

Anticuerpos monoclonales específicos para antígenos de histocompatibilidad y activación de leucocitos humanos

C. Bernabeu*, G. Morago*,
M. Ortiz de Landázuri**, J. Carreira*
y F. Sánchez-Madrid**

*Departamento de Investigación, Alergia e Inmunología Abelló.

**Sección de Inmunología. Hospital de la Princesa. Madrid.

Monoclonal antibodies specific for histocompatibility and activation antigens from human leukocytes

Monoclonal antibodies (MAb) have been generated to human lymphocytic leukemia cell lines and monocytes that recognize leukocyte membrane antigens. The selection of MAb was carried out by indirect binding assay with the immunizing cells. Positive hybrids were then tested by immunoprecipitation from ¹²⁵I-labeled human cell lysates followed by SDS-PAGE and autoradiography. According to the antigens immunoprecipitated, the MAb can be separated in four groups: 1) MHC class I antigens are recognized by the MAb FG2/2 and FG2/20. The MAb FG2/2 is specific for the light chain β 2-m (MW 12-kd) and the MAb FG2/20 is specific for the heavy chain (MW 45-kd). 2) MHC class II antigens are recognized by the MAb CP2/7. This MAb probably reacts with an epitope present on the α chain (MW 34-kd) and does not cross-react with an anti-HLA-DR reagent. 3) MAb FG1/5, FG1/6 and FG2/12 recognize an homodimer of 180-kd which under reducing conditions yields a 90-kd polypeptide. This antigen has been identified as transferrin receptor; and 4) MAb FG1/8, FG1/10, FG1/11 and FG2/10 recognize a heterodimer of 140-kd which resolves as two polypeptides of 100-kd and 40-kd under reducing conditions. These characteristics suggest that this antigen is analogous to a previously described molecule termed 4F2. Both, 4F2 and transferrin receptor are activation antigens since the specific MAb preferentially react with actively dividing cells.

Mediante inmunización de ratones Balb/c con células de líneas leucémicas T y monocitos humanos obtenidos varios anticuerpos monoclonales (AcM) frente a antígenos de la membrana de leucocitos. La selección inicial de los hibridomas secretadores de AcM se realizó con un radioinmunoanálisis de fijación a las células utilizadas en la inmunización. En una segunda etapa, se caracterizaron las especificidades moleculares reconocidas por los AcM mediante inmunoprecipitación seguida de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS). De acuerdo con los antígenos inmunoprecipitados, los AcM pueden ser separados en 4 grupos: a) los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de la clase I son reconocidos por los AcM FG2/2 y FG2/20. El AcM FG2/2 es específico de la cadena ligera β 2-m (peso molecular 12-kd) y el AcM FG2/20 es específico de la cadena pesada (peso molecular 45-kd); b) los antígenos MHC de clase II son reconocidos por el AcM CP2/7. Este AcM se fija a un epítipo presente en la cadena α (peso molecular 34-kd) y no presenta reacción cruzada con un AcM anti-HLA-DR; c) el receptor de transferrina es reconocido por los AcM FG1/5, FG1/6 y FG2/12 como un homodímero de 180-kd que en condiciones reductoras da lugar a dos polipéptidos de 90-kd; d) un antígeno análogo a la molécula previamente descrita como 4F2 es reconocido por los AcM FG1/8, FG1/10, FG1/11 y FG2/10, los cuales inmunoprecipitan un heterodímero de 140-kd que en condiciones reductoras origina dos polipéptidos de 100-kd y 40-kd. Ambas estructuras, 4F2 y receptor de transferrina son antígenos de activación ya que los AcM específicos reconocen preferentemente células que se dividen activamente.

INTRODUCCION

Los leucocitos de la sangre son células con un papel crucial en la respuesta inmune. Tanto los linfocitos T y B, como los monocitos colaboran estrechamente en las respuestas humoral y celular. Los análisis serológicos y bioquímicos de estas células se han llevado a cabo clásicamente, utilizando heteroantisueños y más recientemente mediante el empleo de

AcM^{1,2}. Estos AcM han sido muy útiles, por ejemplo en la identificación de varios marcadores específicos de linfocitos T humanos como T3, T4, T6, T8, T11 y T1 (receptor del antígeno) y además, han servido de gran ayuda para los estudios tanto funcionales como estructurales en dichas células^{3,4}. Algo menos estudiados han sido los linfocitos B, aunque existen varios AcM que reconocen marcadores en su superficie^{5,6}. En la serie monocito-macrófago, también han sido descritos varios AcM específicos, como los que reconocen a los antígenos Mac-1/Mol y Mo2 de monocitos^{10,11}. Por otra parte, también se han caracterizado con AcM otros marcadores que, aunque no son específicos, sí parecen tener una función relevante en el sistema inmune; tal es el caso del antígeno LFA-1,

Correspondencia y solicitud de separatas: Dr. C. Bernabeu. Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Unidad de Membranas. Velázquez 144. 28006 Madrid.

Abreviaturas: β 2-m: beta-2-microglobulina; BSA: albúmina de suero bovino; IEF: isoelectroforesis; PBS: tampón fosfato salino; PHA: fitohemaglutinina; pI: punto isoelectrico; TX-100: Tritón X-100.

TABLA I Mab utilizados como control

Mab	Especificidad	Referencia
W6/32	HLA-A, B, C	17
A88	β 2-m	18
66-1G10	T9 (Receptor transferrina)	19
TS1/2	HLA-DR	20
TS2/16	VLA	20
187-1	kappa ratón	21
TS1/11	LFA-1	20
4 E	HLA-B	22
4 B	HLA-A2, A28	22

Tres días antes de la fusión, el ratón fue inyectado por vía intravenosa con la misma cantidad de células. La fusión se llevó a cabo entre las células del bazo de los ratones inmunizados y las células de los mielomas de ratón P3X63Ag8.6.5.3 y SP2, de acuerdo con el protocolo de Milstein¹⁵. Las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos (Costar) en medio selectivo conteniendo HAT tal como se ha descrito¹⁶.

Anticuerpos monoclonales

En la tabla I se presentan las especificidades de los AcM utilizados. Agradecemos a los Drs. L. Nadler, M. van de Rijn, M. Hemler, M.D. Scharf y B. Dupont su generosa donación de AcM.

Radioinmunoanálisis con células

La selección de clones positivos se llevó a cabo en placas de 96 pocillos incubando los sobrenadantes de los hibridomas con las correspondientes células utilizadas en la inmunización (JM, HPB-ALL o monocitos). Después de una hora de incubación a 4° C con agitación, las células se lavaron dos veces con PBS conteniendo 0,25% BSA y a continuación se les añadió el AcM de rata 187-1 (específico de la cadena kappa de ratón) marcado con ¹²⁵I. Se incubaron durante 1 hora a 4° C y después de lavar 3 veces con 0,25% BSA en PBS, las células se transfirieron a tubos para su recuento radiactivo.

Radioinmunoanálisis con β 2-m humana

La beta-2-microglobulina humana purificada (50 μ l con 20 μ g/ml por pocillo) se absorbió a placas de cloruro de polivinilo (MIC-2000 Dynatech Lab. Inc.) durante 1 hora a 37° C. Las placas se lavaron dos veces con 1% BSA en PBS. A continuación, varios AcM en forma de sobrenadantes de cultivo se incubaron en los pocillos durante 45 min. Después de dos lavados con 0,25% BSA en PBS, se añadió el AcM 187-1 (anticadena kappa de ratón) marcado con ¹²⁵I. Los pocillos se lavaron finalmente 3 veces con 0,25% BSA en PBS y la radiactividad de los pocillos se midió en un contador gamma.

Inmunofluorescencia indirecta

El 2 \times 10⁶ de células se incubaron con los AcM presentes en los sobrenadantes de cultivo durante 30 min a 4° C. Después de 2 lavados con PBS, se añadió FITC-IgG de cabra específico de IgG de ratón (Nordic) y se incubó durante 30 min a 4° C. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS y su fluorescencia se analizó en un EPICS C (Coulter Instruments).

Marcaje de células con ¹²⁵ I

Aproximadamente 20 \times 10⁶ células en tampón PBS se marcaron radiactivamente en su superficie con el isótopo ¹²⁵I (IRE, Fleurus, Bélgica) en presencia del reactivo yodogen (Pierce) tal como lo describen Fraker y Speck²³.

Inmunoprecipitaciones

Después del radiomarcaje, las células se lisaron con trión X-100 (T-X100) al 1% en PBS conteniendo hemoglobi-

TABLA II Radioinmunoanálisis de fijación a β 2-m humana de los AcM FG2/2 y FG2/20*

AcM	cpm (x 10 ⁻³)
A88	3,5
W6/32	0,2
FG2/2	8,6
FG2/20	0,4
X63	0,2

* Sobrenadantes de cultivo de distintos AcM fueron incubados en pocillos de cloruro de polivinilo previamente absorbidos con β 2-m humana purificada. La cantidad de AcM fijados fue cuantificada con el AcM 187-1 específico de la cadena kappa de ratón y marcado con ¹²⁵I. El AcM X 63 se utilizó como control de fijación inespecífica.

el cual parece estar implicado en el reconocimiento célula-célula^{12,13}. El objetivo común de todos estos estudios ha sido el de descifrar la complejidad molecular de la superficie de estas células y asignar funciones específicas para cada una de sus proteínas. Estos mismos objetivos son los que nos han llevado a obtener AcM que reconocen estructuras presentes en la membrana de leucocitos. Como resultado, hemos obtenido AcM específicos de antígenos de histocompatibilidad de las clases I y II, receptor de transferrina y antígeno 4F2.

MATERIAL Y METODOS

Células

La línea linfoblastoide B JY, las líneas leucémicas T HPB-ALL y JM, la línea eritoblastoide K562 y la línea mielomonocítica U937 se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal. Los leucocitos normales de sangre periférica humana (PBL) se obtuvieron de donantes sanos mediante centrifugación en Ficoll-Hypaque (Farmacia). Los monocitos se separaron de los linfocitos mediante adherencia a placas Petri de plástico. Los linfocitos fueron estimulados con fitohemaglutinina (PHA) durante 3 días. La obtención de timocitos y timocitos citotóxicos ha sido descrita previamente¹⁴.

Inmunizaciones y fusiones celulares

Fueron inmunizados ratones Balb/c mediante inyecciones intraperitoneales con 10⁷ células (JM, HPB-ALL o monocitos) a intervalos de 2 semanas durante 2 meses.

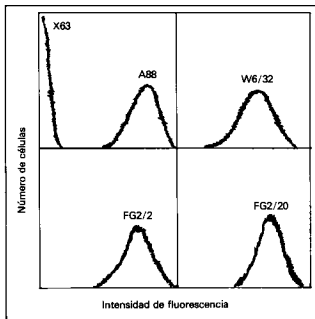


Fig. 1. Análisis de los AcM FG2/2 y FG2/20 mediante citometría de flujo. Las células JY se tiñeron para inmunofluorescencia indirecta, tal como se describe en Material y Métodos. Las células fueron marcadas con los AcM W6/32 (específico de HLA-A, B, C), A88 (específico de β 2-m humana) X63 (no específico), FG2/2 y FG2/20. La fluorescencia está representada en una escala logarítmica.

na bovina al 1 % y fluoruro de fenilmetilsulfonio 1mM. El lisado se centrifugó durante una hora a 30.000 g y el sobrenadante se incubó a 4° C con Sepharosa acoplada a BSA con objeto de eliminar la fijación inespecífica. A continuación, los lisados se incubaron durante 2 h a 4° C con un complejo preformado compuesto por el AcM 187-1 (anti-kappa de ratón) acoplado a Sepharosa y unido al AcM de ratón correspondiente. Finalmente, el complejo se lavó dos veces con T-X100 al 0,1 % en PBS, dos veces en PBS y una vez con Tris 50 mM pH 6,8.

Electroforesis y autorradiografía

La SDS-PAGE se realizó de acuerdo con el procedimiento de Laemmli²⁴. Los geles se hicieron del 8, 19 o 12 % según el peso molecular de los antígenos a analizar. El isoelectrofoqueo (IEF) se llevó a cabo tal como se ha descrito²⁵. Los geles contenían 5 % acrilamida, 0,5 % TX-100, 8 M urea y una mezcla de anfólitos de pl 3,5 a 10 (LKB Instruments Inc). Las muestras se corrieron desde el ánodo hasta el cátodo. Para medir el gradiente de pH se hicieron cortes en el gel de 1,5 x 0,5 cm y se incubaron en 2 ml de agua destilada. La autorradiografía de las proteínas marcadas con ¹²⁵I se llevó a cabo con una película Kodak X-OMAT, junto con pantallas intensificadoras (Cronex Lightning, Dupont Chemical Co.).

Otros métodos

La determinación de las subclases de los AcM obtenidos se llevó a cabo mediante inmunodifusión doble empleando antisueros frente a las diferentes subclases de inmunoglobulinas de ratón (Nordic, Holanda).

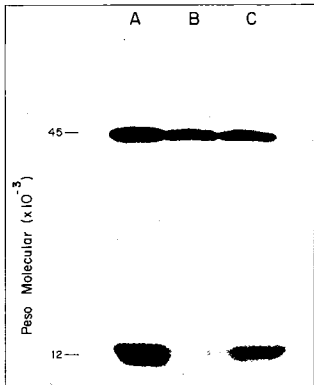


Fig. 2. Análisis mediante SDS-PAGE de antígenos MHC de clase I. Las células JY se marcaron radiactivamente con ¹²⁵I en presencia de yodo-gen. A continuación, las células se lisaron con el detergente TX-100 y se llevó a cabo la inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE en un gel conteniendo 12 % de acrilamida tal como se describe en Material y Métodos A: AcM FG2/2; B: AcM FG2/20; C: AcM W6/32 (específico de HLA-A, B, C).

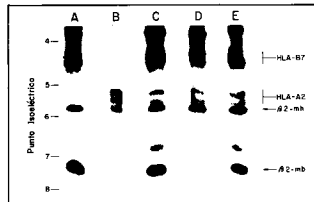


Fig. 3. Análisis mediante IEF de antígenos MHC de clase I. Las células JY se marcaron radiactivamente con ¹²⁵I en presencia de yodo-gen. A continuación, las células se lisaron con el detergente TX-100 y se llevó a cabo la inmunoprecipitación seguida de IEF tal como se describe en Material y Métodos. A: AcM 4E (específico de HLA-B7); B: AcM 4B (específico de HLA-A2); C: AcM FG2/20; D: AcM FG2/2; E: AcM W6/32 (específico de HLA-A, B, C). La posición de las cadenas pesadas (HLA-A2 y HLA-B7), así como la de la β 2-m humana (β 2-m h) y bovina (β 2-m b) están indicadas al margen.

TABLA III Radioinmunoanálisis de fijación del AcM CP2/7 a distintos tipos celulares*

AcM	Monocitos	JY	K562	JM	U937
CP2/7	6	0,4	1,6	1,2	7
TS1/2	4,5	9	0,5	0,5	0,9
W6/32	22	16	0,5	12	21
X63	0,6	0,4	0,5	1	0,9

* La cantidad de AcM fijados a las células está expresada en cpm $\times 10^{-3}$ del segundo anticuerpo (187-1) marcado con 125 I. El AcM X63 se utilizó como control de fijación inespecífica.

TABLA IV Radioinmunoanálisis de fijación de los AcM FG2/12 y FG1/8 a distintos tipos de células*

AcM	Especificidad	Monocitos	PBL	PHA-PBL	K562	JY	HPB-ALL	JM
FG2/12	T9	0,1	0,2	2,4	3,6	20,1	5,7	16,7
FG1/8	4F2	1,8	1,1	7,5	13,0	23	14,8	34,1
W6/32	HLA-A, B, C	28,8	17,7	ND	0	44,4	34	32,0
TS1/11	LFA1	5,3	2,8	ND	0,0	12,3	16,3	16,1

* La cantidad de AcM fijados a las células está expresada en cpm $\times 10^{-3}$ del segundo anticuerpo (187-1) marcado con 125 I. ND: no determinado.

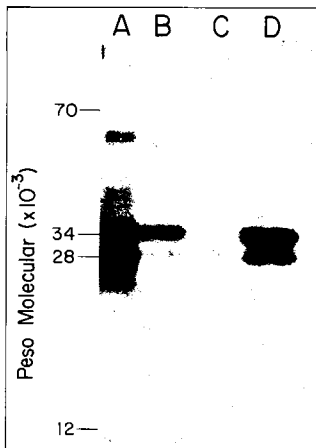


Fig. 4. Análisis mediante SDS-PAGE de los antígenos MHC de clase II. Monocitos y PBL estimulados con PHA fueron marcados radiactivamente con 125 I en presencia de yoduro. A continuación, las células se lisaron con el detergente TX-100 y se llevó a cabo la inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE (12 % acrilamida) tal como se describe en Material y Métodos. A: PBL estimulados con PHA, AcM TS1/2 (específico de HLA-DR); B: monocitos, AcM CP2/7; C: monocitos, AcM X63; D: PBL estimulados con PHA, AcM CP2/7.

RESULTADOS

Selección de AcM

Las fusiones se llevaron a cabo con los bazos de 3 ratones inmunizados con las líneas celulares JM y HPB-ALL y con monocitos respectivamente. Los sobrenadantes de los hibridomas obtenidos se seleccionaron inicialmente mediante radioinmunoanálisis por su capacidad de fijación a las mismas células que habían sido utilizadas en la inmunización. Aquellos hibridomas que dieron reacción positiva se sometieron a una posterior selección mediante inmunoprecipitación. Las células utilizadas en la inmunización se marcaron con 125 I y se utilizaron en inmunoprecipitación con los sobrenadantes de los hibridomas. Aquellos AcM capaces de inmunoprecipitar específicamente algún antígeno fueron finalmente seleccionados. De acuerdo con los antígenos reconocidos hemos dividido los AcM en 3 grupos: a) AcM específicos de antígenos MHC de clase I; b) AcM específicos de antígenos MHC de clase II; y c) AcM específicos de antígenos de activación.

AcM que reconocen antígenos MHC de clase I

Los estudios de caracterización de estos AcM se llevaron a cabo con la línea linfoblástide B JY, la cual presenta la ventaja de ser homocigótica para los antígenos HLA-A2 y HLA-B7 cuya estructura ha sido ampliamente estudiada²⁶. Mediante estudios de citofluorimetría con la línea celular JY, los AcM FG2/2 y FG2/20 presentaron una fijación comparable a otros AcM específicos de antígenos MHC de clase I como son W6/32 y A88 (fig. 1). Los AcM FG2/2 y FG2/20 reconocen mediante inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE, dos polipéptidos con pesos moleculares de 45 kd y 12 kd (fig. 2). Estos pesos moleculares son coincidentes con los obtenidos para la cadena pesada y cadena ligera (β 2-m) de los antígenos MHC de cla-

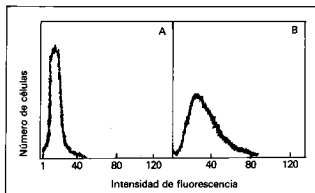


Fig. 5. Análisis de los AcM FG1/5, FG1/6, FG1/8, FG1/10, FG1/11, FG2/12 y FG2/10 mediante citometría de flujo. PBL sin estimular (A) y PBL estimulados con PHA (B) se tiñeron para inmunofluorescencia indirecta tal como se describe en Material y Métodos. En la figura se muestran los resultados obtenidos con el AcM FG2/10, aunque se observó un comportamiento similar con el resto de los AcM mencionados.

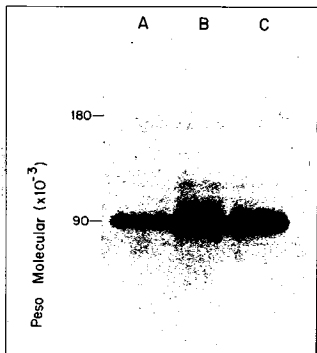


Fig. 6. Análisis mediante SDS-PAGE de los antígenos reconocidos por los AcM FG1/5, FG1/6 y FG2/12. Las células JM fueron marcadas radiactivamente con ¹²⁵I en presencia de yodo-gen. A continuación, las células se lisaron con el detergente TX-100 y se llevó a cabo la inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE (10 % acrilamida) en condiciones reductoras, tal como se describe en Material y Métodos. A: AcM FG1/5; B: AcM FG1/6; C: AcM FG2/12.

TABLA V Anticuerpos monoclonales descritos en el presente trabajo

Anticuerpo monoclonal	Especificidad	Subclase	Inmunógeno
FG2/2	β2-microglobulina	γ2a	JM
FG2/20	Cadena pesada HLA-A, B, C	γ3	JM
FG1/5	Receptor	γ2b	HPB-ALL
FG1/6	transferrina	γ1	HPB-ALL
FG2/12		γ1	JM
FG1/8	4F2	γ1	HPB-ALL
FG1/10		γ2a	HPB-ALL
FG1/11		γ2a	HPB-ALL
FG2/10		γ1	JM
CP2/7	Cadena pesada HLA-D	γ2a	Monocitos

se I inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal W6/32 (fig. 2C). Con objeto de caracterizar más en detalle los antígenos reconocidos por los AcM FG2/2 y FG2/20, se llevó a cabo un análisis mediante isoelectroenfoque de los inmunoprecipitados (fig. 3). En este sistema, las cadenas pesadas de antígenos MHC presentan una heterogeneidad de carga debida a la presencia de 0, 1, 2 o 3 ácidos siálicos unidos a la cadena de carbohidratos presentes en dichos antígenos²⁷. Los AcM FG2/2 y FG2/20 (fig. 3, C y D) reconocen a ambos antígenos HLA-A2 y HLA-B7, al igual que el AcM W6/32 (E). Como control, se incluyeron también los AcM polimórficos 4B (B) y 4E (A), los cuales reconocen a los antígenos HLA-A2 y HLA-B7 respectivamente. Los AcM FG2/20 y W6/32 son capaces de inmunoprecipitar la cadena pesada asociada, bien con la β2-m humana endógena, o con la β2-m bovina procedente del intercambio producido durante el cultivo de las células in medio conteniendo suero fetal bovino²⁸. Sin embargo, el AcM FG2/2 (D), fue

capaz de inmunoprecipitar la β2-m humana, pero no la β2-m bovina. Estos resultados nos hicieron sospechar que el AcM FG2/2 era específico de la β2-m humana, al igual que el AcM A88¹⁸. Para comprobar este punto, decidimos hacer un ensayo de fijación de los distintos AcM a β2-m humana (tabla II). De todos los AcM ensayados, sólo FG2/2 y A88 dieron una fijación apreciable a β2-m humana. Por tanto, podemos concluir que el AcM FG2/2 reconoce la cadena pesada y el AcM FG2/2 reconoce la β2-m humana de los antígenos MHC de la clase I. El AcM FG2/2 parece ser monomórfico puesto que se fija de una forma similar al AcM W6/32 en todas las líneas humanas ensayadas.

El AcM CP2/7 reconoce antígenos MHC de clase II

El hibridoma CP2/7 se obtuvo a partir de células de bazo de un ratón inmunizado con monocitos humanos, los cuales poseen gran cantidad de antígenos MHC de clase II en su superficie. El AcM CP2/7 se fija a monocitos y no a líneas celulares de linfocitos T (tabla III). Estudios mediante inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE demostraron la especificidad de dicho AcM (fig. 4). El AcM CP2/7 precipita dos

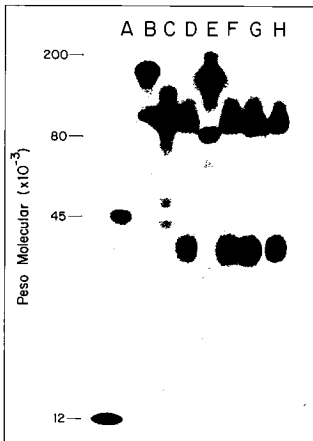


Fig. 7. Análisis mediante SDS-PAGE de los antígenos reconocidos por los AcM FG1/8, FG1/10, FG1/11 y FG2/10. Las células JM fueron marcadas radiactivamente con ^{125}I en presencia de yodo-gen. Las células se lisaron con el detergente TX-100 y se llevó a cabo la inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE (10 % acrilamida) tal como se describe en Material y Métodos. A: AcM W6/32 (específico de HLA-A, B, C); B: AcM TS1/11 (específico de LFA-1); C: AcM 66-IG10 (específico del receptor de transferrina); D: AcM FG1/8; E: AcM TS2/16 (específico del complejo VLA); F: AcM FG1/10; G: AcM FG1/11; H: AcM FG2/10.

polipéptidos de pesos moleculares 34 kd y 28 kd que coinciden con los inmunoprecipitados por el AcM TS1/2 descrito como específico de antígenos HLA-DR²⁰. De los dos polipéptidos inmunoprecipitados por el AcM CP2/7, la subunidad mayor α parece tener mayor marca radiactiva que la subunidad menor β . Este resultado podría explicarse suponiendo que el AcM CP2/7 fuera específico de la subunidad mayor α . Debido a la incapacidad para fijarse dicho AcM a algunas líneas celulares que expresan HLA-DR como la línea linfoblastoide B, JY (tabla III), en este momento estamos estudiando la posibilidad de que el AcM CP2/7 reconozca un determinante polimórfico o una especificidad distinta de HLA-DR. Esta hipótesis estaría de acuerdo con el hecho de que el AcM CP2/7 sea capaz de fijarse a la línea U937, la cual no parece expresar HLA-DR (tabla III).

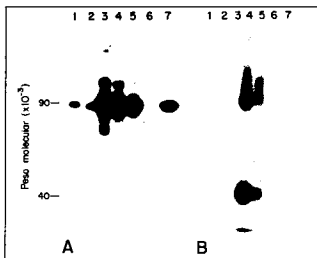


Fig. 8. Análisis mediante SDS-PAGE de los antígenos 4F2 y receptor de transferrina en varias líneas celulares. Las células fueron marcadas radiactivamente con ^{125}I en presencia de yodo-gen. A continuación, las células se lisaron con el detergente TX-100 y se llevó a cabo la inmunoprecipitación con los AcM FG2/12 (A) y FG2/10 (B) seguida de SDS-PAGE (10 % acrilamida) tal como se describe en Material y Métodos. Los extractos inmunoprecipitados fueron: timocitos normales (1), timocitos citotóxicos (2), JY (3), JM (4), K562 (5), PBL normales (6) y PBL estimulados (7).

AcM que reconocen antígenos de activación

Mediante estudios de fijación encontramos que los AcM FG1/5, FG1/6, FG2/12, FG1/8, FG1/10, FG1/11 y FG2/10 reconocían con preferencia antígenos presentes en células activadas. Así por ejemplo, estudios mediante citofluorimetría demostraron que se encontraban en mucha mayor cantidad en linfoblastos estimulados con PHA que en linfocitos sin estimular (fig. 5). Análisis por inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE sirvieron para caracterizar dichos antígenos (fig. 6 y 7). Los AcM FG1/5, FG1/6 y FG2/12 reconocen un homodímero de peso molecular 180 kd (datos no mostrados), el cual en condiciones reductoras da lugar a un polipéptido de peso molecular 90 kd (fig. 6). Las características de este antígeno son idénticas a las ya descritas para el receptor de transferrina²⁹⁻³¹. Por otra parte, los AcM FG1/8, FG1/10, FG1/11 y FG2/10 reconocen un heterodímero de peso molecular 140 kd (datos no mostrados) que en condiciones reductoras da lugar a dos polipéptidos de pesos moleculares 40 kd y 100 kd (fig. 7). Como controles se inmunoprecipitaron en el mismo experimento otros antígenos conocidos como HLA-A, B, C, (45 kd y 12 kd), LFA-1 (180 kd y 95 kd), receptor de transferrina (90 kd) y complejo VLA (165 kd, 130 kd y 80 kd) (fig. 7 A, B, C y E respectivamente). Las características del antígeno reconocido por los AcM FG1/8, FG1/10 y FG2/10 son similares a las descritas por otros dos grupos de investigadores para el antígeno 4F2³².

Con objeto de estudiar la distribución celular de los antígenos 4F2 y receptor de transferrina, realizamos radioinmunoanálisis (tabla IV) e inmunoprecipitaciones (fig. 8) en varias poblaciones celulares. El receptor de transferrina se expresa abundantemente en las líneas celulares JY, JM, HPB-ALL y K562, así como en PBL estimulados con PHA y en menor proporción en los timocitos normales y citotóxicos. Por el contrario, los PBL sin estimular y los monocitos no expresan en absoluto dicho antígeno (tabla IV y fig. 8A). En el caso del antígeno 4F2, la marca radiactiva obtenida en las inmunoprecipitaciones es menor que la del receptor de transferrina (fig. 8B), siendo las líneas JM y K562 las que muestran la mayor cantidad de antígeno precipitado (fig. 8, Calles 4 y 5). Estos datos fueron corroborados mediante radioinmunoanálisis de fijación, encontrándose además una gran expresión del antígeno 4F2 en las líneas JY y HPB-ALL, algo menor en PBL estimulados, no observándose ninguna expresión en PBL sin estimular y monocitos (tabla IV). En el mismo radioinmunoanálisis de fijación se incluyeron como control los AcM W6/32 y TS1/11 que son específicos de los antígenos HLA-A, B, C, y LFA-1 respectivamente.

DISCUSION

En la tabla V se resumen las características más significativas de los AcM descritos en el presente trabajo. Sus especificidades han quedado claramente demostradas mediante estudios de inmunoprecipitación y distribución celular. Los AcM FG2/2 y FG2/20 reconocen determinantes antigénicos no polimórficos en los antígenos MHC de clase I. El AcM FG2/2 reconoce la subunidad menor $\beta 2$ -m, mientras que el FG2/20 parece reconocer la subunidad mayor de los antígenos HLA-A, B, C. Esta última conclusión se basa en el hecho de que el AcM FG2/20 es capaz de inmunoprecipitar las cadenas pesadas de los antígenos HLA-A2 y HLA-B7 asociados con la $\beta 2$ -m humana y la $\beta 2$ -m bovina. AcM similares a FG2/2 y FG2/20 han sido previamente descritos³³. La presencia o no de $\beta 2$ -m bovina en las inmunoprecipitaciones analizadas mediante IEF constituye un nuevo método para determinar si un AcM específico de antígenos MHC de clase I reconoce la subunidad mayor o menor respectivamente. Estos AcM son claramente muy útiles para la purificación rápida del antígeno y posterior obtención de nuevos anticuerpos polimórficos y monomórficos frente a HLA-A, B, C. El AcM FG2/2 (específico de $\beta 2$ -m humana), tiene además otras ventajas adicionales. Por ejemplo, es capaz de precipitar otros antígenos MHC de clase I como el antígeno T6 del timo en virtud de su asociación con la $\beta 2$ -m³. Por otra parte, debido al fenómeno de intercambio de la $\beta 2$ -m presente en los sueros utilizados en el medio de cultivo²⁸, el AcM FG2/2 es capaz de precipitar antígenos MHC de clase I de otras especies asociados con la $\beta 2$ -m humana³⁴.

El AcM CP2/7 reconoce un antígeno MHC de la clase II. Los antígenos codificados en la región D de los genes HLA son muy polimórficos habiéndose definido hasta ahora 3 especificidades distintas, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ³⁵. El antígeno reconocido por el AcM CP2/7 parece ser distinto del reconocido por el AcM TS1/2 (específico de HLA-DR). Esta conclusión se basa en tres evidencias experimentales. En primer lugar, la relación en el marcaje radiactivo de subunidad α : subunidad β es mucho mayor con el AcM CP2/7 que con el AcM TS1/2. En segundo lugar, el distinto patrón de reactividad de los AcM CP2/7 y TS1/2 frente a las líneas celulares JY y U937. Finalmente, estudios de inmunoprecipitación secuencial indican que el antígeno CP2/7 puede ser inmunoprecipitado incluso si antes se inmunoprecipita con el AcM TS1/2 (datos no mostrados). No cabe duda que son necesarios más estudios sobre la especificidad del AcM CP2/7, los cuales ayudarán a esclarecer el complejo polimorfismo de la familia HLA-D.

Varios de nuestros AcM reconocen los antígenos de activación 4F2 y receptor de transferrina, los cuales están presentes en células que proliferan activamente como son las células tumorales⁶. De estos dos antígenos, el receptor de transferrina es el más ampliamente estudiado. La transferrina es un componente necesario del medio de cultivo para el crecimiento de células *in vitro*, lo que sugiere que es necesario un transporte activo del hierro para la proliferación celular. Esta hipótesis ha sido corroborada mediante el empleo de AcM específicos del receptor de transferrina, los cuales originan una detención de la división celular y una acumulación de células en fase S³⁶. Los antígenos 4F2 y receptor de transferrina han sido descritos recientemente como posibles moléculas dianas de las células citotóxicas naturales mediante el empleo de AcM como los descritos en este trabajo^{37,38}. No cabe duda que este tipo de AcM será de gran utilidad en la dilucidación del mecanismo de acción de las células citotóxicas naturales, así como en los estudios sobre proliferación celular.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos la ayuda prestada por A. García Álvarez en la preparación de este manuscrito, así como a C. Aranda (Coulter Científica) el permitirnos el uso del citofluorimetro Epics C. Este trabajo ha sido subvencionado por Alergia e Inmunología Abelló, S.A.

Bibliografía

- Evans RL, Bread JM, Lazarus H, Schlossman SF, Chess L. Detection, isolation, and functional characterization of two human T-cell subclasses bearing unique differentiation antigens. *J Exp Med* 1977; 145:221-233.
- Kung PC, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* 1979; 206:347-349.

3. Terhorst C, van Aagthoven A, Le Clair K, Snow P, Reinherz EL, Schlossman SF. Biochemical studies of the human thymocyte cell surface antigens T6, T9 and T10. *Cell* 1981; 23:771-780.
4. Reinherz EL, Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 1980; 19:821-827.
5. Reinherz EL, Schlossman SF. Human T lymphocyte differentiation. *Immunol-Today* 1982; 3:16-17.
6. Haynes BF. Human T lymphocyte antigens as defined by monoclonal antibodies. *Immunol Rev* 1981; 57:127-161.
7. Meuer SC, Acuto O, Hercend T, Schlossman SF, Reinherz EL. The human T-cell receptor. *Ann Rev Immunol* 1984; 2:23-50.
8. LeBien TW, Kersey JH. Utilization of monoclonal antibodies in the study of cell surface antigens on human B lymphocytes. En: Haynes BF, Eisenbarth eds. Monoclonal antibodies probes for the study of autoimmunity and immunodeficiency. Academic Press 1983; 115-130.
9. McKenzie IFC, Zola H. Monoclonal antibodies to B cells. *Immunol Today* 1983; 4:10-15.
10. Todd RF, Nadler LM, Schlossman SF. Antigens on monocytes identified by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1981; 126:1.435-1.442.
11. Springer T, Galfre CT, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 1979; 9:301-306.
12. Sánchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E, Simon P, Springer TA. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct subunits and a common subunit: the lymphocyte function associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med* 1983; 158:1.785-1.803.
13. Krensky AM, Robbins E, Springer TA, Burakoff SJ. LFA-1, LFA-2 and LFA-3 antigens are involved in CTL-target conjugation. *J Immunol* 1984; 132:2.180-2.182.
14. Toribio ML, de Landazuri MO, López-Botet M. Induction of NK-like cytotoxicity in cultured human thymocytes. *Eur J Immunol* 1983; 13:964-969.
15. Galfre G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol* 1981; 73:3-46.
16. Sánchez-Madrid F, Szklut P, Springer TA. Stable hamster-mouse hybridomas producing IgG and IgM hamster monoclonal antibodies of defined specificity. *J Immunol* 1983; 130:309-312.
17. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens new tools for genetic analysis. *Cell* 1978; 14:9-20.
18. Le Clair K, Van Aagthoven A, Terhorst C. A rapid method for isolation of antigenically active human cell surface antigens associated with $\beta 2$ -microglobulin using a monoclonal antibody. *J Immunol Methods* 1981; 41:137-144.
19. Van de Rijn M, Geurts van Kessel, AHM, Kroezen V, Van Aagthoven AJ, Verstijnen K, Terhorst C, Hilgers J. Localization of a gene controlling the expression of the human transferrin receptor to the region q12 qter of chromosome 3. *Cytogenet Cell Genet* 1983; 36:525-531.
20. Sánchez-Madrid F, Krensky AM, Ware CF, Robbins E, Strominger JL, Burakoff SJ, Springer TA. Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2 and LFA-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:7.489-7.493.
21. Yelton DE, Desaynard C, Scharff MD. Use of monoclonal anti-mouse immunoglobulin to detect mouse antibodies. *Hybridoma* 1981; 1:5-11.
22. Yang SY, Morishima Y, Collins NC, et al. Comparison of one dimensional IEF patterns for serologically detectable HLA-A and B allotypes. *Immunogenetics* 1984; 19: 217-231.
23. Fraker PJ, Spector JC. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 80:849-857.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
25. Bernabeu C, Finlay D, van de Rijn M, Maziarz RT, Biro PA, Spits H, de Vries J, Terhorst CP. Expression of the major histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-B7 by DNA mediated gene transfer. *J Immunol* 1983; 131:2.032-2.037.
26. Orr HT, López de Castro JA, Parham P, Ploegh HL, Strominger JL. Comparison of amino acid sequences of two human histocompatibility antigens, HLA-A2 and HLA-B7: the location of putative alloantigen sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4.395-4.399.
27. Turner MJT, Cresswell P, Parham P et al. Purification of papain-solubilized histocompatibility antigens from a cultured human lymphoblastoid line, RPMI 4265. *J Biol Chem* 1975; 250:4.512-4.519.
28. Bernabeu C, van de Rijn M, Lerch P, Terhorst C. $\beta 2$ microglobulin from serum associates with class I antigens on the surface of cultured cells. *Nature* 1984; 308:642-645.
29. Omary MB, Trowbridge IS, Minowada JM. Human cell surface glycoprotein with unusual properties. *Nature* 1980; 286:888-891.
30. Haynes BF, Hemler M, Cotner T, Mann DL, Eisenbarth GS, Strominger JL, Fauci AS. Characterization of a monoclonal antibody (5E9) that defines a human cell surface antigen of cell activation. *J Immunol* 1981; 127:347-351.
31. Trowbridge IS, Omary MB. Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:3.039-3.043.
32. Haynes BF, Hemler ME, Mann DL, et al. Characterization of a monoclonal antibody (4F2) that binds to human monocytes and to a subset of activated lymphocytes. *J Immunol* 1981; 126:1.409-1.414.
33. Brodsky FM, Parham P, Barnstable CJ, Crompton MJ, Bodmer WF. Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system. *Immunol Rev* 1979; 47:3-60.
34. Bernabeu C, Maziarz R, Murre C, Terhorst C. $\beta 2$ -microglobulin from serum associates with several class I antigens expressed on the surface of mouse L-cells. *Mol Immunol* 1985; 22:955-960.
35. Bach FH. The HLA class II genes and products: the HLA-D region. *Immunol Today* 1985; 6:89-94.
36. Trowbridge IS, López F. Monoclonal antibody to transferrin receptor blocks transferrin binding and inhibits human tumor cell growth *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:1.175-1.179.
37. Vodinich L, Sutherland R, Schneider C, Newman W, Greaves M. Receptor for transferrin may be a target structure for natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:835-839.
38. Hercend T, Schmidt R, Brenan A et al. Identification of a 140 kDa activation antigen as a target structure for a series of human cloned natural killer cell lines. *Eur J Immunol* 1984; 14:844-852.
39. Moingeon P, Nowill A, Courtois G et al. A target structure for a series of human cloned natural killer cell lines is recognized by both anti-TNK tar and 4F2 monoclonal antibodies. *J Immunol* 1985; 134:2.930-2.934.