen tres etapes maduratives sequencials: I) caracteritzada per la presència del antigens T11 i T10; II) és sumen T6 i concomitantment T4 i T8 i comença la expressió de T3 y T1, éssent la població tímica majoritària i de localització cortical; III) T6 i T10 negatius, T1 i T3 positius amb T4 i T8 mutuament exclusius, éssent aquesta la població madura similar a la perifèrica i que és localitza a la medul.la tímica. No és discuteix la immaduresa de la població I ni de la condició madura de la població III, però és troba sota intensa discussió el pas obligat per l'etapa II o la possibilitat d'un "bypass" entre les poblacions I i II, deixant per una línia de diferenciació cega la població III dirigida a la mort intratímica obligatoria (Scollay et al, 1984, 1985). La existència de marcadors comuns entre les poblacions I i III (i negatius per la població II) recolzarien la existència del esmentat "bypass".

Amb aquesta finalitat hem estudiat la presència de més de quinze marcadors de membrana en la població tímica total i en la població "tipus I" corresponent.

Material i mètodes

Immunodeplecció per AcMo i complement: Timus provenents d'infants entre 3m i 12a sotmesos a intervencions cardiovasculars és varen col.locar en PBS procedint-se a la suspensió de els timòcits

mitjançant repetides injeccions de PBS a els lòbuls tímics. Al voltant de 2.109 cèl.lules és varen resuspendra en un volum de 10ml de PBS i foren sensibilitzades amb AcMo en forma ascítica a una dilució final de 1/200 durant 1h a 4.C. Es varen centrifugar i resuspendra en una dilució 1/10 de complement de conill en PBS a una concentració de 50.106 cèl.les/ml. Es van incubar durant 1h a 37.C i és van centrifugar. Es van separar els agregats de cèl.lules mortes mitjançant pipeta Pasteur i és centrifugaren sobre un gradient de Ficoll-Hypaque. De persistir cèl.lules mortes, habent-se valorat amb blau tripà, és va repetir una centrifugació sobre un "matalàs" de sèrum bovin fetal, recollint del culot una suspensió amb una viabilitat sistemàticament superior al 90%.

Immunofluorescència indirecta: Es va realitzar amb tots els AcMo de la Taula I a una dilució final saturant en PBS/Sèrum humà AB 10%/NaN₃ 0.1% durant 1h a 4.C enfront a 1.106 cèl.lules. Es rentaren dues vegades i es resuspendgueren en una dilució 1/70 d'un sèrum fluoresceïnat de conill anti immunoglobulines de ratolí (Nordic). Aquesta segona incubació és va fer en les mateixes condicions que la primera. Es van rentar dues vegades amb PBS/sèrum bovin fetal 2%/NaN₃ 0.1% i és varen llegir en un citofluorímetre Becton Dickinson utilitzant com blanc les mateixes cèl.lules incubades amb ascitis NS1.

Immunohistoquímica: Es va realitzar sobre de talls per congelació de timus humà de 8um de gruixut colocats sobre porta-objectes gelatinitzats i fixats amb acetona 5 min. Una vegada rehidratats amb PBS, s'incuben amb el AcMo durant 30 min a temperatura ambient i és renten durant 15 min amb tres canvis de PBS. S'incuben de nou amb el segon anticòs, un sèrum de cabra anti ratolí marcat amb fosfatasa alcalina (Sigma) durant 30 min. Es renta de la mateixa forma i és revela el color amb Naphtol AS phosfhate free acid (Sigma) Fast red violet LB salt en Tris 0.2M pH 7.2. Es contratiyeix amb

Taula I. Anticòssos monoclonals utilitzats.

AcMo	Reactivitat	Pes molecular	Subclasse Ig	Referències i observacions
OKT6	Timòcits corticals	49/12	IgG1	Reinherz et al (1980)
OKT10	Timòcits, precursors limfoides, cèl.lules activades i cèl.lules plasmàtiques	45	IgG1	Reinherz et al (1980)
OKT11	Timòcits i cèl.lules T perifèriques	55	IgG1	Reinherz et al (1980)
Leu 9	Timòcits i cèl.lules T perifèriques	40	IgG2a	Link et al (1983)
331C6	Timòcits i cèl.lules T perifèriques (M,C)	67	IgG2a	T1, CD5 (I Workshop)
332A3	Timòcits i cèl.lules T perifèriques (M,C)	22/27	IgG2a	T3, CD3 (II Workshop)
1092D4	Timòcits, cèl.lules T supressores/citotoxiques	n.d.	IgM	T8, CD4 (III Workshop)
725A4	Timòcits, cèl.lules inductores (helper)	56	IgG2a	T4, CD4 (II Workshop)
994D5	Leucocitari comun (M)	80	IgG2a	Borche et al (1985)
333B3	Leucocitari comun (M)	80	IgG2a	Borche et al (1985)
331D2	Pan T i monòcits (M,C)	170/95	IgG2b	(II Workshop)
1003C6	Timòcits	n.d.	IgM	(III Workshop)
421B5	Timòcits, T, B, monòcits i plaquetes (M)	43/12	IgG1	Clase I (II Workshop)
725D3	Leucocitari comun (M,C)	200	IgG2a	T200 (III Workshop)
685A5	Leucocitari comun (M,C)	170/160/95	IgG2a	LFA-1, CD18, (III Workshop)
1011D2	Leucocitari comun (M,C)	110/120	IgG1	
843C1	Leucocitari comun	106	IgG1	(III Workshop)
1082C5	Timòcits, T, B, monòcits i plaquetes	43/12	IgG1	Clase I monomèrfic
635A3	Leucocitari comun	33-35	IgG2b	(III Workshop)

Timòcits significa reactivitat amb algú % dels mateixos. I, II i III Workshops fan referència a els Workshops internacionals de diferenciació leucocitaria. Leucocitari comun és una denominació genèrica per aquells AcMo que reaccionen amb T, B, monòcits i PMN perifèrics en un percentatge superior a el 80%. M = tinció medular, C = tinció cortical

hematoxilina i s'incloeix en gelatina.

Anticòssos Monoclonals: Excepte quatre AcMo comercials, OKT11, OKT10, OKT6 (Ortho) i Leu9 (Becton Dickinson), tots son resultat de la producció en el nostre laboratori segons tècniques ja descrites (Vilella et al, 1982). La seva reactivitat i característiques están descrites a la taula I.

Resultats

El porcentatges de reactivitat amb suspensions cel.lulars no tractades son expressades a la taula II i resulten de promediar set tímus diferents.

Taula II. Resultats de lectura citofluorimètrica sobre tímòcits normals.

AcMo	$(\bar{x} \pm 1 DS)$	AcMo	$(\bar{x} \pm 1 DS)$
OKT6	70 9.4%	331D2	50 18 %
OKT11	70 19 %	1003C6	51 8 %
OKT10	69 14 %	421B5	16 6 %
Leu 9	35 21 %	725D3	86 6.5%
331C6	34 19 %	685A5	38 13 %
332A3	37 9 %	1011D2	48 18.5%
1092D4	38 11 %	843C1	33 14 %
725A4	33 18.5%	1082C5	37 9.5%
994D5	35 11 %	635A3	39 11 %
333B3	32 6 %		

A les figures 1, 2 i 3 és mostren immunoprecipitacions corresponents a els AcMo utilitzats. A les figures 4 i 5 és mostren dos casos de reactivitat tisular diferent: a la figura 4 el AcMo 725D3 done una tinció tan de medul.la com d'escorça; mentres que a la figure 5 el AcMo 421B5 done una tinció medul.lar dominant. Altres AcMo donen

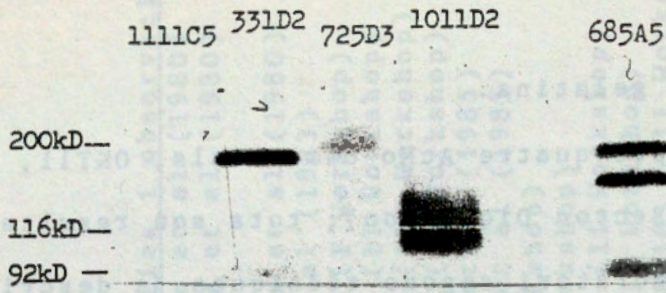


Fig.1

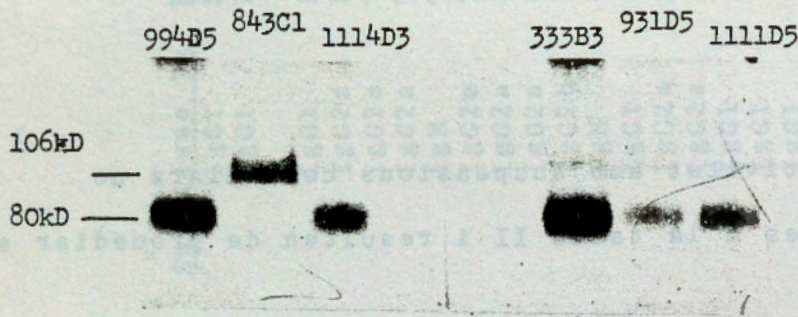


Fig.2

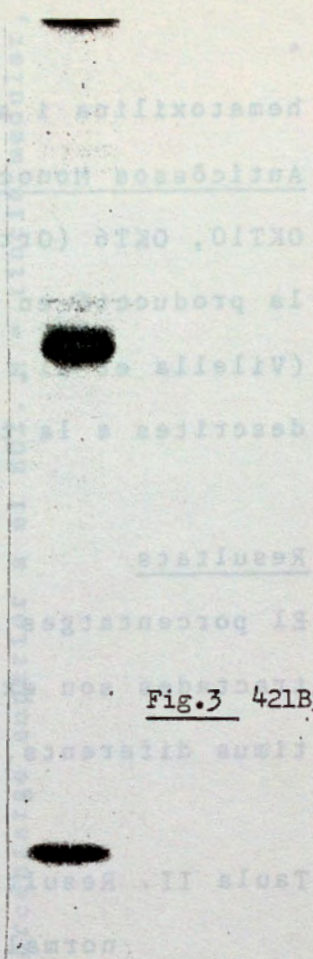


Fig.3 421B5

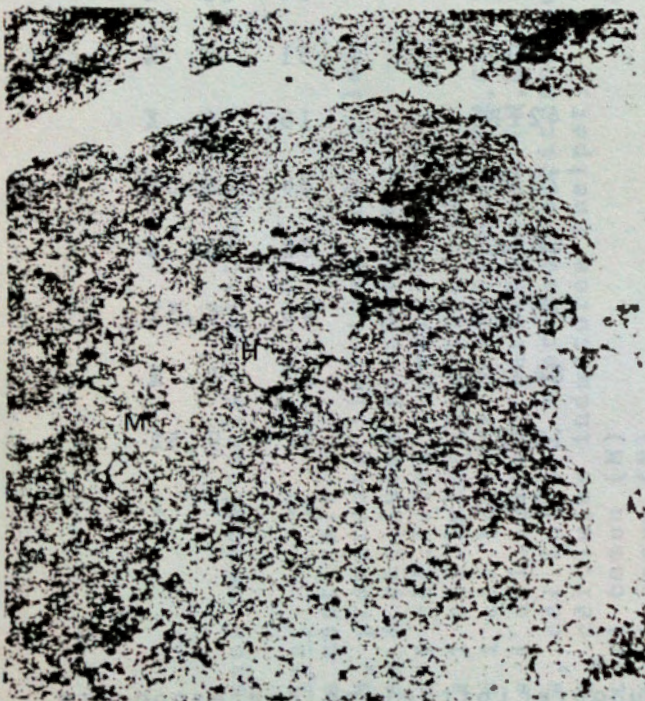


Fig.4

M= Medul.la ,C= Cortical,H= Corpuscle de Hassall

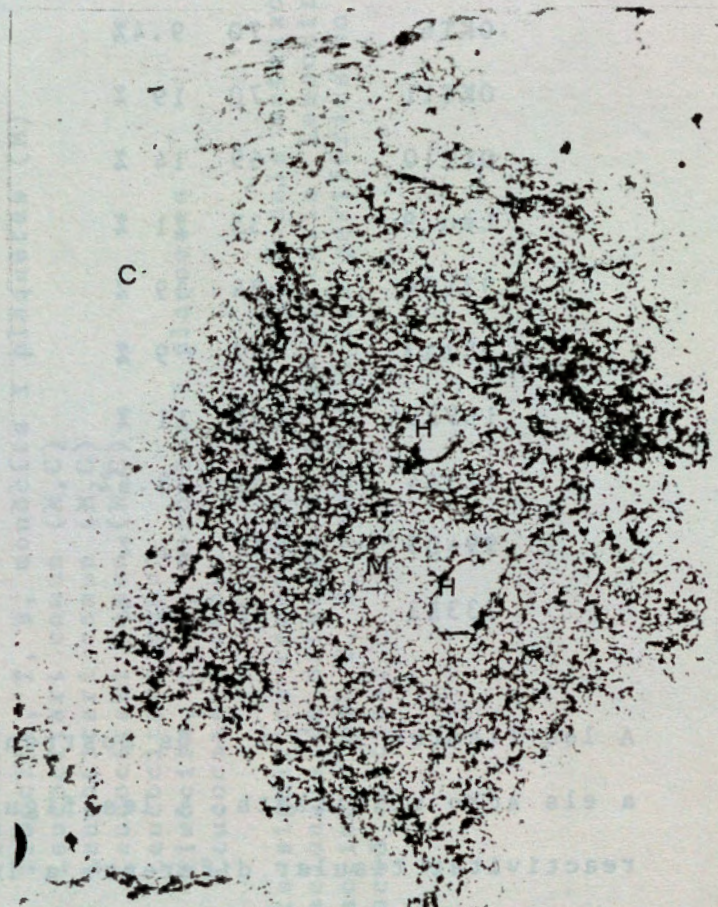


Fig.5

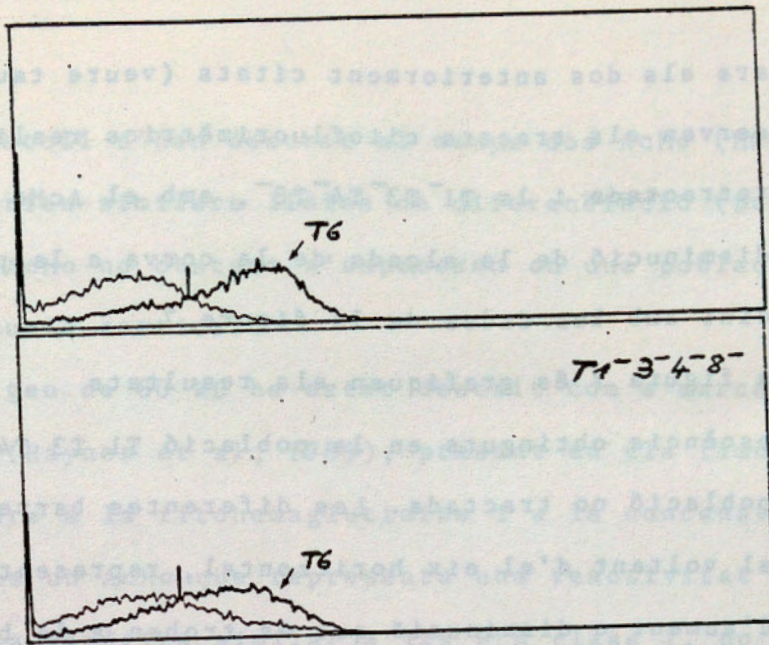


Fig.6

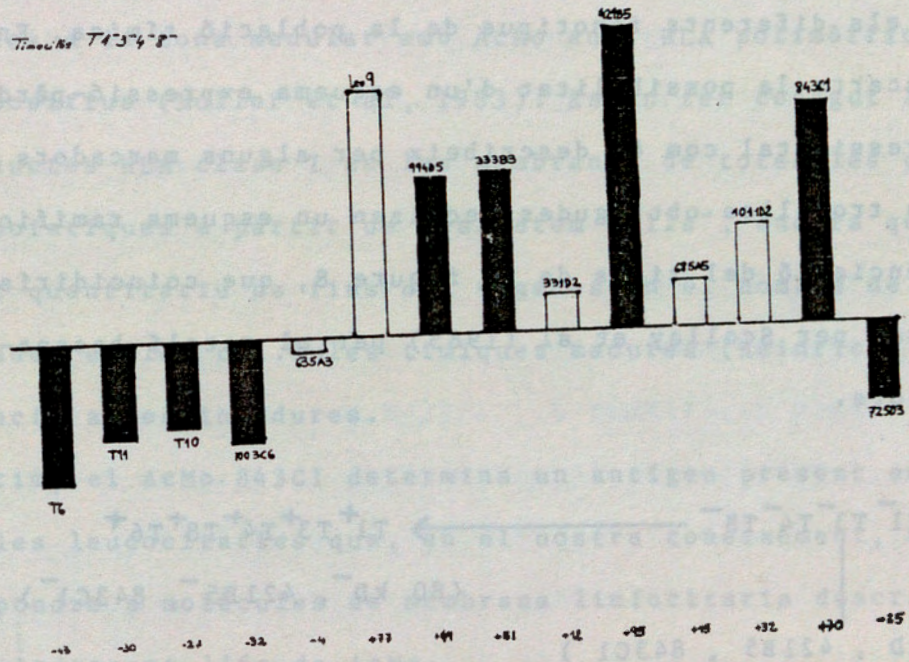


Fig.7 Les barres plenes corresponen a poblacions LD.S. per sobre o per sota de l'horitzontal.

patrons similars als dos anteriorment citats (veure taula I). A la figure 6 s'observen els traçats citofluorimètrics realitzats sobre la població pretractada i la $T1^- T3^- T4^- T8^-$, amb el AcMo OKT6. Existeix una disminució de la alçada de la corva a la població precoç coincidint amb les dades de la figure 7. Per últim a la figura 7 és grafiquen els resultats d'immunofluorescència obtinguts en la població $T1 T3 T4 T8$ en relació a la població no tractada. Les diferents barres és distribuïxen al voltant d'el eix horitzontal, representant porcentatges d'aument o disminució que és troben a la base de la figura.

Discussió

El present treball està dirigit a la recerca de marcadors de membrana que permeteixin l'establiment d'una relació madurativa entre els diferents fenotips de la població tímica. Encara que no és descarta la possibilitat d'un esquema expressió-pèrdua-reexpressió tal com és descriu per alguns marcadors de la serie B, les troballes obtingudes recolzen un esquema ramificat de diferenciació del tipus de la figure 8, que coincidiria amb el proposat per Scollay et al (1985) per el ratolí basant-se en altres marcadors.

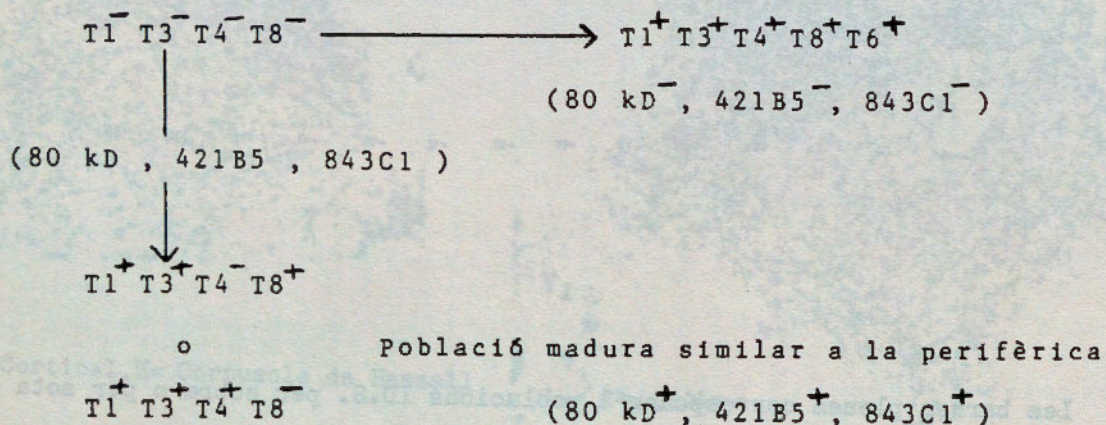


Fig. 8

En el ratolí s'han descrit al menys dos AcMo (MEL-14 i Pgp) que detectarien similars línies de diferenciació (Born et al, 1985). Ambdòs AcMo no obstant s'expressen en una població molt petita i de distribució cortical.

El antigen de 80 kD ha estat descrit com a marcador de maduresa tímica (Haynes et al, 1983), present en els timòcits capaços de respondre a la fitohemaglutinina i a la concanavalina A.

421B5 es un AcMo que representa una reactivitat i precipita una molècula dimèrica similar a las HLA clase I, no obstant no reaccione amb la línia cel.lular MOLT-4 que no té antigens HLA del locus B i poseeix un nombre de determinants aproximadament un 50% de els detectats amb AcMo anti HLA monomòrfics (dades no incluídes en aquest treball). En el ratolí estàn descrites un comportament similar per els antigens H2 K (Scollay et al, 1980) i reactivitats limitades a la zona medular amb AcMo anti HLA polimòrfics humans en timus positius (Muller et al, 1983). Es un fet conegut la presència de productes HLA clase I en les membranes de totes les cèl.lules hematopoiètiques a partir de les "stem cells", encara que amb un augment quantitatiu de fins deu vegades en el nombre de molècules expresades en les cèl.lules tímiques madures (Heinrichs et al, 1980) en relació a les inmadures.

Per últim, el AcMo 843C1 determina un antigen present en totes les cèl.lules leucocitaries que, en el nostre coneixement, no sembla correspondre a molècules de membrana limfocitaria descrites fins avui, mitjançant l'ús de AcMo.

A partir del present treball és planteja la possibilitat d'obtenir, previa immunoselecció, la diferenciació in vitro de diferents subpoblacions, estudiant en elles l'aparició seqüencial dels marcadors de membrana limfocitaria T.

Bibliografía

- BORCHE L., COLL P., VILELLA R., MARTORELL J., VIVES J. (1985). Glicoproteína leucocitaria común de 80 kD. Caracterización por anticuerpos monoclonales. XI Congreso Nacional de Inmunología, Alicante.
- BORN W. (1985). Antigen specific T cell receptor. T cell maturation and antigen receptor expression in the thymus. *Inmunología* 4, 133-145.
- CANTOR H., BOYSE E.A. (1975). Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. The generation of functionally distinct T cells subclasses is a differentiative process independent of antigen. *J Exp Med* 141, 1376-1389.
- HAYNES B., HARDEN E., HEMLER M., STROMINGER J., PALKER T., SCEARCE R., EINSENBARTH G. (1983). Differentiation of human lymphocytes T. Acquisition of a novel human cell surface protein (p80) during normal intrathymic T cell maturation. *J Immunol* 131, 1195-1200.
- HEINRICHS H., WERNET P., ZIEGLER A., (1980). Expression of major histocompatibility complex on human thymocytes studied using monoclonal antibodies. *Immunogenetics* 11. 629-635.
- HSU S.M., JAFFE E. (1985). Phenotypic expression of T lymphocytes in thymus and peripheral lymphoid tissues. *Am J Path* 121, 69-78.
- LINK M., WARNKE R., FINLAY J., AMYLN M., MILLER R., DILLEY J., LEVY R. (1983). A single monoclonal antibody identifies T-cell lineage of childhood lymphoid malignancies. *Blood* 62, 722-728.
- MULLER C., STEIN H., ZIEGLER A., WERNET P. (1983). Quantitative and qualitative differences in the distribution of HLA class I antigenic determinants in the human thymic compartments. *Eur J Immunol* 13, 414-418.
- REINHERZ E.L., KUNG P., GOLDSTEIN G., et al (1980). Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblast of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*

77, 1588-1592.

SCOLLAY R., JACOBS S., JERABEK L., BUTCHER E., WEISSMAN I. (1980). T cell maturation: thymocyte and thymus migrant subpopulations defined with monoclonal antibodies to MHC region antigens. *J Immunol* 124, 2845-2853.

SCOLLAY R., SHORTMAN K. (1983). Thymocyte subpopulations: an experimental review including flow cytometric cross-correlations between the major murine thymocyte markers. *Thymus* 5, 245-295.

SCOLLAY R., BARTLETT P., SHORTMAN K. (1984). T cell development in the adult murine thymus: changes in the expression of the surface antigens Ly2, L3T4 and B2A2 during development from early precursor cells to emigrants. *Immunol Rev* 82, 79-103.

SCOLLAY R., SHORTMAN K. (1985). Identification of early stages of T lymphocyte development in the thymus cortex and medulla. *J Immunol* 134, 3632-3642.

VAN EWYK W., VAN SOEST P.L., VAN DER ENGH G.J. (1981). Fluorescence analysis and anatomic distribution of mouse T lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies to the antigens Thy-1, Lyt-1, Lyt-2 and T-200. *J Immunol* 127, 2594-2604.

VILELLA R. et al (1992). Eficacia de la metodología de hibridomas para el estudio de antígenos de superficie de linfocitos T y B humanos. *Inmunología* 1, 58-64.

I WORKSHOP on Leucocyte antigens (Paris, 1982). BERNARD A., BOUMSELL J., DAUSSET J., MILSTEIN C., SCHLOSSMAN S.F. (eds). *Leucocyte Typing I*. Berlin, Springer-Verlag (1984).

II WORKSHOP on Leucocyte antigens (Boston, 1984). REINHERZ E., HAYNES B.F., NADLER L., BERNSTEIN I.D. (eds). *Leucocyte Typing II*. New York, Springer-Verlag, 1986.

III WORKSHOP on Leucocyte antigens (Oxford, Sept 1986).

References

77, 1288-1292.

SCOLLAY R., JACOBS G., JACOBSON L., BUTCHER L., WEISBERG L. (1980). T cell-mediated immunity in the murine lymphoma system. *Journal of Experimental Medicine* 152: 1-11.

2842-2853.

SCOLLAY R., SHORTMAN K. (1983). The role of the thymus in the development of the murine lymphoma system. *Journal of Experimental Medicine* 158: 1-11.

SCOLLAY R., BARKETT T., SHORTMAN K. (1982). The role of the thymus in the development of the murine lymphoma system. *Journal of Experimental Medicine* 156: 1-11.

SCOLLAY R., SHORTMAN K. (1983). Identification of early stages of T lymphocyte development in the thymus cortex and medulla. *Journal of Experimental Medicine* 158: 1-11.

VAN TWILK W., VAN ROEST P.E., VAN DER ENCK G.J. (1987). The role of the thymus in the development of the murine lymphoma system. *Journal of Experimental Medicine* 165: 1-11.

VILLER K. (1987). Role of the thymus in the development of the murine lymphoma system. *Journal of Experimental Medicine* 165: 1-11.

YVES M., JACOBSON L., JACOBSON L., JACOBSON L., JACOBSON L. (1980). The role of the thymus in the development of the murine lymphoma system. *Journal of Experimental Medicine* 152: 1-11.

L. DAUSSET J. (1987). The role of the thymus in the development of the murine lymphoma system. *Journal of Experimental Medicine* 165: 1-11.

SCOLLAY R., SHORTMAN K. (1983). The role of the thymus in the development of the murine lymphoma system. *Journal of Experimental Medicine* 158: 1-11.