

B2763

Emberi fehérvérsejtek
sejtfelszíni fehérjéinek vizsgálata
monoklonális ellenanyagok segítségével

Doktori értekezés

Készítette:

Gaálné Sebestyén Magdolna

MTA

Szegedi Biológiai Központ

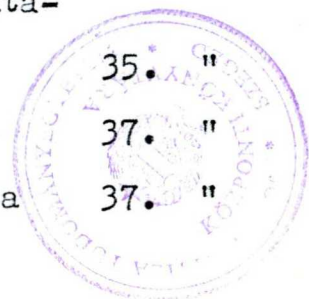
Szeged

1987.



Tartalomjegyzék

| | | |
|--------|---|----------|
| 1. | Bevezetés | 1. oldal |
| 2. | Irodalmi áttekintés | 2. " |
| 2.1. | A monoklonális ellenanyag technikáról | 2. " |
| 2.2. | A humán limfociták egyes sejtfelszíni markereire vonatkozó ismeretek összefoglalása | 4. " |
| 3. | Anyag és módszer | 22. " |
| 3.1. | Oldatok és tápfolyadékok összetétele | 22. " |
| 3.2. | Sejtek, sejtvonalak, sejttenyésztés körülményei | 24. " |
| 3.2.1. | Sejtek izolálása perifériás vérből és timuszból | 24. " |
| 3.2.2. | Sejtvonalak | 27. " |
| 3.2.3. | A sejttenyésztés körülményei | 28. " |
| 3.3. | Monoklonális ellenanyagok előállítása | 28. " |
| 3.4. | Szerológiai vizsgálatok | 31. " |
| 3.4.1. | Indirekt immunfluoreszcencia | 31. " |
| 3.4.2. | Az ellenanyagok izotípusának meghatározása ELISA módszerrel | 31. " |
| 3.5. | Funkcionális vizsgálatok | 32. " |
| 3.5.1. | Transzformálás poliklonális mitogénekkal | 32. " |
| 3.5.2. | Kevert limfocita kultúra | 33. " |
| 3.5.3. | Citotoxikus aktivitás meghatározása | 34. " |
| 3.5.4. | Transzformálás Epstein-Barr vírussal | 35. " |
| 3.5.5. | Az ellenanyagok funkciót módosító hatásának kiszámítása | 35. " |
| 4. | Eredmények | 37. " |
| 4.1. | Monoklonális ellenanyagok előállítása | 37. " |



| | | |
|--------|--|-----------|
| 4.2. | Az ellenanyagok izotípusa és Protein-A kötése | 39. oldal |
| 4.3. | A szerológiai vizsgálatok eredményei | 39. " |
| 4.3.1. | Vizsgálatok egészséges donorok perifériás véréből izolált sejtfrakciókon, és timusz sejteken | 39. " |
| 4.3.2. | Vizsgálatok leukémiás betegek véréből izolált sejteken | 39. " |
| 4.3.3. | Vizsgálatok humán sejtvonalakon | 43. " |
| 4.4. | A funkcionális vizsgálatok eredményei | 43. " |
| 4.4.1. | A természetes ölü sejtek hatásának gátlása | 43. " |
| 4.4.2. | A citotoxikus T limfociták működésének gátlása | 44. " |
| 4.4.3. | Az ellenanyagok hatása kevert limfocita kultúrában | 44. " |
| 4.4.4. | Az ellenanyagok mitogén hatásának tesztelése | 45. " |
| 4.4.5. | Növényi lektinek mitogén hatásának módosítása | 46. " |
| 4.4.6. | Epstein-Barr vírus /EBV/ okozta blasztosodás gátlása | 49. " |
| 5. | Diszkusszió | 52. " |
| 6. | Összefoglalás | 66. " |
| | Köszönetnyilvánítás | 68. " |
| | A dolgozatban szereplő fontosabb differenciálódási markerek jegyzéke | 69. " |
| | Rövidítések jegyzéke | 70. " |
| | Irodalomjegyzék | 72. " |

1. Bevezetés

Mint minden sejt, az emberi fehérvérsejt is fehérjék sokaságát hordozza membránjában. Ezek a polipeptiddek - sok egyéb funkció mellett - részt vesznek a szervezetbe került idegen részecskék és molekulák /antigének/ felismerésében, a sejtkölcsönhatásokban, különböző molekulák /immunglobulinok, hormonok, más biológiailag aktív anyagok stb./ megkötésében és az immunrendszer effektor funkcióiban. Megismerésük tehát elvezethet az immunrendszer működésének és szabályozásának megértéséhez.

Ha intakt sejteket egy más faj egyedébe juttatunk, a sejt fehérjéi immunválaszt váltanak ki, és specifikus ellenanyagok termelődését indukálják a szervezetben. Az így termeltetett immunszérumok már hosszú évtizedek óta fontos eszközei a sejtfelszíni antigének kutatásának. A hibridóma technika felfedezése azonban minőségileg új utakat nyitott meg. Ma már világszerte monoklonális ellenanyagokat használnak az emberi immunrendszer működésének és szabályozásának megismerésére, a vérképző szervek és az immunrendszer megbetegedéseinek klinikai vizsgálatára.

Munkám célja a humán immunválaszban résztvevő sejtek egyes sejtfelszíni fehérjéinek szerológiai és funkcionális vizsgálata volt, monoklonális ellenanyagok segítségével.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A monoklonális ellenanyag technikáról

Még a viszonylag egyszerű antigének is általában számos különböző antigén-determináns csoportot, epitópot, hordoznak, s így egy sor különböző ellenanyag termelődését indukálják az immunizált szervezetben. Amennyiben ép sejtekkel végzünk immunizálást, sokféle fehérjét juttatunk a szervezetbe, így a keletkezett szérum sokféle ellenanyag keverékét tartalmazza. Már régóta használták ezeket a polispecifikus szérumokat a kutatásban, amikor még mindig vitatott kérdés volt, hogy e polispecifikusság sokféle sejt monoklonális, vagy az egyes sejtek poliklonális válaszának eredménye-e. Erre csak az utolsó három évtized kutatási eredményei adtak választ. Burnet klónszelekciós elmélete /Burnet, F.M. 1957./ szerint minden limfocitának egyedi, specifikus receptora van, amely előre elkötelezi a sejtet egyetlenféle ellenanyag termelésére. Az elméletet később kísérleti eredmények is igazolták, a kérdés mégis sokáig vitatott volt. Végül az 1967-es Cold Spring Harbor Conference fogadta el általánosan a klónszelekciós elméletet, ami a monoklonális ellenanyag technika elvi alapja. A technika kidolgozásához azonban számos egyéb kutatási eredmény is nélkülözhetetlen volt. A hatvanas évek elején igazolták, hogy a myeloma egyetlen B limfocitából kiinduló rákos sejtburjánzás. Ezt követően számos mesterségesen indukált myeloma sejt vonalat izoláltak különböző egértörzsekből, amelyek egy része szövettanyészet-

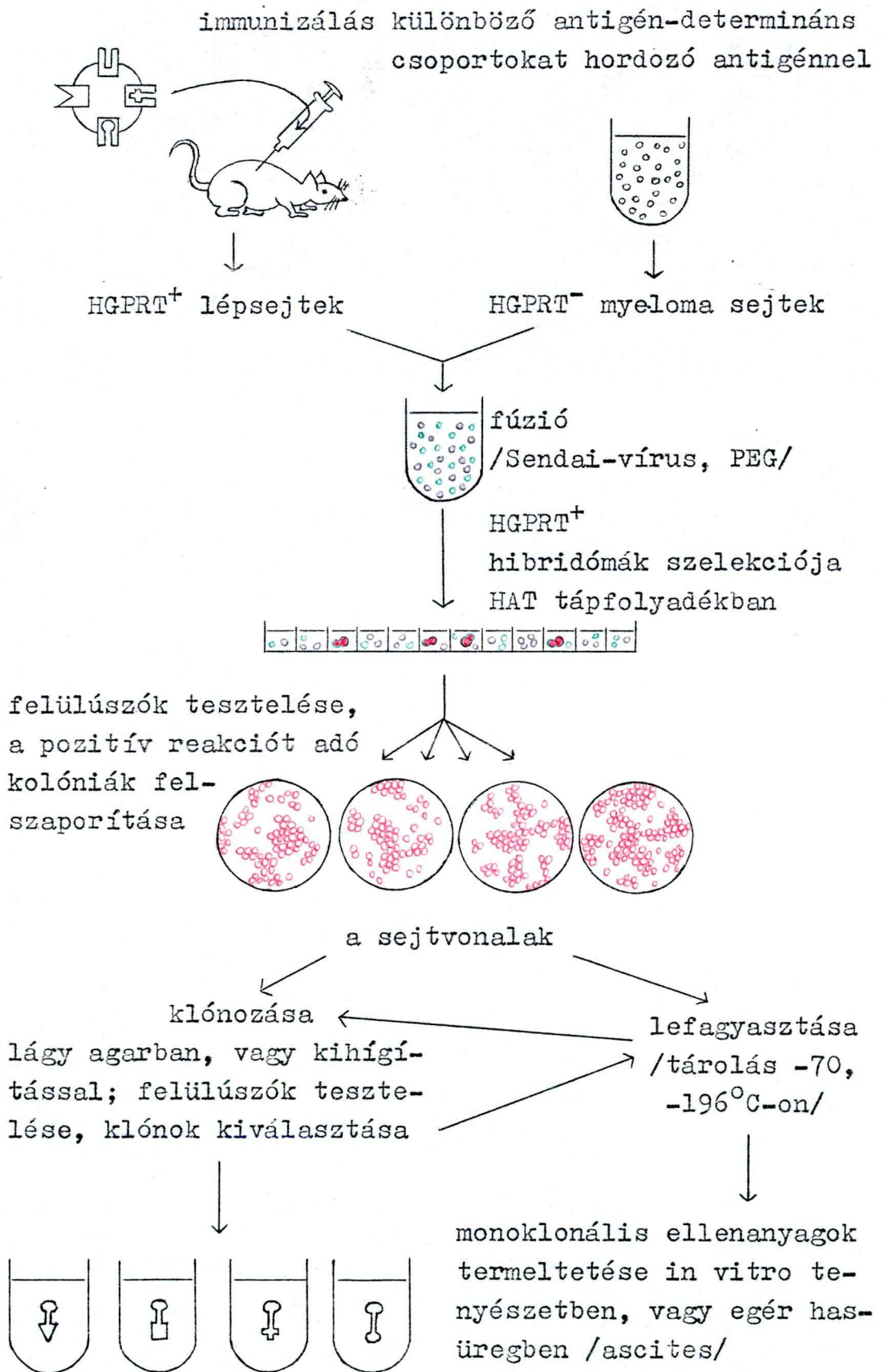
ben is fenntartható volt. Ezekből később izoláltak olyan mutánsokat is, amelyek nem termeltek hipoxantin-guanin-foszfribozil-transzferáz /HGPRT/ enzimet. Az ilyen mutánsok egy folsav antagonistá, az aminopterin jelenlétében nem képesek DNS szintézisre, azaz osztódásra. A mutánsok egészséges sejtekkel képzett hibridjei azonban ismét képesek aminopterin jelenlétében is osztódni, ami lehetővé teszi a hibridek szelektálását /Littlefield, J.W. 1964./. Mindezek ismeretében 1975-ben Köhler és Milstein inaktivált Sendai vírus segítségével fuzionált HGPRT⁻ myeloma sejteket egy birka vörösvértestekkel immunizált egér lépsejtjeivel. A hibrideket hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó /HAT/ tápfolyadékban szelektálták. Ebben a HGPRT⁻ myeloma sejtek, az egér lépsejtek, és ezek önmagukkal képzett hibridjei néhány nap alatt elpusztulnak, és csak a myeloma-lépsejt hibridek képesek szaporodni. A szelektáló táptalajon felnőtt kolóniákat a szerzők klónozták, és tesztelték az ellenanyag termelést. Számos olyan egyetlen sejtől kiinduló klónt kaptak, amely birka vörösvértestekkel reagáló ellenanyagot termelt. A hibrideket szövettényészetben is fent lehetett tartani, vagy egérbe injektálva tumorként szaporítani. Az így nyert sejtvonalakat hibridómáknak, magát a technikát hibridóma, vagy monoklonális ellenanyag technikának nevezték el /Köhler,G.-Milstein,C. 1975. és 1976./. A szerzők már 1976-os cikkükben felvetik, hogy előnyös lenne immunglobulint nem termelő myeloma variánsokat használni a fúzióhoz, s ez néhány év múlva meg is valósult /Shulman,M. és mtsi. 1978. és

Kearney, J.F. és mtsi. 1979./ . Később a sejtek fúzionálására is új módszert vezettek be, a polietilén-glikol használatát /Pontecorvo, G. 1976. és Gefter, M.C. és mtsi. 1977./, de ezen változtatásoktól eltekintve a technikát ma is Köhler és Milstein leírása szerint alkalmazzák. Főbb lépéseit az 1. ábra foglalja össze.

Két-három évvel Köhlerék cikke után már számos közlemény bizonyította, hogy a monoklonális ellenanyagok, sok egyéb alkalmazásuk mellett, a sejtfelszíni antigének leírásának, szöveti megoszlásuk és az immunválaszban betöltött szerepük vizsgálatának is bevált eszközei. A kutatások eredményeként számos sejtfelszíni fehérjét sikerült azonosítani és valamely ismert limfocita funkcióval kapcsolatba hozni. A szerteágazó és igen nagy terjedelmű irodalomból az alábbiakban azokat az eredményeket próbálom meg összefoglalni, amelyek alapvető információkat nyújtanak az emberi immunrendszert felépítő sejtféleségekre és a köztük lévő kapcsolatokra vonatkozóan, illetve amelyek ismerete kísérleteim értékeléséhez nélkülözhetetlen.

2.2. Az emberi fehérvérsejtek egyes sejtfelszíni markereire vonatkozó ismeretek összefoglalása

Az immunrendszer sejtjes elemeit már jóval a monoklonális ellenanyagok felfedezése előtt ismerték és osztályozták. Leírták a morfológiailag is jól elkülöníthető monocitákat, a belőlük kifejlődő nagy falósejteket /makrofágok/, a granulocitákat valamint a morfológiai szem-



1.ábra: Monoklonális ellenanyagok előállításának vázlatja

pontból egységes csoportnak tűnő kis limfocitákat. Hagyományos immunszérumokkal adott reakcióik alapján a limfocitákat két csoportra, a csontvelőben fejlődő B limfocitákra, illetve a timuszban érő T limfocitákra osztották. Később a T limfocitákon belül alcsoportokat is ki tudtak mutatni, és sikerült a főbb csoportok funkcióját is megismerni. Alpopulációkkal reagáló monoklonális ellenanyagok előállítására további sejttípusok azonosítását is lehetővé tette, ami azonban sok esetben csak ugyanazon sejtféleség különböző differenciáltsági fokát jelzi. Lehetőség nyílt továbbá az alcsoportok szerepének, és a különböző funkcióval rendelkező sejtek közötti bonyolult kölcsönhatásoknak molekuláris szinten történő vizsgálatára.

A perifériás vérben keringő érett B limfociták legjellemzőbb sejtfelszíni fehérjéi az immunglobulinok. A vérbe kiválasztott Ig molekulák azonban más sejtek Fc receptoraihoz is kötődhetnek, így nem kizárólagos B-sejt markerek. A B1 (=CD 20/), a B2 (=CD 21/ és a B4 (=CD 19/ antigéneket eddig csak B limfocitákon mutatták ki, ezek tehát alkalmasak a B-sejteknek a többi sejtes elemtől való elkülönítésére. A B1 és B4 antigének minden nyugvó B-sejten megtalálhatók, míg a B2 csak egy alpopulációra jellemző /Nadler, L.M. és mtsi. 1983. és Anderson, K.C. és mtsi. 1985./. A nyugvó B limfociták IgM és IgD típusú immunglobulinokat hordoznak felszínükön, ezek az antigén-receptoraik. Az antigén megkötését követően a sejt aktiválódik, osztódni kezd s közben sejtfelszíni markerei is változásokon mennek keresztül. Az IgD eltűnik a

sejtfelszínről, s helyette IgG jelenik meg. Egymás után eltűnnek a B2, B1 és B4 antigének is, és helyüket új, csak az aktivált B-sejtekre jellemző antigének veszik át /pl. BB-1, Yokochi, T. és mtsi. 1982. és B-LAST 1, Thorley-Lawson, D.A. és mtsi. 1982./. Közben limfokinek megkötésére szolgáló receptorok /pl. az IL-2 receptora, a Tac antigén, Andó, I. és mtsi. 1985/a, és Boyd, A.W. és mtsi. 1985./ ^{jelennek meg,} és maga a sejt is termel limfokineket. Végül az aktivált B-sejt klón ellenanyag termelő plazmasejteké és hosszú élettartamú memóriasejteké differenciálódik. További jellemző B-sejt marker a C3d komplement receptor, ami egyúttal az Epstein-Barr vírus receptorául is szolgál, és valószínűleg ennek egy epitópja azonos a már említett B2 antigénnel, mivel egy B2-specifikus monoklonális ellenanyag gátolja az EBV okozta transzformációt /Åman, P. és mtsi. 1985./. A fentiekén kívül minden B limfocita hordoz I. és II. osztálybeli MHC fehérjét, és olyan markereket, amelyek általában a limfocitákra jellemzőek /LFA-1, LFA-3 stb./. Ezek szerepére később térek ki.

A perifériás T limfociták funkcionális szempontból három, sejtfelszíni markereik alapján két domináló csoportba tartoznak. A két csoport vagy a T4 [=CD 4/, vagy a T8 [=CD 8/ antigént hordozza. A T4 a perifériás T-sejtek 55-60%-án, a T8 ugyanezek 25-35%-án mutatható ki. Van továbbá egy kis /3-5%/ populáció, amely T4⁺T8⁺ fenotípussal jellemezhető. Megfigyelték, hogy ezek aránya mitogén hatásra /pl. Con-A/ 60%-ra is nőhet, aminek az immunválasz szabályozásában lehet szerepe /Blue, M.L. és

mtsi. 1985./ . Magának a T4 és T8 molekulának a funkciójáról még később szó lesz.

Minden perifériás T-sejt hordozza a T1 /=CD 5/, T3 /=CD 3/ és T11 /=CD 2, =LFA-2/ antigéneket, amelyek segítségével a többi sejtes elemtől elkülöníthetők.

A T1 antigén a birka vörösvértestekkel rozettát képző sejtek 85-95%-án, a timuszsejtek 35-60%-án, és egyes krónikus limfoid leukémiás /T- és B-CLL/ betegek perifériás mononukleáris /PM/ sejtjein mutatható ki. Egészséges B-sejteken, monocitákon és granulocitákon nem fordul elő. T1 antigénnel reagáló monoklonális ellenanyagok hatását vizsgálva megállapították, hogy oldott antigének, poliklonális mitogének /PHA, Con-A stb./ és alloantigének T-sejt aktiváló hatását nem gátolták /Engleman, E.G. és mtsi. 1981/a/. Az antigén funkciója egyelőre nem ismert.

A T11 antigén csak timuszsejteken, perifériás T limfocitákon és a nagy, granulált morfológiájú természetes ölü sejteken fordul elő. Ez a glikoprotein felelős a felsorolt sejttípusok birka vörösvértestekkel való rozetta képzéséért, ami mai napig is tisztításuk alapja. Az elmúlt években a rozetta képzésen kívül számos funkciót kapcsoltak ehhez a molekulához. Több epitópját azonosították, és megállapították, hogy a különböző epitópokhoz kapcsolódó ellenanyagok különböző hatásúak. Egyes ellenanyagok gátolják a rozetta képzést /Howard, F.D. és mtsi. 1981./, számos ellenanyag gátolja a fitohemagglutinin /O'Flynn, K. és mtsi. 1985. és 1986./ és más növényi lektinek /Görög, Gy. és mtsi. 1985./ mito-

gén hatását, és több szerző is kimutatta a citotoxikus T-sejtek és a természetes ölü sejtek lítikus aktivitásának gátlását /Sanchez-Madrid, F.A. és mtsi. 1982., Krensky, A.M. és mtsi. 1983., Martin, P.J. és mtsi. 1983. és Clayberger, C. és mtsi. 1985./ . Vannak olyan T11-specifikus ellenanyagok is, amelyek az antigénhez kötődve aktiválják és osztódásra készítetik a sejtet. Meuer és munkatársai szerint a molekula "2" és "3" epitópjához kötődő ellenanyagok keveréke antigén és járulékos sejtek jelenléte nélkül is aktiválják a T-sejtet, amit a Tac-antigén megjelenése, és intenzív H^3 -timidin beépülés jelez /Meuer, S.C. és mtsi. 1984./ . Különböző "1" epitóppal, és az úgynevezett D66 epitóppal reagáló ellenanyagok kombinációjával Brottier és munkacsoportja is tudott proliferációt indukálni, de ehhez egyértelműen szükség volt monociták jelenlétére is. Nem minden donor sejtjei reagáltak azonban egyformán az ellenanyagok kötődésére. Az egyedek kb. 75%-ánál intenzív H^3 -timidin beépülést mértek, 25%-ánál azonban csak gyenge sejtosztódást tapasztaltak. A különbségek oka a monociták közötti valamilyen eltérés volt, de bizonyítottan nem a különböző Ig izotípusok Fc régiójának kötőképessége. Hogy mi okozta a donorok közötti eltérést, valamint hogy mitől függ, hogy a két leírt aktiválódás során szükség van-e járulékos sejtek jelenlétére, vagy nincs, azt még nem sikerült tisztázni /Brottier, P. és mtsi. 1985./ .

A T limfociták antigén-felismerését a T3 molekula és a hozzá kapcsolódó klónspecifikus Ti molekula komplexe biztosítja. Az immunglobulinokhoz hasonlóan a Ti molekula

is tartalmaz egy variábilis régiót, ami biztosítja az egyes T limfociták különböző antigén-specifitását /Meuer, S.C. és mtsi. 1983./. Ezek az antigén receptorok a B-sejtek receptoraival ellentétben a T sejtek többségén nem képesek a vérben, vagy nyirokban oldott natív antigéneket felismerni. Az idegen molekuláknak a szervezet úgynevezett antigén-prezentáló sejtjeinek /monociták, makrofágok, aktivált B-sejtek, dendritikus sejtek stb./ membránján kell megjelenni, méghozzá bizonyos saját fehérjékkel együtt. Ezek a saját fehérjék a fő szöveti összeférhetőségi génrendszer /Major Histocompatibility Complex = MHC/ által kódolt molekulák, amelyeknek két fő csoportjuk van. Az I. osztálybeli MHC fehérjék /HLA-A, -B, -C/ a szervezet minden magvas sejtjén megtalálhatók, minden sejtbe rányomva ezáltal a "saját" bélyegzőt. A II. osztálybeli /HLA-DP, -DQ, -DR/ antigének az immunrendszer sejtjei közül csak B limfocitákon, antigén-prezentáló sejteken és aktivált T-sejteken mutathatók ki. A T-sejtek által közvetített immunválasz megindításához általában az szükséges, hogy a sejt receptora az antigént és az MHC fehérjét együttesen ismerje fel. A már említett két domináló T-sejt populáció többek között abban is különbözik, hogy a T8 antigént hordozók az I., míg a T4 antigént hordozók a II. osztálybeli MHC fehérjékkel kapcsolt antigént ismerik fel. A T-sejt populációk működésének ezt a szabályozását nevezzük MHC-korlátozásnak. Az antigén-inger hatására aktiválódott T-sejtek különböző szabályozó és effektor funkciókat töltenek be. Jelenleg három főbb működést ismerünk, és a különböző feladatokat ellátó cso-

portok vagy a T4, vagy a T8 antigén hordozásával jellemezhetők, ez azonban nem jelent szigorú kategóriákat.

A T4 antigént hordozók többsége úgynevezett induktor/segítő sejt, amelyek egyrészt közvetlen kölcsönhatások révén, másrészt biológiailag aktív anyagok /pl. BCGF, IL-2 stb./ kiválasztásával serkentik a többi T-sejt fajta működését, és a B limfociták ellenanyag termelését. Természetesen nem hatnak minden sejtre, csak azokra, amelyek szintén találkoztak már az antigénnel, s ennek hatására aktiválódva új markerek jelentek meg a felületükön. A T-sejt aktiválódás folyamata ugyanis, a B-sejtekéhez hasonlóan, a sejtfelszíni markerek változásával jár együtt. Az aktivációs antigének jellemzésével, és megjelenésük kinetikájával számos közlemény foglalkozik. A leggyorsabban megjelenő aktivációs markerek az IL-2 receptor /Tac-antigén/ és a transzferrin receptor. Mindkettő jelenléte nélkülözhetetlen a sejtek osztódásához. A velük reagáló monoklonális ellenanyagokkal a sejtek blasztos transzformációja gátolható /Depper, J.M. és mtsi. 1983. és Vaickus, L.-Levy, R. 1985./ . A Tac antigént sokáig T-sejt specifikus markernek tartották, de később igazolták, hogy aktivált B és NK /természetes ölő/ sejtek felszínén is kifejeződik /Andó, I. és mtsi. 1985/a, Boyd, A.W. és mtsi. 1985. és Henney, C.S. és mtsi. 1981./ . A T4⁺ segítő sejtek által termelt IL-2 ezen a receptoron kötődik meg, s elősegíti a már aktivált T, B és NK sejtek osztódását. Másik jellemző aktivációs jelenség, hogy a nyugvó HLA-DR⁻ T-sejtek 60-80%-a DR-pozitívvá válik, s ezáltal felismerhetőek lesznek a II. osztálybeli MHC fe-

hérjékre korlátozott $T4^+$ sejtek számára. Ennek szerepe lehet az immunválaszt szabályozó sejt-sejt /pl. segítő T-sejt \rightarrow citotoxikus T-sejt/ kölcsönhatások érvényesülésében. Mitogén hatásra a már említett változásokon kívül egyes, a nyugvó sejteken is előforduló antigének százalékos előfordulása vagy denzitása is növekedhet, illetve leírtak további markereket is, de ezek szerepe még nem tisztázott /Holter, W. és mtsi. 1985./.

A $T4^+T8^-$ fenotípusú T limfociták között előfordulnak olyanok is, amelyek nem induktor/segítő szerepet töltenek be az immunválaszban, hanem citotoxikus effektor sejt-ként működnek. Az antigént a segítő sejtekhez hasonlóan ezek is a II. osztálybeli MHC fehérjékkel együtt ismerik fel /Meuer, S.C. és mtsi. 1982./, míg a citotoxikus sejtek döntő többségét alkotó $T4^-T8^+$ sejtek I. osztálybeli MHC fehérjékre specifikusak. Mivel ezek az MHC fehérjék a szervezet minden sejtjén megtalálhatók, a $T4^-T8^+$ citotoxikus sejtek rendszerint minden olyan sejtet elpusztítanak, amely receptoruk számára felismerhető antigént /pl. vírus vagy tumor antigént/ hordoz a felszínén. A $T4^-T8^+$ sejtpopuláció másik részét az úgynevezett elnyomó sejtek alkotják. Ezek a T limfociták az immunválasz visszafogásáért és befejezéséért felelősek. Az antigén felismeréséhez nem igénylik az antigén-MHC komplex létrejöttét, hanem a natív antigénhez közvetlenül is képesek kapcsolódni. Hatásukat antigén-specifikus szupresszor faktor kiválasztásával közvetítik, ami egyrészt további szupresszor sejtek differenciálódását indítja meg, másrészt közvetlenül hat a segítő T-sejtekre és B

limfocitákra /Janeway,C.A. és mtsi. 1985./.

Az antigén inger hatására aktiválódott segítő, citotoxikus és elnyomó /szupresszor/ T limfociták, valamint B limfociták között létrejövő bonyolult sejtkölcsönhatások molekuláris mechanizmusára a különböző sejtfelszíni antigénekkal reagáló monoklonális ellenanyagok hatásából vontak le következtetéseket. Damle és munkatársai allogén kevert limfocita reakcióban végzett kísérletekben az elnyomó T limfociták aktiválódásában és effektor funkcióiban résztvevő antigéneket vizsgálták. Megállapították, hogy az aktiválódási lépésben, azaz a segítő T-sejt → pre-elnyomó T-sejt kölcsönhatásban a T3, T8, T11 /=LFA-2/ és az LFA-1 molekulák játszanak szerepet, míg a fordított lépésben, azaz az érett elnyomó T-sejt → segítő T-sejt kölcsönhatásban a T11-nek már nincs szerepe. A kölcsönhatások T1, T4, LFA-3 valamint I. és II. osztálybeli MHC antigénekhez kötődő ellenanyagokkal nem voltak gátolhatóak /Damle,N.K. és mtsi. 1985./. Korábbi kísérletek eredményei szerint kevert limfocita kultúrában a sejtek aktiválódása T4-specifikus és II. osztálybeli MHC /HLA-DR/ specifikus ellenanyagokkal is gátolható volt. Ezek a reakció első lépését, a segítő T limfociták antigén-saját MHC komplex felismerését gátolják /Engleman,E.G. és mtsi. 1981/b, Palacios,R. 1982./. A citotoxikus T-sejtek effektor működésében a célsejt felismerését T8, az effektor és a célsejt összetapadását LFA-1, -2 és -3, magát a lízist pedig T3 antigénekkal reagáló ellenanyaggal lehetett gátolni /Landegren,U. és mtsi. 1982., Krensky,A.M. és mtsi. 1984. és Clayberger,

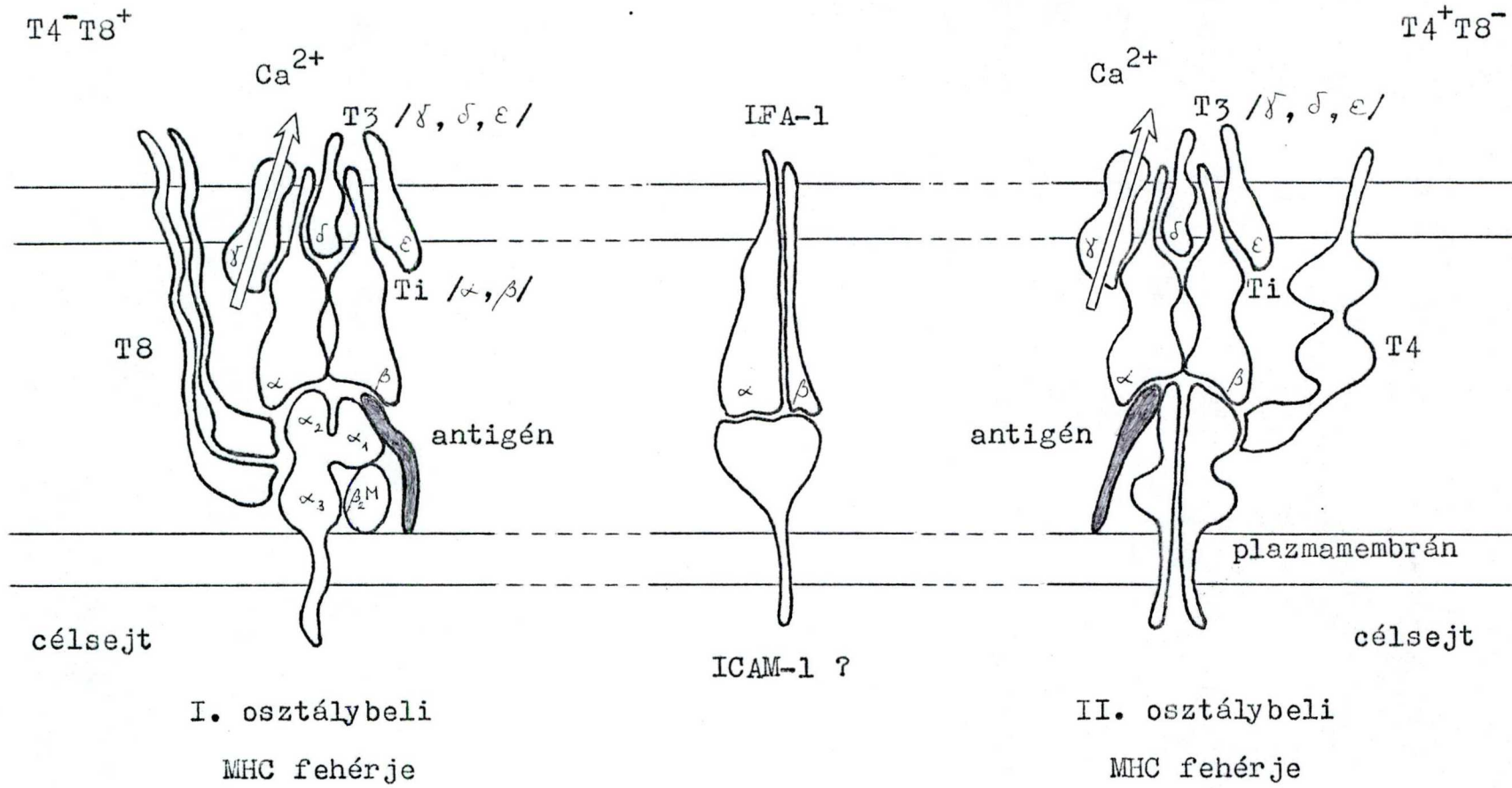
C. és mtsi. 1985./

Úgy tűnik, hogy a már többször is említett LFA-1 antigén központi szerepet játszik minden sejtkölcsönhatás kialakításában, ezért érdemes a rá vonatkozó eredményeket külön áttekinteni. A molekula két alegységből, α és β láncból épül fel. A β lánc azonos más sejtfelszíni markerek β láncával /Sanchez-Madrid, F. és mtsi. 1983./, és a hozzá kötődő ellenanyagok minden eddig vizsgált funkció /MLC, CTL, NK, növényi lektinek hatása, komplex kötés/ gátlását eredményezték. Az α lánchoz kötődő ellenanyagok hatásáról ellentmondásos közlemények jelentek meg. Hildreth szerint az α lánc nem vesz részt az NK sejtek működésében, ezzel szemben Schmidt és munkatársai szerint az NK aktivitás mind α , mind β lánc specifikus ellenanyagokkal gátolható, és a gátló hatás additív /Hildreth, J.E.-August, J.T. 1985. és Schmidt, R.E. és mtsi. 1985./. Számos kutatócsoport eredményeit összegezve az LFA-1 molekulának szerepe van a kevert limfocita reakcióban, valamint poliklonális mitogének /pl. PHA/ hatására végbemenő sejtaktiválódásban /Hildreth, J.E.-August, J.T. 1985./, a természetes öló és a citotoxikus T-sejtek működésében /Sanchez-Madrid, F. és mtsi. 1982., Krensky, A.M. és mtsi. 1984., Schmidt, R.E. és mtsi. 1985/a/, a B limfociták homotípusos összetapadásában /Mentzer, S.J. és mtsi. 1985./, valamint az induktor/segítő, a citotoxikus és az elnyomó T limfociták közötti sejtkölcsönhatásokban /Damle, N.K. és mtsi. 1985./. Egyelőre nem ismert, hogy az LFA-1 molekula a célsejt felületén milyen fehérjéhez kapcsolódik, de erre az egyik je-

lött a nemrégiben leírt ICAM-1 antigén, amely szintén a sejtek összetapadásában játszik szerepet, de nem azonos az LFA-1 antigénnel /Rothlein,R. és mtsi. 1986./.

A T-sejt specifikus markerek, az MHC fehérjék, az LFA-1, valamint a feltehetőleg ehhez kapcsolódó ICAM-1 molekulák közreműködését a T limfocita - célsejt kölcsönhatásban a 2.ábrán látható modell foglalja össze /Parnes,J.R. 1986. és Auffray,C. 1986. cikkei nyomán/. A T4 és T8 molekulák a megfelelő MHC fehérje egy monomorf régiójához kapcsolódnak, míg a klónspecifikus T_i molekula variábilis régiója az antigén és az MHC fehérje egy polimorf szakaszának komplexét ismeri fel. Parnes szerint elképzelhető, hogy a kötődés hatására a T_i-hez kapcsolt T3 molekulán át Ca²⁺ ionok áramlanak a citoplazmába, s ezáltal a sejt aktiválódik. A T3 molekula ilyen működése azonban egyelőre nem bizonyított. A két sejt összekapcsolódását stabilizálja, erősíti az LFA-1 molekula, amely a célsejt felületén az ICAM-1, vagy valamilyen más, még nem azonosított antigénhez kapcsolódik. Effektor T-sejt esetén az aktiválódást a célsejt lízise követi, de ennek mechanizmusa, és a lépésben résztvevő molekulák még nem ismertek.

A perifériás mononukleáris sejtek 10-15%-a előzetes aktiválás nélkül, spontán képes bizonyos tumoros és vírusfertőzött sejteket elpusztítani. Ezek a már említett természetes ölő /natural killer = NK/ sejtek, amelyek a T és B limfocitáktól morfológiailag jól elkülöníthető nagy, granulált limfociták. Sejtfelszíni markereiket tekintve nem képeznek egységes csoportot: T-sejt, monocita



2. ábra: A segítő és citotoxikus T limfociták célsejt-felismerésének és a célsejthez való kötődésének molekuláris modellje /Parnes, J.R. 1986. és Auffray, C. 1986. cikkei nyomán/. Magyarázat a szövegben.

és granulocita specifikus antigéneket egyaránt hordozhatnak. A legtöbb NK aktivitással rendelkező sejt felszínén kimutatható a birka vörösvértetek kötéseért felelős T11 antigén. Így a perifériás mononukleáris sejtek frakciójából az NK sejtek a T limfocitákkal együtt tisztíthatók. Az NK sejtek 20-50%-án a T8 antigén is kifejeződik, csak denzitása kisebb, mint a citotoxikus/ellenyomó T limfocitákon /Perussia, B. és mtsi. 1983./. A nyugvó perifériás mononukleáris sejtek egy kis csoportján az NK-specifikus HNK-1 [=Leu7/ antigénnel együtt a T1 és T3 antigéneket is kimutatták, de az ilyen fenotípusú sejtek nem rendelkeztek lítikus aktivitással /Lanier, L.L. és mtsi. 1983./. Schmidt és munkatársai azonban izoláltak T3⁺ NK sejt vonalakat is, amelyek lítikus aktivitása anti-T3 monoklonális ellenanyaggal gátolható volt /Schmidt, R.E. és mtsi. 1985./. A D44 jelű antigén szintén előfordul citotoxikus T-sejteken és NK sejteken is, de nem azonos a T8 antigénnel. Komplement jelenlétében az anti-D44 ellenanyag mindkét sejt típus lítikus aktivitását megszünteti, de hogy az antigén ténylegesen részt vesz-e a funkcióban, az még nem bizonyított /Calvo, C.F. és mtsi. 1984./.

Az, hogy a citotoxikus T-sejtek és a természetes ölő sejtek rendelkeznek közös differenciálódási markerekkel, lehet a hasonló funkció fenotípusos kifejeződése, de utalhat közös eredetre is. A közös eredet ellen szól, hogy az NK sejtek rendelkeznek olyan markerekkel is, amelyek a timuszban érő sejtek egyetlen fejlődési stádiumán sem mutathatók ki. Ilyenek pl. a már említett

HNK-1 antigéneken kívül a MO1 /= CD 11 , =Mac-1, =OKM1/, az NKP-15 /= CD 16 , =Leulla/ stb. antigének. Ezek egy része granulocitákon is kifejeződik. Az NKP-15 antigén gyakorlatilag minden NK aktivitással rendelkező sejten megjelenik, míg a HNK-1 ezeknek csak 75-90%-án mutatható ki, azaz egy alpopuláció elkülönítésére alkalmas /Lanier, L.L. és mtsi. 1983./. Meg kell még említeni a Tac-antigént, amelyet szintén kimutattak NK sejtek felszínén, és működése nem csak a szaporodáshoz bizonyult nélkülözhetetlennek, hanem a lítikus aktivitást is fokozta /Henney,C.S. és mtsi. 1981./.

Az NK sejteknek nem csak származásuk és fejlődésük kérdéses, hanem a célsejtek felismerésének és lízisének módja is. Az NK sejtek által felismert struktúrák száma nagyságrendekkel elmarad az immunglobulinok és T-sejt receptorok által felismerhető epitópok száma mögött, és ilyen antigén receptorokkal az NK sejtek általában nem is rendelkeznek. Az elpusztítandó sejtet tehát valamilyen más módon azonosítják. A felismerés és lízis mechanizmusának kutatásában fontos szerepet kaptak az NK aktivitást gátló monoklonális ellenanyagok. Ilyenek a T11 antigén "1" epitópjához kötődők, amelyek a természetes ölő aktivitáson kívül a citotoxikus T limfociták működését, PHA-val történő aktiválását és rozetta képzését is gátolják /Martin,P.J. és mtsi. 1983./. Szintén gátló hatásúak az LFA-1 és a gp95-150 antigének közös β láncához kötődő ellenanyagok, amelyek az effektor sejt - célsejt összekapcsolódást gátolják /Sanchez-Madrid,F. és mtsi. 1983. és Hildreth,J.K.-August,J.T. 1985./. Az RH1-38

jelű ellenanyag valószínűleg szintén az LFA-1 antigén egy epitópját ismeri fel, de nem ugyanazt, mint az előbb említettek, mivel ez nem e két sejt kapcsolódását, hanem egy késői lítikus lépést gátol /Hall,R.E. 1985./. Fontos eredményeket hozott a T-200 antigén-család elemeivel reagáló ellenanyagok vizsgálata is. Az NK sejteken ennek az antigén-családnak mind a négy eleme kimutatható /akárcsak T limfocitákon/, és ezek "A" epitópjával reagáló ellenanyagoknak sejtlízist gátló hatásuk van. A gátlás mechanizmusának vizsgálatával kimutatták, hogy a folyamatnak van egy úgynevezett triggering stádiuma, ami a célsejthez kötődést azonnal követi, és elkülönül a Ca^{2+} -igényes lízistől. Egyes anti-T-200 ellenanyagokkal ennek a "triggering" stádiumnak az elérése volt gátolható, ezért felvetődött, hogy a T-200 antigének talán az NK sejtek receptoraiként működnek. A feltevésnek ellentmond, hogy ezek az antigének gyakorlatilag minden limfocita populáción megtalálhatók, és nem ismerjük a többi sejt típuson betöltött szerepüket /Newman,W. és mtsi. 1984./. A természetes öló sejtek származása, differenciálódása, célsejt-felismerése és lítikus hatása tehát még nyitott kérdés.

Az immunrendszer sejtjes elemei közül nem volt még szó a közös származású, csontvelőben érő monocitákról és granulocitákról. A vérben keringő monociták, és a belőlük kifejlődő szöveti makrofágok /pl. dendritikus sejtek, a bőr Langerhans sejtjei stb./ az antigéneket fagocitálják, intracellulárisan feldolgozzák, és emésztett formában a sejtfelszínre juttatják, ahol azok a II.

osztálybeli MHC antigénekkel együtt már felismerhetőek a T sejtek receptorai számára. A jelenségnek /antigénprezentálás/ alapvető szerepe van tehát a T-sejtek aktiválásában. Ezen túl a monociták oldható faktorok, úgynevezett monokinek /pl. interleukin-1/ termelésével is elősegítik a többi sejtpopuláció osztódását és differenciálódását. A monociták és makrofágok, a granulocitákkal együtt, fontos szerepet játszanak továbbá a sérült saját szövetek, a transzplantátumok s más idegen sejtek és részecskék elpusztításában, fagocitálásában. Az elpusztítandó részecskék megtalálásában az Fc receptoroknak és a kemotaktikus ingereket felfogó molekuláknak van a legnagyobb szerepük. Monocitákon és makrofágokon mind IgG, mind IgM kötő Fc receptorokat kimutattak, granulocitákon csak IgG kötőket találtak. A fagocitáló sejtek irányításában több kemotaxist indukáló anyag hatását igazolták /pl. komplement töredékek, kollagén, leukotriének stb./. Sikerült már olyan monoklonális ellenanyagokat előállítani, amelyek a granulociták felszínén lévő molekulákhoz kapcsolódva megváltoztatták a kemotaktikus aktivitást. Egy ellenanyag gátló, két másik aktiváló hatásúnak bizonyult /Cotter, T. és mtsi. 1981. és Laskin, D.L. és mtsi. 1985./. Várható, hogy hamarosan a felismerés és fagocitózis molekuláris mechanizmusáról is többet fogunk tudni.

Közös eredetüknek megfelelően a monociták és granulociták számos közös differenciálódási markerrel rendelkeznek. Legfontosabbak a MO1 /ez NK sejteken is megtalálható/, a MO5 és MO6 antigének, de vannak a két populáció elkülönítésére alkalmas antigének is, pl. a csak

monocitákon kifejeződő MO2 /Todd, R.F. és mtsi. 1984./.
A MO antigének funkcionális szerepéről nem sokat tudunk.

Mint láttuk, a humán limfociták differenciálódási antigénjeinek monoklonális ellenanyagokkal való vizsgálata mindössze 7-8 éves múlttal rendelkezik. E néhány év alatt azonban óriási mennyiségű információ gyűlt össze az ember immunrendszerének fejlődését, valamint működésének és szabályozásának molekuláris alapjait illetően. Az adatok áttekinthetőbbé tételét, és könnyebb értékelhetőségét szolgálják a már háromszor megrendezett International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens rendezvények, ahol bevezették az eddig leírt antigének csoportokba sorolását /CD = cluster of differentiation/. A nagyszámú adat, és azok szervezett értékelése ellenére sem mondhatjuk, hogy kimerítően ismerjük az emberi fehérvérsejtek sejtfelszíni, differenciálódási markereit, és ezek szerepét az immunrendszer működésében. Az ilyen irányú kutatások ma is a világ számos laboratóriumában intenzíven folynak. További, monoklonális ellenanyagokkal végzett vizsgálatok új molekulák leírását, új összefüggések feltárását tehetik lehetővé. Az általam előállított ellenanyagok, és a velük végzett kísérletek eredményei beleilleszthetők ebbe a sokszínű mozaikba, s az eddig leírt információkkal összevetve értékelhetők.

3. Anyag és módszer

3.1. Oldatok és tápfolyadékok összetétele

A legtöbb felhasznált anyag alt. minőségű Reanal vegyszer volt. Az ettől eltérő minőségű készítményeket külön jelölöm.

Heparin oldat: 5 mg/ml Heparin Sodium /100 U/mg; Nutritional Biochem. Corp. USA/
PBS-ben oldva, sterilre szűrve

PBS /phosphate buffered saline/:

8,0 g NaCl
0,2 g KCl
1,81 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,2 g KH_2PO_4 /1000 ml deszt.víz
pH 7,4
sterilizálás: 121°C 20 perc

Ficoll-Uromiro oldat:

7,648 g Ficoll - 400 /Pharmacia/
20,0 ml 60% Uromiro /Bracco, Italy/
100,4 ml deszt.víz
sűrűsége: 1,08 g/ml
sterilizálás: 121°C 20 perc

Versen-tripszin oldat:

8,0 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,2 g KH_2PO_4
1,25 g EDTA /Selecton B₂/
0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1,25 g tripszin /8U/mg/
/1000 ml deszt.víz
sterilre szűrve

Gey-féle hemolizáló oldat:

A. 35,0 g NH_4Cl
1,85 g KCl
1,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
0,119 g KH_2PO_4
5,0 g glükóz
0,05 g fenolvörös indikátor
25,0 g zselatin
/1000 ml deszt.víz

B. 4,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
1,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
3,4 g CaCl
/1000 ml deszt.víz

C. 22,5 g NaHCO_3 /1000 ml deszt.víz

sterilizálás: 121°C 20 perc

felhasználás: deszt.víz : A : B : C =

7 : 2 : 1/2 : 1/2 arányban

frissen összekeverve

ELISA pufferek:

A. kötő puffer

1,59 g Na_2CO_3
2,93 g NaHCO_3
0,2 g NaN_3 /1000 ml deszt.víz
pH 9,6

B. mosó puffer

8,0 g NaCl
0,2 g KH_2PO_4
1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,0 g mertiolát /1000 ml deszt.víz
pH 7,2

+0,5 ml Tween-20

C. szubsztrát puffer

11,18 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
5,6 g citromsav
1,0 g mertiolát /1000 ml deszt.víz
pH 6,0

Szcintillációs folyadék:

5,0 g 2,5-difenil-oxazol /PPO/
0,05 g 2,2'-fenilén-bis/5-feniloxazol
/POPOP/ /Serva/
/1000 ml toluol

RPMI tápfolyadék:

10,0 g RPMI Medium 1640 /Gibco/
0,1 g penicillin /Sigma/
0,1 g streptomycin /Sigma/
/1000 ml trideszt.víz
pH 6,8 - 7,0 /1N HCl-val/
sterilre szűrve

Komplett RPMI tápfolyadék:

500 ml RPMI tápfolyadék
50 ml FCS /Humán Oltóanyag Term. Váll./
9 ml 39 mg/ml-es L-glutamin oldat /Sigma/

HAT szelektáló tápfolyadék:

100 ml komplett RPMI tápfolyadék
10 ml HAT törzsoldat:
136,0 mg hipoxantin /Sigma/
4,4 mg aminopterin /Sigma/
38,0 mg timidin /Sigma/
2,2 mg glicin /Sigma/
/1000 ml trideszt.víz

HT tápfolyadék:

100 ml komplett RPMI tápfolyadék
10 ml HT törzsoldat: mint a HAT törzsol-
dat aminopterin nélkül

3.2. Sejtek, sejtvonalak, sejttenyésztés körülményei

3.2.1. Sejtek izolálása perifériás vérből és timuszból

Egészséges donorok heparinos /0,05 mg/ml végkoncent-
ráció/ véréát azonos térfogatú PBS-sel hígítottam, majd

Ficoll-Uromiro oldat tetejére rétegeztem. Janetzki K26-os centrifuga kilengőfejes rotorjában +4°C-on 1000 fordulatszámmal /250.g/ centrifugáltam. 15 perc alatt a granulociták /grc/ és a vörösvértetek /vvt/ kiüledtek, a perifériás mononukleáris /PM/ sejtek a két fázis határán gyűltek össze /Böyum,A. 1968./. A leszívott PM sejteket kétszer mostam RPMI tápfolyadékkal, majd további felhasználásig komplett RPMI-ben szuszpendáltam fel őket.

Az üledékben levő granulociták és vörösvértetek elválasztására 3% Dextrán T 70 /Pharmacia/ tartalmú PBS-t használtam. Egy órás inkubálás /37°C/ alatt a vvt-k kiüledtek, a granulocitákat a felülúszóból centrifugálással össze lehetett gyűjteni /Böyum,A. 1968./. A grc frakciót szennyező vvt-eket Gey-féle oldattal hemolizáltam, majd mosás után a sejteket komplett RPMI-ben szuszpendáltam fel.

A PM sejtek frakciójából a monocitákat adherens tulajdonságuk alapján izoláltam. A PM sejteket komplett RPMI-ben CO₂-termosztátban 1 óráig üveg- vagy műanyag tenyészedényben inkubáltam. Enyhe szuszpendálás után a nem adherens T és B limfocitákat a tápfolyadékkal eltávolítottam, a kitapadt sejteket 1 percig Versen-tripszin oldattal kezeltem, majd RPMI-vel való mosás után komplett RPMI-ben szuszpendáltam fel őket.

A T és B limfociták elválasztását rozetta technikával végeztem /Kaplan,M.E.-Clark,C. 1974. és Pellegrino, M.A. és mtsi. 1975./. AET-vel kezelt birka vvt-k 2 térfogat%-os szuszpenziójához /PBS-ben/ fele térfogatú 10⁷

sejt/ml-es PM szuszpenziót /RPMI-ben/ kevertem, és 15% végkoncentrációban FCS-t adtam hozzá. A sejteket 250.g-vel 10 percig centrifugáltam, majd a centrifugacsőben 1 óráig 0°C-on /olvadó jég között/ inkubáltam. Az inkubációs idő leteltével az üledéket nagyon óvatosan fel-szuszendáltam, Ficoll-Uromiro oldat tetejére rétegeztem, és 250.g-vel 30 percig centrifugáltam. A B-sejtek és monociták a két fázis határán gyűltek össze, a birka vvt-vel rozettát képző T-sejtek kiülepedtek. A T-sejteket a vvt-k hemolízise és mosás után komplett RPMI-ben szuszpendáltam fel.

Szívműtéten átesett gyermektől származó timuszt feldaraboltam és tápfolyadékban spatulával szétnyomkodtam. A kiszabadult sejteket centrifugálással /100.g, 5 perc/ gyűjtöttem össze.

Az izolált sejtfrakciókat ismert specifitású kontroll ellenanyagokkal, indirekt immunfluoreszcenciával vizsgáltam. A felhasznált ellenanyagok:

UCHT 1 : T3 antigénre specifikus

UCHT 4 : T8 antigénre specifikus

2A1 : I. osztálybeli MHC antigénre /HLA-A,B,C/
specifikus

Mindhárom ellenanyag Peter Beverly /Imperial
Cancer Research Fund, Human Tumour Immunology
Group, London/ ajándéka.

JD2-C6 : II. osztálybeli MHC antigénre /HLA-DR/
specifikus

CC1-7 : monocita és granulocita specifikus

MA5-E1 : monocita specifikus

Utóbbi három ellenanyagot az MTA SzBK Genetika Intézetének Immunológia Laboratóriumában állították elő /Monostori Éva, Andó István/.

A reakciók eredményét az I. táblázatban foglaltam össze.

3.2.2. Sejtvonalak

A hibridómák előállításánál használt egér myeloma sejtvonal a Balb/c eredetű Sp2/O-Ag14 jelű HGPRT⁻, immunoglobulint nem termelő sejtvonal volt /Shulman, M. és mtsi. 1978./.

Emberi B limfociták EBV-vel való transzformálásához a B95-8 EBV-termelő majom B-sejtvonal /Miller, G.-Lipman, M. 1973./ felülúszóját használtam.

A monoklonális ellenanyagok jellemzéséhez és funkcionális vizsgálatokhoz használt emberi eredetű sejtvonalak a következők:

- CEM : éretlen T-sejtes leukémia /T1⁺, T3⁻, T4⁻, T8⁻/, /Cathcart, M.K.-Murakami, M. 1983./
- 1A3-4 : egészséges T limfociták és HGPRT⁻ CEM sejtek hibridje /T1⁺, T3⁺, T4⁺, T8⁻/, /Andó, I. és mtsi. 1985/b./
- 1A-á-EBV : IL-2 függő, EBV-specifikus citotoxikus T-sejtvonal /Andó, I. és mtsi. 1986./
- 1A EBV : EBV-transzformált B-sejtvonal /Andó, I. és mtsi. 1986./
- P3HR1 : EBV⁺ Burkitt limfóma /Hinuma, J. és mtsi. 1967./
- Raji : EBV⁻ Burkitt limfóma /Pulvertaft, R.J.V. és mtsi. 1964./

U937 : myeloid leukémia /Sundstrom,E.-Nilsson,
K. 1974./

K562 : eritroleukémiás sejtvonal /Lozzio,C.B.-
Lozzio,B.B. 1975./

A felsorolt sejtvonalak kontroll ellenanyagokkal adott reakcióit az I. táblázat foglalja össze.

3.2.3. A sejttenyésztés körülményei

Valamennyi sejtet és sejtvonalat komplett RPMI tápfolyadékban, 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában, 95% nedvességtartalom mellett tenyésztettem /Hotpack CO₂ Incubator/. Az LA-á-EBV sejtvonal kivételével a sejtek nem igényeltek növekedési faktort a szaporodáshoz, és 1-2·10⁵ - 1-2·10⁶ sejtszám között nőttek optimálisan. Az LA-á-EBV sejtvonalat 1-2·10⁴/ml sejtszám mellett 1-2·10⁵/ml röntgen sugárral /2000R/ inaktivált LA EBV sejttel indukáltam, és a tápfolyadékhoz 2 U/ml IL-2 növekedési faktort adtam, ami Margaret Slusarenko /Amersham International PLC/ ajándéka volt.

3.3. Monoklonális ellenanyagok előállítás

5-5 hat hetes Balb/c egeret immunizáltam humán nyugvó, illetve PHA-val aktivált T limfocitával. /Az aktiválás leírása a 3.5.1. pontban./ 0,5 ml PBS- ben 2·10⁷ sejtet adtam intraperitoneálisan, 4 hetenként, 3 alkalommal. Az utolsó immunizálás utáni 3. napon 1-1 egér lépjét sterilien eltávolítottam és RPMI tápfolyadékban izoláltam belőlük a lépsejteket /2,5-3,0·10⁸ sejt/lép/.

| Ellenanyag Sejt-típus | UCHT 1 /T3/ | UCHT 4 /T8/ | 2A1 /HLA-A, B,C/ | JD2-C6 /HLA-DR/ | CC1-7 /Mo+ Grc/ | MA5-E1 /Mo/ |
|--------------------------|----------------|----------------|------------------------|--------------------|-----------------------|----------------|
| PM | 45 | 18 | 89 | 24 | 36 | 22 |
| nyugvó-T | 73 | 28 | -- | 5 | 6 | 12 |
| PHA-T | 81 | 39 | -- | 21 | -- | 13 |
| Con-A-T | 69 | 24 | -- | 9 | -- | 7 |
| B+Mo | 5 | 3 | -- | 31 | 32 | 30 |
| Mo | -- | -- | -- | -- | 81 | 80 |
| Grc | 7 | 3 | 86 | 0 | 93 | 0 |
| Timuszsejt | 29 | 95 | -- | 2 | 0 | 0 |
| CLL I. | 3 | 0 | 100 | 63 | 0 | 12 |
| CLL II. | 4 | 1 | -- | 53 | 5 | 46 |
| CGL | 25 | 10 | -- | 11 | 46 | 14 |
| CEM | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| IA3-4 | 100 | 0 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| IA EBV | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| P3HR1 | 0 | 0 | 72 | 0 | 0 | 0 |
| Raji | 0 | -- | 100 | 100 | 0 | 0 |
| U937 | 0 | -- | 69 | 56 | 40 | 19 |
| K562 | 0 | 0 | 36 | 0 | 0 | 0 |

I. táblázat: A szerológiai és funkcionális vizsgálatoknál használt sejtfrakciók és sejtvonalak jellemzése ismert specificitású monoklonális ellenanyagokkal. A megadott értékek a pozitív reakciót adó sejtek százalékos arányát jelentik, -- : nem vizsgáltam.

Háromszor mostam őket RPMI-vel, majd 2-3 : 1 arányban összekevertem őket Sp2/O-Ag14 myeloma sejtekkel. A lecentrifugált sejteket 1 ml 50%-os PEG₁₄₀₀ jelenlétében fúzionáltattam /1 perc, 37°C/. Fokozatosan 10 ml térfogatra hígítottam RPMI-vel, centrifugáltam /400·g, 5 perc/, és 60-60 ml komplett RPMI-ben felfuszpendálva 96 lyukú, lapos fenekű mikrotiter lemezekbe /Greiner/ szétosztottam a sejteket /100 µl/lyuk/. 20-24 óra inkubálás után 100 µl HAT tápfolyadékban 10⁴sejt/lyuk egér hasúri makrofágot adtam a tenyészetekhez. A továbbiakban két naponta a tápfolyadék felét leszívtam, és friss HAT tápfolyadékkal pótoltam. Két hét után fokozatosan átszoktattam a sejteket HT, majd komplett RPMI tápfolyadékra, és a további tenyésztést komplett RPMI-ben végeztem /Köhler,G.-Milstein,C. 1975. és Pontecorvo,G. 1976./.

A tesztelések eredménye alapján kiválasztott sejtvonalakat hígítási módszerrel klónoztam. 3, 1 és 0,3 sejt/lyuk sejtszámmal 96 lyukú, lapos fenekű mikrotiter lemezekre szétosztottam a sejteket. Másnaponta frissre cserélve a tápfolyadék felét két hétig tenyésztettem őket. Ismételt tesztelés után a kiválasztott klónokat felfuszaporítottam, majd 10% DMSO tartalmú komplett RPMI-ben lefagyasztottam, és -70, vagy -196°C-on tároltam őket.

3.4. Szerológiai vizsgálatok

3.4.1. Indirekt immunfluoreszcencia

A kísérleteket 0,1% NaN_3 /Sigma/ tartalmú komplett RPMI-ben, 96 lyukú U fenekű mikrotiter lemezen /Greiner/ végeztem. $10 \mu\text{l}$ térfogatban $5 \cdot 10^5$ sejtet tettem egy-egy lyukba és $50 \mu\text{l}$ megfelelően hígított ellenanyaggal inkubáltam /30 perc, olvadó jégen/. Négyyszer mostam a sejteket /150-150 μl -rel, centrifugálás 250.g, 1 perc/, majd fluoreszcein izotiocianáttal /FITC, Sigma/ konjugált nyúl-anti egér Ig-F/ab'/₂ ellenanyaggal /dr. Rajnavölgyi Éva készítménye/ inkubáltam őket /30 perc, olvadó jégen/. Ismét négyyszer mostam a sejteket, majd az eredményt fluoreszcens mikroszkóppal /Leitz, Dialux 20/ értékeltem. Negatív kontroll: első ellenanyagként az immunglobulint nem termelő Sp2/0-Ag14 myeloma sejtvonal felülúszóját, vagy megfelelően hígított ascitesét használtam.

3.4.2. Az ellenanyagok izotípusának meghatározása ELISA módszerrel

A meghatározáshoz Engvall, E. /1980./ módszerét alkalmaztam az alábbiak szerint. 96 lyukú mikroelisa lemezt /Greiner/ érzékenyítettem éjen át $5 \mu\text{g/ml}$ kötőpufferben hígított nyúl-anti egér Ig-F/ab'/₂ ellenanyaggal /100 μl /lyuk, $+4^\circ\text{C}$ /. Mostam a lemezt 3.3 percig mosópufferrel, majd a vizsgálandó hibridóma felülúszókkal 3 óráig 37°C -on inkubáltam. Ismételt mosás után torna peroxidázzal jelzett anti-egér IgG_1 , $-\text{IgG}_{2a}$, $-\text{IgG}_{2b}$, $-\text{IgG}_3$ és $-\text{IgM}$ izotípus-specifikus ellenanyagokkal, vala-

mint peroxidázzal jelzett Protein-A-val /Miles-Yeda/ inkubáltam /1 óra, 37°C/. Mosás után 0,3 mg/ml OPD-t és 0,005% H₂O₂-t tartalmazó szubsztrát pufferrel inkubáltam /30 perc, 37°C/, majd a színreakciót 4N H₂SO₄ oldattal állítottam le. Az extinkciót Titertek-Multiskan /Flow Laboratories/ készüléssel 492 nm-en mértem.

3.5. Funkcionális vizsgálatok

3.5.1. Transzformálás poliklonális mitogénekkal

A kísérletekhez frissen izolált, vagy mélyhűtve tárolt PM sejteket használtam 10⁶ sejt/ml sejtszám mellett. A komplett RPMI tápfolyadékot 4 µg/ml PHA-val /Difco/, 6 µg/ml Con-A-val /Pharmacia/, vagy 20 µl/ml PWM-nel /Gibco/ egészítettem ki. A tenyészeteket 72 óráig CO₂ termosztátban inkubáltam.

Immunizáláshoz és indirekt immunfluoreszcenciához a PHA-val indukált tenyészetekből a már leírt módon, rozetta képzéssel tisztítottam aktivált T limfocitákat.

Funkcionális vizsgálatok esetén az aktiválást 96 lyukú U fenekű mikrotiter lemezekben végeztem, 200 µl/lyuk térfogatban, a vizsgálandó ellenanyagok jelenlétében és nélküle. Az inkubáció utolsó 8-16 órájára 10 µl térfogatban 1 µCi/lyuk aktivitású H³-timidint /Prágai Izotópintézet/ adtam a tenyészetekhez. 72 órás korban a sejteket 12 csatornás sejt-leszívó készülékkel /házi készítésű/ Whatmann GFC filterre gyűjtöttem és desztillált vízzel mostam. A megszáritott korongokat szcintillációs folyadékba tettem, és a sejtekbe beépült H³ ak-

tivitását szcintillációs számlálóval /Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer/ mértem. A kísérleteket 3-5 párhuzamos mérés átlaga alapján értékeltem.

3.5.2. Kevert limfocita kultúra

A kísérleteket Hildreth, J.K. és August, J.T. /1985./ leírása alapján az alábbiak szerint végeztem. Két véletlenszerűen kiválasztott donor frissen izolált PM sejteket használtam. Mindkét sejttípusból készítettem $5 \cdot 10^6$ sejt/ml-es szuszpenziót, amit $100 \mu\text{g/ml}$ végkoncentrációban Mitomicin-C-vel /Sigma/ kezeltem 37°C -on 1 óráig / I_M és V_M sejtek/. Az így nyert I_M indukáló sejteket használtam a kezeletlen V /válaszolók/ sejtek aktiválására. A V sejteket $1 \cdot 10^5$ /lyuk/ 96 lyukú U fenekű lemezre osztottam szét $50-50 \mu\text{l}$ térfogatban, majd 30 percig szobahőn előinkubáltam $50 \mu\text{l}$ hígított ellenanyaggal. Az $1 \cdot 10^5$ /lyuk I_M sejtet $100 \mu\text{l}$ térfogatban ezután adtam a rendszerhez. Tápfolyadéként 10% hőkezelt, normál humán AB szérummal kiegészített komplett RPMI-t használtam. Kontroll: $V+I_M$ ellenanyaghatás nélkül, $V+V_M$, V_M+I_M és V +tápfolyadék kombinációk. A tenyészeteket 5 napig CO_2 termosztátban inkubáltam, majd 24 órára $1 \mu\text{Ci/lyuk}$ aktivitású H^3 -timidint adtam $10-10 \mu\text{l}$ térfogatban. A 6. nap végén a 3.5.1. pontban leírtak szerint mértem a H^3 -timidin-beépülés mértékét. Az értékelésnél a különböző $V+I_M$ kombinációkra kapott beütésszámból levontam a V +tápfolyadék esetén mérhető "hátteret", és az ellenanyaghatás nélkül mérhető beépülést 100%-nak véve a gátlást a 36. oldalon látható képlettel fejeztem ki.

3.5.3. Citotoxikus aktivitás meghatározása

Sejtek lízisével együttjáró limfocita funkciókat /NK- és CTL-aktivitás/ a nátrium-kromáttal / $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, MTA Izotópintézet, Budapest/ jelzett célsejtekből kiszabaduló ^{51}Cr aktivitásának mérésével lehet nyomonkövetni.

NK-aktivitás mérésére frissen izolált, vagy mélyhűtve tárolt PM sejteket /effektor/ és NK-érzékeny K562 célsejteket használtam Hall, R.E. /1985./ leírása szerint. A K562 sejteket $2 \cdot 10^7$ /ml sejtszám mellett $100 \mu\text{Ci}$ aktivitású $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -tal jelöltem 2-4 órán át / CO_2 termosztátban/, majd hatszor mostam RPMI-vel. Az effektor : célsejt arány 25 : 1 vagy 50 : 1 volt. Az effektor sejteket / $0,5-1 \cdot 10^6$ /lyuk, $50 \mu\text{l}$ térfogatban/ 1 óráig előinkubáltam a vizsgálandó ellenanyagok /illetve tápfolyadék, mint pozitív kontroll/ $100 \mu\text{l}$ -ével, s a célsejteket csak ezután adtam a rendszerhez / $2 \cdot 10^4$ sejt $50 \mu\text{l}$ -ben/. A lemezeket 4-16 óráig CO_2 termosztátban inkubáltam, majd a felülúszó $100 \mu\text{l}$ -ének γ -sugárzását mértem /NZ-138 Shielded Counter, Gamma Művek, Budapest/. A spontán ^{51}Cr -felszabadulás megállapítására a jelölt célsejteket effektor sejtek nélkül, komplett RPMI-ben, a teljes felvett aktivitás megállapítására pedig 1% SDS-ben inkubáltam. Az effektor sejtek lítikus aktivitásának tulajdonítható specifikus ^{51}Cr -felszabadulást az alábbi képlettel számoltam:

$$\% \text{spec.felszab.} = \frac{\text{cpm}_{\text{minta}} - \text{cpm}_{\text{spontán}}}{\text{cpm}_{\text{teljes}} - \text{cpm}_{\text{spontán}}} \cdot 100$$

CTL-aktivitás mérésére az LA-á-EBV citotoxikus T

sejtvonalat, és 1A EBV célsejteket használtam. A módszer az előzővel majdnem azonos, csak itt az effektor : célsejt arány 15 : 1 volt, és csak 6 óráig inkubáltam a tenyészeteket. A sejtvonal NK-aktivitásának ellenőrzésére jelölt K562 sejteket használtam, szintén 15 : 1 effektor : célsejt arány mellett. A CTL- és NK-specifikus ^{51}Cr -felszabadulást a fenti képlettel számoltam.

3.5.4. Transzformálás Epstein-Barr vírussal

A B95-8 sejtvonal /EBV-transzformált majom B limfociták/ sterilre szűrt felülúszója nagy számú, transzformáló vírusrészecskét tartalmaz. Frissen izolált, vagy mélyhűtött PM sejteket $/1 \cdot 10^7/$ 2 ml steril B95-8 felülúszóban szuszpendáltam fel, és két óráig CO_2 termosztátban inkubáltam. Centrifugálás után komplett RPMI-ben a sejteket U fenekű mikrotiter lemezen $150 \mu\text{l}$ -ként $/1 \cdot 10^5$ sejt/lyuk/ szétosztottam, és $50\text{-}50 \mu\text{l}$ megfelelően hígított ellenanyagot, vagy komplett RPMI-t adtam hozzá. A tenyészeteket 5 napig CO_2 termosztátban inkubáltam, majd 8 órára $1 \mu\text{Ci/lyuk}$ aktivitású H^3 -timidint adtam hozzá. A H^3 -beépülés mértékét a mitogénekkal történő aktiválásnál leírt módon /3.5.1. pont/ mértem.

3.5.5. Az ellenanyagok funkciót módosító hatásának kiszámítása

A legtöbb kísérletben a vizsgált ellenanyagok vagy hatástalanok voltak, vagy negatív irányba módosították az eredményeket, azaz gátolták a vizsgált limfocita

funkciót. Ezekben az esetekben a gátlás mértékét százalékosan, az alábbi képlettel fejeztem ki:

$$\%gátlás = \frac{n-m}{n} \cdot 100 ,$$

ahol n az ellenanyaghatás nélkül /komplett RPMI, vagy limfocitákkal nem reagáló kontroll ellenanyag jelenlétében/ mérhető érték, m pedig ugyanez az adott ellenanyag jelenlétében /Gromkowski, S.H. és mtsi. 1985./. A mérhető érték H^3 -timidin beépülés esetén a szcintillációs számláló által mért beütésszámot, NK és CTL aktivitás mérése esetén a specifikus ^{51}Cr -felszabadulás %-os értékét jelenti.

A poliklonális mitogénekkal végzett kísérletekben egyes ellenanyagok nem gátló, hanem aktiváló hatásának bizonyultak, azaz m értéke n értékét meghaladta. Hogy ne kelljen negatív előjelű gátlásról beszélni, ezekben az esetekben az ellenanyag módosító hatását a

$$\%aktiválás = \frac{m}{n} \cdot 100$$

képlettel számítottam, ahol m az ellenanyag jelenlétében, n pedig a nélküle mérhető beütésszámot / H^3 -beépülés mértékét/ jelenti.

4. Eredmények

4.1. Monoklonális ellenanyagok előállítás

A nyugvó, illetve a PHA-val indukált humán T limfocitákkal immunizált egerek lépsejtjeit Sp2/O-Ag14 myeloma sejtekkel fuzionálva, a két /TM illetve ITM/ fúzióból összesen 760 hibrid kolóniát sikerült felnevelni. A kolóniák felülúszóját indirekt immunfluoreszcenciával nyugvó, illetve PHA-val indukált T-sejteken teszteltem. Az első tesztek során 227 felülúszó adott pozitív reakciót. Ezek közül 118 sejtvonalat szaporítottam fel 5-5 ml térfogatig. A sejteket lefagyasztottam /10% DMSO tartalmú komplett RPMI-ben/, felülúszójukat pedig további vizsgálatokra használtam.

A 118 felülúszót teszteltem perifériás vér különböző sejtfrakcióin /PM sejtek, nyugvó és PHA-val indukált T limfociták, B limfociták + monociták frakciója/, valamint jól jellemzett humán eredetű sejtvonalakon /K562, 1A EBV, 1A3-4/. Ezen vizsgálatok eredményeit nagy terjedelmük miatt nem mellékelem, de ezek értékelése alapján választottam ki a további kísérletekben használt hibridómákat. Mivel sokféle sejten és sejtvonalon, illetve sokféle funkcionális tesztben kívántam az ellenanyagok reakcióit tesztelni, igyekeztem a kiválasztott ellenanyagokkal minél szélesebb területet átfogni. Választottam T-sejt, illetve T-alpopuláció specifikusnak tűnő, T és B limfocitákkal egyaránt reagáló, monocita specifikusnak ígérkező és minden vizs-

gált sejttel reagáló ellenanyagokat.

A kiválasztott sejtvonalakat felolvasztottam és hígítással módszerrel klónoztam. A klónok felülűszóját indirekt immunfluoreszcenciával egy olyan sejtvonalon, vagy perifériás vérből szeparált sejt-frakción teszteltem, amellyel az eredeti felülűszó jól reagált. A pozitív reakciót adó klónok közül sejtvonalanként ötöt 10 ml térfogatig felszaporítottam, majd a sejteket lefagyasztottam, és folyékony nitrogénben tároltam.

A kísérletekben két korábbi fúzióból származó monoklonális ellenanyagot is használtam, amelyeket dr. Monostori Éva bocsájtott a rendelkezésemre. A CC5-ID7 hibridóma egy krónikus limfoid leukémiás beteg CLL sejtjével, a T2/53-4 klón pedig emberi timusz sejtekkel történő immunizálásból származik. A fúziós partner ezeknél is az Sp2/O-Ag14 myeloma sejtvonal volt.

A hibridómák egy-egy kiválasztott klónjával in vitro sejttenyészetben, illetve egérbe injektálva termeltem ellenanyagot. A tenyészetek felülűszóját sterilre szűrve, tartósítószer nélkül, vagy 0,1% NaN_3 hozzáadásával $+4^\circ\text{C}$ -on tároltam. Az egerek hasüregéből leszívott ascites folyadékot 0,2-1,0 ml-ként eppendorf csövekbe szétosztva -20°C -on tároltam, és felolvasztás után hígítottam az adott kísérlethez szükséges mértékben. Valamennyi felülűszó és ascites ellenanyag tartalmát indirekt immunfluoreszcenciával, PM sejteken ellenőriztem. Az ascitesek 100-szoros hígításban, a felülűszók hígítatlanul kivétel nélkül pozitív reakciót adtak.

4.2. Az ellenanyagok izotípusa és Protein-A kötése

Az izotípust és Protein-A kötő képességet ELISA-val határoztam meg. A vizsgált tíz ellenanyag közül kilenc IgG₁ izotípusú, egyedül az ITM3-2 sejtvonal termel IgG_{2b} típusú immunglobulint. Ez, és az ITM12-1/1 sejtvonal IgG₁ ellenanyaga kötik a Protein-A-t, a többi nem. Az eredményeket a IV. táblázatban is feltüntettem.

4.3. A szerológiai vizsgálatok eredményei

4.3.1. Vizsgálatok egészséges donorok perifériás véréből izolált sejtfrakciókon, és timusz sejteken

Valamennyi szerológiai vizsgálatot indirekt immunfluoreszcenciával végeztem az anyag és módszer fejezetben jellemzett sejtfrakciókon. Izolált monocitákon, vörösvértesteken és timusz sejteken egy-egy vizsgálatot végeztem, az összes többi sejtfrakción a reakciót több alkalommal, különböző donorok sejtjein is megismételtem. Az eredményeket a II. táblázatban foglaltam össze. Amely sejttípusnál több meghatározást végeztem, ott a táblázatban közölt érték a kapott eredmények átlagát jelenti. Minden vizsgálatnál ismert specifitású kontroll ellenanyagokkal jellemeztem a sejtfrakció összetételét, ezek az eredmények a 29. oldalon, az I. táblázatban láthatók.

4.3.2. Vizsgálatok leukémiás betegek véréből izolált sejteken

Az ellenanyagok reakcióját három leukémiás beteg-

| Ellen- anyagok \ Sejtek | PM | nyugvó T | PHA-val akt.T | Con-A-val akt.T | B+Mo | Mo | Grc [*] | Timusz | vvt |
|----------------------------|----|-------------|------------------|--------------------|------|----|------------------|--------|-----|
| ITM3-2 | 48 | 79 | 77 | 100 | 41 | 59 | 5+91 | 100 | 0 |
| TMD3-1 | 58 | 88 | 90 | 83 | 51 | 56 | 5+90 | 100 | 0 |
| CC5-ID7 | 45 | 52 | -- | -- | 41 | 72 | 56 | 93 | 0 |
| TM4-1 | 42 | 73 | 77 | 43 | 3 | 2 | 4+90 | 43 | 0 |
| ITM12-1/1 | 34 | 74 | 70 | 74 | 9 | 4 | 3+90 | 71 | 0 |
| ITM8-1 | 19 | 28 | 33 | 26 | 11 | 1 | 3 | 94 | 0 |
| TMG6-5 | 27 | 20 | 5 | 1 | 57 | 80 | 96 | 1 | 0 |
| TMT-1 | 83 | 91 | 97 | 100 | 85 | 96 | 94 | 100 | 0 |
| TMB6-5 | 65 | 91 | 95 | 98 | 68 | 88 | 84 | 100 | 0 |
| T2/53-4 | 55 | 58 | -- | -- | 43 | 93 | 95 | 83 | 0 |

II. táblázat: Az ellenanyagok reakciója egészséges donorok perifériás véréből izolált sejtfrakciókon. A feltüntetett értékek a pozitív reakciót adó sejtek %-os arányát jelentik.

* granulociták esetén négy ellenanyaggal a sejtek egy kis része /3-5%/ erős membránfluoreszcenciát adott, de ezen kívül nagyon halványan a sejtek többsége /90-91%/ is fluoreszkált

től származó vérmintán teszteltem. A CLL I. sejtek atól a krónikus leukémiás betegtől származtak, akinek a sejtjeit a T2/53-4 hibridóma előállításánál az immunizálásához használták. -70°C -on tárolt sejtjein több alkalommal megismételtem a vizsgálatot, így a táblázatban közölt értékek több eredmény átlagát jelentik. A CLL II. és a CGL /krónikus granuloid leukémia/ sejtjeit frissen izoláltam a betegek perifériás véréből, és csak egy-egy kísérletet végeztem velük. Az eredményeket a III. táblázat tartalmazza.

| Ellen- anyagok \ Sejtek | CLL I. | CLL II. | CGL |
|----------------------------|--------|---------|-----|
| ITM3-2 | 95 | 4 | -- |
| TMD3-1 | 83 | 5 | 32 |
| CC5-ID7 | 80 | 5 | 45 |
| TM4-1 | 91 | 2 | 5 |
| ITM12-1/1 | 54 | 4 | 16 |
| ITM8-1 | 1 | 1 | 15 |
| TMG6-5 | 1 | 5 | 59 |
| TMT-1 | 88 | 59 | 45 |
| TMB6-5 | 100 | 100 | 31 |
| T2/53-4 | 20 | 10 | 67 |

III. táblázat: Az ellenanyagok reakciója leukémiás betegek véréből izolált sejteken. A feltüntetett értékek az indirekt immunfluoreszcenciával pozitív reakciót adó sejtek %-os arányát jelentik.

-- : nem vizsgáltam

| Ellen- anyagok | Sejt- vonal | CEM | 1A3-4 | 1A EBV | Raji | P3HR1 | U937 | K562 | | | izotípus | PrA |
|-------------------|----------------|-----|-------|--------|------|-------|------|------|--|--|-------------------|-----|
| ITM3-2 | | 0 | 100 | 68 | 0 | 81 | 28 | 0 | | | IgG _{2b} | + |
| TMD3-1 | | 0 | 100 | 69 | 0 | 76 | 46 | 0 | | | IgG ₁ | - |
| CC5-ID7 | | 0 | 94 | 97 | 0 | 84 | 70 | 0 | | | IgG ₁ | - |
| TM4-1 | | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | IgG ₁ | - |
| ITM12-1/1 | | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | IgG ₁ | + |
| ITM8-1 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | IgG ₁ | - |
| TMG6-5 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 77 | 0 | | | IgG ₁ | - |
| TMT-1 | | 100 | 100 | 94 | 93 | 74 | 66 | 95 | | | IgG ₁ | - |
| TMB6-5 | | 100 | 100 | 100 | 94 | 74 | 70 | 0 | | | IgG ₁ | - |
| T2/53-4 | | 100 | 97 | 94 | 79 | 0 | 54 | 100 | | | IgG ₁ | - |

IV. táblázat: Az ellenanyagok reakciója humán sejtvonalakon. A feltüntetett értékek az indirekt immunfluoreszcenciával pozitív reakciót adó sejtek %-os arányát jelentik. Feltüntettem továbbá az ellenanyagok izotípusát és Protein-A kötő képességét.

4.3.3. Vizsgálatok humán sejtvonalakon

Megvizsgáltam az ellenanyagok reakcióját humán T és B limfocita eredetű, valamint myeloid és eritroid sejtvonalakon. A kísérletet minden sejtvonalon legalább kétszer megismételtem. Az eredményeket a IV. táblázatban foglaltam össze. A sejtvonalak jellemzése, és kontroll ellenanyagokkal adott reakciói a 3.2.2. pontban található.

4.4. A funkcionális vizsgálatok eredményei

4.4.1. A természetes ölő sejtek hatásának gátlása

A tesztet hat alkalommal, különböző donorok PM sejtjein végeztem el. Egy alkalommal 200-szoros véghígítású ascitest, kétszer 4-szeres hígítású, háromszor pedig hígítatlan, Na-azid mentes felülúszót használtam, 3-3 párhuzamos minta alkalmazásával. A párhuzamosok szórása nem haladta meg az átlagérték 10%-át. Gátlásként értékeltem, ha az ellenanyag hatására a specifikus ^{51}Cr -felszabadulás átlagosan 25%-nál nagyobb mértékben csökkent /képlet a 33. oldalon/. Pozitív kontrollként az LFA-1 antigén β -láncára specifikus MHM.23 ellenanyagot használtam /Hildreth, J.E.K.-August, J. 1985./, amely átlagosan 49% gátlást eredményezett. Negatív kontrollként a limfocitákkal nem reagáló 27kd7 monoklonális ellenanyagot használtam.

A kísérletek eredményei azt mutatják, hogy hat ellenanyag /CC5-ID7, TM4-1, ITM12-1/1, ITM8-1, TMT-1 és T2/53-4/ nincs hatással a természetes ölő sejtek ak-

tivitására. Egy ellenanyag, az ITM3-2 jelentősen, átlagosan 61%-kal gátolta a célsejtek lízisét, három ellenanyag pedig gyengébben /TMD3-1 29%-kal, TMG6-5 38%-kal, TMB6-5 30%-kal/ gátolta a ^{51}Cr -felszabadulást. Az eredményeket az V.táblázat foglalja össze. A hatástalan ellenanyagokra vonatkozó értékeket zárójelbe tettem.

4.4.2. A citotoxikus T limfociták /CTL/ működésének gátlása

A tesztet két alkalommal, 200-szoros véghígítású ascitessel, 3-3 párhuzamosban végeztem. A szórás az átlagérték 10%-a alatt maradt. Kontrollként a T8 antigénre specifikus UCHT4 [=CD 8/ ellenanyagot használtam, amelynek CTL gátló hatását Andó és munkatársai /1985./, valamint Clayberger és munkacsoportja /1985./ írták le. Kísérleteimben az UCHT4 átlagosan 63%-kal gátolta az LA EBV célsejtek lízisét. A vizsgált 10 ellenanyag közül három ennél erősebben /CG5-ID7 71%-kal, ITM8-1 82%-kal, TMB6-5 83%-kal/, kettő közepesen /ITM3-2 és TMD3-1 47-47%-kal/, egy pedig gyengén /T2/53-4 28%-kal/ gátolta a citotoxikus LA-á-EBV sejtek lítikus aktivitását. Négy ellenanyag hatása /TM4-1, ITM12-1/1, TMG6-5, TMT-1/ 25% alatt maradt. Az NK aktivitás 1-3% között volt, tehát az eredményeket nem befolyásolta. Az eredményeket az V. táblázatban tüntettem fel.

4.4.3. Az ellenanyagok hatása kevert limfocita kultúrában /MLC/

A kevert limfocita reakciót háromszor, véletlensze-

rúen kiválasztott donorok PM sejtjeivel végeztem. Két alkalommal a Mitomicin-C-vel inaktivált stimulátor sejtek nagyfokú sejtosztódást eredményeztek, harmadik alkalommal azonban alig történt sejt-aktiválás, feltehetően a két donor hasonló HLA típusa miatt. Ennek a kísérletnek az eredményét ezért nem vettem figyelembe.

A MLC kísérleteknél, és a többi H^3 -timidin beépülés mérésén alapuló kísérletnél is, 4-4 párhuzamossal dolgoztam. Ennek ellenére a szórás - különösen alacsony beütésszámok esetén - néha az átlagérték 15-20%-át is elérte, és csak ritkán volt 10% alatt. Ezért ezeknél a kísérleteknél csak a 100%-tól \pm 30%-kal való eltérést értékeltem aktiválásként, illetve gátlásként.

A két értékelhető MLC kísérlet eredményei alapján öt ellenanyag /TM4-1, ITM12-1/1, ITM8-1, TMG6-5, T2/53-4/ hatástalannak látszik. Az ITM3-2 ellenanyag közepesen /52%-kal/, a TMD3-1, CC5-ID7, TMT-1 és TMB6-5 ellenanyagok jelentősen /rendre 67, 72, 72 illetve 79%-kal/ gátolják a kevert limfocita reakcióban résztvevő sejtek aktiválódását. Az eredményeket a negatív kontrollhoz /27kd7 ellenanyag/ viszonyítottam, amely nem gátolta a reakciót. Az eredményeket az V. táblázat tartalmazza.

4.4.4. Az ellenanyagok mitogén hatásának tesztelése

Az ellenanyagok mitogén hatását három különböző koncentrációban, négy különböző donor PM sejtjein vizsgáltam. Az alkalmazott ellenanyag koncentrációk az ascitesek $2 \cdot 10^2$, $3 \cdot 10^5$ és $1 \cdot 10^6$ -szoros hígításai voltak, ami az ascitesek átlagos immunglobulin tartalmát figyelembe véve kb. 25 $\mu\text{g/ml}$, 15 ng/ml és 5 ng/ml Ig koncentráció-

nak felel meg. Pozitív kontrollként a T3 antigént felismerő UCHT1 ellenanyagot használtam, ami az irodalom szerint már 1 ng/ml koncentrációban is mitogén hatású /Chang, T.W. et al. 1981./. Pozitív kontrollként használtam továbbá a fitohemagglutinin /PHA/, 4 µg/ml koncentrációban. A PHA mind a négy kísérletben nagyfokú ³H-timidin beépülést eredményezett /a komplett RPMI-ben inkubált sejteknél mérhető beépülés 20-30-szorosát/, míg az UCHT1 ellenanyag a négy közül egy donornál nem okozott sejtosztódást. Ennek oka, hogy az egészséges donorok kb. 30%-a úgynevezett "nonresponder", azaz válaszára képtelen az IgG₁ izotípusú UCHT1 ellenanyag mitogén hatásával szemben /Tax, W.J.M. et al. 1983./. A "responder" típusú donorok esetében az UCHT1 ellenanyag hatására a komplett RPMI-hez képest 5-8-szorosára nőtt a ³H-beépülés.

A négy kísérlet eredményeként megállapítható, hogy a vizsgált 10 monoklonális ellenanyag egyike sem mitogén hatású, egyik alkalmazott koncentrációban sem, és függetlenül attól, hogy a donor "responder", vagy "nonresponder" típusú volt.

4.4.5. Növényi lektinek mitogén hatásának módosítása

A kísérletekhez háromféle növényi lektint használtam. A fitohemagglutinin főleg a segítő T limfociták osztódását indukálja, a Concanavalin-A általános T-sejt aktivátor, míg a Pokeweed-mitogén egyaránt hat T és B limfocitákra. A PHA a T-sejtek antigén receptorához /Ti/ és/vagy a T11 antigénhez kötődik, mint azt két egyidőben

megjelent közleményben leírták /Kanellopoulos, J.M. et al. 1985. és O'Flynn, K. et al. 1985./. Hatása a Leu5 jelű, T11 antigénnel reagáló ellenanyaggal gátolható. Ezt használtam a kísérletekben pozitív kontrollként; átlagosan 59%-kal gátolta a PHA sejtaktiváló hatását. A Con-A receptorául a T3 antigént írták le /Kanellopoulos, J.M. et al. 1985./, és hatása T3-mal reagáló monoklonális ellenanyagok Fab fragmentjével gátolható. /Az intakt ellenanyag maga is mitogén hatású lenne./ Ilyen kontrollt a Con-A-val végzett kísérletekben nem használtam. A PWM receptorára, vagy hatásának gátlására vonatkozóan nem találtam irodalmi utalást, így a kísérleteket szintén pozitív kontroll nélkül végeztem.

A kísérletek meglepő eredményeket hoztak, mivel a 10 ellenanyag között mindössze 1 volt, amely semmilyen irányba nem módosította e három mitogén ágens hatását. Ez az ellenanyag a TMG6-5. A többiek egy, kettő, vagy mindhárom lektin hatását befolyásolták.

PWM-nel két kísérletet végeztem, ugyanannak a donornak -70°C -ra lefagyasztott PM sejtjeivel. A két kísérlet azt mutatta, hogy 5 ellenanyag gátolja a PWM hatását /ITM3-2 86%-kal, TMD3-1 83%-kal, CC5-ID7 60%-kal, TM4-1 54%-kal, TMB6-5 38%-kal/. Két ellenanyag, jóllehet magában egyik sem mitogén hatású, fokozta a ^3H -timidin beépülést. A negatív kontrollhoz viszonyítva az ITM8-1 átlagosan 153%-ra, a T2/53-4 pedig 140%-ra emelte a PWM aktiváló hatását. Három ellenanyagnál sem gátló, sem fokozó hatást nem tapasztaltam /ITM12-1/1, TMG6-5, TMT-1/.

Con-A-val három különböző donor PM sejtjein, összesen öt alkalommal ismételt meg a kísérletet. Az ellenanyagokat mindig 200-szoros ascites véghígításban használtam. A kísérletek 7 ellenanyag hatására nézve adtak következetes eredményt. A már korábban említett, másol sem hatásos TMB6-5 ellenanyagon kívül itt a TMT-1 is hatástalannak bizonyult. Az ITM3-2, a TMD3-1 és CC5-ID7 erősen /rendre 93, 89 illetve 87%-kal/, a TMB6-5 közepesen /58%-kal/ gátolta a Con-A hatását. Ezzel szemben az ITM12-1/1 jelentős mértékben /átlagosan 247%-ra/ emelte a sejtek ^3H -timidin felvételét, noha magában nem volt mitogén hatású. A még nem tárgyalt három ellenanyagra nézve az eredmények nem következetesek. A TM4-1 ellenanyag két donornál 200 illetve 275%-ra /átlag 238%-ra/ emelte a beépült izotóp mennyiségét, a harmadik donorral végzett három kísérletben viszont átlagosan csak 110%-ra emelte, amit nem tekintek a hatás fokozásának. Az ITM8-1 pont fordítva, az első két donornál hatástalan volt /11 illetve 12% gátlás/, míg a harmadik donornál 241-251%-ra /átlagosan 244%/ emelte a ^3H -timidin beépülést. A T2/53-4 az első donornál aktivátorként működött /223%/, a második donornál hatástalan volt /5% gátlás/, a harmadik donor esetében ismét 201-243%-ra /átlagosan 224%-ra/ emelte a Con-A hatását. Ezek az ellentmondások valószínűleg valamilyen, a donorok között lévő különbséggel magyarázhatók, de ennek felderítéséhez további kísérletek szükségesek.

A PHA-val végzett kísérleteket mindig Con-A-val párhuzamosan, azzal teljesen megegyező körülmények kö-

zött végeztem. Az ellenanyagok hatása is sok esetben megegyezik, vagy hasonlít a Con-A-nál tapasztalthoz. Hatástalannak itt is két ellenanyag bizonyult: a TMG6-5 és a T2/53-4. A Con-A esetében hatástalan TMT-1 a PHA hatását 51%-kal gátolta. Gátolt továbbá az ITM3-2, TMD3-1 és TMB6-5 /rendre 42, 37 illetve 38%-kal/. A CC5-ID7 29%-os gátlása kívül esik ugyan a meghúzott 30%-os határon, összes többi reakciója alapján azonban valószínűsíthető, hogy szintén gátló hatású. Az ITM12-1/1 itt is következetesen fokozta a mitogén hatást, átlagosan 169%-kal. A TM4-1 és ITM8-1 is majdnem ugyanúgy viselkedett. A TM4-1 ellenanyag az első két donor esetén fokozta a hatást /150%/, a harmadik donor sejtjeinek aktiválását azonban nem befolyásolta /95-125%/. Az ITM8-1 ellenanyag az első két donornál enyhén gátolta a ³H-timidin beépülését /37%-kal/, a harmadik donor sejtjeivel végzett kísérletekben viszont 140%-ra emelte azt. A Con-A-hoz hasonlóan az eltérések valószínűleg a donorok közötti különbségekkel magyarázhatók.

A növényi lektinokkal végzett kísérletek eredményeit is az V. táblázat foglalja össze.

4.4.6. Epstein-Barr vírus okozta blasztosodás gátlása

Minden humán B limfocita rendelkezik EBV-receptorral, a vírus kötődése mégsem jelenti minden sejt transzformációját. Csak a kicsi, nyugvó állapotban lévő B sejtek, sőt azoknak is csak mintegy 20%-a érzékeny a vírus transzformáló hatására. Az érzékenységet befolyásoló faktorok, és a sejtosztódás indukciójának pontos mecha-

| Funkció Ellen- anyagok | NK | CTL | MLC | PWM | | Con-A | | PHA | |
|------------------------------|------|------|-------|-------|----|--------------------------------------|----|--------------------------------------|------|
| | | | | + | - | + | - | + | - |
| ITM3-2 | 61 | 47 | 52 | | 86 | | 93 | | 42 |
| TMD3-1 | 29 | 47 | 67 | | 83 | | 89 | | 37 |
| CC5-ID7 | /14/ | 71 | 72 | | 60 | | 87 | | /29/ |
| TM4-1 | /17/ | /20/ | /-16/ | | 54 | 238/1-2./; 110/3./ donortól függő | | 150/1-2./; 112/3./ donortól függő | |
| ITM12-1/1 | /14/ | /20/ | /2/ | /-17/ | | 247 | | 169 | |
| ITM8-1 | /-1/ | 82 | /-20/ | 153 | | 244/3./; 11/1-2./ donortól függő | | 140/3./; 37/1-2./ donortól függő | |
| TMG6-5 | 38 | /11/ | /5/ | /4/ | | /-6/ | | /23/ | |
| TMT-1 | /24/ | /11/ | 72 | /-22/ | | /-5/ | | | 51 |
| TMB6-5 | 30 | 83 | 79 | | 38 | | 58 | | 38 |
| T2/53-4 | /21/ | 28 | /13/ | 140 | | 224/1,3./; 5/2./ donortól függő | | /-16/ | |

V.táblázat; Az ellenanyagok hatása egyes limfocita funkciókra.

nizmusa még nem ismert /Aman, P. et al. 1985., Fingeroth, J.D. et al. 1984./. A folyamatban a vírus kötéséért felelős, és aktivált B-sejtekről eltűnő B2 (=CR2) antigéneken kívül más sejtfelszíni fehérjék is szerepet játszhatnak. Ezért megvizsgáltam, hogy az ellenanyagoknak van-e valamilyen hatásuk az EBV-okozta sejt-aktiválódásra.

A kísérletet háromszor ismételttem, 200-szoros ascites véghígítást, és ugyanazon donor frissen izolált, illetve -70°C -on tárolt PM sejtjeit használva. A negatív kontrollhoz /27kd7/ viszonyítva egyetlen ellenanyag hatására sem volt átlagosan 25%-nál nagyobb eltérés, tehát a vizsgált monoklonális ellenanyagok nem befolyásolják a B limfociták EBV-okozta aktiválódását.

5. Diszkusszió

A fenti eredményekből kitűnik, hogy a vizsgált ellenanyagok az emberi fehérvérsejtek különböző csoportjaiban előforduló, és különböző funkcióval rendelkező antigénekkal reagálnak. Az eredmények részletes elemzése, értékelése a hasonló reakciókat mutató ellenanyagok csoportosításával célszerű.

Az ITM3-2, TMD3-1 és CC5-ID7 ellenanyagok mind a szerológiai eredményeket, mind a funkcionális vizsgálatok eredményeit tekintve nagyon hasonlóak. Az általuk felismert antigén timuszsejteken /93-100%/, T limfocitákon /52-88%/, B limfocita+monocita frakció sejtjein /41-51%/, tisztított monocitákon /56-72%/ és granulocitákon egyaránt előfordul. Granulociták esetén a sejteknek csak 5%-án tapasztalható erős membránfluoreszcencia, de nagyon halványan a többi sejt /90%/ is reagál. /A fluoreszcencia intenzitása a többi sejtfrakció esetén is heterogén volt, de nem volt ilyen éles különbség, mint granulocitáknál./ A három ellenanyag a két limfoid leukémia közül csak az egyikkel reagált magas százalékos arányban /CLL I. 80-95%/, a granuloid leukémiás beteg sejtjeinek pedig 32-45%-ával adott reakciót. A sejtvonalakkal végzett vizsgálatok eredményei is igazolják, hogy T limfociták /IA3-4/, B limfociták /IA EBV, P3HR1/ és myeloid sejtek /U937/ egyaránt hordozzák az antigént. Nem reagált az ellenanyagokkal a CEM /T-sejt eredetű/, a Raji /B-sejt eredetű/ és a K562 /eretroid/ sejtvonal. A

funkcionális vizsgálatok eredményei szerint ezek az ellenanyagok minden vizsgált limfocita funkciót gátolnak. Eltérést csak a CC5-ID7 ellenanyag mutatott az NK aktivitás és a PHA-val történő T-sejt aktiválás tesztelésénél: nem gátolta 25 illetve 30%-nál nagyobb mértékben a reakciót /14 illetve 29% gátlás/. A gátlás mértékében természetesen a többi tesztenél, és a másik két ellenanyag között is mutatkoznak eltérések, ennek ellenére az összes eredményt figyelembe véve valószínűsíthető, hogy a három ellenanyag ugyanahhoz a sejtfelszíni fehérjéhez kötődik. Ezt a feltevést alátámasztja, hogy a három ellenanyag timuszsejtek lizátumával végzett immunoblotting kísérletekben nagyon hasonló molekulatömegű fehérjékhez kötődött /dr.Monostori Éva szóbeli közlése/. Az antigén molekulatömege ITM3-2 esetén 170 és 172 kd-nak, TMD3-1 esetén 162 és 170 kd-nak, CC5-ID7 esetén 170 és 177 kd-nak adódott; mindhárom esetben két-két csíkot jelöltek az ellenanyagok.

Az antigén megoszlása a különböző sejtpopulációkon, a vizsgált limfocita funkciók gátlása és az antigén molekulatömegére vonatkozó eredmények nagyon hasonlóak az irodalomból jól ismert LFA-1 antigénről leírt eredményekhez. Mint arról a 14. oldalon már szó esett, ez a két alegységből felépülő molekula szerepet játszik a kevert limfocita kultúrában, illetve növényi mitogének hatására létrejövő sejtaktiválódásban, valamint az NK és CTL sejtek működésében. Az α és β láncsal, illetve ezek különböző epitópjaival reagáló ellenanyagok hatása az említett funkciókra különböző mértékű /Gromkowski, S.H.

et al. 1985./, koncentráció függő /Sanchez-Madrid, F. et al. 1982./, illetve egyes α -láncsal reagáló ellenanyagoknak az NK aktivitásra nincs gátló hatásuk /Hidreth, J. C.-August, T. 1985./. A szerológiai vizsgálatok eredményét összevetve az LFA-1 antigénre vonatkozó irodalmi adatokkal, a legtöbb esetben azonosság tapasztalható: T és B limfocitákon, monocitákon és timuszsejteken egyaránt kimutatták az LFA-1 antigént, vörösvértesteken azonban nem fordul elő. A szerzők nem közölnek ugyan %-os adatokat az antigén előfordulásának gyakoriságára, mégis az általam mért 45-58% kevésnek tűnik perifériás mononukleáris sejtek frakciójában egy minden fehérvérsejt populáción előforduló antigén esetében. Ez az adat tehát az LFA-1 antigénnel való azonosítás ellen szól. Mellette szólnak azonban a molekulatömegre kapott eredmények, amelyek az antigént az LFA-1 molekula α -alegységével /az irodalmi adatok alapján 177-180 kd méretű polipeptiddel/ mutatják azonosnak.

A meglévő eredmények alapján tehát úgy tűnik, hogy az ITM3-2, a TMD3-1 és a CC5-ID7 ellenanyagok az LFA-1 antigén α -alegységének valamelyik funkcionális szempontból fontos epitópját ismerik fel. A reakcióik közötti eltérést okozhatja az, hogy más-más epitópot ismernek fel, vagy más az antigénhez való affinitásuk, vagy a használt ascitesek és hibridóma felülűszók ellenanyag tartalma különböző. A vizsgálatok ismert koncentrációjú, tisztított ellenanyagokkal való megismétlése, valamint az epitópok feltérképezése /kompetitív-e az ellenanyagok kötődése, vagy sem/ ezekre a kérdésekre is választ ad majd.

A TM4-1 és ITM12-1/1 ellenanyagokkal végzett vizsgálatok eredményei szintén nagyon hasonlóak. A két ellenanyag által felismert antigén/ek/ a PM sejtek 42 ill. 34, a nyugvó T limfociták 73 ill. 74, a timuszsejtek 43 ill. 71%-án, a B+Mo és tisztított monocita frakció sejtjeinek mindössze 2-9%-án és a granulociták 3-4%-án fordul/nak/ elő. Granulocitáknál itt is tapasztalható volt a sejtek többségének igen gyenge fluoreszkálása, az ITM3-2 és TMD3-1 ellenanyagok reakciójához hasonlóan, jóllehet ilyen reakciót a többi ellenanyag és a negatív kontroll nem mutatott. A CLL I. limfocitákkal 91 ill. 54, a CLL II.-vel 2 ill. 4, a CGL sejtekkel 5 ill. 16%-os reakciót adtak. A megvizsgált humán sejtvonalak közül csak a T limfocita eredetű CEM és IA3-4 sejtekkel reagáltak. A funkcionális vizsgálatok egy részében mindkét ellenanyag hatástalannak bizonyult: NK, CTL és MLC kísérletekben a gátlás 25 illetve 30% alatt maradt. Növényi lektinek aktiváló hatását vizsgálva azonban a két ellenanyag között különbségek mutatkoztak. PWM esetében az ITM12-1/1 nem befolyásolta a H^3 -timidin beépülést, míg a TM4-1 54%-os gátlást eredményezett. A csak T limfocitákat indukáló Con-A és PHA esetében azonban mindkét ellenanyag fokozta a mitogének hatását, az ITM12-1/1 mindhárom vizsgált donor sejtjeinél, a TM4-1 pedig csak az első két donor sejtjeinél. Ehhez hasonló jelenséget Ledbetter, J.A. és munkatársai tapasztaltak a p220 antigénhez kapcsolódó ellenanyagok vizsgálatakor. A p220 antigén a 18. oldalon már említett T200 antigén-család legnagyobb molekulatömegű, B limfocitákon, NK sejteken és a T limfoci-

ták egy részén kimutatható eleme. Egy anti-p220 monoklonális ellenanyag szuboptimális /0,5 µg/ml/ PHA jelenlétében a H³-timidin beépülést 207%-ra emelte, jóllehet magában nem volt mitogén hatású, és megváltoztatta a sejtek aktiválódásának kinetikáját. Az ellenanyag a PHA kötődésére nem volt hatással, hanem a szerzők következtése szerint a p220 antigénhez kötődve befolyásolta /fokozta/ az IL-2-receptor szintézisét /Ledbetter, J.A. et al. 1985./. Más, a növényi lektinek által okozott sejtosztódás mértékét fokozó ellenanyagokról nem találtam közleményeket. Az általam előállított TM4-1 és ITM-12-1/1 ellenanyagok - szerológiai reakcióikat figyelembe véve - nem a p220 antigént ismerik fel. Van tehát a T limfociták felületén még egy vagy több olyan fehérje, amely B-sejteken, monocitákon és granulocitákon nem /vagy csak nagyon kis denzitással/ fordul elő, és a T sejtek aktiválódásának valamelyik lépésében szerepet játszik. A T11 antigén ilyen szerepe igazolt; a hozzá kötődő monoklonális ellenanyagokkal ugyanis egyrészt gátolható a PHA, Con-A, PWM okozta sejtaktiváció, másrészt egyes ellenanyagok magukban mitogén hatásúak /részletesebben ld. a 8-9. oldalon/, és ezen hatások feltehetőleg összefüggnek az aktiválódáshoz szükséges intracelluláris Ca²⁺-szint növekedésének módosításával /Palacios, R. - Martinez-Maza, O. 1982., Görög, Gy. et al. 1985./, és az IL-2-receptor gén aktiválásával /Fox, D.A. et al. 1985./. Hasonló módon történik a T-sejtek aktiválódása a T3-Ti receptor-komplexhez kötődő antigén-saját MHC molekulák, anti-T3 ellenanyagok, vagy növényi lektinek hatására. E

két antigén esetében azonban az ellenanyagoknak csak a mitogén hatást gátló szerepét írták le, és a szerológiai vizsgálatok eredményei is ellene szólnak a TM4-1 és ITM12-1/1 ellenanyagok T3 vagy T11 antigénnel való azonosításának.

A TM4-1 és ITM12-1/1 ellenanyagok által felismert antigének tehát olyan T-sejt specifikus markerek, amelyeknek szerepük van egyes növényi mitogének okozta sejtaktiválódásban. Az ellenanyagok vagy a lektin molekulák kötődését befolyásolják, vagy a kötődés hatására létrejött intracelluláris és/vagy sejtfelszíni változásokat módosítják. A meglévő adatok alapján ezek a sejtfelszíni fehérjék egyik eddig leírt antigénnel sem azonosíthatók.

Az ITM8-1 ellenanyag a timusz sejtek 94, a nyugvó T limfociták 28, a perifériás mononukleáris sejtek 19%-ával adott indirekt immunfluoreszcenciával reakciót, az összes többi vizsgált sejtfrakción és leukémiás vérmin-tán a sejteknek kevesebb, mint 15%-ával reagált. A sejtvonalak közül egyikén sem lehetett az ITM8-1 által felismert antigént kimutatni. Az ellenanyag az összes szerológiai vizsgálatban a kontrollként használt UCHT 4 /anti-T8/ ellenanyaggal azonosan, vagy nagyon hasonlóan reagált. A funkcionális vizsgálatok eredményei is mutatnak részleges azonosságot. A citotoxikus T limfociták működését az UCHT 4 átlagosan 63, az ITM8-1 82%-kal gátolta, s ez összhangban van a T8 antigénnel a citotoxikus T-sejtek célsejt-felismerésében betöltött szerepéről kialakult képpel. Az ITM8-1 nem befolyásolta az NK sejtek lítikus

aktivitását, és kevert limfocita kultúrában a sejtek aktiválódását. Befolyásolta azonban mindhárom poliklonális mitogén transzformáló hatását. Con-A és PHA esetében az első két donor sejtjeire hatástalan volt, illetve enyhén gátolt /11 illetve 37%/, míg a PWM-nel végzett kísérletekben is használt harmadik donortól származó sejtek ³H-timidin beépítését mindhárom mitogénnél fokozta /140-244%-ra/. Ilyen hatást anti-T8 ellenanyagokról még nem írtak le. A T8 antigénnel való azonosítás ellen szól az is, hogy egyes T8-specifikus ellenanyagok kevert limfocita kultúrában is gátló hatásúnak bizonyultak /pl. Leu-2, Engleman, E.G. és mtsi. 1981/b./, míg az ITM8-1 nem gátolta ezt a reakciót.

Az eredményeket összegezve, az ITM8-1 egy T-alpopuláció specifikus ellenanyag. Olyan sejtfelszíni fehérjével reagál, amelynek előfordulása a fehérvérsejteken megegyezik a T8 antigénnel, és ahhoz hasonlóan szerepet játszik a citotoxikus T limfociták lítikus működésében. Szerepet játszik továbbá a vizsgált növényi lektinek által okozott sejtaktiválódásban, még hozzá a TM4-1 antigénhez hasonlóan donor-függő módon. Elképzelhető, hogy az ITM8-1 ellenanyag a T8 molekula egy új epitópjával reagál /eddig két epitópot, a Leu-2a és Leu-2b epitópot írták le, Fujimoto, J. és mtsi. 1984./, vagy egy attól eltérő antigént ismer fel. Ez a kérdés az ITM8-1 antigén molekulatömegének ismeretében lesz majd eldönthető.

A TMG6-5 ellenanyag a szerológiai vizsgálatok során a kontrollként használt CCl-7, monocita és granulocita

cita specifikus ellenanyaghoz hasonlóan viselkedett. A perifériás vér B+Mo frakciójában a sejtek 57%-ával, a tisztított monocita frakcióban 80%-kal, és a granulociták 96%-ával reagált, míg a PM sejtek frakciójában átlagosan csak 27% pozitív reakciót adó sejt volt. A rozetta technikával tisztított nyugvó T-sejtek 20%-a adott reakciót, de a mitogénnel /PHA és Con-A/ aktivált T limfocitáknak csak 1-5%-a fluoreszkált. A leukémiás vérminták közül csak a CGL, a sejtvonalak közül pedig csak a myeloid eredetű U937 sejtek reagáltak magas százalékos arányban /rendre 59 ill. 77%. Ezek alapján a TMG6-5 egy monocitákon, granulocitákon és a T11⁺ /rozetta technikával tisztított/ sejtek egy csoportján előforduló markert ismer fel. Az ellenanyag a legtöbb funkcionális tesztben hatástalannak bizonyult, egyedül a természetes ölő sejtek lítikus aktivitását gátolta 38%-kal.

Az általam ismert irodalomban nem találok olyan monoklonális ellenanyaggal, amelynek szöveti megoszlása és funkcionális hatása a TMG6-5 ellenanyagével megegyezne. A szerológiai oldalt tekintve a 20. oldalon említett MO1 [=Mac1 =OKM1/ antigénhez áll igen közel, mivel ez is monocitákon, granulocitákon és NK sejteken fordul elő, T és B limfocitákon nem /Sanchez-Madrid, F. et al. 1983./. Ez az antigén az LFA-1 és gp95-150 antigénekkal közös β -láncból, és egy egyedi α -láncból áll. A β -láncához kapcsolódó ellenanyagokkal az NK, CTL, MLC és növényi mitogénekkal végzett aktiválási kísérletek egyaránt gátolhatók, mivel a β -lánc nem csak monocitákon, granulocitákon, és NK sejteken, hanem más α -láncokhoz kapcsolatlan T és B lim-

focitákon is megtalálható /Sanchez-Madrid,F. et al. 1983./.

A MO1 antigén α -láncához kapcsolódó H5A4 ellenanyag nem volt hatással a PHA-val történő transzformációra, a kevert limfocita kultúra sejtjeinek aktiválódására, és NK illetve CTL reakcióban a célsejtek lízisére, egyedül a CR₃ aktivitást /C3bi komplement komponens kötődést/ gátolta 70%-kal /Hildreth,J.E.K. - August,J.T. 1985./.

A CR₃ aktivitás különböző mértékű gátlását különböző α -lánc specifikus ellenanyagokkal más szerző is leírta /Sanchez-Madrid,F et al. 1983./.

Az általa használt három ellenanyag /OKM1, OKM9 és OKM10/ a MO1 antigén α -láncának különböző epitópjait ismeri fel /Talle,M.A. et al. 1983./, és kicsit eltérő hatású. A többi monocita, és granulocita specifikus ellenanyaggal foglalkozó cikk általában az ellenanyagnak a kemotaxisra és a fagocitózisra gyakorolt hatását vizsgálja, NK aktivitást nem tesztl. Mindezek miatt a TMG6-5 ellenanyag további vizsgálatát egyrészt a monocitákra és granulocitákra jellemző funkciók /CR₃-aktivitás, kemotaxis, fagocitózis/ területén kell folytatni, másrészt molekulatömegének meghatározása nyújthat majd segítséget az irodalmi adatokkal való összevetésben. Egyelőre nem zárható ki, hogy a MO1 antigén α -láncának valamely epitópját ismeri fel, de ezt csak a szöveti megoszlás azonosságga támasztja alá.

A TMT-1 és TMB6-5 ellenanyagok a szerológiai vizsgálatok során szinte mindig azonosan viselkedtek, egyedül a K562 eritroid sejt vonalon adott 95 illetve 0%-os reakciójuk mutatta, hogy nem ugyanazt az antigént ismerik

fel. Mindkét antigén T és B limfocitákon egyaránt előfordul magas, 65-100%-os arányban. A TMT-1 antigént a K562 sejtvonalon is ki lehetett mutatni. A két ellenanyag által felismert antigének különbözőségét a funkcionális vizsgálatok eredményei is mutatják. A TMT-1 ellenanyag a kevert limfocita reakciót 72%-kal, a PHA okozta transzformációt 51%-kal gátolta, a többi tesztben a gátlás 25% alatt maradt. Mivel az antigén minden fehérvérsejt populáción előfordul, a további vizsgálatokat érdemes a PWM-mel történő aktiváláson, és az EBV-vel való transzformáláson túl más B limfocita, valamint monocita és granulocita funkciók tesztelésére is kiterjeszteni. Az eddigi eredmények alapján nem tudtam a TMT-1 antigént a már ismert, fehérvérsejteken általánosan előforduló markerek /LFA-1, T200 antigén-család, gp95-150/ valamelyikével azonosítani.

A funkcionális vizsgálatok eredményeit tekintve, a TMB6-5 az elsőként tárgyalt ITM-3-2, TMD3-1 és CC5-ID7 ellenanyagokhoz hasonlít, azaz minden vizsgált funkciót gátol. Hogy azokkal nem azonos antigént ismer fel, azt elsősorban a CEM és Raji sejtvonalakon végzett indirekt immunfluoreszcenciás eredmények mutatják: a TMB6-5 ezekkel is 94-100%-os reakciót adott, míg az első három ellenanyag nem reagált velük. A perifériás vérből izolált sejtfrakciókon is a reakció százalékos aránya általában magasabb, és a fluoreszcencia intenzitása egyenletesebb és erősebb volt. Az ellenanyag K562 sejtekkel nem reagál.

A szerológiai és funkcionális kísérletek eredményeit összevetve az irodalmi adatokkal a TMB6-5 ellenanyag

reakciói az LFA-1, MO1 és gp95-150 antigénekből álló család közös β -alegységének reakcióival és szöveti megoszlásával tűnnek azonosnak. Mint arról az 59. oldalon már szó volt, ez a polipeptid minden fehérvérsejt csoporton kimutatható, és az általam vizsgált limfocita funkciók közül az NK és CTL működésben, a kevert limfocita reakcióban és a PHA-val történő sejt-aktiválásban szerepet játszik /Hildreth, J.E.K.-August, T. 1985./. A Con-A és PWM lektinokkal előidézett sejtosztódás gátlására nem találtam utalást. A szöveti megoszlás alapján az ellenanyag I.osztálybeli MHC fehérjéhez is kötődhet, de az azokhoz kötődő monoklonális ellenanyagoknak a TMB6-5 ellenanyagéhoz hasonló funkcionális hatását még nem írták le. Összegezve az eredményeket, a TMB6-5 az ismert általános fehérvérsejt antigének közül az LFA-1, MO1 és gp95-150 antigének közös β -alegységével tűnik azonosnak. Ezt az azonosságot azonban csak az antigén molekulatömegének meghatározásával lehet majd igazolni, vagy cáfolni.

A T2/53-4 ellenanyag által felismert polipeptid a PM sejtek 55, a nyugvó T limfociták 58, a B+Mo frakció sejtjeinek 43, tisztított monociták és granulociták 93 illetve 95%-án fordul elő. A leukémiás betegektől származó sejtek közül a CGL mintán adott az ellenanyag legmagasabb reakciót /67%/, míg a két CLL sejtmintával csak 20 illetve 10%-ban reagált. A sejtvonalak közül egyedül a P3HR1 B-sejtvonala nem hordozza az antigént, a többinek 54-100%-án kimutatható. Ezek szerint a T2/53-4 ellena-

anyag egy olyan antigénnel reagál, amely a T és B limfociták egy csoportjára, valamint monocitákra és granulocitákra jellemző. Az ellenanyag a funkcionális vizsgálatokban csak a Con-A és a PWM transzformáló hatását módosította. Con-A esetében a vizsgált három donor közül kettőnél, az első és a harmadik sejtjeinél fokozta az izotóp beépülést /223 illetve 224%-ra/, míg a második donor sejtjeinél nem befolyásolta az aktiválódást /5% gátlás/. A PWM-mel való aktiválást a harmadik donor sejtjeivel végeztem, s az ellenanyag ennek a lektinnek a hatását is fokozta, 140%-ra emelve a ³H-timidin beépülést. PHA-val történő aktiválás esetén az ellenanyag mindhárom donorral végzett kísérletben hatástalan volt. Dr.Monostori Éva eredményei szerint az ellenanyaggal timuszsejtek lizátumából, immunoblotting technikával, három közeli molekulatömegű csík jelölhető: 96, 113 és 129 kd. A T2/53-4 ellenanyag által felismert antigén tehát meglehetősen elterjedt a különböző fehérvérsejt populációkon, de funkcionális szerepét csak egyes növényi lektinek által okozott sejt-aktiválódásban lehetett kimutatni. Ez a hatás, a TM4-1 és ITM8-1 ellenanyagok hatásához hasonlóan donor-függőnek bizonyult. Ismeretem szerint az irodalomban leírt antigének közül egyre sem jellemző a T2/53-4 -re megismert szöveti előfordulás, funkcionális szerep és molekulatömeg.

Mint láttuk, az ellenanyagok által felismert antigének előfordulási mintázata a különböző fehérvérsejt csoportokon meglehetősen változatos. Változatos a vizs-

gált limfocita funkciókra gyakorolt hatásuk is, de feltűnően sok ellenanyag módosította a növényi lektinek sejt-aktiváló hatását. Ennek oka lehet, hogy a növényi lektinek feltehetően nem csak egyféle receptorhoz kötődnek a sejt felületén, még ha egy-egy molekulának /például PHA esetén a T11 antigénnek/ kitüntetett szerepe is van a folyamatban. A kötődésben résztvevő glikoproteinek részlegesen átfedhetnek a különböző lektinek esetén, így előfordulhat, hogy egy-egy membránfehérjéhez kötődő ellenanyag több mitogén ágens hatását is megváltoztatja. Ráadásul a sejtek aktiválódása soklépéses, bonyolult folyamat, a sejt számos anyagcsere folyamatában okoz változást, és bármely ellenanyag hatással lehet rá, amely ezen lépések valamelyikét gátolja, vagy fokozza. Az általam vizsgált ellenanyagok, különösen az irodalomból eddig nem ismert, aktiváló hatású TM4-1, ITM12-1/1, ITM8-1 és T2/53-4, értékes reagensek lehetnek a lektinek okozta sejt-aktiválás további kutatásában.

Érdekes a TM4-1, ITM8-1 és T2/53-4 ellenanyag mitogén hatást fokozó tulajdonságának donor-függése. A különbségeknek ez esetben valószínűleg nem az ellenanyagok izotípusa az oka /mint azt az anti-T3 ellenanyagok mitogén hatása esetén kimutatták/, mivel mindhárom ellenanyag IgG₁ típusú. Az ITM12-1/1 is IgG₁ típusú, és ennek hatása mindhárom vizsgált donor esetén azonos volt, tehát nem valószínű, hogy a donorok az IgG₁ típusú ellenanyag-kötő képességben különböztek volna. Az eltéréseket a donorok között meglévő más, eddig még nem ismert különbség okozhatja. A jelenség felderítésére sok további

donor sejtjeinek vizsgálatára lesz szükség, elemezve, hogy a különböző reakciót adó donorok sejtjei milyen más tulajdonságokban különböznek egymástól.

6. Összefoglalás

A sejtfelszíni differenciálódási markerek monoklonális ellenanyagokkal történő vizsgálata új utakat nyitott meg az immunrendszer működésének és szabályozásának megismerésében. A technikát az MTA SzBK Genetika Intézetében is évek óta alkalmazzák. Az általam előállított és korábbi fúziókból származó monoklonális ellenanyagokkal végzett munka során tíz ellenanyag részleges jellemzését végeztem el. Meghatároztam az ellenanyagok által felismert antigének előfordulását perifériás vérből izolált sejtfrakciókon, leukémiás betegek véréből izolált fehérvérsejteken és különböző eredetű humán sejtvonalakon. Megvizsgáltam, hogy a sejtekhez kötődő ellenanyagok befolyásolnak-e egyes limfocita funkciókat. Az eredményeket az általam ismert irodalmi adatokkal összevetve értékeltem. Hat ellenanyag esetében tudtam a már ismert ellenanyagok jellemzőivel párhuzamot vonni, és az általuk felismert antigént feltételesen valamelyik ismert sejtfelszíni markerrel azonosítani: ITM3-2, TMD3-1 és CC5-ID7 $\stackrel{?}{\approx}$ LFA-1 antigén α -alegységével, ITM8-1 $\stackrel{?}{\approx}$ T8 antigénnel, TMG6-5 $\stackrel{?}{\approx}$ MO1 antigén α -alegységével és TMB6-5 $\stackrel{?}{\approx}$ LFA-1, MO1 és gp95-150 antigének közös β -alegységével. Az azonosság igazolására azonban további kísérletek, a legtöbb esetben az antigén molekulatömegének meghatározása, szükségesek. Négy ellenanyag reakcióihoz hasonlót nem találtam a közleményekben. Ezek közül három, a TM4-1, az ITM12-1/1 és a T2/53-4 ellenanyag egyes növényi lektinek sejt-aktiváló hatását fokozza, ami úgy tűnik, ke-

véssé ismert jelenség, illetve a TMT-1 ellenanyag a T limfociták aktiválódását gátolja kevert limfocita kultúrában és PHA jelenlétében.

Az elért eredményeken túl az előállított monoklonális ellenanyagok hasznos reagensek lehetnek a további kutatások során, és némelyiknek közvetlen gyakorlati alkalmazására is lehetőség van. A TM4-1 /T limfocita specifikus/, az ITM8-1 /T alpopuláció specifikus/ és a TMG6-5 /monocita és granulocita specifikus/ ellenanyagok például alkalmasak a fenti sejttípusok azonosítására és tisztítására, felhasználhatók az immun- és vérképző-szervek szöveti felépítésének vizsgálatára, leukémiás megbetegedések tipizálására stb. Egyes ellenanyagokkal jelenleg is folynak kísérletek az MTA SzBK Genetika Intézetében.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a munkám során nyújtott szakmai irányításért és segítségért dr. Monostori Évának, dr. Andó Istvánnak és dr. Zákány Józsefnek. Külön köszönöm dr. Monostori Évának a rendelkezésemre bocsájtott ellenanyagokat és egyes antigének molekulatömegére vonatkozó eredményeket.

Köszönetet mondok Alföldi Lajos professzornak, és a Kőbányai Gyógyszerárugyár Mikrobiológia Kutató Laboratóriuma vezetőinek, akik lehetővé tették, hogy a munka kísérletes részét az MTA Szegedi Biológiai Központjának Genetika Intézetében végezhessem.

A munkát az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság egy ösztöndíjjal támogatta.

A dolgozatban szereplő fontosabb differenciálódási mar-
kerek jegyzéke

| Antigén neve | Egyéb elnevezései | CD besorolás | Előfordulás a periférián | Ref. sor-száma |
|--------------|-------------------|--------------|---------------------------------------|----------------|
| B1 | | CD 20 | pan-B | 60. |
| B2 | EBVR, C3dR | CD 21 | B alcsoport | 60. |
| B4 | | CD 19 | pan-B | 60. |
| BB-1 | | | akt. B | 86. |
| B-LAST 1 | | | akt. B | 82. |
| T1 | Leu1 | CD 5 | pan-T, B-CLL | 11. |
| T3-Ti | Leu4 | CD 3 | pan-T | 56. |
| T4 | Leu3 | CD 4 | T _{segítő} | 73. |
| T8 | Leu2 | CD 8 | T _{citotox.} , NK | 73. |
| T11 | LFA-2, Leu5 | CD 2 | pan-T, NK | 38. |
| CD44 | | | T _{citotox.} , NK | 9. |
| HNK-1 | Leu7 | | NK alcsoport | 1. |
| NKP-15 | Leu11 | CD 16 | pan-NK | 70. |
| MO1 | Macl, OKM1 | CD 11 | Mo, NK | 83. |
| MO2 | | CD 14 | Mo | 83. |
| MO5 | | | Mo, Grc | 83. |
| MO6 | | | Mo, Grc | 83. |
| Tac | IL-2R | CD 25 | akt. B, T, NK | 84. |
| ICAM-1 | | | | 74. |
| LFA-1 | | | } általános limfocita antigének | 75. |
| LFA-3 | | | | 75. |
| T200 | | | | 64. |
| gp95-150 | | | | 8. |

Rövidítések jegyzéke

| | |
|-------|---|
| AET | 2-aminoetil-izotiouronium-bromid |
| BCGF | B-cell growth factor, B-sejtekre ható növekedési faktor |
| CD | cluster of differentiation, a jól jellemzett sejtfelszíni fehérjék csoportjainak jelölésére |
| CGL | krónikus granuloid leukémia |
| CLL | krónikus limfoid leukémia |
| Con-A | Concanavalin-A, növényi lektin |
| CTL | citotoxikus T limfocita |
| DMSO | dimetil-szulfoxid |
| EBV | Epstein-Barr vírus |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| Fab | az immunglobulin molekulák papainos emésztésekor képződő N-terminális darab |
| Fc | az immunglobulin molekulák papainos emésztésekor képződő C-terminális darab |
| FCS | foetal calf serum, magzati borjú-savó |
| FITC | fluoreszcein-izotiocianát |
| Grc | granulocita |
| HAT | hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó szelektáló tápfolyadék |
| HGPRT | hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz |
| HRPO | torma-peroxidáz |
| IgD | immunglobulin-D |
| IgG | immunglobulin-G |
| IgM | immunglobulin-M |
| IL-2 | interleukin-2, növekedési faktor |

| | |
|-----|---|
| MHC | major histocompatibility complex, fő szöveti összeférhetőségi génrendszer |
| MLC | mixed lymphocyte culture, kevert limfocita kultúra |
| Mo | monocita |
| NK | natural killer, természetes ölő |
| PEG | polietilén-glikol |
| PHA | phitohemagglutinin, növényi lektin |
| PM | perifériás mononukleáris sejt |
| PrA | protein-A |
| PWM | pokeweed mitogen, növényi lektin |
| SDS | nátrium-dodecil-szulfát |
| vvt | vörösvértest |

Irodalomjegyzék

- 1./ Abo, T.-Balch, C.M.: A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody /HNK-1/
J. Immunol. 127 : 1024. /1981./
- 2./ Åman, P.-Gordon, J.-Lewin, N.-Nordström, M.-Ehlin-Henriksson, B.-Klein, G.-Carstensson, A. : Surface marker characterization of EBV target cells in normal blood and tonsil B lymphocyte populations
J. Immunol. 135 : 2362. /1985./
- 3./ Anderson, K.C.-Boyd, A.W.-Fisher, D.C.-Slaughenhaupt, B.-Groopman, J.E.-O'Hara, C.J.-Daley, J.F.-Schlossman, S.F.-Nadler, L.M. : Isolation and functional analysis of human B cell populations I. Characterization of the $B1^+B2^+$ and $B1^+B2^-$ subsets
J. Immunol. 134 : 820. /1985./
- 4./ Andó, I.-Crawford, D.H.-Kissonerghis, M.A.-Owen, M.J.-Beverley, P.C.L. : Phorbol ester-induced expression and function of the interleukin-2 receptor in human B lymphocytes
Eur. J. Immunol. 15 : 341. /1985./a/
- 5./ Andó, I.-Hariri, G.-Wallace, D.-Beverley, P.C.L. : Tumor promoter phorbol esters induce unresponsiveness to antigen and expression of interleukin-2 receptor on T cells
Eur. J. Immunol. 15 : 196. /1985./b/
- 6./ Andó, I.-Crawford, D.H.-Beverley, P.C.L. : Phorbol ester induces changes in the pattern of cell sur-

face molecules involved in CTL-target cell interaction

in Leukocyte Typing II. Vol. 1.

Editors: Reinherz, E.L.-Haynes, B.F.-Nadler, L.M.-
Bernstein, I.D.

Springer-Verlag, 1986.

- 7./ Auffray, C. : A molecular model of interaction between the T4 antigen and HLA class II antigens or the LAV virus
C.R.Acad.Sc.Paris 302 : 287. /1986./
- 8./ Beatty, P.G.-Ledbetter, J.A.-Martin, P.J.-Price, T.H.-Hansen, J.A. : Definition of a common leukocyte cell-surface antigen /Lp95-150/ associated with diverse cell-mediated immune functions
J. Immunol. 131 : 2913. /1983./
- 9./ Bernard, A.-Gay-Bellile, V.-Amiot, M.-Caillou, B.-Charbord, P.-Boumsell, L. : A novel human leukocyte differentiation antigen: monoclonal antibody anti-D44 defines a 28 kd molecule present on immature hematologic cells and a subpopulation of mature T cells
J. Immunol. 132 : 2338. /1984./
- 10./ Blue, M.L.-Daley, J.F.-Levine, H.-Schlossman, S.F. : Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry
J. Immunol. 134 : 2281. /1985./
- 11./ Boumsell, L.-Coppin, H.-Pham, D.-Raynal, B.-Lemerle, J.-Dausset, J.-Bernard, A. : An antigen shared by a hu-

man T cell subset and B cell chronic lymphocytic
leukemic cells

J. Exp. Med. 152 : 229. /1980./

- 12./ Boyd, A.W.-Fisher, D.C.-Fox, D.A.-Schossman, S.F.-
Nadler, L.M. : Structural and functional character-
ization of IL 2 receptors on activated human B cells

J. Immunol. 134 : 2387. /1985./

- 13./ Böyum, A. : Isolation of mononuclear cells and gra-
nulocytes from human blood

Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21/Suppl.97/ : 77.
/1968./

- 14./ Bradstock, K.F.-Jánossy, G.-Pizzolo, G.-Hoffbrand, V.-
Michael, M.C.-Pilch, J.P.-Milstein, C.-Beverley, P.C.-
Bollum, F. : Subpopulations of normal and leukemic
human thymocytes: an analysis with the use of mono-
clonal antibodies

J.Natl.Cancer.Inst. 65 : 33. /1980./

- 15./ Brottier, P.-Boumsell, L.-Gelin, C.-Bernard, A. :
T cell activation via CD 2 /T, gp50/ molecules:
accessory cells are required to trigger T cell acti-
vation via CD 2 - 9.6/T11₁ epitopes

J. Immunol. 135 : 1624. /1985./

- 16./ Burnet, F.M. : A modification of Jerne's theory of
antibody production using the concept of clonal se-
lection

Austral.J.Sci. 20 : 67. /1957./

- 17./ Calvo, C.F.-Boumsell, L.-Kolb, J.P.-Laffy, B.-Bernard,
A.-Senik, A. : Preferential elimination of NK and
CTL functions by anti-D44 monoclonal antibody

- J. Immunol. 132 : 2345. /1984./
- 18./ Cathcart, M.K.-Murakami, M. : Establishment of human T cell hybridomas secreting nonspecific suppressor factors
Clin. Res. 31 : 734A /1983./
- 19./ Chang, T.W.-Kung, P.C.-Gingras, S.P.-Goldstein, G. : Does OKT3 monoclonal antibody react with an antigen-recognition structure on human T cells?
Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 78 : 1805. /1981./
- 20./ Clayberger, C.-Uyehara, T.-Hardy, B.-Eaton, J.-Krarsek, M.-Krensky, A.M. : Target specificity and cell surface structures involved in the human cytolytic T lymphocyte response to endothelial cells
J. Immunol. 135 : 12. /1985./
- 21./ Cotter, T.-Priscilla, S.-Henson, P. : A monoclonal antibody inhibiting neutrophil chemotaxis and degranulation
J. Immunol. 127 : 1355. /1981./
- 22./ Damle, N.K.-Fishwild, D.M.-Engleman, E.G. : Antigen-specific suppressor T lymphocytes in man make use of the same set of surface molecules as do cytolytic T lymphocytes: Roles of Leu-2/T8, Leu-4/T3, Leu-5/T11, LFA-1 molecules
J. Immunol. 135 : 1724. /1985./
- 23./ Depper, J.M.-Leonard, W.J.-Robb, R.J.-Waldmann, T.A.-Greene, W.C. : Blockade of the interleukin-2 receptor by anti-Tac antibody: inhibition of human lymphocyte activation
J. Immunol. 131 : 690. /1983./

- 24./ Engleman, E.G.-Warnke, R.-Fox, R.I.-Dilley, J.-Benike, C.J.-Levy, R. : Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody
Proc.Natn.Acad.Sci. U.S.A. 78 : 1791. /1981./a/
- 25./ Engleman, E.G.-Benike, C.J.-Glickman, E.-Evans, R.L. : Antibodies to membrane structures that distinguish suppressor/cytotoxic and helper T lymphocyte subpopulations block the mixed leukocyte reaction in man
J. Exp. Med. 153 : 193. /1981/b/
- 26./ Engvall, E. : Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT in Methods in Enzymology Vol. 70./419.
Academic Press.Inc. 1980.
- 27./ Fingeroth, J.D.-Weiss, J.J.-Tedder, T.F.-Strominger, J.L.-Biro, P.A.-Feazon, D.T. : Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2
Proc.Natn.Acad.Sci. U.S.A. 81 : 4510. /1984./
- 28./ Fox, D.A.-Hussey, E.-Fitzgerald, K.A.-Bensussan, A.-Daley, J.F.-Schlossman, S.F.-Reinherz, E.L. : Activation of human thymocytes via the 50kd T11 sheep erythrocyte binding protein induces the expression of interleukin 2 receptors on both T3⁺ and T3⁻ populations
J. Immunol. 134 : 330. /1985./
- 29./ Fujimoto, J.-Stewart, S.J.-Levy, R. : Immunochemical analysis of the released Leu-2 /T8/ molecule
J. Exp. Med. 160 : 116. /1984./
- 30./ Gefter, M.C.-Margulies, D.H.-Scherf, M.D. : A simple method for polyethylene glycol promoted hybridiza-

tion of mouse myeloma cells

Somatic Cell Genet. 3 : 231. /1977./

- 31./ Görög, Gy.-Bátory, G.-Laskay, T.-Petrányi, G. Gy. :
Effect of anti-human pan-T monoclonal antibodies
on lymphocyte proliferative and cytotoxic functions
Cell. Immunol. 96 : 184. /1985./
- 32./ Gromkowski, S.H.-Krensky, A.M.-Martz, E.-Burakoff, S.J. :
Functional distinctions between the LFA-1, and LFA-3
membrane proteins of human CTL are revealed with
trypsin-pretreated target cells
J. Immunol. 134 : 244. /1985./
- 33./ Hall, R.E.-Schall, R.P.- Black, L.A. : A monoclonal
antibody /RH1-38/ which inhibits multiple systems
of cell-mediated cytotoxicity II. Evidence that the
epitope recognized is involved in a late step in
the cytolytic mechanism
Mol. Immunol. 22 : 765. /1985./
- 34./ Henney, C.S.-Kuribayashi, K.-Kern, D.E.-Gillis, S. :
Interleukin-2 augments natural killer activity
Nature 291 : 335. /1981./
- 35./ Hildreth, J.E.K.-August, J.T. : The human lymphocyte
function-associated /HLFA/ antigen and related mac-
rophage differentiation antigen /HMac-1/: functio-
nal effects of subunit-specific monoclonal antibo-
dies
J. Immunol. 134 : 3272. /1985./
- 36./ Hinuma, Y.-Konn, M.-Yamaguchi, J.-Wudarski, D.J.-Bla-
keslee, J.R.-Grace, J.T. : Immunofluorescence and
Herpes-type virus particles in the P3HR1 Burkitt

lymphoma cell line

J. Virol. 1 : 1045. /1967./

- 37./ Holter, W.-Majdic, O.-Liszka, K.-Stockinger, H.-Knapp, W. :
Kinetics of activation antigen expression by in vitro-stimulated human T lymphocytes

Cell. Immunol. 90 : 322. /1985./

- 38./ Howard, F.D.-Ledbetter, J.A.-Wong, J.-Bieber, C.P.-
Stinson, E.B.-Herzenberg, L.A. : Human T lymphocyte
differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block E-rosette formation

J. Immunol. 126 : 2117. /1981./

- 39./ Janeway, C.A.-Bottomly, K.-Horowitz, J.-Kaye, J.-
Jones, B.-Tite, J. : Modes of cell:cell communication
in the immune system

J. Immunol. 135 : 739s /1985./

- 40./ Kanellopoulos, J.M.-Petris, S.-Leca, G.-Crumpton, M.J. :
The mitogenic lectin from Phaseolus vulgaris does
not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes

Eur. J. Immunol. 15 : 479. /1985./

- 41./ Kaplan, M.E.-Clark, C. : An improved rosetting assay
for detection of human T lymphocytes

J. Immunol. Meth. 5 : 131. /1974./

- 42./ Kearney, J.F.-Radbruch, A.-Liesegang, B.-Rajewsky, K. :
A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody in secreting cell lines

J. Immunol. 123 : 2932. /1979./

- 43./ Köhler, G.-Milstein, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity

Nature 256 : 495. /1975./

- 44./ Köhler, G.-Milstein, C. : Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion

Eur. J. Immunol. 6 : 511. /1976./

- 45./ Krensky, A.M.-Sanchez-Madrid, F.-Robbins, E.-Nagy, J.A.-Springer, T.A.-Burakoff, S.J. : The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2 and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions

J. Immunol. 131 : 611. /1983./

- 46./ Krensky, A.M.-Robbins, E.-Springer, T.A.-Burakoff, S.J. : LFA-1, LFA-2, and LFA-3 antigens are involved in CTL-target conjugation

J. Immunol. 132 : 2180. /1984./

- 47./ Landegren, U.-Ramstedt, U.-Axberg, I.-Ullberg, M.-Jon-
dal, M.-Wigzell, H. : Selective inhibition of human T cell cytotoxicity at levels of target recognition or initiation of lysis by monoclonal OKT3 and Leu-2a antibodies

J. Exp. Med. 155 : 1579. /1982./

- 48./ Lanier, L.L.-Le, A.M.-Phillips, J.H.-Warner, N.L.-Bab-
cock, G.F. : Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 /HNK-1/ and Leu-11 /NK-15/ antigens

J. Immunol. 131 : 1789. /1983./

- 49./ Laskin, D.L.-Rovera, G. : Stimulation of human neutrophilic granulocyte chemotaxis by monoclonal antibodies

- J. Immunol. 134 : 1146. /1985./
- 50./ Ledbetter, J.A.-Rose, L.M.-Spooner, C.E.-Beatty, P.G.-
Martin, P.J.-Clark, E.A. : Antibodies to common
leukocyte antigen p220 influence human T cell pro-
liferation by modifying IL 2 receptor expression
J. Immunol. 135 : 1819. /1985./
- 51./ Littlefield, J.W. : Selection of hybrids from matings
of fibroblasts in vitro and their presumed recombi-
nants
Science 145 : 709. /1964./
- 52./ Lozzio, C.B.-Lozzio, B.B. : Human chronic myelogenous
leukemia cell line with positive Philadelphia chro-
mosome
Blood 45 : 321. /1975./
- 53./ Martin, P.J.-Longton, G.-Ledbetter, J.A.-Newman, W.-
Braun, M.P.-Beatty, P.G.-Hansen, J.A. : Identification
and functional characterization of two distinct
epitopes on the human T cell surface protein Tp50
J. Immunol. 131 : 180. /1983./
- 54./ Mentzer, S.J.-Gromkowski, S.H.-Krensky, A.M.-Burakoff,
S.J.-Martz, E. : LFA-1 membrane molecule in the re-
gulation of homotypic adhesion of human B lympho-
cytes
J. Immunol. 135 : 9. /1985./
- 55./ Meuer, S.C.-Schlossman, S.F.-Reinherz, E.L. : Clonal
analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4⁺ and
T8⁺ effector cells recognize products of different
major histocompatibility complex regions
Proc.Natn.Acad.Sci. U.S.A. 79 : 4395. /1982./

- 56./ Meuer, S.C.-Cooper, D.A.-Hodgdon, J.C.-Hussey, R.E.-
Fitzgerald, K.A.-Schlossman, S.F.-Reinherz, E.L. :
Identification of the receptor for antigen and ma-
jor histocompatibility complex on human inducer
T lymphocytes
Science 222 : 1239. /1983./
- 57./ Meuer, S.C.-Hussey, R.E.-Fabbi, M.-Fox, D.A.-Acuto, O.-
Fitzgerald, K.A.-Hodgdon, J.C.-Protentis, J.P.-Schloss-
man, S.F.-Reinherz, E.L. : An alternative pathway of
T cell activation: a functional role for the 50kd
T11 sheep erythrocyte receptor protein
Cell 36 : 897. /1984./
- 58./ Miller, G.-Lipman, M. : Release of infectious Epstein-
Barr virus by transformed marmoset leukocytes
Proc.Natn.Acad.Sci. U.S.A. 70 : 190. /1973./
- 59./ Nadler, L.M.-Anderson, K.C.-Marti, G.-Bates, M.-Park, E.-
Daley, J.F.-Schlossman, S.F. : B4, a human B lympho-
cyte-associated antigen expressed on normal, mito-
gen-activated and malignant B lymphocytes
J. Immunol. 131 : 244. /1983./
- 60./ Nadler, L.M.- Anderson, K.C.-Bates, M.-Park, E.-Slaug-
henhaupt, B.-Schlossman, S.F. : Human B cell-associ-
ated antigens: expression on normal and malignant
B lymphocytes
in Leucocyte Typing 354.
Editors: Reinherz, E.L.-Haynes, B.F.-Nadler, L.M.-
Bernstein, I.D.
Springer-Verlag, 1984.
- 61./ Newman, W.-Targan, S.R.-Fast, L.D. : Immunobiological

and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins

Mol. Immunol. 21 : 1113. /1984./

62./ O'Flynn,K.-Krensky,A.M.-Beverley,P.C.L.-Burakoff, S.J.-Linch,D.C. : Phytohaemagglutinin activation of T cells through the sheep red blood cell receptor
Nature 313 : 686. /1985./

63./ O'Flynn,K.-Russel-Saib,M.-Ando,I.-Wallace,D.L.-Beverley,P.C.L.-Boylston,A.W.-Linch,D.C. : Different pathways of human T cell activation revealed by phytohaemagglutinin P and phytohaemagglutinin M
Immunology 57 : 55. /1986./

64./ Omary,M.B.-Trowbridge,I.S.-Battifora,H.A. : Human homologue of murine T-200 glycoprotein
J. Exp. Med. 152 : 842. /1980./

65./ Palacios,R. : Mechanism of T cell activation: role and functional relationship of HLA-DR antigens and interleukins
Immunol. Review 63 : 83. /1982./

66./ Palacios,R.-Martinez-Maza,O. : Is the E receptor on human T lymphocytes a "negative signal receptor"?
J. Immunol. 129 : 2479. /1982./

67./ Parnes,J.R. : Structure and function of T lymphocyte differentiation antigens
TIG, July 1986 : 179. /1986./

68./ Pellegrino,M.A.-Ferrone,S.-Dierich,M.P.-Reisfield, R.A. : Enhancement of sheep red blood cell - human lymphocyte rosette formation by the sulphhydryl compound 2-aminoethyl-isothiuronium bromide

- Clin.Immunol.Immunopathol. 7 : 804. /1975./
- 69./ Perussia,B.-Fanning,V.-Trinchieri,G. : A human NK and K cell subset shares with cytotoxic T cells expression of the antigen recognized by antibody OKT8
J, Immunol. 131 : 223. /1983./
- 70./ Phillips,J.J.-Babcock,G.F. : NKP-15; a monoclonal antibody reactive against purified human natural killer cells and granulocytes
Immunol. Lett. 6 : 143. /1983./
- 71./ Pontecorvo,G. : Production of indefinitely multiplying mammalian somatic cell hybrids by polyethylen glycol /PEG/ treatment
Somatic Cell Genet. 1 : 397. /1976./
- 72./ Pulvertaft,R.J.V. : Cytology of Burkitt's tumour
Lancet 1964 : 238. /1964./
- 73./ Reinherz,E.L.-Schlossman,S.F. : The differentiation and function of human T lymphocytes
Cell 19 : 821. /1980./
- 74./ Rothlein,R.-Dustin,M.L.-Marlin,S.D.-Springer,T.A. : A human intercellular adhesion molecule /ICAM-1/ distinct from LFA-1
J. Immunol. 137 : 1270. /1986./
- 75./ Sanchez-Madrid,F.-Krensky,A.M.-Ware,C.F.-Robbins,E.-Strominger,J.L.-Burakoff,S.J.-Springer,T.A. : Three distinct antigens associated with human T lymphocyte-mediated cytolysis: LFA-1, LFA-2 and LFA-3
Proc.Natn.Acad.Sci. U.S.A. 79 : 7489. /1982./

- 76./ Sanchez-Madrid, F.-Nagy, J.A.-Robbins, E.-Simon, P.-
Springer, T.A. : A human leukocyte differentiation
antigen family with distinct -subunits and a
common -subunit
J. Exp. Med. 158 : 1785. /1983./
- 77./ Schmidt, R.E.-Bartley, G.-Levine, H.-Schlossman, S.F.-
Ritz, J. : Functional characterization of LFA-1 anti-
gens in the interaction of human NK clones and
target cells
J. Immunol. 135 : 1020. /1985./
- 78./ Shulman, M.-Wilde, C.D.-Köhler, G. : A better cell
line for making hybridomas secreting specific an-
tibodies
Nature 276 : 269. /1978./
- 79./ Sundström, C.-Nilsson, K. : Establishment and charac-
terization of a human histiocytic lymphoma cell
line /U937/
Int. J. Cancer 17 : 565. /1976./
- 80./ Talle, M.A.-Rao, P.E.-Westberg, E.-Allegar, N.-Makowski,
M.-Mittler, R.S.-Goldstein, G. : Patterns of antigenic
expression on human monocytes as defined by monoclo-
nal antibodies
Cell. Immunol. 78 : 83. /1983./
- 81./ Tax, W.J.M.-Willems, H.W.-Reekers, P.P.M.-Capel, P.J.A.-
Koene, R.A.P. : Polymorphism in mitogenic effect of
IgG₁ monoclonal antibodies against T3 antigen on hu-
man T cells
Nature 304 : 445. /1983./
- 82./ Thorley-Lawson, D.A.-Schooley, R.T.-Bhan, A.K.-Madler,

L.M. : Epstein-Barr virus superinduces a new human B-cell differentiation antigen /B-LAST 1/ expressed on transformed lymphoblasts

Cell 30 : 415. /1982./

83./ Todd,R.F.-Bhan,A.K.-Kabawat,S.E.-Schlossman,S.F. :
Human myelomonocytic differentiation antigens defined by monoclonal antibodies

in Leucocyte Typing 424.

Editors: Bernard,A.-Boumsell,L.-Dausset,J.-
Milstein,C.-Schlossman,S.F.

Springer-Verlag, 1984.

84./ Uchiyama,T.-Broder,S.-Waldmann,T.A. : A monoclonal antibody /anti-Tac/ reactive with activated and functionally mature human T cells I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac⁺ cells

J. Immunol. 126 : 1393. /1981./

85./ Vaickus,L.-Levy,R. : Antiproliferative monoclonal antibodies: detection and initial characterization

J. Immunol. 135 : 1987. /1985./

86./ Yokochi,T.-Holly,R.D.-Clark,E.A. : B lymphoblast antigen /BB-1/ expressed on Epstein-Barr virus activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines and Burkitt's lymphomas

J. Immunol. 128 : 823. /1982./