

Establiment i caracterització d'una línia limfoblastoide de cèl.lules B d'aparició espontània

T.Gallart, J.Solé, I.Rojo, F.Lozano, I.Tejada^o, S.Woessner^{oo}, J.Vives

Servei d'Immunologia. Unitat d'Estudi i Consell Reproductiu.^o
Hospital Clínic i Provincial. Facultat de Medicina.^{oo}
Villarroel,170, 08036 Barcelona. Laboratori d'Hematologia del
Hospital de la Creu Roja de Barcelona.

Abstract

Stablishment and characterization of a "spontaneous" B cell lymphoblastoid line

A B cell lymphoblastoid line (Carmen) was spontaneously derived from peripheral blood lymphocytes from a patient with a long-standing clinically benign adult T-cell lymphocytosis with an unusual phenotype, the T cells exhibiting features of large granular lymphocytes and positivity for T1, T11, T3, T4 and T8 antigens (Gallart et al 1983; Lancet ii:769-770). Continuously growing cell line was achieved after 4 weeks of initiation of culture in RPMI 1640+10% FCS (2.10 ml) without the aid of Epstein-Barr virus-containing supernatants (EBV). Cells grew as visible large aggregates in stationary suspension cultures. At cell concentration between $1 - 2.5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ the doubling time was 48-72h. with a maximal cell density of $0.8 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$. Ultrastructural examination did not disclose viral particles. Structural chromosome abnormalities were not found. Cell surface analysis with a wide panel of monoclonal antibodies (MoAb) showed a phenotype of B cells since they were B1, B-C1, B4, DR positive, and negative for MoAb defining T-cell antigens (T1, T11, T3, T4, T8, T6) and for other MoAb (OKM1, Mo2, Leu11) recognizing myeloid/NK cells antigens. In addition, surface IgM was present in 24% of cells and surface kappa chains in 16% of them. Surface delta, gamma, alpha and lambda chains were not detected; 15% of cells contained cytoplasmic IgMK. Furthermore immunoglobulin measurement (ELISA) in the supernatant of cultures revealed cells secreted only IgMK ($2-3 \mu\text{g ml}^{-1}$ by 0.5×10^5 cells/3 days). These results were obtained three-five months after stablishment. Thus Carmen line expressed monoclonality from the beginning while B cell lymphoblastoid lines carrying EBV-genome, regardless they are "spontaneous" or in vitro-transformed by EBV, are polyclonal for 1-2 years of continuous culture.

En condicions fisiològiques les cèl.lules del sistema immune presenten un gran heterogenitat: diferents llinatges (limfòcits T, B, cèl.lules auxiliars, cèl.lules K/NK), diferents estadis diferenciats i subtipus funcionals dintre de cada llinatge, i a més a més la gran diversitat d'estructures específiques per l'antigen, distribuïdes de forma clonal. En conseqüència l'estudi de les interaccions entre cèl.lules T i B, via factors solubles o via contacte cel.lular, es troba limitat pel fet de que aquesta heterogenitat fa molt difícil de conseguir subpoblacions cel.lulars pures. En canvi les cèl.lules T i B tumorals son expansions proliferades d'una sola clona "aturada" a una determinada etapa de la via diferenciativa i poden ser considerades com una purificació "ab initium" d'aquesta clona; això les converteix en models operatius per l'estudi de la diferenciació limfoide normal (Lanier et al 1982). Una variant d'aquest mateix enfoc es emprar línies de cèl.lules T i B tumorals adaptades a un creixement permanent in vitro. (Nilsson 1983). Actualment es també possible utilitzar cèl.lules T normals clonades i fetes créixer in vitro amb factor de creixement de les cèl.lules T o IL2. Tanmateix pel que fa a les cèl.lules B normals, de moment, no hi ha altre medi pràctic d'immortalitzar-les que infectant-les in vitro amb virus Epstein-Barr (EBV). (Nilsson 1979, Brown i Miller 1982). Aquestes línies tenen un gran interès com a models operatius per l'estudi de l'activació i diferenciació de les cèl.lules B normals (Muraguchi et al 1981; Kishimoto et al 1978); a més a més recentment han servit per demostrar en cèl.lules B humanes l'existència d'un sistema autocri el qual probablement també actuaria sobre cèl.lules B normals (Gordon

et al 1984). També són una alternativa a la tècnica de hibridomes per tal d'obtenir línies permanents que secretin immunoglobulines d'especificitat coneguda si les cèl.lules B abans de ser infectades és seleccionen per la seva reacció amb l'antigen (Steinitz, 1977). En aquesta comunicació presentem l'establiment i caracterització d'una línia humana limfoblastoide de cèl.lules de cèl.lules B derivada de forma espontànea sense infecció in vitro per EBU, a partir de la sang perifèrica d'un pacient que presentava una síndrome limfoproliferativa de cèl.lules T de fenotip atípic (Gallart et al 1983).

Material i Mètodes

Els cultius cel.lulars van ser fets en flascons (Nunc) de 25ml i 250ml en medi complet constituït per RPMI 1640 (Gibco) enriquit amb 1% de glutamina (Gibco) i amb 10% de serum de ternera fetal (Gibco) al qual es va afegir gentamicina (50µg/ml) i 2.5 µg/ml de Fungizone (Flow Laboratories). La quantificació de immunoglobulines (Igs) en el sobrenatant dels cultius és va fer per un Elisa ja descrit (Gallart et al 1985) capaç de detectar fins a 7 i 10 ng/ml de IgG i IgM respectivament; també es va emprar aquest mètode per determinar el tipus de cadenes lleugeres kappa o lambda de les immunoglobulines secretades al medi de cultiu. La detecció de immunoglobulines de superfície (SIg) i intracitoplasmàtiques va ser feta per immunofluorescència directa. (Gallart et al 1985). La detecció d'antigens de membrana mitjançant anticossos monoclonals (AcMo) és va realitzar per immunofluorescència indirecta tal com ja ha estat descrit (Anegón et al 1984). La lectura de les cèl.lules positives va ser feta en un FACS Analyzer (Becton Dickinson) o en un microscopi de fluorescència

Leitz. L'estudi del cariotip va ésser fet segons les tècniques descrites per Summer et al 1971, i Junis 1976. Els anticossos monoclonals emprats es detallen a la Taula 2. Alguns van ésser produïts en el nostre laboratori (Vilella et al 1982; Anegón et al 1984; 1st International Workshop on Human Leukocyte Differentiation 1982; 2nd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens 1984) i d'altres van ésser comprats a Coulter i Becton Dickinson).

Resultats

1. Establiment de la línia, característiques del creixement i morfologia

La línia va ésser derivada de la sang perifèrica d'un pacient de 55 anys amb una limfocitosi d'evolució benigna que des de fa més de dotze anys presenta comptatges entre 20.000-27000 limfòcits per mm^3 , el 98% dels quals han estat sempre constituïts per limfòcits T de fenotip atípic doncs co-expressen els antigens T4 i T8 a més a més dels T1, T3 i T11 essent negatius pel T6 i T10 i alhora presenten morfologia de limfòcits grans granulars (Gallart et al 1983).

Els limfòcits de sang perifèrica totals van ser posats a cultivar en medi complet a una concentració de $2 \cdot 10^6$ ml en flascons de 25 ml en una incubadora a 37 C en una atmosfera humida d'aire amb 5% de CO_2 sense afegir-hi cap mitogen ni medi condicionat amb factors de creixement ni tampoc sobresurants de línies cèl.lulars productores de virus Epstein-Barr (EBV). Després de 3-4 setmanes d'iniciat el cultiu les cèl.lules eren capaces de créixer in vitro de forma continuada. Creixien en suspensió formant agregats molt gruixuts, fins i tot visibles. Les cèl.lules eren rodones amb variacions del tamany dintre d'elles essent la majoria de gran diàmetre. Un petit percentatge d'elles eren multinucleades. Quan ja portaven més

de 3 mesos en cultiu continuat és van fer durant 1 mes experiments sistèmatics de comptatge de les cèl.lules en diferents temps i a diferents concentracions per tal de determinar el temps de duplicació i la densitat òptima i màxima de creixement. Cada una de les condicions es va estudiar per quadruplicat doncs el creixement agregats tan grossos dificulta la exactitud en els comptatges cel.lulars. Es va poder determinar que a concentracions entre 1 i $2,5 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$ les cèl.lules és duplicaven entre les 48-72h. A la concentració de $5 \cdot 10^5$, el nombre de cèl.lules només incrementarà en un 10-20% passats 3-4 dies, i el nombre de cèl.lules mortes incrementava. Per sota de concentracions de $4 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1}$, les cèl.lules apenes creixien i moltes d'elles morien. Es pot concluir doncs que la densitat màxima es troba a $0,8 \cdot 10^5$ cèl.lules $\times \text{ml}^{-1}$. Passats més de cinc mesos, les cèl.lules tant les congelades a diversos moments com les que han estat cultivant-se continuament segueixen posseint aquestes mateixes característiques de creixement.

Al microscopi electrònic de transmissió la majoria de les cèl.lules apareixen com la que es mostra a la figura 1., amb nuclis de forma irregular i nucleols prominents; en el citoplasma monorribosomes e inclusions lipídiques; no és van observar partícules virals.

2. Estudi cromosòmic

De 100 mitosis estudiades, el 93% eren diploides; en el 7% restant es va observar hiperdiploidia (1% = $8n$ i 6% = $4n$). No és van detectar anomalies estructurals, (ni inversions de bandeig ni translocacions) com es pot veure en el cariotip que es mostra a la fig 2.

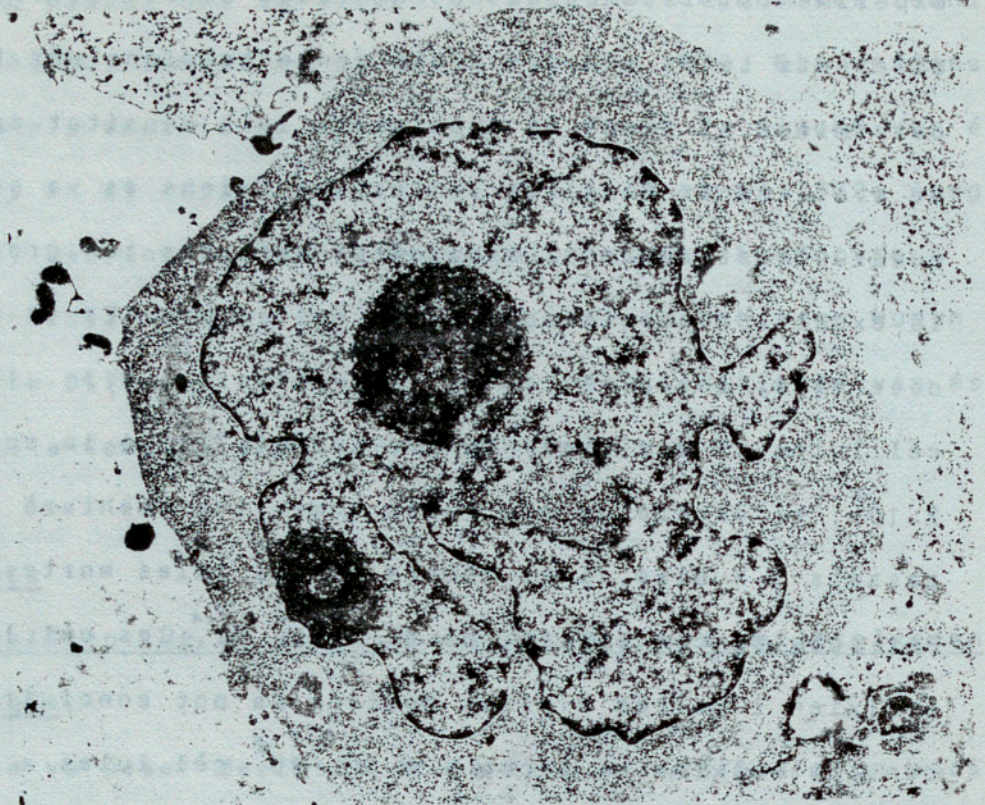


Fig. 1 Una cel.lula de la linea Carmen. Observació al microscopi electronic de transmissió(x 6900)

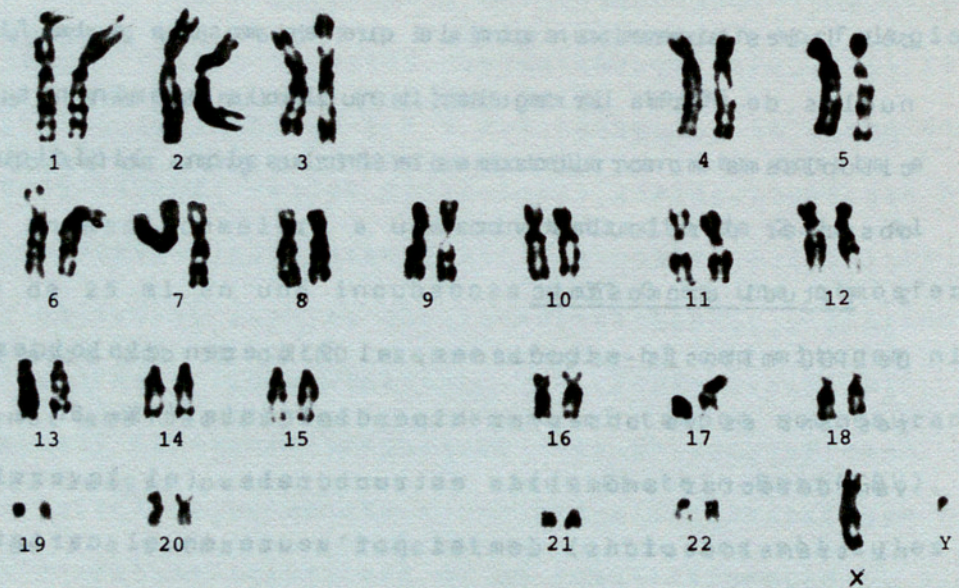


Fig.2 Cariotip linea Carmen (Bandes G)

3. Marcadors limfòcitaris i producció d'immunoglobulines (Igs)

Entre els tres-cinc mesos després de l'establiment de la línia, les cèl.lules es van analitzar amb una amplia bateria d'anticossos monoclonals i d'altres marcadors limfocitaris per tal d'esbrinar el llinatge i estadi diferenciatiu. Com és pot veure a la Taula 1, el fenotip d'aquestes cèl.lules correspon al d'una cèl.lula B doncs és positiva per a antigens DR (productes controlats pel locus D del sistema HLA), així com pels antigens específics de cèl.lules B, com són ara B1, B4 i B-C1, i el fet de ésser negativa per tots els antigens específics de cèl.lules B com són ara T1, T3, T4, T8, T11 i T6 i també negativa per antigens de cèl.lules mieloides (OKM1, Mo2, Leu7). A més a més un 40% de les cèl.lules presentaven Igs de superfície, que eren de classe IgM i tipus kappa (Taula II). A més a més, un 20% de les cèl.lules tenien immunoglobulines intracitoplasmàtiques IgMK. No es van detectar cèl.lules amb cadenes gamma, alfa, delta ni cadenes lleugeres lambda intracitoplasmàtiques (Taula II). D'altra banda les cèl.lules eren capaces de secretar IgMK, al medi de cultiu, IgMK. (Taula III) Això es va comprovar en diferents dates en el sobrenadant corresponent a cultius de tres dies amb diferents concentracions inicials de cèl.lules. Segons les dades presentades a la Taula III, es pot establir que la línia Carmen produeix entre 2 i 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ per 5×10^5 cèl.lules durant 3 dies. També es va comprovar que les cèl.lules de la línia Carmen expresen antigens classe I (antigens codificats pels loci ABC del sistema HLA) pel mètode de microcitotoxicitat amb complement segons tècnica del NIH, demostrant un haplotip idèntic al dels limfòcits de la sang perifèrica del pacient.

TAULA I. Reactivitat de la linea "Carmen" (% de cel.lules positives) amb AcMo definits d'antigens de cèl.lules B, cèl.lules T i cèl.lules de la serie mieloide/NK en diferents dates després de l'establiment de la linea.

AcMo	"Cluster of [‡] Differentiation"	Especificitat	Mes 2	Mes 4
B1	CD 20 ,p35	PanB específic	72	95
B-C1*	-----	PanB específic	n.f.	68
B-C2*	-----	PanB+granulòcits	20	2
B4	CD19 ,p95	PanB específic	60	55
EDU-1*		antígens DR	83	70
J5	CD10 p100	CALLA	0	0
FMC7	-----	Cèl.lules B força madures	0	0
T1(CRIS1)	[*] CD5, p 67	Pan T+subpoblació limfòcits B	0	0
T3(CRIS7) [*]	CD3, p19-29	Cèl.lules T madures	0	0
T4(EDU2) [*]	CD4, p55	Subpoblació T, induc- tores/cooperadores	0	0
T8	CD8, p32-33	Subpoblació T, supres- sors/citotòxiques	0	0
T11	CD2, p50	Pan T	0	0
T6	CD1, p45,12	Timòcits corticals	0	0
Mo2		Monòcits	0	0
OKM1		Monòcits/granulòcits	0	0
Leu7	CO03	Cèl.lules NK/K, granulòcits/monòcits/ subpoblació T subpoblació B	0	0

‡ Definites en el 1st and 2nd International Workshop On Human Leukocyte Differentiation Antigens ,Paris 1982 i Boston 1984 , respectivament

* Produïts en el nostre laboratori .

n.f.=no fet

TAULA II . Percentatge de cèl.lules de la linea Carmen amb immunoglobulines de superfície(SIgs) i intracitoplasmàtiques (CIgs) en diferents dates després de l'establiment de la linea.

data	SIgs							CIgs					
	Totals	mu	gamma	alfa	delta	kappa	Lambda	mu	gamma	alfa	delta	kappa	lambda
mes 2	40	n.f.	1	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
mes 4	49	24	0	0	0	16	0	15	0	0	0	16	0

n.f.= no fet

TAULA III. Concentracions de Igs en el sobresurant de cultius de cèl.lules de la linea Carmen a diferents concentracions

concentració inicial de cèl.lules (dies de cultiu)	IgM (ng.ml ⁻¹)	IgG (ng.ml ⁻¹)	cadena Kappa	cadena Lambda
3.10 ⁴ . ml ⁻¹ (3 dies)	87	0	++	neg
1.10 ⁵ . ml ⁻¹ (2 dies)	360	0	++	neg
1.5.10 ⁵ ml ⁻¹ (3 dies)	590	0	++	neg
5.10 ⁵ ml ⁻¹ (1 dia)	> 2400	0	+++	neg

Discussió

La línia Carmen es clarament una línia limfoide de cèl.lules B de caracter monoclonal pel que fa a la producció de Igs, i amb un fenotip de membrana corresponent a un estadi diferenciatu de limfòcit B immunocompetent. Hi havia un desequilibri en la presència de cadenes pesades mu i lleugeres kappa en la superfície de les cèl.lules, essent predominants les primeres. En leucèmies i limfomes de cèl.lules B de fenotip maduratiu equivalent al de la línia Carmen, freqüentment s'observa un desequilibri amb predomini de lleugeres. En canvi el fenomen vist amb Carmen també s'ha observat en d'altres línies limfoblastoides B, quan s'ha estudiat (Nilsson 1977). Cal remarcar que aquesta es la primera vegada que es descriu la derivació d'una línia de cèl.lules B a partir del limfòcits d'una síndrome proliferativa de cèl.lules T. Fins ara hem estat incapaços de demostrar la presència de l'antigen nuclear del EBV (EBNA) mitjançant un tècnica de fixació de complement i immunofluorescència (dades no dites) però molt probablement aquesta línia es portadora del EBV la qual cosa haurà d'esser demostrada per una tècnica més apropiada.

Les línies limfoides de cèl.lules B portadores del genoma del EBV (demostrable per la presència del EBNA) es poden classificar en dos grups (Nilsson 1977): a) les derivades de les cèl.lules B tumorals del limfoma de Burkitt (LB), limfoma amb el qual el EBV hi té una relació etiologica, i b) les derivades de limfòcits B normals infectats in vitro amb el EBV. Això es fàcil d'aconseguir quan s'empren limfòcits totals de sang de cordó umbilical; si s'utilitzen limfòcits totals de persones adultes el procediment pot resultar fallit si no s'eliminen abans els

limfòcits T, doncs aquests exerceixen algun tipus de control impedit la proliferació dels limfocits B infectats (Thorley-Lawsson et al 1977; Tsoukas et al 1981). Aquestes linees, l'inrevés de les derivades dels LB, no son neoplàsiques malgrat el seu creixement ilimitat; no tenen anomalies cromosòmiques i secreten immunoglobulines en quantitats semblants a Cramen pero de caracter policlonal, al menys durant els 1-2 anys de creixement. En canvi les derivades de LB son monoclonals des del principi i presenten translocacions cromosòmiques (8-14) des de l'inici. En el cromosoma 8 s'hi troba el locus del oncogen c-myc i en el 14 els dels gens que codifiquen les cadenes pesades de les Igs i la translocació comporta un intercanvi d'aquests locus. (Croce i Nowell, 1985). També s'han obtingut linees limfoblastoides de cel.lules B portadores del genoma del EBV de forma espontània sense realitzar un infecció in vitro amb aquest virus, i les seves característiques son semblants a les obtingudes amb la infecció in vitro. Es poden aconseguir amb facilitat a partir dels limfòcits totals de pacients en la fase aguda de la mononucleosi infecciosa (MI), una síndrome limfoproliferativa autolimitada causada per aquest virus; també n'han descrit algunes obtingudes de pacients sense MI sempre que siguin seropositius pel EBV, indicant una infecció primaria anterior (clínica o subclínica). Se n'han obtingut de pacients amb leucèmies i limfomes de cèl.lules B, però en aquests casos no es la clona neoplàsica la que prolifera in vitro sinó limfòcits B normals. També fins i tot se n'han obtingut de persones normals, pero la freqüència es extremadament baixa o nula si no s'empren sistemes especials de cultius amb gran quantitat de cèl.lules i a una gran densitat cel.lular i amb un dispositiu tipus cultiu d'organ com el descrit per Nilsson (1977).

La línia Carmen va ser establerta a partir de limfòcits totals dels quals només un 2% eren limfòcits B i no es van eliminar els limfòcits T. Va ser establerta amb més rapidesa fins i tot que quan es realitza una infecció in vitro amb EBV. Sembla raonable relacionar aquest fet amb les propietats funcionals i fenotípiques dels limfòcits T del pacient Car, els quals es caracteritzaven per co-expressar els antigens T4 i T8 junt amb els T1, T3 i T11 essent negatius pel T6 i T10 i la Tdt; a més a més presentaven morfologia de limfòcits grans granulars (LGL) la qual es creu que correspon a les cèl·lules NK (cèl·lules amb activitat "Natural Killer" (Orbaldo i Herberman, 1984)). Tanmateix aquests limfòcits no tenien cap activitat supressora ni NK sinó una potent activitat cooperadora per la producció de Igs per part dels limfòcits B (Gallart et al 1983; Gallart et al, manuscrit en preparació). Això ens va permetre concloure que la morfologia de LGL no necessàriament es restringida al les cèl·lules NK, conclusió que es reforça pel fet que aquest limfòcits co-expressaven T1, T3, T11, T4 i T8 un fenotip propi de timòcits tardans i que mai s'ha descrit en cèl·lules amb activitat NK; també la reforça la facilitat amb que s'ha derivat aquesta línia.

La línia Carmen pot ser una eina útil per posar de manifest antigens de membrana relacionats amb el process d'activació de les cèl·lules B que no s'expressen en cèl·lules B en repòs, i amb aquest objectiu s'han conseguit ja híbridsomes que produeixen aAcMo contra les cèl·lules Carmen, els quals estan en fase de clonació. També disposem d'experiments preliminars que suggereixen que la línia Carmen, com probablement tots aquests tipus de línies, sintetitzen un factor soluble que promou el seu propi creixement. (Gordon et al 1984).

Bibliografía

Anegón I., Vilella R., Gallart T., Cuturi C., Borche L., Milà J., Vives J. B-C1, B-C2, B-C3: Monoclonal antibodies against B-cell differentiation antigens 2nd International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. Boston 1984. Springer Verlag 1984 (in press)

Brown N.A., Miller G. 1982 Immunoglobulin expression by human B lymphocytes clonally transformed by Epstein Barr Virus. J.Immunol.128, 24-29

Croce C.M., Nowell P.C. 1985. Molecular Basis of Human B cell neoplasia. Blood, 65, 1-7.

Gallart T., Anegón I., Woessner S., de la Fuente R., Florensa L., Sans-Sabafren J., Vives J. 1983, J.Clinically benign adult T-cell chronic lymphocytosis with unusual phenotype. Lancet ii, 769-770

Gallart T., Bladé J., Martínez-Quesada J., Sierra J., Rozman C., Vives J. 1985, Multiple myeloma with monoclonal IgG and IgA of lambda type exhibiting under treatment a shift from mainly IgG to mainly IgD. Immunology 55, 45-57

Gordon J., Ley S.C., Melamed M.D., English L.S., Hugher-Jones N.C. 1984. Immortalized B lymphocytes produce B-cell growth factor. Nature 310: 145-147

Junis J.J., 1976, High resolution of human chromosome. Science 191, 1268-1270

Kishimoto T., Hirano T., Kuritani T., Yamamura Y., Ralph P., Good R.A. 1978, Induction of IgG production in human B lymphoblastoid cell lines with normal human T cells. Nature 271, 756-758.

Lanier L.L., Walker E.B., Richie E.R., Warner N.L. 1982. Murine hematopoietic cell tumors: models for analysis of cellular differentiation. A "B and T cell tumors". Ed Ellen S. Vitetta. UCLA Symposia on molecular and cellular biology. Vol. XXIV, pags. 29-42.

Martinez-Quesada J, Gallart T, Borche L, Vilella R, Solé J, Vives J. 1983 La digestión con pepsina de una IgG2b monoclonal de ratón anti-DR monomórfico no proporciona cantidades detectables de fragmentos F(ab')₂. Inmunología 2, 125-131.

Muraguchi A, Kishimoto T., Miki Y., Kuritani T., Kaieda T., Yoshizaki K., Yamamura Y., 1981. T cell replacing factor (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. J.Immunol. 127, 412-416

- Nilsson K., 1979. The nature of lymphoid cell lines and their relationship to virus A "The Epstein-Barr virus" Eds. Epstein MA., Achong B-G. págs 225-282. Springer-Verlag. Berlin, New York
- Nilsson K. 1983. Malignant Hematopoietic cell lines as models for studies of the biology of malignant lymphoproliferative diseases. A "Intercellular Communication in Leukocyte Function" Eds. Parker J.W., O'Brien R.L. pág.491-498. John Wiley and Sons 1983 Chichester, New York.
- Ortaldo J.R., Herberman R.B. 1984. Heterogeneity of natural killer cells. Ann.Rev.Immunol. 2,359-394
- Sidman C.L., Marshall J.D., Shultz L.D., Gray P.W., Johnson H.M. 1984. γ -interferon is one of several direct B cell-maturing lymphokines. Nature 309, 801-804
- Steinitz M., Klein G., Koskimies S., Makola O. 1977. EBV-induced lymphocyte cell lines producing specific antibody. Nature 269, 420-422
- Summer A.T., Evans H.Y., Buckland R. 1971. New technique for distinguishing between human chromosomes. Nat.New.Biol.232, 31-32
- Thorley-Lawson D.A., Chess L., Strominger J.L. 1977 Suppression of in vitro Epstein-Barr virus infection A new role for adult human T lymphocytes. J.of Exp.Med.146, 495-508
- Tsoukas C.D., Fox R.I., Slovin S.F., Carson D.A., Pellegrino M., Fong S., Pasquali J-L., Ferrone S., Kung P., Vanhan J.H. 1981 T lymphocyte-mediated cytotoxicity against antologous EBV genome-bearing B cells. J.Immunol. 126, 1742-1746
- Vilella R., Yague J., Gallart T., Vives J. 1982. Eficacia de la metodologia de hibridomas para el estudio de antígenos de superficie de linfocitos T y B humanos. Inmunología 1, 58-64