

ESTUDI DE LES IMMUNOGLOBULINES *

Comunicació presentada el dia 14 de maig de 1970 pels doctors

J. VIÑAS i RIERA

Director del Servei d'Hematologia

J. LI. RODRÍGUEZ i SÁNCHEZ

Adjunt a la Unitat d'Immunologia del Servei d'Hematologia

i

P. GARCÍA i CALDERÓN

Adjunt a la Unitat d'Immunologia del Servei d'Hematologia

* Treball en curs efectuat a la Unitat d'Immunologia del Servei d'Hematologia de l'Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau de Barcelona, gràcies a la generosa ajuda de la Fundació Maria Francesca Roviralta.

INTRODUCCIÓ

Les dades que presentem en aquesta reunió vénen a ésser un avanç sobre el treball que hom realitza a la Unitat d'Immunologia del Servei d'Hematologia i Immunologia de l'Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau de Barcelona.

Les presentem amb la doble finalitat de donar a conèixer allò que hom fa per tal d'intentar de trobar la interacció amb altres grups del país, i de provocar la discussió sobre aquests temes. En certa manera es podrien considerar com una introducció per a la Taula Rodona, i en la present publicació apareixen força resumides per tal de no restar importància al motiu principal de la reunió que és la Taula Rodona. A més a més, es tracta de treballs que en conjunt no estan madurs per a una publicació formal i que seran publicats «in extenso» en el seu dia.

Dintre dels projectes que tenim a la Unitat d'Immunologia ocupa un lloc important l'estudi de les immunoglobulines. En la primera fase, que és l'actual, el treball consisteix gairebé exclusivament a engegar i perfeccionar mètodes i a obtenir reactius immunològics en quantitat i qualitat adequades per al futur treball. Aquests reactius són principalment antisèrums específics per als diversos tipus de cadenes de les immunoglobulines (anti- α , λ , γ , μ , α , δ , ϵ) i factors del complement (C'_1 i C'_2).

MATERIAL I MÈTODES

Fraccionament de les immunoglobulines

Fins aquest moment hem aconseguit d'aïllar la IgG, la IgA i la IgM pures a partir del sèrum humà normal.

Per a l'obtenció de la IgG i la IgM hom empra els mateixos passos inicials i hom pot aprofitar el mateix lot de sèrums per a obtenir aquestes dues immunoglobulines.

Cal mesclar un volum de sèrum humà normal amb un volum igual d'aigua destil·lada i afegir-hi un volum de solució saturada de sulfat amònic

(4,05 M), tot tenint cura d'agitar suaument per tal de no provocar l'aparició d'escuma. Hom deixa tot plegat dues hores en un bany maria a 37 °C, amb agitació suau. A continuació hom ho sotmet a una centrifugació de 30 minuts a 4000 r.p.m. Hom redissol el precipitat en la meitat del volum original de sèrum amb solució salina isotònica i hom el reprecipita mitjançant l'addició d'un volum igual de solució 0,5 saturada (2,025 M) de sulfat amònic i una incubació d'una hora, a 37 °C. Després de centrifugar durant 30 minuts a 4000 r.p.m., hom redissol el precipitat en un quart del volum original de sèrum amb solució salina isotònica ^{11, 14, 22}. La fracció resultant és passada per una columna de Sephadex G-50 prèviament equilibrada amb amortidor de fosfats 0,01 M, pH 8 ²³. La fracció amb contingut proteic és passada per una columna de DEAE-Sephadex equilibrada amb amortidor de fosfats 0,01 M, pH 8 ^{10, 12, 16}. En aquestes condicions la IgG passa directament a través de la columna i forma la primera fracció, abans de procedir a l'elució.

Per a l'obtenció de la IgM hom parteix també del segon precipitat. Una vegada redissolt, hom el passa per una columna de Sephadex G-50 prèviament equilibrada amb solució salina isotònica. Hom dilueix la fracció amb contingut proteic amb 15 volums d'aigua freda i hom la deixa a la nevera durant 24 hores ¹¹. Passat aquest temps hom la centrifuga a 4 °C amb centrifuga refrigerada durant 30 minuts a 4000 r.p.m. El precipitat és redissolt amb un volum reduït de solució salina isotònica i passat per una columna de Sephadex G-200 equilibrada amb solució salina ^{11, 23, 24, 28}. La primera fracció obtinguda a la sortida d'aquesta columna és passada per una altra columna de Sephadex G-50 prèviament equilibrada amb amortidor de fosfats 0,015 M, pH 8. La fracció amb contingut proteic és passada per una columna de DEAE-Sephadex prèviament equilibrada amb el mateix amortidor i eluïda successivament amb amortidors de fosfat 0,05 M, pH 8, 0,1 M, pH 8 i 0,25 M, pH 8. La IgM és obtinguda amb la fracció eluïda amb amortidor 0,25 M, pH 8 ¹².

Per a l'obtenció d'IgA ha estat emprada la precipitació amb sulfat de zinc tal com la recomanen VAERMAN i HEREMANS ²⁹. El sobrenedant és passat per una columna de G-50 prèviament equilibrada amb amortidor d'acetat amònic 0,01 M, pH 7 i a continuació aplicat a una columna de DEAE-Sephadex equilibrada amb el mateix amortidor. La IgA és eluïda amb acetat amònic 0,2 M, pH 7.

RESULTATS

Estudi de les fraccions obtingudes

Les immunoglobulines obtingudes amb aquests fraccionaments tenen la puresa suficient per a la major part d'aplicacions i són les que han estat emprades fins ara. Per a immunitzacions prolongades potser caldria acabar-les de purificar passant-les per una columna de CM-Sephadex.

Per al control de la puresa d'aquestes fraccions han estat emprats els mètodes d'immunodifusió simple, d'immunolectroforesi, d'immunodifusió radial (MANCINI) i d'electroimmunodifusió (LAURELL) amb antisèrum humà total i antisèrums monospecífics per a les diverses immunoglobulines. Possiblement aquests mètodes no són prou sensibles per a detectar petites quantitats de proteïnes contaminants, les quals poden posar-se en evidència després en el curs d'una immunització; caldria emprar mètodes més refinats, els quals impliquen l'ús d'isòtops radioactius.

El mètode que ens ha permès de tenir resultats quantitius més reproductibles i a la vegada s'ha demostrat com més sensible és el de LAURELL, el qual mètode està molt ben descrit¹⁵. Per a estudiar la IgG cal emprar la modificació suggerida per B. WEEKE³⁰.

Obtenció de sèrums específics

Les immunoglobulines aïllades han estat emprades per a l'obtenció de sèrums potents i abundants per a la immunització de conills, rates i cabres. Les pautes d'immunització han estat similars en tots els animals. La més estandarditzada és la dels conills i consisteix en una primera injecció subcutània d'1 mg de proteïna en 1 ml de solució salina barrejada amb 1 ml d'adjuvant complet de Freund fent una emulsió. Als 10 dies hom administra una altra injecció igual que la primera en un lloc diferent de l'animal. Al cap de 7 dies hom obté la primera sagnia. Cal deixar reposar l'animal uns 20 dies i injectar-li en dos dies successius 1 mg de proteïna en solució salina, la primera intraperitoneal i la segona intravenosa. Set dies després hom practica una sagnia per punció cardíaca.

L'obtenció d'antisèrums específics per a les cadenes α i λ , fins ara ha estat aconseguïda per immunització amb proteïnes de Bence-Jones obtingudes a partir d'orines de mielomes per fraccionament amb DEAE-Sephadex.

Preparació i utilització d'immunoabsorbents

La purificació dels sèrums obtinguts és un aspecte al qual hem dedicat una atenció especial perquè creiem que per a la utilització futura d'aquests anticossos en tècniques immunològiques fines (anticossos marcats, fixació i trànsfer de C₁, etc.) és de vital importància comptar amb reactius d'especificitat ben definida.

L'absorció d'anticossos per antígens solubles presenta certes dificultats i mai no és tan perfecta com l'obtinguda amb antígens no solubles. A més, en el primer cas generalment no és possible recuperar l'anticòs absorbit. Per aquest motiu hem utilitzat en totes les absorcions immunoglobulines insolubilitzades^{1, 2, 19, 21}. Dels mètodes assajats, el que ens ha donat millors resultats és el basat en l'ús del glutaraldehyd.

El glutaraldehyd, a pH 7, es fa reaccionar amb la proteïna que es vol insolubilitzar.

Com a exemple donarem la pauta seguida per a la insolubilització de la IgG:

- a) 500 mg d'IgG són diluïts en 10 ml d'amortidor de fosfats 0,1 M, pH 7.
- b) Tot agitant, hom afegeix 2 ml de glutaraldehyd al 2,5 %.
- c) Un cop obtinguda la insolubilització hom renta el material, per centrifugació, amb solució salina amortida.

Aquests immunoabsorbents conserven les característiques antigèniques de la proteïna nativa. Per a llur utilització emprem dos mètodes distints: la centrifugació o la columna.

Per al primer, un cop s'ha deixat reaccionar l'immunoabsorbent amb un antisèrum determinat, se separa per centrifugació. Si hom pretenia només d'eliminar del sèrum determinats anticossos ja no cal fer res més. Però si interessa recuperar l'anticòs fixat a l'immunoabsorbent, cal fer una elució del complex amb amortidor de glicina-clor 0,1 M, pH 2,8. Aquest amortidor dissocia l'anticòs de l'antigen i s'aprofita aquesta propietat per a obtenir, per centrifugació, l'anticòs en el sobrenedant. Tan aviat com resulta possible, cal neutralitzar a pH 7,2 amb fosfat trisòdic.

L'amortidor utilitzat per a l'elució no és innocu per a l'anticòs i per això cal que hi estigui en contacte el mínim de temps possible. Aquest detall ens induï a adoptar el mètode d'elució a l'operació en columna.

En el mètode d'absorció i elució en columna que hem ideat, aprofitem l'efecte de gel filtració per a reduir a un mínim el temps en què l'anticòs està en contacte amb l'amortidor d'elució. Hom prepara una columna

cromatogràfica i l'omple fins a un cert nivell amb Sephadex G-50; a sobre hom deixa sedimentar l'immunoabsorbent juntament amb una quantitat de G-50 que permeti a les partícules d'immunoabsorbent de quedar separades les unes de les altres. Un cop preparada la columna es pot fer servir diverses vegades. Cal procedir de la forma següent:

- a) Hom renta la columna amb amortidor d'elució fins que no dona densitat òptica a 280 μm .
- b) Hom renta amb solució salina amortida a pH 7,4.
- c) Hom fa passar lentament el sèrum a absorbir.
- d) Hom torna a rentar la columna amb solució salina fins que l'eluent no presenti densitat òptica a 280 μm .
- e) Hom elueix amb amortidor de glicina-clor.
- f) Hom recull els tubs que presenten proteïna, detectable per D.O. a 280 μm .
- g) Hom renta la columna amb solució salina.
- h) Hom pot tornar a començar per «c».

Cal que l'alçada del G-50 que ve a sota de l'immunoabsorbent sigui suficient, altrament (fig. 1) part de l'anticòs sortirà amb amortidor d'elució, que és precisament el que es tracta d'evitar. En la figura 2 es veu com l'anticòs ha sortit netament distanciat de l'amortidor de glicina.

Nosaltres creiem que amb aquest mètode l'anticòs queda exposat a les condicions d'elució un mínim de temps. Gràcies a la propietat del gel emprat (Sephadex G-50), així que una molècula d'anticòs s'ha dissociat, a causa del seu pes molecular elevat, avança per la columna amb més rapidesa que les sals d'amortidor i aviat es distancia de la zona d'elució. Així l'anticòs no resta mai exposat a condicions més dràstiques que les necessàries per a la seva dissociació de l'antigen. Creiem els comunicants que per aquest procediment obtenim anticossos eluïts amb llurs propietats biològiques molt ben conservades.

Fixació i trànsfer del factor primer del complement (C'_1)

Aquest és un procediment ideat per a poder demostrar un nombre molt baix de molècules d'anticòs sobre hematies o altres antígens particulats. Primerament fou posat a punt per RAPP i BORSOS³, basats en els treballs de MAYER, RAPP i BORSOS^{4, 5, 6, 8, 9, 20, 25} i altres. Posteriorment ha estat aplicat a algun estudi concret per COLTEN, RAPP i BORSOS^{13, 27} i per LINSOTT^{17, 18}.

És sabut que els factors del complement reaccionen successivament

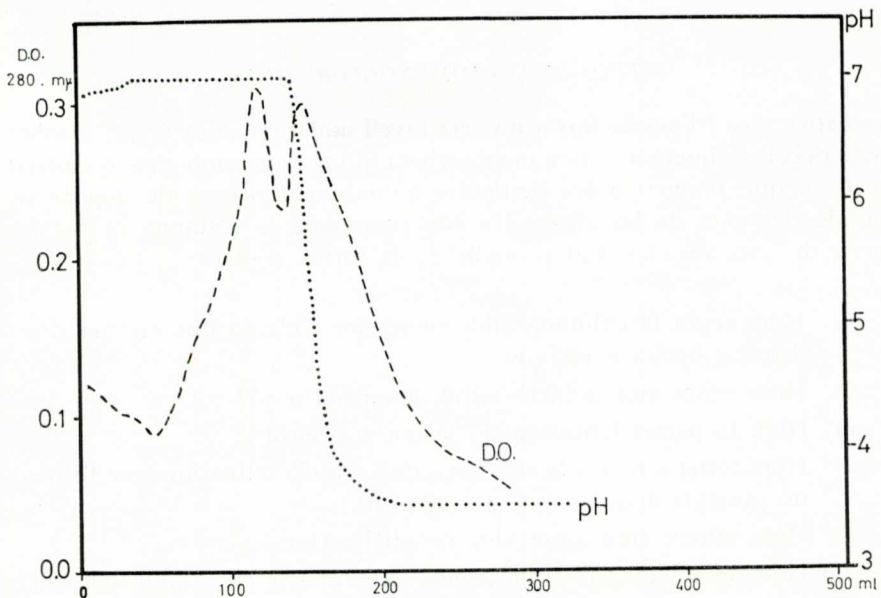


FIG. 1. — Elució d'anti- λ . Columna preparada amb immunoabsorbent fet amb una proteïna de Bence-Jones tipus λ . S'ha passat un sèrum anti-IgG. En eluir amb amortidor glicina-clor, pH 2.8, s'obté anticòs anti- λ aïllat. Observeu com apareix un segon pic que coincideix exactament amb la sortida de l'amortidor de pH baix. Aquest segon pic no correspon a anticòs, sinó a molècules de mida reduïda arrossegades per l'amortidor. És evident que el gruix de Sephadex G-50 és insuficient per a distanciar de forma eficaç l'anticòs eluït i l'amortidor de pH baix

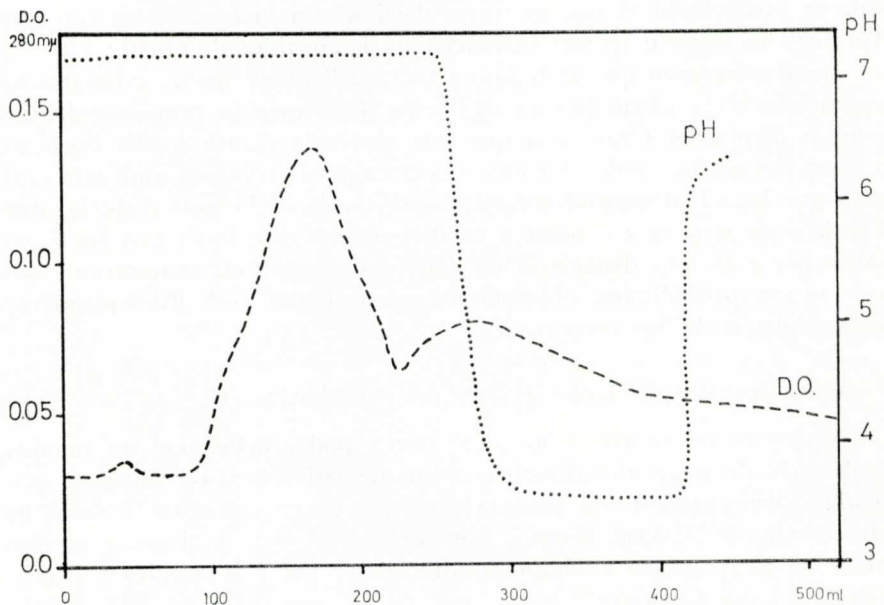
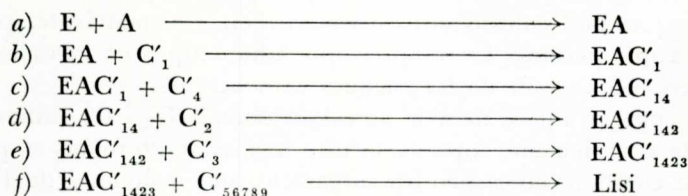


FIG. 2. — L'experiment de la figura 1 s'ha repetit amb una columna amb el doble de gruix de G-50. L'anticòs s'ha obtingut ben distanciat de l'amortidor d'elució i es pot emprar immediatament sense haver de recórrer a diàlisi

amb el substrat antigen-anticòs de manera seqüencial²⁰, tal com expressa l'esquema següent:



Essent: E: Eritròcit

A: Anticòs

C': Complement, amb subíndex que indica cada un dels factors.

La reacció «b» requereix ions Ca^{++} , i la «d», ions Mg^{++} .

En realitat els eritròcits en l'estat EAC'_{142} són inestables i decauen de nou a EAC'_{14} . Per altra banda, amb EDTA és possible treure el C'_1 d'aquestes hematies. Això fa que sigui possible preparar eritròcits en estat EAC'_4 que serveixen de substrat per a detectar C'_1 .

El C'_1 que es troba en el complex EAC'_1 és molt estable a M 0,067, però es pot dissociar fàcilment a M 0,15. El C'_1 dissociat segueix essent actiu i té una gran afinitat per als llocs EAC'_4 , que el capten molt eficaçment⁹.

RAPP i BORSOS han aprofitat aquestes peculiaritats de la reacció dels diversos components del complement per a posar a punt un mètode que permet quantificar molt exactament el C'_1 .

El mètode consisteix a fer reaccionar el complex antigen-anticòs (eritròcits amb anticòs) amb un excés de C'_1 en condicions òptimes de temperatura i força iònica. En les mateixes condicions hom renta per centrifugació per a eliminar tot el C'_1 no reaccionat.

El C'_1 es dissocia en un medi amb força iònica més elevada (0,15 M). Per a quantificar el nombre de molècules de C'_1 en el sobrenedant hom empra com a substrat eritròcits EAC'_4 . Després hom afegeix C'_2 i a continuació es fan reaccionar amb un excés de complement amb EDTA (que impedeix les reaccions «b» i «d»). A partir del nombre final d'eritròcits lisats hom pot calcular el nombre de molècules de C'_1 fixades als primers eritròcits. Aquest mètode és d'una sensibilitat tan gran que permet gairebé de detectar una molècula de C'_1 i àdhuc una molècula d'anticòs per eritròcit³.

Per a estudiar anticossos que estan combinats amb la superfície de l'eritròcit, però que no fixen C'_1 , hom pot emprar el recurs de fer reac-

cionar aquests eritròcits amb sèrums antiglobulina (que pot ésser específic per a una determinada classe) i així transformar els llocs amb anticòs en fixadors de C'_1 . D'aquesta manera hom pot quantificar molt finament, fins a molt poques molècules d'anticòs per eritròcit, i al mateix temps definir la classe a què pertany. Es comprèn que aquest tipus de mètode sigui de gran interès en l'estudi de les anèmies hemolítiques.

Per a engregar aquest mètode ha calgut obtenir C'_1 i C'_2 lliures d'altres factors de complement. Aquests factors han estat obtinguts a partir de sèrum de conill d'Índies per fraccionament amb columnes de DEAE-Sephadex i CM Sephadex, tot treballant sempre a baixes temperatures. Ha calgut ajustar les condicions de treball per a aquests productes ja que els treballs originals es refereixen a DEAE i CM cel·lulosa, la qual té propietats una mica diferents^{7, 26}. Presentem diverses corbes d'elució cromatogràfica per a il·lustrar aquest punt.

També han estat preparats diversos lots d'eritròcits amb anticòs i C'_4 (EAC'_4) que, guardats al refrigerador, poden ésser emprats en experiments durant diversos dies⁹.

Amb aquests productes han estat fets diversos assaigs de fixació i transfer quantitatiu de C'_1 . Pensem aplicar aquest mètode a l'estudi de les anèmies hemolítiques. En la literatura ja hi ha exemples d'aplicació d'aquest mètode a l'estudi d'anticossos anti-eritròcit^{8, 13, 17, 27}.

BIBLIOGRAFIA

1. AVRAMEAS, S. i TERNYNCK, T. — *Biologically active water-insoluble protein polymers. Their use for isolation of antigens and antibodies.* «J. Biol. Chem.», 242, 1651-1659 (1967).
2. AVRAMEAS, S. i TERNYNCK, T. — *The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoabsorbents.* «Immunochemistry», 6, 55-56 (1969).
3. BORSOS, T., COLTEN, H. R., SPALTER, J. S., ROGENTINE, N. i RAPP H. J. — *The C'_1 fixation and transfer test: examples of its applications to the detection and enumeration of antigens and antibodies at cell surfaces.* «J. Immun.», 101, 392 (1968).
4. BORSOS, T., RAPP, H. J. i MAYER, M. M. — *Studies on the second component of complement. I.—The reaction between EAC'_{14} and C'_2 ; evidence on the single site mechanism of immune hemolysis and determination of C'_2 on a molecular basis.* «J. Immun.», 87, 310 (1961).
5. BORSOS, T., RAPP, H. J. i MAYER, M. M. — *Studies on the second component of complement. II.—The nature of the decay of EAC'_{14} .* «J. Immun.», 87, 326 (1961).
6. BORSOS, T., RAPP, H. J. i MAYER, M. M. — *Studies on the second component of complement. III.—Separation of the second component from guinea pig serum by chromatography on cellulose derivatives.* «J. Immun.», 87, 330 (1961).
7. BORSOS, T. i RAPP, H. J. — *Chromatographic separation of the first component of complement and its assay on a molecular basis.* «J. Immun.», 91, 851 (1963).

8. COLTEN, H. R., BORSOS, T. i RAPP, H. J. — *Complement fixation by different classes of immunoglobulins: The effect of temperature.* «Protides of the biological fluids». «Elsevier Publishing Company», Amsterdam, 15, 471 (1967).
9. COLTEN, H. R., BORSOS, T. i RAPP, H. J. — *Reversible loss of activity of the first component of complement (C'_{1a}) as a function of ionic strength.* «J. Immun.», 100, 799 (1968).
10. FAHEY, S. L. — *Methods of immunology chromatographic separation immunoglobulins.* Chose M. and Williams, 1966.
11. FULLER, J. F. — *The proteins.* Vol. 1, p. 1. Neurath H., New York Academic Press, 1953.
12. GELOTE, B., FLODIN, P. i KILLANDE, J. — *Fractionation of human proteins by gel filtration and zone electrophoresis or ion exchange chromatography.* «Arch. Biochem. Suppl.», 18, 17, 315-326 (1962).
13. HOYER, L. W., BORSOS, T., RAPP, H. J. i VANNIER, W. E. — *Heterogeneity of rabbit IgM antibody as detected by C'_{1a} fixation.* «J. Exp. Med.», 127, 589 (1968).
14. KELLER, S. i BLOCK, R. S. — *Analytical methods of protein chemistry.* Vol. I, pp. 2-30. Alexander, P. New York. Pergmon Press, 1960.
15. LAURELL, C. B. — *Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.* «Analyt. Biochem.», 15, 45 (1966).
16. LEVY, A. B. i SOBER, H. A. — *A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin.* «Proc. Soc. Exp. Bid. Med.», 103-250 (1960).
17. LINSKOTT, W. D. — *Immune hemolysis: Serial studies on the dissociability of IgG and IgM anti-forsman antibodies using the C'_{1a} fixation and transfer technique.* «J. Immun.», 102, 986 (1969).
18. LINSKOTT, W. D. — *The effects of ionic strength, temperature, and antibody class and activity on fixation and transfer of the first component of complement.* «J. Immun.», 102, 993 (1969).
19. MALLEY, A. i CAMPBELL, D. H. — *Isolation of antibody by means of an immunological specific absorbent.* «J. Amer. Chem.», 85, 487 (1963).
20. MAYER, M. M. — *Elvin A. Kabat and Manfred M. Mayer: «Experimental Immunochemistry», 2nd. Edition, p. 133. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, III, 1961.*
21. ONOUE, K., YAGI, Y. i PRESSMAN, D. — *Immunoabsorbents of high capacity.* «Immunochemistry», 2, 181 (1965).
22. PENNELL, R. B. — *The plasma proteins.* Vol. 1, p. 9. Putnam F. N. New York Academic Press, 1960.
23. PORATH, S. i FLODIN, P. — *Gel filtration, a method for desalting and group separation.* «Nature», 183, 1657 (1959).
24. PORATH, J. — *Gelf-filtration of proteins, peptides and amino acids.* «Biophys. Acta», 39, 193 (1960).
25. RAPP, H. J. i BORSOS, T. — *Forsman antigen antibody: Preparation of water soluble antigen and measurement of antibody concentration by precipitin analysis by C'_{1a} fixation and by hemolytic activity.* «J. Immun.», 96, 913 (1966).
26. RAPP, H. J., SIMS, M. R. i BORSOS, T. — *Separation of components of guinea pig complement by chromatography.* «Proc. Soc. Exper. Bio. and Med.», 100, 730 (1959).
27. ROSE, W. F., BORSOS, T. i RAPP, H. J. — *Cold-reacting antibodies: The enhancement of antibody fixation by the first component of complement (C'_{1a}).* «J. Immun.», 100, 259 (1968).
28. TOMBS, M. P., COOKE, K. B., BRUSTONS, D. i MACLAGEN, N. F. — *The chromatography of normal serum proteins.* «Biochem. J.», 80, 284 (1961).
29. VAERMAN, J. P., HEREMANS, J. F. i VAERMAN, C. — *Studies of the immune globulins of human serum. — I. A method for the simultaneous isolation of the three immune globulins (γ 5S-, γ 1M and γ 1A-) from individual small serum samples.* «J. Immun.», 91, 7 (1963).
30. WEEKE, B. — *Carbamylated human immunoglobulins tested by electrophoresis in agarose and antibody containing agarose.* «Scand. J. Clin. Lab. Invest.», 21, 351 (1968).