

Über den Nachweis von Plättchenglykoproteinen bei Hund und Katze

Analysis of canine and feline major platelet glycoproteins: A histochemical and electrophoretical study employing monoclonal antibodies and lectins

J.A.A. Darbès

Zusammenfassung: Drei gegen antigene Determinanten des Glykoproteinkomplexes IIb/IIIa menschlicher Thrombozyten gerichtete monoklonale Antikörper (HPL 1, CLB-37, Y2/51) wurden mit Hilfe der indirekten Immunperoxidase- bzw. der ABC-Technik auf Kreuzreaktivität mit Thrombozyten und Megakaryozyten von Hund und Katze untersucht. HPL 1 und der einzige auch für paraffineingebettetes Material geeignete Antikörper Y2/51 reagierten deutlich mit Thrombozyten und Megakaryozyten von Hund und Katze, CLB-37 dagegen ausschließlich mit von der Katze stammendem Material. In paraffineingebettetem Gewebe schien bezüglich des Antikörpers Y2/51 ein deutlich besserer Erhalt der Antigenität bei Fixation mit 10%igem statt 5%igem Formaldehyd gewährleistet. Die Spezifität der Reaktion konnte im Falle von Y2/51 mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und des "Immunoblotverfahrens" verifiziert werden. Der anti-GP IIIa-Antikörper markierte in nichtreduzierten, SDS-solubilierten Thrombozytenlysaten von Hund und Katze je eine Bande im Molekulargewichtsbereich von ca. 90 bzw. 95 kDa. Diese Werte liegen innerhalb der Spannweite, die für das GP IIIa des Menschen beschrieben wurde. Der komplexabhängige anti-GP IIb/IIIa-Antikörper HPL 1 sowie der möglicherweise ebenfalls komplexabhängige anti-GP IIIa-Antikörper CLB-37 führten im "immunoblot" zu keiner spezifischen Reaktion. In Verbindung mit der ABC-Technik wurden zehn biotinylierte Lektine an isolierten Thrombozyten sowie an paraffineingebettetem Knochenmark- und Lymphknotengewebe von Hund und Katze erprobt. Vier der getesteten Lektine, PHA-L, WGA, PSA und LCA, reagierten deutlich mit Thrombozyten und Megakaryozyten, zeichneten sich jedoch im Vergleich mit dem immunzytologischen und -histologischen Nachweis durch geringere Spezifität und Regelmäßigkeit der Reaktion aus. Bei den weitgehend analog zu den "immunoblots" durchgeführten "Lektinblots" von Hunde- und Katzen-Thrombozytenlysaten führten PSA und LCA zur Anfärbung einer Reihe von Banden, die zumindest mit einiger Wahrscheinlichkeit bekannten Thrombozyten-Membranglykoproteinen zugeordnet werden konnte. Mit WGA wurde beim Hund im Gegensatz zur Katze eine einzelne Bande markiert, die molekulargewichtsmäßig dem aus der Literatur bekannten GP I des Hundes entspricht und vom Molekulargewicht in etwa mit dem GP Ib des Menschen übereinstimmt. Mit PHA-L konnten im "Lektinblot" keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

Summary: Three monoclonal antibodies (HPL 1, CLB-37, Y2/51) against antigenic determinants of the glycoprotein complex IIb/IIIa in human platelet membranes were tested with the indirect immune peroxidase and ABC-technique for crossreactivity with canine and feline platelets and megakaryocytes. HPL 1 as well as Y2/51, the only antibody suited for paraffin-embedded tissue, reacted strongly with platelets and megakaryocytes in specimens from both dogs and cats. On the other hand CLB-37 showed no affinity for any canine material. Furthermore, the antigenicity of paraffin-embedded specimens with respect to Y2/51 seemed to be better preserved when 10% instead of 5% formaldehyde had been used as a fixative. The specificity of the reaction could be verified in the case of Y2/51 by means of SDS-PAGE and immunoblotting. In nonreduced samples of SDS-solubilized platelet lysates from both dogs and cats the anti-GP IIIa antibody labelled a single band corresponding to a protein of approximately 95 kDa molecular weight, values which are within the range reported for human GP IIIa. The complex-dependent antibody HPL 1 as well as the possibly complex-dependent CLB-37 produced no specific reaction with immunoblot analysis. With the help of the ABC-technique, ten biotinylated lectins were tested on isolated platelets as well as on sections of paraffin-embedded bone marrow and lymph node tissue from dogs and cats. Four of the tested lectins (PHA-L, WGA, PSA and LCA) clearly reacted with platelets and megakaryocytes, the reactions however displayed

less specificity and regularity than immunocytochemical and -histochemical analysis. Lectinblots of canine and feline SDS-solubilized platelets with PSA and LCA displayed several coloured bands that with some probability can be related to known platelet membrane glycoproteins. The use of WGA in lectinblots of canine but not feline platelet lysates showed a single band that displayed a molecular weight corresponding to the known molecular weight of canine GP I as described previously, and approximates that of human GP Ib. PHA-L lectinblots did not produce any interpretable results.