

Antigens de diferenciació de limfòcits B detectats mitjançant anticossos monoclonals.

R.Vilella, I.Anegón, T.Gallart, J.Milà, C.Cuturi, L.Borche, J.Vives.
Hospital Clínic i Provincial. Servei d'Immunologia.
Villarroel, 170. Barcelona-36

Abstract

B lymphocyte differentiation antigens detected by monoclonal antibodies.

B lymphocyte differentiation antigens were studied by using monoclonal antibodies. Two Mab:93-3B1, and 93-D6 were produced immunizing a Balb/c mouse with cells from a patient affected of prolymphocytic leukemia. Mab characterization was done by indirect immunofluorescence microscopy or citofluorimetry on cells from peripheral blood, bone marrow and lymphatic organs, Raji, Raji Mutant, Daudi and Molt-4 cell lines and cells from patients with acute leukemias and lymphomas. The antigens detected by the two Mab are beared only by B lymphocytes and they appeared on immature B precursors. The reactivity pattern, immunochemistry and antigenic modulation data showed that the two Mab detects different antigen and appeared at distinct differentiation levels. The two Mab are not mitogenic when used alone, they partially inhibit B cell proliferation induced by PKW mitogen or conditioned media rich in BCGF when utilized at low dilutions.

Introducció.

La diferenciació ontogénica es produeix gracies a un procés de regulació de la activitat gènica típic de cada llinatge cel·lular. Aquesta activitat gènica queda reflectida a la membrana cel·lular per la expressió d'uns antigens de superfície característics. L'expressió d'aquests es reproduïx fidelment durant el procés de diferenciació de cada cèl·lula. Aquests antigens poden expressar-se al llarg de tot el procés diferenciatiu ó bé a partir d'un determinat estadi, també poden ésser característics d'un o d'uns pocs estadis i finalment poden apareixer en un moment determinat, desaparèixer i reapareixer més endavant. Aquest tipus d'antigens podran ésser utilitzats com a marcadors de diferenciació sempre que es tingui un anticòs per a identificar-los.

L'adveniment a l'any 1975 (1) de la tecnologia dels híbridomes per a la obtenció d'anticòsos monoclonals (A.M.) d'una especificitat determinada, ha estat una aportació inestimable en aquest sentit.

Al nostre laboratori, i amb l'objectiu d'obtindre A.M. dirigits contra marcadors de diferenciació limfocitària i donat que, la representació de les cèl·lules més indiferenciades es nula en sang perifèrica i molt pobre porcentualment en el moll de l'os i en el fetge fetal de l'individu (deixant a part la dificultat d'obtindre els dos darrers tipus d'espècimens en humans), es va decidir utilitzar cèl·lules provinents de síndromes limfoproliferatius que tinguessin una important representació en sang perifèrica de cèl·lules immadures.

La nostra estratègia està basada en la idea de que un síndrome limfoproliferatiu no es mes que la contrapartida neoplàsica (i per tan molt expandida) d'una cèl.lula normal aturada en un determinat estadi de la seva diferenciació (2)

En el present article es descriu la producció i caracterització de dos anticossos monoclonals reactius exclusivament amb limfòcits B.

Material i mètodes

Els mètodes d'immunització, fusió cel.lular, cultius i clonacions seguits per a l'obtenció del A.M. han estat descrits anteriorment (3,4,5).

Técnica de detecció dels anticossos als sobrenadants dels cultius. El mètode seguit esta basat en el de R.H.Kennet(6), amb petites modificacions, breument: el nombre de cèl.lules adherides als pous de les plaques de microelisa era de 200.000. La antiglobulina marcada amb peroxidasa fou la RAM/Ig/P0 (Nordic), el substrate utilitzat estava format per: 4,7 ml de 3-dimetilaminobenzoic acid, 9,3 ml de 3-metil-2 benzathiazolina, 7 ml de tampó fosfat 0,1M pH=7 i 5 λ de H₂ O₂ per cada placa de ELISA (200 per pou), la reacció s'aturava amb 50 λ per pou de SO₄ H₂ 2M, i la lectura es feia a 600 nm en un Titertek Multiskan.

Introducció.

Immunofluorescència indirecta : la preparació de les cèl.lules per la fluorescència va ser descrita anteriorment (5), les lectures van realitzar-se be per microscopia amb un Leitz. Ortholux II be per citofluorimetria amb un "FACS-Analyzer" (Becton Dickinson).

DOT immune: el mètode seguit es basat en el de Hanks i col (7), amb petites modificacions, breument: es tracten les cèl.lules a estudiar amb un tampó de lisi constituït per: NP-40, 2%-Iodoacetamida 10m M-NaN₃ 10m M-EDTA 10m M-PMSF 10m M-PBS, en una relació sediment cel.lular-buffer de lisi entre 1/1 i 1/5 durant 30' a 4°C, després es centrifuga amb una microfuge i s'utilitza el sobrenadant com a font d'antigen. Sobre una membrana de nitrocel.lulosa si posen "dots" de 1 μ l de sobrenadant, sobre el "dot" es posa la mostra de A.M. diluïd 1/500 amb ovoalbúmina al 5% i s'incuba durant 1h., es renta durant 1h, s'incuba amb una anti-Ig de ratolí marcada a la peroxidasa (Dako) 1/400 durant 1h., finalment es renta durant 1 h., i es desenvolupa amb Diaminobenzidina H2O2.

Western blot :el mètode seguit es basat en el de Towbin(9) breument: els sobrenadants dels lisats cel.lulars obtinguts com en la tècnica del DOT es sotmeten a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, les fraccions obtingudes es transfereixen elèctricament a una membrana de nitrocel.lulosa i a continuació es realitza un ELISA com en la tècnica del DOT immune

Modulació antigénica: Aquests experiments es van portar a terme segons el mètode de Reinherz i col.(10), breument: s'incuben les cèl.lules amb el A.M. durant 24h. a 37°C en presència de anti-Ig de ratolí, es fan 3 rentats amb PBS sol i després sobre les cèl.lules així tractades es fa la tècnica de Immunofluorescència indirecta descrita anteriorment.

Efecte dels A.M. sobre la proliferació de les cèl.lules B en cultiu amb mitogens i amb mitjà condicionat.

Els cultius es feren amb cèl.lules procedents d'una melsa humana sotmeses a l'acció del A.M. Cris-1(3) i complement de conill per tal d'eliminar les cèl.lules T. Es testà l'efecte dels 2AM, sobre la proliferació cel.lular del cultiu als 3,5 i 7 dies en presència de Pokewed mitogen (1,25 g/ml, Sigma), Fitohemaglutinina (0,6 μ g/ml Sigma, més 7 μ g/ml Wellcome) i factor de creixement de les cèl.lules B (BCGF). Es cultivaban $2 \cdot 10^5$ cèl.lules en plaques de 96 pous de fons plà (Nunc)on).

El BCGF es va obtenir per cultiu de cèl.lules de la melsa a una concentració de $1,5 \cdot 10^6$ cèl.lules/ml amb PHA(0,6 μ g/ml Sigma més 7 μ g/ml Wellcome) durant 3 dies a 37°C i 5% CO₂.

La proliferació cel.lular va ser mesurada per adició als corresponents cultius cel.lulars de 2 μ Ci de Timidina-H³ (2.0 Ci/m.mol, Amersham) 18 hores abans de la seva recollida a 3,5 i 7 dies.

Els resultats obtinguts amb aquest 2 A.M. sobre cèl.lules procedents de diferents síndromes limfoproliferatius, s'expressen a la :

Taula 2:

	93-3B1	93-4D6
Leucèmia limfoblàstica aguda "nulla" (n=1)	-	+
" " " "comu" (n=2)	-	+
" " " "pre-B" (n=2)	+	+
" linfoide crònica "B" (n=14)	+(10/14)	+
Linfoma no Hodking "B" (n=4)	+	+
Leucèmia prolimfocítica-B. (n=2)	+	+

Els resultats obtinguts sobre diferents cèl.lules per les tècniques del DOT i del Western blot s'expressen a la :

Taula 3:

	93-3B1	93-4D6
Síndromes limfoproliferatius (n=11)	+	+
DOT Línies B (Raji, Raji Mutant, Daudi)	+	-
Línies T (Molt-4)	-	-
T perifèriques	-	-
Western Blot	33,35 i 41 KD	-
	(Raji)	(S.Limf)

El experiments de modulació antigénica donaren els següents resultats:

Taula 4:

Reactivitat de les cèl.lules modulades amb els anticossos monoclonals.

Modulació per l'anticòs monoclonal.	93-3B1	93-4D6
93-3B1	-	74%
93-4D6	63%	-

La taula següent mostra els percentatges d'inhibició de la proliferació provocats per el mitja condicionat (MC), el Pokewed mitogen (PKW) i el MC+PKW a diferents dilucions dels A.M. en el 3 dia de cultiu, (s'assigna el valor del 100% a les cpm produïdes per el mitògen ó el mitja condicionat

Taula 5:

Dilucions del anticòs monoclonal	93-3B1	93-4D6	93-3B1+93-4D6
PKW 1/10	68	78	
" 1/10 ²	78	101	
" 1/10 ³	113	78	
MC+PKW 1/10	52	57	
" 1/10 ²	58	74	
" 1/10 ³	112	71	
MC 1/5	61	76	75
MC 1/10	51	69	53
MC 1/10 ²	84	114	88
MC 1/10 ³	100	108	106

Discussió:

Els A.M. 93-3B1, i 93-4D6 reconeixen antigens de superfície de limfòcits B com mostren els resultats d'immunofluorescència indirecta expresats a la taula 1 (el B1 es un A.M. comercial utilitzat com a control, específic per els limfòcits B madurs).

El 93-3B1 es negatiu amb una leucèmia aguda "nulla" i amb una leucèmia aguda "comu", que son els dos tipus de leucèmies considerats més primitius, mentre que el 93-4D6 es positiu amb totes les leucèmies agudes estudiades (taula 2). Malgrat que el nombre de leucèmies agudes "nulles" i "comuns" estudiades es insuficient per treure conclusions, el fet d'haver-se estudiat paral·lelament ambdós A.M. insinua que els antigens reconeguts per ambdós anticòssos son diferents i que l'antigen reconegut per el 93-4D6 es d'aparició previa al reconegut per el 93-3B1. Que els antigens reconeguts siguin diferents es veu recolçat per els resultats obtinguts amb la tècnica del DOT sobre línies cel·lulars B (taula 3), per la tècnica del Western blot es detecten amb el A.M. 93-3B1, 3 bandes a 33,35 i 41 KD de les cèl·lules Raji, mentre que amb el A.M. 93-4D6 no es consegueix banda a partir de les cèl·lules d'un síndrome limfoproliferatiu que havia estat positiu per la tècnica del DOT (taula 3). Per la tècnica del Western blot no es pot determinar si les bandes detectades corresponen a antigens de superfície ó citoplásmics, ja que el sobrenadant utilitzat com a font d'antigen en aquesta tècnica conté antigens de membrana i citoplasmics.

Els experiments de modulació (taula 4) demostren que els antigens detectats per ambdós A.M. son diferents ja que no s'observà inhibició de la fluorescència produïda per un dels anticossos per pre-incubació amb l'altre anticòs i viceversa.

Els experiments per determinar l'efecte dels A.M. sobre la proliferació de les cèl.lules B induït per el Pokeweed mitogen ó per el mitja condicionat (que conté factor de creixement de les cèl.lules B) demostraren: l'absència d'efecte mitogénic dels dos A.M. quan s'utilitzaben sols i que ambdós A.M. provocaven una disminució de la proliferació cel.lular induïda per el Pokeweed mitogen i per el Mitja condicionat quan eren utilitzats a elevades concentracions (fins una dilució de 1/100).

La reactivitat dels 2 A.M. sobre cèl.lules leucèmiques son encara insuficients per extreure conclusions sobre el moment de aparició de cada un dels antigens detectats, també ho son les dades de l'acció dels A.M. sobre la proliferació de les cèl.lules B induïda per mitógens i mitja ric en factor de creixement de les cèl.lules B, per tal determinar si aquests antigens porten a terme un paper en el funcionalisme de la cèl.lula B. Finalment manquen les dades de immunoprecipitació SDS-PAGE i autorradiografia per tal de conèixer quins antigens son precipitats de la superfície de la cèl.lula B per cada un dels A.M. Aquests estudis son portats a terme en la actualitat al nostre laboratori.

Aquest treball s'està portant a terme gràcies a l'ajut:

"Ayuda para la Investigación del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, exp.nº 82/64.

BIBLIOGRAFIA

Kohler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:397-399

Vilella R. 1983. Aplicaciones clínicas de los anticuerpos monoclonales. Medicina Clínica 80:11, 509-511

Vilella R. et al. 1982. Eficacia de la metodología de hibridomas para el estudio de antígenos de superficie de linfocitos T y B humanos. Inmunología 1:2, 58-64

Vilella R. et al. 1983. Monoclonal antibody against HLA-Aw32+A25. Is HLA-Aw32 an allele with no unique antigenic determinant. Hum. Immunol. 6, 53-62

Vilella R. et al. 1984. An antiplatelet monoclonal antibody that inhibits ADP and epinephrine-induced aggregation. Thromb. Haemostas (Stuttgart) 51(1) 93-96

Kennett R.H. 1981. Enzyme-linked antibody assay with cells attached to polyvinyl chloride plates in: Monoclonal antibodies Hybridomas: a new dimension in biological analyses (R.H. Kennet, T.J. McKearn and K.B. Bechtol. edit) Plenum Press. New York and London 376-377.

Hawkes R. et al. 1982. A Dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem. 119:142-147

Towbin H. et al. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354.

Reinherz E.L., et al 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell 30: 735-743