

Anàlisi de subpoblacions en el procés de maduració de  
l'afinitat en ratolins A/J immunitzats amb KLH-ARS.

A.Gayà, A.Nieto, C.Moreno, C.Muñoz, J.Vives.  
Hospital Clínic i Provincial. Servei d'Immunologia.  
Villarroel, 170. Barcelona-36

Abstract

Affinity maturation in KLH-ARS immunized A/J mice:  
subpopulation analysis.

Anti-hapten antibodies produced during the immune response exhibit a wide distribution of affinity constants showing several antibody subpopulations of different affinity in the same serum.

Evolution of these subpopulations during affinity maturation was followed using an hapten-inhibition ELISA designed in our laboratory. Immune response to arsonate (Ars) in A/J mice immunized with keyhole lymphot hemocyanin copulated with Ars (KLM-Ars) was used as model system.

An average affinity constant ( $K_m$ ) increase was observed from primary to secondary response and during the latter, showed that when id-1A3 percentage increased the percentage of  $aK=10$  L/m subpopulation also increase being not related to the increase in anti-Ars antibody concentration. Five subpopulations of different affinity could be detected whose relative concentrations changed during the immune response exhibiting a process where subpopulations of lower affinity were substituted by those of higher affinity when time after immunization increased. This substitution process explains the observed  $k_m$  increase. An idiotype (1A3) defined by a monoclonal anti-Ars antibody ( $a_k=4 \times 10^6$  L/M) was detected in all mice and the analysis of its evolution during secondary response. Nonetheless regulation of affinity maturation by idiotypic mechanisms could not be concluded from there results.

## Introducció.

Es un fet conegut que els anticossos anti-hapte són heterogenis pel que fa a l'afinitat per el determinant antigènic i, en un sèrum immune, es poden distingir així diverses subpoblacions d'anticossos amb diferents afinitats per l'antigen (Eisen i Siskind 1964). Però la determinació experimental de la distribució de les subpoblacions amb diferents afinitats es complexe. Werblin i Siskind (1972) va desenvolupar un metode iteratiu de generació de distribucions per ordinador de tal manera que les afinitats mitjanes calculades a partir d'aquestes distribucions s'aproximessin el més possible a les dades experimentals obtingudes per diàlisi d'equilibri. Werblin i cols (1973) van identificar diferents patrons de distribució de subpoblacions durant el procés d'immunització. A més a més s'ha demostrat que durant el desenvolupament de la resposta immune l'afinitat dels anticossos per el determinant haptènic incrementa progressivament (Eisen i Siskind 1964). Aquest fenomen es denomina "maduració de la resposta immune". La seva importancia radica en el fet que l'eficacia de la immunitat humoral depen en gran part o potser totalment de l'afinitat de l'anticòs per l'antigen, més que no de la quantitat d'anticòs produït.

La disminució progressiva de la concentració d'antigen a mesura que es desenvolupa la resposta determinaria la estimulació selectiva de les clones productores d'anticossos d'alta afinitat (Siskind i Benacerraf 1969). Basant-se en la teoria de la regulació idiotípica de la resposta immune (Jerne 1974) y contant amb l'existència d'uns idiotips presents a tots els

individus d'una mateixa soca un cop immunitzats amb alguns antigens determinats, es va pensar que les interaccions idiotip anti-idiotip podrien ser les responsables d'aquesta maduració. Les investigacions de nombrosos autors, però ens permeten considerar que la intervenció de la regulació idiotípica és un fet més accidental que no pas avantatjós. Per exemple els treballs de Kapsalis i cols (1976), Conger i cols (1981) i Sigal (1983) demostren que en el sistema A/J:ArS els anticossos anti ArS de major afinitat no són precisament els portadors de l'idiotip principal (CRI). A més a més en altres sistemes idiotípics la dominància per part de l'idiotip principal es major al principi de la resposta i disminueix quan aquesta progressa. Així doncs la relació entre la regulació idiotípica i la maduració de l'afinitat no està ben definida, el menys en l'aspecte experimental, ja que existeix un model teòric (Herzenberg i cols 1980) que concedeix un paper primordial a les interaccions idiotip anti idiotip i deixa l'antigen en segon terme.

En el present treball hem analitzat la distribució de subpoblacions durant la maduració de l'afinitat a la resposta secundària de ratolins A/J en front de l'hapté Arsenat (ArS). Hem comprovat que tant l'aparició de noves subpoblacions d'anticossos com el canvi de les proporcions relatives de les diferents espècies moleculars presents a la població total són responsables de les variacions de l'afinitat mitjana.

Per analitzar la regulació idiotípica de la maduració de l'afinitat hem estudiat un idiotip (1A3) que apareix durant la resposta a l'Ars de tots els ratolins A/J. Aquest idiotip, que no té relació amb l'idiotip principal d'aquest sistema, experimenta un augment de la seva concentració durant el procés de maduració de l'afinitat, i per tant pot ser un instrument útil per estudiar l'intervenció de la regulació idiotípica en la maduració de l'afinitat.

#### Material i Mètods.

**Animals.**- Es van utilitzar ratolins A/J procedents d'OLAC LTD (Oxon, U.K.) i mantinguts en el nostre estabulari.

**Antigens i immunització.**- Per la conjugació de l'àcid arsanilic (Fluka, A.G.) amb les proteïnes KLH (Calbiochem Behring Corp, La Jolla, CA) i BSA (Merck Darnistad, FRG) es va utilitzar el mètode de Nisonoff (1967). Es van administrar 0,2 ml/ratolí d'una emulsió preparada amb una solució de KLH-Ars i d'adjuvant complet de Freund (Gibco, Grand Island, NY) en proporció 1:1. Es van realitzar extraccions periòdiques per via retroorbital. L'anti sèrum anti-idiotip es va preparar immunitzant un conill amb el monoclonal 1A3 i es va absorbir amb immunoglobulines normals de ratolí.

ELISA.- Les tècniques d'ELISA utilitzades en el present treball han sigut descrites en una altre publicació (Nieto et al 1984). Breument, per a la determinació de la concentració d'anticossos anti-Ars es van sensibilitzar plaques de poliestiré (Dynatech M-129-B, Swizertland) incubant 0,1 ml/pouet d'una solució de BSA-Ars (10ug/ml) preparada amb tampó carbonat-bicarbonat 0,1M pH=9,6 durant tote la nit, i es van bloquejar la resta de llocs actius amb PBS-T-BSA (0,05% Tween 20 i 1% BSA en PBS). Després de rentar, es van incubar els serums immunes diluïts amb PBS-T-S(0,2ml/pouet) 3h a TA. Un cop rentades novament es van incubar tota la nit a 4 C amb una dilució adequada d'antisèrum de conill anti-IgG de ratolí, conjugat a peroxidasa (Nordic, Tilburg, the Netherlands). L'activitat enzimàtica es va determinar segons la tècnica de Ng(1980). Com estandard es van utilitar anticossos anti-ARS purificats per cromatografia d'afinitat. Tots els resultats es van expressar en ug/ml d'aquest estandard. Per a determinar la concentració i l'afinitat de les subpoblacions d'anticossos, les plaques es van sensibilitzar amb diferents concentracions de BSA-Ars (0,03- 0,1-0,5-1-10 ug/ml). Els serums es van incubar amb presència de diferents concentracions de tirosina-Ars ( $10^{-3}$  M -  $10^{-8}$  M). Els percentatges de cada subpoblació es van calcular a partir dels increments d'anticòs (ng/ml) enganxat a concentracions succesives de l'antigen. La constant aparent d'afinitat d'una subpoblació es  $1/(\text{concentració d'hapté necessaria per obtenir el 50\% d'inhibició per una concentració d'A})$ . La determinació de la concentració de l'idiotip 1A3 es fonamental en el grau d'inhibició de l'unió de l'anti-idiotip i l'idiotip (1A3 en fase sòlida) obtingut amb dilucions succesives dels serums immunes.

## Resultats

Tècnica de determinació de sub poblacion per ELISA.

A la figura 1 es presenta un esquema de la tècnica. Es pot observà que a concentracions baixes d'Ag solament els anticossos d'alta afinitat son capaços d'enganxar-se.

L'inhibició amb hapté lliure de la reacció Ag-Ac ens permet determinar la constant aparent d'afinitat de cada sub població.

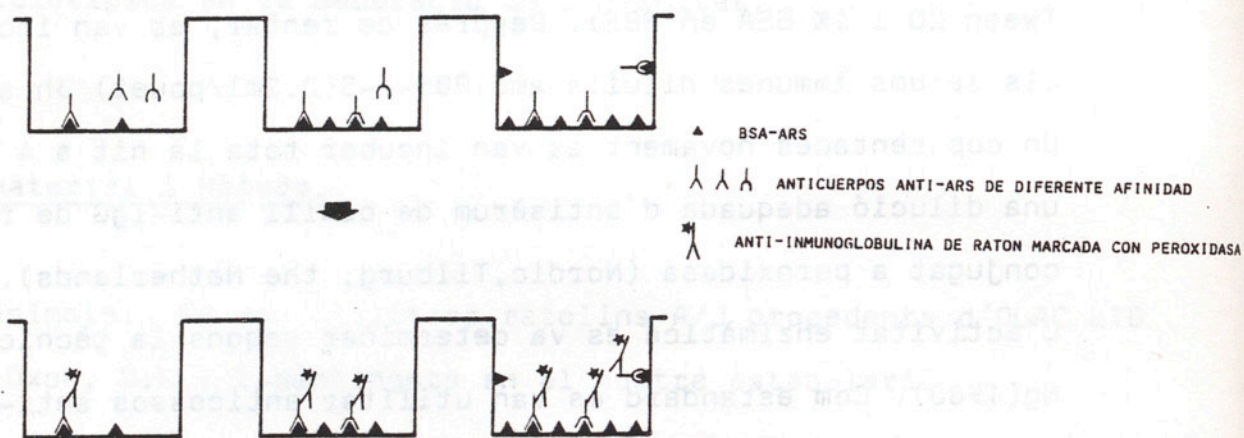


Fig.1.- Esquema de la tècnica de determinació de la distribució de sub poblacions. L'afinitat dels anticossos es representa amb la forma de la regió combinant i amb la complementareïtat d'aquesta per l'antigen en fase sòlida.

Maduració de l'afinitat.

A la taula 1 es presenten les concentracions d'anticossos i les  $K_m$  (mitjana ponderada de les afinitats de les diferents sub poblacions). Els logaritmes de les  $K_m$  es grafiquen a la figura 2, on es pot observar l'augment de l'afinitat durant la resposta, més accentuat al pasar de la primària a la secundària. A la taula 1 es comprova que les variacions de la  $K_m$  i de la concentració d'anticossos son independents.

Dias	Ac anti-Ars ( $\mu\text{g/ml}$ )	Km ( $\times 10^5$ ) (L/M)
45	453 $\pm$ 244	.18 $\pm$ .08
20	15250 $\pm$ 4013	2.1 $\pm$ 1.7
36	11440 $\pm$ 1966	7.5 $\pm$ 12.6
50	11360 $\pm$ 2539	11.7 $\pm$ 18.6
70	6320 $\pm$ 4191	2.9 $\pm$ 1.8

Taula 1.- Concentració d'anticossos anti Ars i valor de la constant d'afinitat mitjana (Km) a la resposta primària (dia 45) i secundària (dies 20, 36, 50, 70) d'un grup de ratolins A/J immunitzats amb 500  $\mu\text{g}$  de KLH-Ars i reimmunitzats amb 50  $\mu\text{g}$  del mateix antigen.

Mentre que la màxima concentració d'anticossos s'aconsegueix el dia 20 de la resposta secundària, la Km segueix augmentant fins el dia 50. En el dia 70 l'afinitat disminueix, com s'ha descrit amb d'altres models experimentals (Doria i cols 1972, Tasiaux i cols 1978, Werblin i cols 1973, Goidl et al 1975, Pini et al 1980). Aquest fet serà comentat al analitzar la cinètica de les diferents subpoblacions.

Expressió de l'idiotip 1A3 durant la resposta.

Aquest idiotip apareix ja a la resposta primària, però a nivells inferiors a 800  $\mu\text{g/ml}$ . Durant la resposta secundària el percentatge de l'id-1A3 augmenta progressivament (fig.3) i el dia 70 és detecta a tots els ratolins, amb un percentatge que varia de 0,01% a 0,4%.

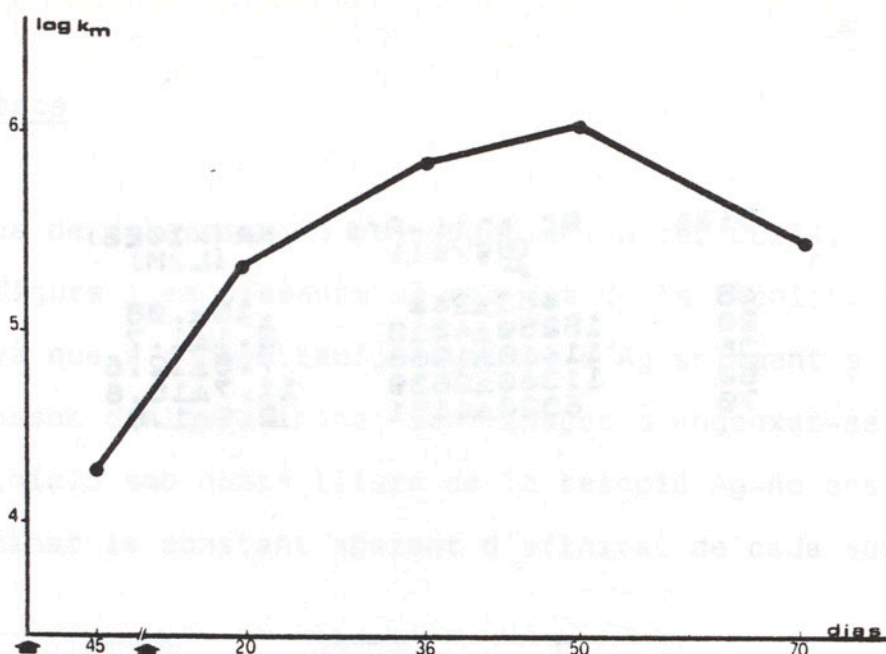


Fig. 2.- Gràfica de la variació de la Km durant la resposta. Les administracions d'antigen s'indiquen amb fletxes. Els punts representen la mitjana de 5 ratolins analitzats individualment.

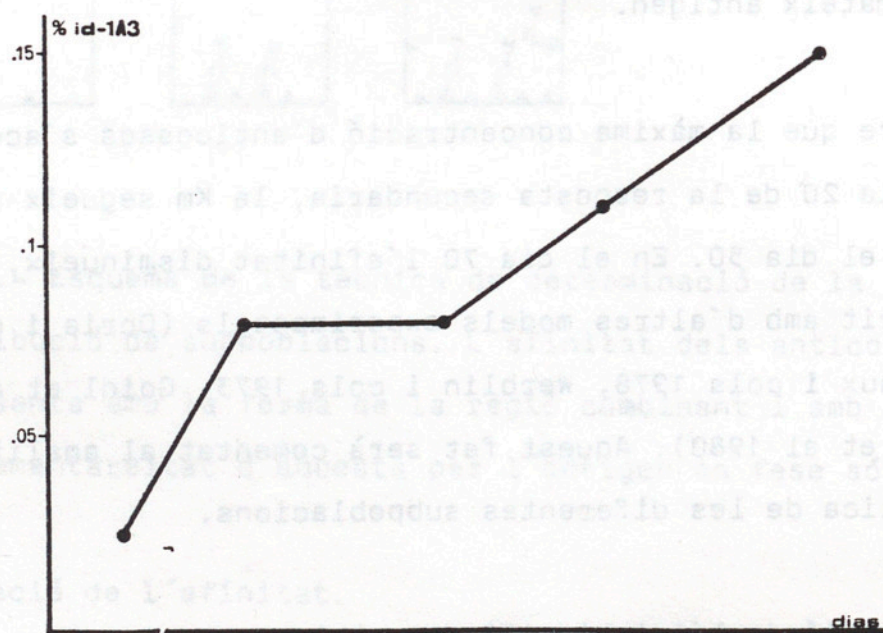


Fig. 3.- Variació del percentatge d'idiotip 1A3 durant la resposta. Els valors s'expressen en percentatge de la concentració de l'idiotip 1A3 respecte a la concentració total d'anticossos anti-Ars. D'aquesta manera les dades comparatives, independentment de l'intensitat de la resposta.



Anàlisi de les subpoblacions durant la maduració de l'afinitat. A la figura 4 es pot observar l'evolució de les subpoblacions de diferent afinitat durant la resposta. A la primària no apareixen subpoblacions amb afinitat superior a  $10^4$ . Posteriorment, al reimmunitzar apareixen subpoblacions d'afinitat més elevada ( $10^5$  i  $10^6$ ). Coincidint amb la disminució de les de menys afinitat ( $10^3$  i  $10^4$ ) endavant, es detecten subpoblacions de  $10^7$ , que desapareixen el dia 70, el que ens permet d'explicar la disminució de l'afinitat descrita a la figura 1. Es comprova que totes les subpoblacions estan presents durant la resposta, modificant-se únicament la seva proporció relativa. Al comparar les figures 3 i 4 es pot observar que el percentatge de l'idiotip 1A3 evoluciona de manera semblant a la subpoblació de  $10^5$ , que correspon a l'afinitat del monoclonal 1A3.

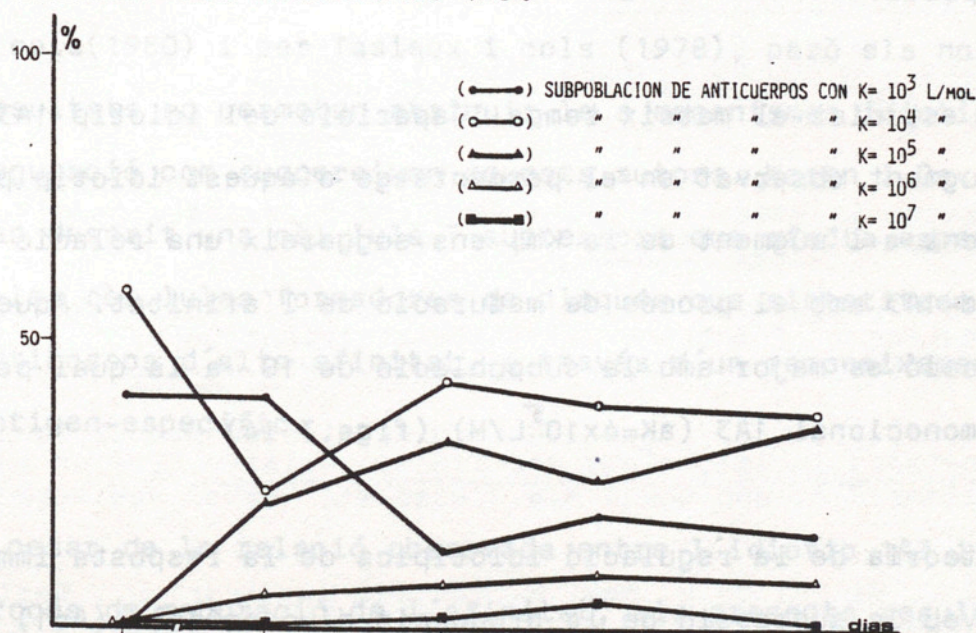


Fig.4.- Variació del percentatge relatiu de les diferents subpoblacions durant la resposta.

## Discussió.

En el present treball hem analitzat la maduració de l'afinitat estudiant la cinètica de les diferents subpoblacions d'anticossos durant la resposta primària i secundària. Hem comprovat (fig.4) de manera experimental que les variacions de l'afinitat del serum són degudes, principalment, a variacions dels percentatges relatius de les diferents subpoblacions així com també a l'aparició de noves subpoblacions, tal com van proposar Werblin i cols (1973). A la mateixa figura es pot comprovar que les subpoblacions d'alta afinitat encara que no es presenten en percentatges importants, tenen un efecte determinant sobre l'afinitat mitjana del serum. A més es pot observar que totes les subpoblacions estan presents durant la resposta.

Hem estudiat al mateix temps l'aparició del idiotip 1A3. L'augment observat en el percentatge d'aquest idiotip paral·lelament a l'augment de la Km, ens suggereix una relació de l'id-1A3 amb el procés de maduració de l'afinitat. Aquesta relació es major amb la subpoblació de 10 a la qual pertany el monoclonal 1A3 ( $aK=4 \times 10^5$  L/M) (figs.3 i 4)

La teoria de la regulació idiotípica de la resposta immune preveu la supressió de la producció d'un anticòs (Ac1) degut a que l'augment de la seva concentració estimula la síntesi d'anticossos dirigits contra el seu idiotip (anti id-Ac1). Però a la fig.4 es comprova com la subpoblació de 10<sup>7</sup> desapareix el dia 70 sense haver aconseguit nivells per sobre del 10%, mentre que d'altres subpoblacions amb percentatges més elevats no experimenten disminució. Aquesta diferència de comportament es podria atribuir a una menor heterogeneïtat

idiotípica de la subpoblació de  $10^7$ . Això faria que els idiotips presents a les altres subpoblacions s'expressessin en percentatges inferiors als de la pròpia subpoblació a diferència de la de  $10^7$ . D'aquesta manera, encara que existeix un procés actiu de supressió de determinats idiotips i d'aparició d'altres, no seria possible apreciar l'efecte sobre el conjunt de la subpoblació. En canvi, en una subpoblació més homogènia ( $10^7$ ) qualsevol variació d'un dels idiotip que l'integren tindria una repercussió més important sobre el total de la subpoblació. No obstant això al analitzar un dels idiotips de la subpoblació de  $10^5$  (id-1A3), veiem com augmenta progressivament i en cap moment es detecta una disminució atribuïble a mecanismes idiotípics de regulació. La major variabilitat en el percentatge de les subpoblacions d'afinitat més alta, durant la resposta, ha sigut observada també per Pini i cols (1980) i per Tasiaux i cols (1978), però els nostres resultats no permeten atribuir-la a mecanismes idiotípics de regulació com suggereixen aquests autors. Waren i Davie (1977) han descrit una cèl.lula T supressora que afecta especialment a les cèl.lules formadores de plaques que sintetitzen anticossos d'alta afinitat, a través d'un reconeixement antígen-específic.

A pesar de la relació observada entre l'idiotip 1A3 i el procés de maduració de l'afinitat, els presents resultats no permeten deduir una intervenció de mecanismes idiotípics sobre la regulació d'aquest procés. Actualment, al nostre laboratori, estem desenvolupant una altra via experimental d'aproximació que es basa en la modulació de la maduració de l'afinitat mitjançant l'administració d'anti sèrums anti-idiotip.

### Bibliografia.

Conger J.D., Lewis G.K., Goodman J.W. (1981). Idiotypic profile of an immune response. I contrast in idiotypic dominance between primary and secondary responses and between IgM and IgG plaque-forming cells. J.Exp.Med. 153: 1173.

Doria G., Schiaffini G., Garavini M., Mancini C. (1972). The rise and fall of antibody activity at the level of single immunocytes. J.Immunol. 109:1245.

Eisen H.N., Siskind G.W. (1964). Variations in affinities of antibodies during the immune response. Biochemistry 3: 996.

Herzenberg L.A., Black S.J., Herzenberg L.A. (1980). Regulatory circuits and antibody responses. Eur.J.Immunol. 10:1

Jerne N.K. (1974). Towards a network theory of immune system. Ann.Immunol.Inst.Pasteur 125c:373.

Kapsalis A.A., Tung A.S., Nisonoff A. (1976). Relative combining affinities of anti-p-azophenylarsenate antibodies bearing a cross reactive idiotype. Immunochemistry 13:783.

Ngo T.T., Lenhoff H.M. (1980). A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-complexed reactions. Analyt Biochem. 105:389.

Nieto A., Gayà A., Jansa M., Moreno C., Vives J. (1984). Direct measurement of antibody affinity distribution by hapten-inhibition enzyme immunoassay. Mol.Immunol. -en prensa-

Nisonoff A. (1967). Coupling of diazonium compounds to proteins In methods in Immunology and Immunochemistry. (Edited by Williams C.A. and Chase M.W.). Academic Press. New York. Vol.1: 120.

Pini C., Di Felice G., Neri R., Mancini C., Vicari G., Doria G. (1980). Oscillations of IgM antibody affinity at the level of single immunocytes. J.Immunol. 125: 1349.

Sigal N.H.(1983). Regulation of azophenylarsonate-specific repectoric expression II Fine specificity and isotype heterogeneity of anti-arsenate antibodies. J.Immunol.131: 1889

Tasiaux N., Leuwenkroon R., Bruyns C., Uzbain J.(1978). Possible occurrence and meaning of lymphocytes bearing auto anti-cohotypic receptors during the immune response. Eur.J.Immunol. 8:464.

Siskind G.W., Benacerraf B.(1969). Cell selection by antigen in the immune response. Adv.Immunol. 10: 1.

Warren R.W., Davie J.M.(1977). Antigen mediation of a late-acting suppressor T-cell activity. J.Exp.Med. 146:1627

Werblin T.P., Kim Y.T., Quagliata F., Siskind G.W.(1973). Studies on the control of antibody synthesis III.Changes in heterogeneity of antibody affinity during the course of the immune response. Immunology. 24:477.

Werblin T.P., Siskind G.W.(1972). Distribution of antibody affinities: technique of measurements. Immunology 9:987.