

VEZIVANJE PRIRODNOG AUTOANTITELA IGM DJ ZA LIMFOCITE SLEZINE

Tijana Vukadinović¹, Snežana Živančević-Simonović¹, Ljiljana Mijatović², Ljiljana Dimitrijević³

¹ Institut za patološku fiziologiju, Medicinski fakultet u Kragujevcu

² Zavod za nuklearnu medicinu, Klinički centar "Kragujevac"

³ Institut za imunologiju i virusologiju Torlak

BINDING OF NATURAL AUTOANTIBODY IGM DJ TO SPLEEN CELLS

Tijana Vukadinovic¹, Snezana Zivancevic-Simonovic¹, Ljiljana Mijatovic², Ljiljana Dimitrijevic³

¹ Institute of Pathophysiology, School of Medicine, University of Kragujevac,

² Department of Nuclear Medicine, Clinical Center "Kragujevac"

³ Institute of Immunology and Virology, Torlak

SAŽETAK

Humani monoklonski imunoglobulin DJ izolovan je iz seruma pacijenta sa Waldenstromovom makroglobulinemijom. Ranije je pokazano da ima karakteristike prirodnog idiotipa, koji je specifičan za fosforil-holin i vezuje se za T-limfocite limfnog čvora i T-hibridomske ćelije. U ovom radu je ispitivano vezivanje IgM DJ za membranu neseparisanih limfocita slezine. Metodom protočne citofluorimetrije pokazano je da se IgM DJ vezuje za membranu ćelija slezine neimunizovanih i imunizovanih miševa. Analizom ćelija slezine imunizovanih miševa koje su prema karakteristikama upravnog i bočnog rasipanja svetlosti podeljene u tri subpopulacije, pokazano je da se IgM DJ vezuje za ćelije koje imaju manji volumen i unutrašnju složenost građe, što karakteriše apoptotične ćelije. Ovi rezultati ukazuju na to da IgM DJ, vezujući se za membranu ćelija koje ispoljavaju fosforil-holin, može biti uključen u održanje homeostaze.

Ključne reči: Autoantitela, Waldenstromova makroglobulinemija, limfociti slezine, protočna citometrija

ABSTRACT

Human monoclonal immunoglobulin DJ was isolated from the sera of patients with Waldenström macroglobulinemia. It was shown earlier that IgM DJ possessed the characteristics of natural autoantibody with phosphoryl-choline (PC) specificity. Moreover, the binding of IgM DJ to lymph node T-cells as well as T-hybridomas was shown in this work. We analyzed the binding of IgM DJ to spleen cells isolated from nonimmunized or immunized mice in this work. By flow cytometry analysis, the binding of IgM DJ to the membrane of murine spleen cells isolated from nonimmunized as well as immunized mice was obtained. By analysing the cells which are bound to IgM DJ, according to the cell size and complexity, it has been established that DJ binds to cells with the characteristics of cells undergoing apoptosis. These results indicate that IgM DJ, by binding to the membrane of cells expressing phosphoryl-choline could be included in the maintenance of homeostasis.

Key words: natural autoantibodies, Waldenström macroglobulinemia, spleen cells, flow cytometry

UVOD

U serumu zdravih osoba mogu se detektovati antitela koja reaguju sa sopstvenim antigenima. To su prirodna autoantitela koja ne prouzrokuju nastanak autoimunskih bolesti (1, 2). Sintetišu ih CD5+ B-limfociti (3) lokalizovani u pleuralnoj i peritonealnoj šupljini (4, 5). Prirodna autoantitela su polireaktivna i slabog afiniteta za antigene sa kojima reaguju. S obzirom na to da se vezuju za antigene patogenih mikroorganizama (6, 7, 8) smatra se da predstavljaju prvu liniju odbrane organizma, pre nego što se sintetišu specifična, visokoafinitetna antitela, a vezivanje prirodnih antitela za sopstvene ćelije i molekule ukazuje na to da ona mogu imati ulogu u održanju home-

ostaze (9, 10) i sprečavanju nastanka autoimunskih bolesti (11, 12).

Za razliku od prirodnih IgM autoantitela, monoklonski makroglobulini pacijenata sa Waldenstromovom makroglobulinemijom nastaju kao posledica patološke proliferacije i sekrecije IgM određene specifičnosti. Pokazano je, međutim, da neki humani monoklonski imunoglobulini pacijenata sa Waldenstromovom makroglobulinemijom imaju karakteristike prirodnih autoantitela (13). I IgM DJ izolovan iz seruma pacijenta sa Waldenstromovom makroglobulinemijom (14), budući da je sadržan u serumu novorođenčadi (15) pripada prirodnim autoantitelima. Ranije je pokazano da se IgM DJ vezuje za mišje T limfocite izolovane iz

limfnog čvora i T hibridomske ćelije (16) koje imaju manji volumen i unutrašnju složenost građe, što karakteriše apoptotične ćelije (17).

CILJ RADA

S obzirom na to da je ranije pokazano da se IgM DJ vezuje za T limfocite limfnog čvora i T hibridomske ćelije, cilj ovog rada je bio da se ispita vezivanje antitela DJ za membranu mišjih splenocita.

MATERIJAL I METODE

Ekperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni BALB/c miševi oba pola, starosti 6-8 nedelja dobijeni iz Instituta za eksperimentalnu medicinu VMA, Beograd.

Izolovanje humanog IgM DJ

IgM DJ je iz seruma pacijenta sa dijagnostifikovanom WM izolovan euglobulinskim taloženjem. Iz globulinske frakcije IgM DJ je izolovan gel filtracijom na koloni Superose 6 integrisanoj u FPLC sistem (Pharmacia LKB) i ekvilibranoj PBS puferom, sa protokom od 0,4 ml/min. Pik na 27,28 minuta koji odgovara retencionom vremenu humanog IgM standarda sakupljen je kao IgM frakcija seruma.

Izolovanje limfocita slezine

Limfociti slezine izolovani su iz neimunizovanih ili prethodno imunizovanih miševa. Imunizovanim miševima subkutano je aplikovan goveđi serumski albumin (BSA) u kompletnom Freundovom adjuvansu (CFA), 100 µg/dozi, u zadnje šapice i u bazu repa. Miševi su žrtvovani sedam dana posle imunizacije. Nakon izdvajanja slezine iz neimunizovanih ili imunizovanih životinja, tkivo slezine je iseckano, usitnjeno i macerirano kroz čeličnu mrežicu sa otvorima veličine 80 µm, da bi se istisnula suspenzija limfocita. Ćelije su oprane 3 puta centrifugiranjem na 200xg, 10 minuta na 4°C u PBS-u pH 7,2, a vijabilnost i broj ćelija određeni su pomoću tripan plavog (Sigma), brojanjem na hemocitometru.

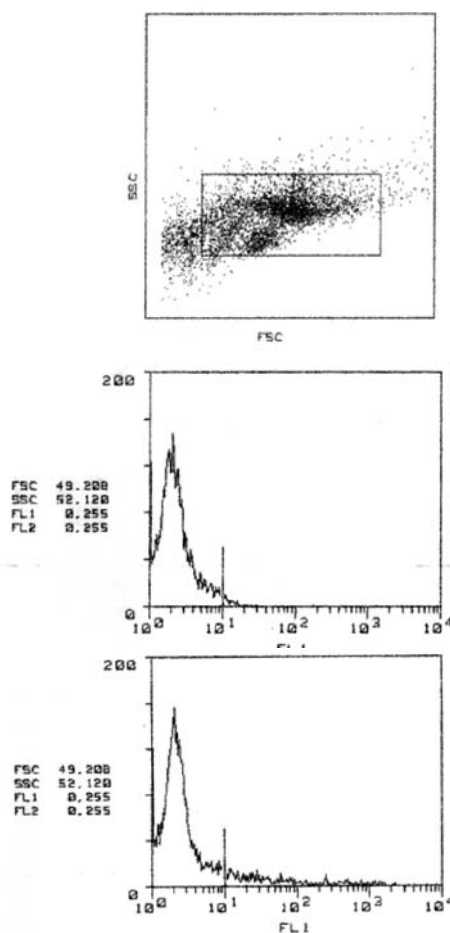
Vezivanje IgM DJ za limfocite slezine

Vezivanje IgM DJ za membranu limfocita slezine određivano je imunofluorescentnom tehnikom. Ćelije (10^6) su inkubirane sa normalnim mišjim serumom u toku 30 minuta, a nakon pranja (rastvorom PBS, 2% FCS, 0,01% NaN_3) centrifugiranjem na 1000 rpm, u toku 10 minuta na 4°C limfociti su inkubirani sa kontrolnim humanim monoklonskim antitelom (K) ili IgM DJ na 4°C tokom 30 minuta. Antitela koja se nisu veza-

la za membranu limfocita uklonjena su pranjem limfocita u rastvoru PBS (2% FCS, 0,01% NaN_3) 3 puta, centrifugiranjem na 1000 rpm, 10 minuta na 4°C, a zatim su limfociti inkubirani sa sekundarnim anti-mišjim antitelima poreklom iz ovce, obeleženim FITC-om (1µg/testu) tokom 30 minuta. Nakon uklanjanja viška antitela pranjem ćelija u rastvoru PBS, ćelije su resuspendovane u 1% rastvoru formalina i analizirane na protočnom citofluorometru FACScan (Becton Dickinson). Rezultati su prikazani kao histogrami fluorescencije, pri čemu je intenzitet fluorescencije prikazan na X osi (na logaritamskoj skali od četiri dekade) a broj pozitivnih ćelija ba Y osi.

REZULTATI

Vezivanje IgM DJ za ćelije slezine neimunizovanih miševa

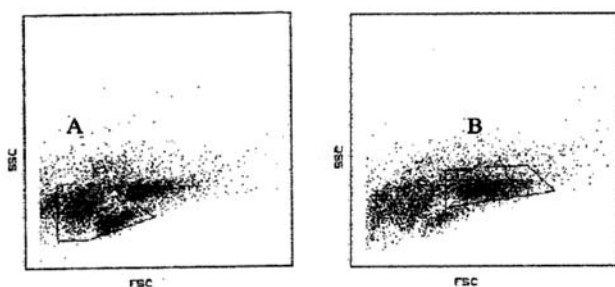


Slika 1. Vezivanje IgM DJ za limfocite slezine neimunizovanih miševa. Na osnovu upravnog (fsc) i bočnog (ssc) rasipanja svetlosti identifikovane su tri nejasno razdvojene populacije ćelija (a). Vezivanje kontrolnog antitela (b) i IgM DJ (c) za membranu limfocita slezine prikazano je u obliku histograma fluorescencije.

Vezivanje prirodnog IgM autoantitela DJ za limfocite slezine neimunizovanih miševa ispitivano je neposredno nakon izolovanja ćelija. Pokazano je da se kontrolno antitelo vezuje za 2.1% (Slika 1b), a prirodno antitelo DJ za 8.9% ćelija slezine (Slika 1c). Iako broj pozitivnih ćelija nije veliki, među njima postoje i ćelije sa većim intenzitetom fluorescencije (do treće dekade logaritamske skale) (Slika 1c). Analizom karakteristika analiziranih ćelija, na osnovu fsc i ssc parametara, uočeno je da sve ispitivane ćelije nemaju istu veličinu i unutrašnju složenost građe, i da se izdvajaju tri nejasno razgraničene populacije ćelija (Slika 1a).

Vezivanje IgM DJ za membranu limfocita slezine imunizovanih miševa

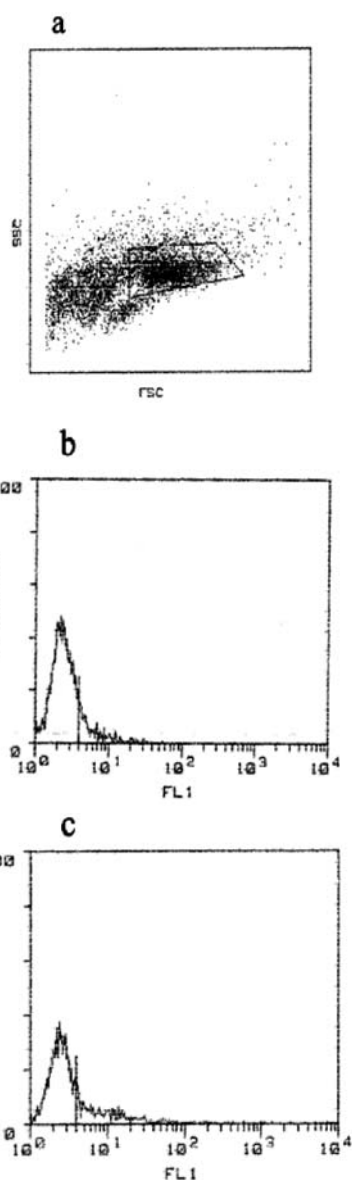
I pri analizi ćelija izolovanih iz slezine imunizovanih miševa uočeno je postojanje razlike u veličini i unutrašnjoj složenosti njihove građe, što je uslovalo grupisanje ćelija u tri nejasno razgraničene subpopulacije (Slika 2).



Slika 2. Karakteristike ćelija slezine imunizovanih miševa. Na osnovu upravnog (fsc) i bočnog (ssc) rasipanja svetlosti identifikovane su tri nejasno razgraničene populacije ćelija koje su analizirane u dva prozora (A i B).

Da bi se ispitalo da li postoje razlike u vezivanju IgM DJ za membranu ispitivanih ćelija i utvrdile karakteristike ćelija za koje se DJ vezuje, sve vijabilne ćelije su podeljene u analizirane u dva odvojena prozora (gate A i B). Vezivanje kontrolnog antitela u populaciji B iznosilo je 6% (Slika 3b), što ukazuje na veće nespecifično vezivanje humanog monoklonskog imunoglobulina, a vezivanje IgM DJ je bilo nešto veće i iznosilo 11%, (Slika 3c).

U populaciji ćelija koja je analizirana u prozoru A nespecifično vezivanje je bilo neznatno (4%) (Slika 4a), a broj ćelija za koje se vezalo antitelo IgM DJ daleko veći (37%) (Slika 4b). Iako intenzitet fluorescencije nije veliki (neznatno prelazi drugu dekadu logaritamske skale), ravnomerno raspoređen broj ćelija prema intenzitetu fluorescencije (odsustvo oštrog pika) ukazuje na to da ćelije za koji se vezalo antitelo

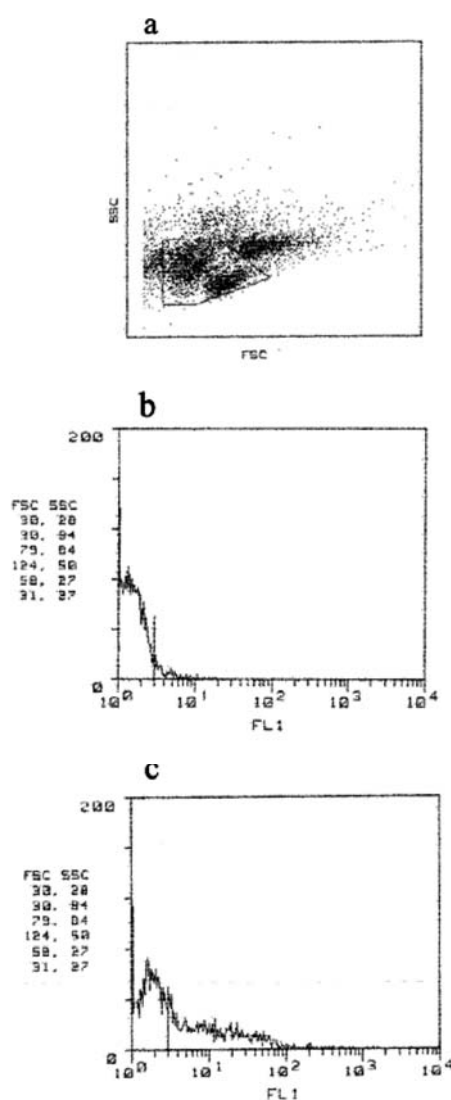


Slika 3. Vezivanje IgM DJ za limfocite slezine imunizovanih miševa. Na osnovu upravnog (fsc) i bočnog (ssc) rasipanja svetlosti izdvojene su ćelije u prozoru B (a). Vezivanje kontrolnog (b) antitela i IgM DJ (c) za limfocite slezine (analizirane u prozoru B) prikazano je u obliku histograma fluorescencije..

IgM DJ nemaju istu gustinu antigena. S obzirom na to da su u prozoru A analizirane ćelije sa manjim fsc i ssc karakteristikama, možemo reći da se za te ćelije vezuje antitelo DJ.

DISKUSIJA

U ovom radu je pokazano vezivanje prirodnog autoantitela IgM DJ za membranu limfocita slezine. S obzirom na to da humani monoklonski IgM DJ speci-



Slika 4. Vezivanje IgM DJ za limfocite slezine imunizovanih miševa. Na osnovu upravnog (fsc) i bočnog (ssc) rasipanja svetlosti izdvojene su ćelije u prozoru A (a). Vezivanje kontrolnog (b) antitela i IgM DJ (c) za limfocite slezine (analizirane u prozoru A) prikazano je u obliku histograma fluorescencije.

fično prepoznaje fosforil-holin koji se nalazi u sastavu mnogih bakterija i u lipidnom dvosloju ćelijske membrane sisara (18), može se pretpostaviti da se prirodni idiotip DJ antitela za membranu splenocita vezuje posredstvom fosforil-holina. I drugi autori su pokazali da se prirodna antitela vezuju za ćelijsku membranu prepoznajući fosforil-holin (19), posebno u ranoj fazi apoptoze, kada se gubi lipidna simetrija ćelijske membrane. Promene u lipidnom sastavu ćelijske membrane u toku apoptoze pokazane su populaciji zrelih B-limfocita (20), a

apoptotične promene u populaciji B-limfocita i T-limfocita slezine (21, 22), kao i timocita i T-limfocita limfnog čvora (16). Pošto u našem radu nije vršeno izdvajanje limfocitnih subpopulacija, niti njihova karakterizacija, ne može se reći da li se prirodno autoantitelo vezuje za membranu B i/ili T-limfocita. Metodom protočne citometrije analiziran je volumen i unutrašnja složenost građe ćelija slezine za koje se vezalo autoantitelo IgM DJ i pokazano je da se u populaciji ćelija koji imaju karakteristike apoptotičnih ćelija (17) nalazi znatno veći procenat IgM+ ćelija. Pošto se desetina miliona apoptotičnih ćelija, uključujući i limfocite, iz organizma uklanjaju svakoga dana (23) vezivanje prirodnog autoantitela DJ za membranu apoptotičnih ćelija može imati važnu ulogu u održanju homeostaze.

ZAKLJUČAK

Prirodno autoantitelo IgM DJ izolovano iz seruma pacijenta sa Waldenstrom makroglobulinemijom i specifično za fosforil-holin vezuje se za limfocite slezine neimunizovanih i imunizovanih miševa. Ćelije za koje se ispitivano prirodno antitelo vezuje na protočnoj citofluorimetriji imaju karakteristike apoptotičnih ćelija.

LITERATURA

1. Živančević-Simonović S. Ispitivanje idiotipskih interakcija T limfocita u imunom odgovoru. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet u Beogradu, 1994;
2. Živančević-Simonović S. Autoimunske bolesti. U. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet u Kragujevcu, 2002, 127-37.
3. Hamilton AM, Lehuen A, Kearney JF. Immunofluorescence analysis of B-1 cell ontogeny in the mouse. *Int Immunol* 1994; 6: 355-61.
4. Micolino TJ, Arnold LW, Hawkins LA, and Haughton G. Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1+ (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline.

- Relationship to cells that secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes. *J Exp Med* 1988; 168: 687-98.
5. Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 501-538, Hardy RR, Hayakawa K. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* 1994; 55: 297-339.
 6. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Molecul Immunol* 2000; 37: 1141-9,
 7. Abu-Shakara M and Shoenfeld Y. What natural autoantibodies, In *Natural antibodies, Their physiological role and regulatory significance*, CRC Press 1993 Ed by Shoenfeld Y and Isenberg AD, p 15-33;
 8. Shaw PX, Horkko S, Chang M, Curtiss LK, Palinski W, Silverman GJ and Witztum JL. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* 2000; 105: 1731-40.
 9. Chang M. et al. Monoclonal autoantibodies specific for oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6353-58.
 10. Marchalonis JJ, Kaveri S, Lacroix-Desmazes S, and Kazatchkine MD. Natural recognition repertoire and the evolutionary emergence of the combinatorial immune system. *FASEB Journal* 2002; 16: 842-48.
 11. Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-Rothstein A, and Chen J. 2000. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1184-9.
 12. Ehrenstein MR, Cook HT, Neuberger MS. 2000. Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M pre-disposes to development of IgG autoantibodies. *J Exp Med* 191: 1253-8.
 13. Avrames S, Guilbert B, and Dighiero G. Natural antibodies against tubulin, actin, myoglobin, thyroglobulin, fetuin, albumin and transferrin are present in normal human sera and monoclonal immunoglobulins from multiple myeloma and Waldenstroms macroglobulinemia may express similar antibody specificities. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1981; 132C:231-6.
 14. Dimitrijević Lj, Radulović M, Ćirić B, Odrlić T, Jankov RM, Marzari R. Immunochemical characterisation of a murine monoclonal anti-idiotypic antibody. *J Immunoassay* 1992; 13: 181-96.
 15. Radulović M, Ćirić B, Jurišić A, Jankov MR, Apostolski S, Živančević-Simonović S, Dimitrijević Lj. Expression of idiotope on IgM molecules from cord sera. In *ML Lukić at al. Eds. Immunoregulation in Health and Disease, Experimental and Clinical Aspects*, Academic Press 1997; 205-11.
 16. Živančević-Simonović S, Inić-Kanada A, Kosec D, Dimitrijević Lj. Vezivanje prirodnog IgM autoantitela DJ ta T-limfocite i T-ćelijske hibridome i njegova moguća uloga u apoptozi. *Med Pregl* 2003; LVI (Suppl 1): 65-71.
 17. Bertho AL, Santiago MA, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000. 95: 429-33.
 18. Harnett W and Harnett MM. Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system. *Immunol Today* 1999; 20: 125-9.
 19. Kim SJ, Gershow D, Ma X, Brot N, and Elkon KB. 2002. I-PLA2 activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation. *J Exp Med* 196: 655-65.
 20. Mower DA, Peckham DW, Illera VA, Fishbaugh JK, Stunz LL, and Ashman RF. Decreased membrane phospholipid packing and decreased

cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis. *J Immunol* 1994, 152: 4832-42.

21. Illera VA, Perandones CE, Stunz LL, Mower DA, and Ashman RF. Apoptosis in splenic B lymphocytes: regulation by protein kinase C and IL-4. *J Immunol* 1993; 151: 2965- 73.

22. Perandones CE, Illera VA, Peckham D, Stunz LL, and Ashman RF. Regulation of apoptosis in vitro in mature murine spleen cells. *J Immunol* 1993; 151: 3521 - 9.

23. Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. and Avrameas, S. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7: 812-8.

SKRAĆENICE

BSA - goveđi serumski albumin (engl. bovine serum albumin)

CFA - kompletni Freundov adjuvans

FCS - fetalni teleći serum (engl. fetal calf serum)

FPLC - engl. Fast Protein Liquid Chromatography

fsc - rasipanje svetlosti u pravcu prostiranja (engl. forward scatter)

IgM - imunoglobulin M

IgM DJ - monoklonski imunoglobulin pacijenta sa Waldenströmovom makroglobulinemijom

NaN₃ - natrijum azid

PBS - engl. phosphate buffer saline

ssc - bočno rasipanje svetlosti (engl. side scatter)

WM - Waldenströмова makroglobulinemija