

ПРОДУКЦИЯ IgM И J ЦЕПИ

В-ЛИМФОБЛАСТОИДНЫМИ КЛЕТОЧНЫМИ ЛИНИЯМИ

М.П. Самойлович, А.А. Пиневич, Н.Л. Вартамян, В.Б. Климович

Российский научный центр радиологии и хирургических технологий,
Санкт-Петербург; mpsamoylovich@gmail.com

Характерной чертой В-лимфобластоидных клеточных линий является продукция связанных с мембраной или секретируемых иммуноглобулинов (Ig). Многие линии секретируют молекулы IgM, в состав которых обычно входит полипептид – J цепь. В клетках J цепь участвует в сборке пентамерных молекул IgM, при отсутствии или недостаточной экспрессии J цепи клетки синтезируют гексамеры. Гексамерные молекулы IgM, в отличие от пентамерных, не способны связываться с рецептором полимерных иммуноглобулинов (pIgR) эпителиальных клеток и формировать секреторный IgM. Обнаружение J цепи в цитоплазме или в среде культивирования позволяет судить о том, какой из вариантов полимерных молекул IgM синтезируют клетки. Задача работы состояла в изучении продукции IgM и J цепи клетками линий Namalva, NC-37, RPMI 1788 и Raji, представленных в Российской коллекции клеточных культур позвоночных. В исследовании использованы методы иммуноферментного анализа (ИФА) и проточной цитофлуориметрии, разработанные на основе созданных в лаборатории моноклональных антител против мю-цепей и против J цепи. В культурах линии RPMI 1788 обнаружена широкая вариабельность содержания внутриклеточного IgM, при этом менее одной трети клеток экспрессирует J цепь. В среде культивирования линии RPMI 1788 выявлена высокая концентрация IgM, большая часть которого не имеет J цепи. Клеточные популяции Namalva и NC-37 однородны по содержанию как IgM, так и J цепи. Для этих линий характерен низкий уровень секреции IgM. В среде культивирования клеток Namalva и NC-37 доминируют молекулы IgM, содержащие J цепь. Клетки линии Raji экспрессируют J цепь, но не секретируют IgM в среду культивирования. Полученные данные позволяют заключить, что линии Namalva и NC-37 синтезируют пентамеры IgM, а линия RPMI 1788 гетерогенна и является продуцентом преимущественно гексамерной формы IgM.

Ключевые слова: IgM, J цепь, Namalva, NC-37, RPMI 1788, Raji

Характерной чертой клеток В-лимфобластоидных линий является продукция секретируемых в среду или связанных с мембраной иммуноглобулинов (Ig). Клетки многих

линий секретируют молекулы IgM, в состав которых наряду с тяжелыми и легкими цепями входит J-цепь [1, 2]. Этот полипептид обеспечивает сборку пентамерных молекул IgM, их взаимодействие с pIgR, образование секреторного IgM и транспорт его через эпителий слизистых оболочек [3, 4, 5]. При отсутствии или недостаточной экспрессии J цепи в клетках происходит сборка гексамерных молекул IgM [6, 7]. Гексамеры не взаимодействуют с pIgR, не образуют секреторной формы IgM и не транспортируются на поверхность слизистых. Они активируют комплемент в 10–20 раз эффективнее, чем пентамерные молекулы [8]. Обнаружение J цепи в среде культивирования или в цитоплазме позволяет судить о том, какой из вариантов полимерных молекул синтезируют клетки. Сведения о продукции IgM лимфобластоидными линиями были получены с помощью реагентов и методов разной степени специфичности и чувствительности, а потому требуют уточнения и дополнения. Кроме того, эти данные относятся к оригинальным штаммам, которые в ходе длительного культивирования претерпели эволюцию и дали начало сублиниям, охарактеризованным недостаточно полно [9, 10, 11].

Задача работы состояла в исследовании продукции IgM и J цепи клетками В-лимфобластоидных линий, находящихся в фондах Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Материал и методы

Клеточные линии Namalva, NC-37, RPMI 1788 и Raji, полученные из указанной выше коллекции, культивировали в 12-луночных планшетах при +37°C в газовой среде с 5% CO₂. Использовали среду RPMI1640 без антибиотиков с добавлением 5% сыворотки крови плода коровы. Клетки рассевали дважды в неделю. На 3 сутки после пересева культур клеточные суспензии собирали, с помощью счетчика частиц Coulter Z1 (Beckman Coulter) определяли содержание клеток и затем осаждали центрифугированием 5 мин при 180g. Среду, полученную после отделения клеток, замораживали при –20°C. Осадок клеток дважды отмывали в ФСР, замораживали и хранили при –20°C. Лизаты клеток готовили инкубацией размороженных проб в 0,1% растворе тритона X100 на льду в течение 5 мин, затем центрифугировали 5 мин при 200g.

Для выявления IgM и J цепи в клетках и определения концентраций их в среде использовали полученные в лаборатории моноклональные антитела (МкАт) против мю- и J

цепей Ig человека [12, 13]. Конъюгаты МкАт с пероксидазой и с ФИТЦ синтезировали в соответствии с описанными протоколами [14, 15].

Концентрацию IgM определяли с помощью разработанного в лаборатории метода двухцентрового ИФА, основанного на применении МкАт против мю-цепей [12]. Для связывания антигена на твердой фазе и для детекции его использовали адсорбированные и меченые МкАт одной и той же эпитопной специфичности, что позволяло избирательно выявлять полимерные молекулы IgM. При оценке количества секретируемого в среду IgM значения концентраций пересчитывали на 1000 клеток исходной суспензии.

Концентрацию J цепи определяли, используя двухцентровый ИФА, разработанный на основе МкАт против различных эпитопов молекулы J цепи [13]. Антигенные детерминанты J цепи, связанной с полимерным IgM, недоступны для распознавания антителами, поэтому J цепь высвобождали из молекулярного комплекса путем восстановления дисульфидных связей кипячением в течение 7 мин в 0,75% растворе 2-меркаптоэтанола и последующего алкилирования иодацетамидом [16].

Однородность клеточных популяций по содержанию IgM и J цепи оценивали с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Клетки отмывали от культуральной среды как указано выше, ресуспендировали в охлажденном до -20°C 70% этаноле и хранили при той же температуре. Пробы, содержащие 1×10^6 клеток, отмывали центрифугированием при 200g 10 мин в буфере для окраски, содержащем ФСР, сыворотку плодов коровы (3%) и азид натрия (0,1%). Далее клетки помещали в Permeabilizing Solution 2 (BD Biosciences, США) на 15 мин, затем отмывали центрифугированием (250g, 8 мин) в буфере для окраски, инкубировали 30 мин с МкАт, меченными ФИТЦ, вновь отмывали и ресуспендировали в буфере Flowsheath Fluid. Флуоресценцию регистрировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, США) с фильтром 530/30 нм. Исходя из распределения клеток по прямому и боковому светорассеянию, выделяли логический гейт. В каждой пробе анализировали 10000 событий в гейте. Для сбора и анализа данных использовали программное обеспечение CellQuest Pro (BD Biosciences, США).

Результаты

Наиболее высокие концентрации IgM были обнаружены в среде культивирования линии RPMI 1788 (рис. 1). В культурах клеток Namalva и NC-37 содержание секретируемого IgM было в 10–30 раз ниже. В среде линии Raji концентрация IgM была близка к порогу чувствительности метода.

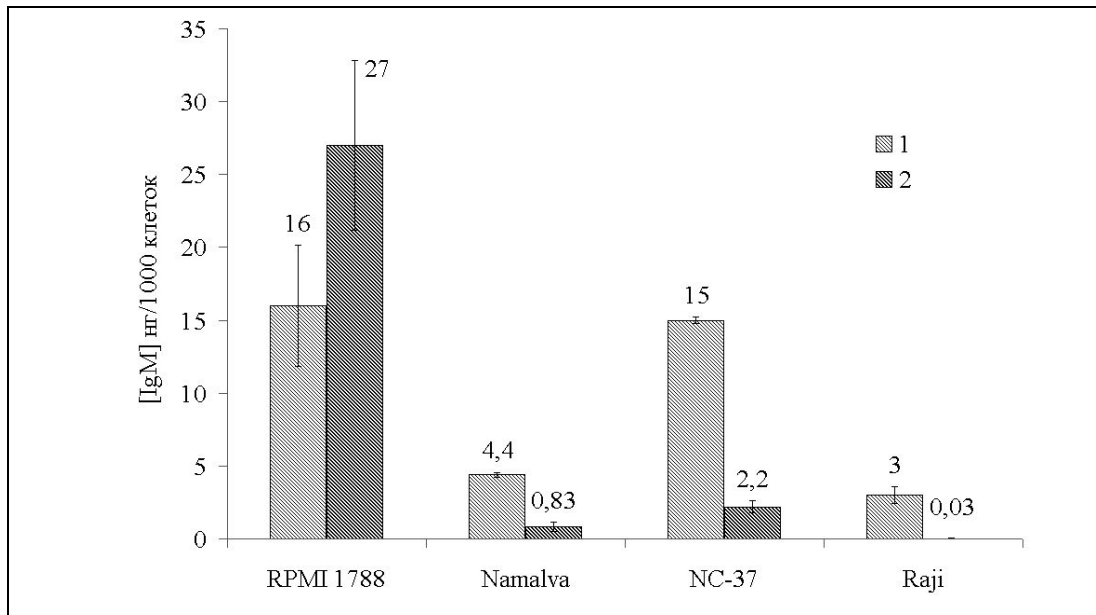


Рис. 1. Содержание секретируемого в культуральную среду (1) и внутриклеточного полимерного IgM (2) по результатам определения с помощью метода двухцентрового ИФА (пересчитано на 1000 клеток). Указаны значения средних арифметических и стандартные ошибки. По оси абсцисс – названия клеточных линий.

Выявление внутриклеточного IgM при анализе клеточных лизатов позволило получить данные о средней продуктивности клеток каждой из линий. По уровню цитоплазматического IgM клетки линии NC-37 не отличались от линии RPMI 1788, тогда как в клетках линий Namalva и Raji определялось в 3–5 раз меньше IgM (рис. 1). Таким образом, исследованные клеточные линии различаются принципиально по уровню IgM, секретируемого в среду культивирования, и значительно меньше отличаются по внутриклеточному содержанию этого Ig.

Оценка уровня IgM в клетках с помощью метода проточной цитофлуориметрии показала, что распределение сигналов от клеток линий NC-37 и Namalva близко к нормальному (рис. 2). Линия RPMI 1788 отличалась широкой вариабельностью значений флуоресцентных сигналов. Доля клеток с наиболее высоким содержанием IgM составляла около 10% общей численности. В популяции линии Raji отчетливо выделялись две фракции клеток – одна с низким, а вторая со средним уровнем IgM.

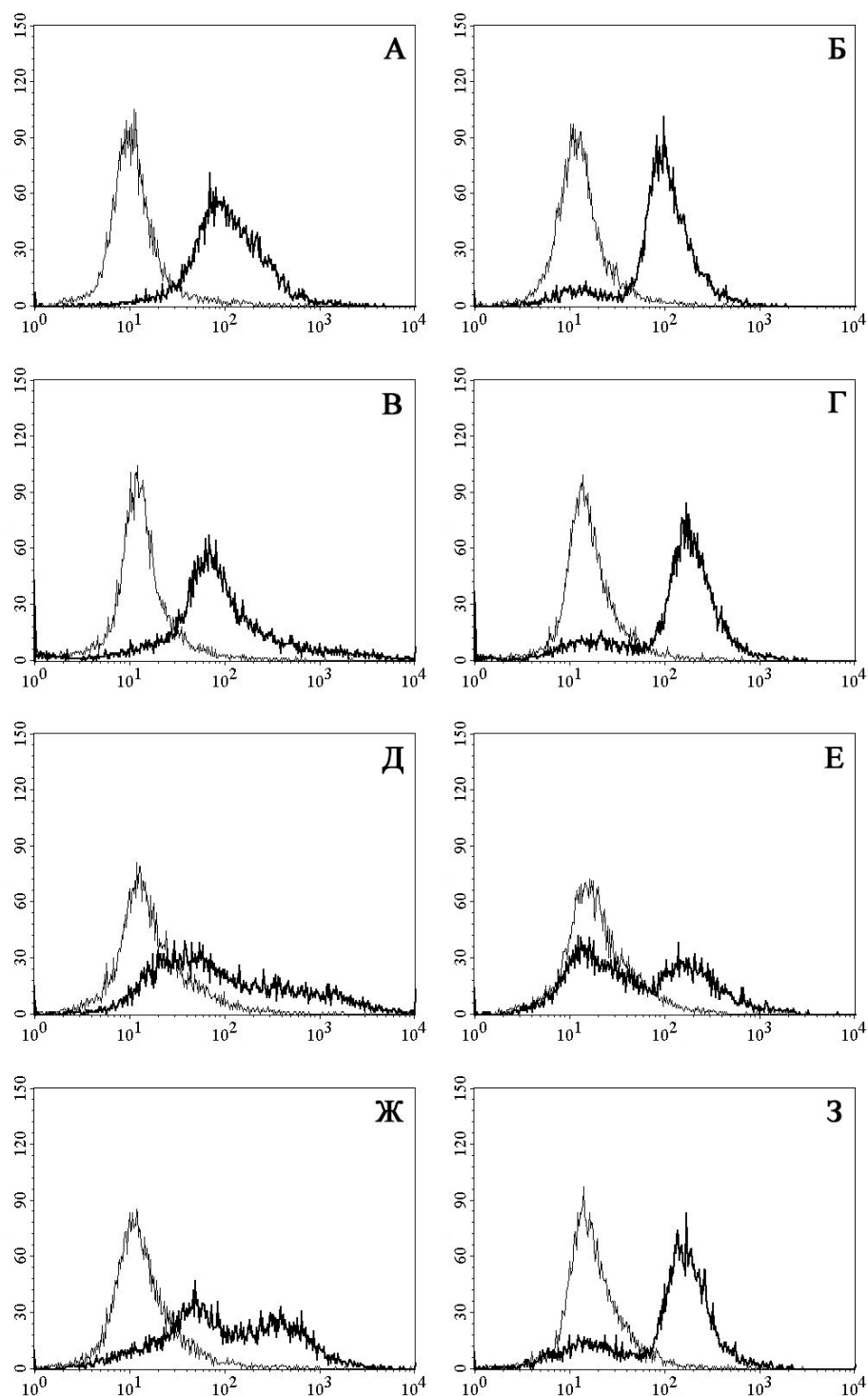


Рис. 2. Содержание IgM (А, В, Д, Ж) и J цепи (Б, Г, Е, З) в клетках линий Namalva (А, Б), NC-37 (В, Г), RPMI 1788 (Д, Е) и Raji (Ж, З), исследованное с помощью проточной цитофлуориметрии. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – число клеток. Жирная линия – опыт, тонкая линия – изотипический контроль.

Цитофлуориметрическое исследование с помощью МкАт против J цепи выявило гомогенность клеточного состава линий NC-37, Namalva и Raji. Модальное значение сигнала флуоресценции, и, соответственно, содержания антигена, было наиболее высоким в популяции клеток NC-37. При исследовании линии RPMI 1788 значимый сигнал детектировался только в небольшой части популяции.

С помощью метода двухцентрового ИФА было определено содержание J цепи в среде культивирования двух линий – RPMI 1788 и Namalva, оппозитных по уровню секреции IgM (таблица). Концентрация J цепи в среде культивирования клеток RPMI 1788 и Namalva была одинаковой.

Таблица. Концентрации J-цепи и IgM в культуральных жидкостях в пересчете на 1000 клеток и их процентное соотношение.

Клеточные линии	[IgM], пг/1000 клеток	[J-цепь], пг/1000 клеток	J/IgM, %
RPMI1788	27 000	11,2	0,04%
Namalva	830	9,9	1,2%

Для оценки степени полимерности секретируемых клетками продуктов было вычислено соотношение концентраций IgM и J цепи. Поскольку молекулярные массы IgM и J цепи составляют 970 КДа и 15 КДа соответственно, массовая доля J цепи в пентамерах близка к 1,5%. Оценивая отношение весовых количеств J цепи и IgM в образце, можно судить о наличии в нем пентамерных и гексамерных молекул IgM. В культуральной среде линии Namalva это отношение было близко к показателю, характерному для пентамерных молекул, тогда как в среде линии RPMI 1788 это соотношение было в 30 раз меньше, что указывает на преимущественную продукцию клетками RPMI 1788 молекул IgM, не содержащих J цепь, т.е. гексамеров.

Обсуждение

В Российской коллекции клеточных культур представлены лимфобластоидные линии Namalva и RPMI 1788, которые известны как продуценты IgM, а также линия Raji, которая синтезирует IgM, но не секретирует его. Сведения о синтезе Ig клетками NC-37 в доступной литературе не обнаружены. В настоящей работе получены количественные данные о внутриклеточном содержании и секреции полимерных форм IgM клетками перечисленных

линий. Данные легко воспроизводимы, поскольку получены с помощью современных методов, основанных на применении МкАт.

Для определения концентраций внутриклеточного и секретируемого IgM была использована система ИФА на основе МкАт, которая позволяла исключать из пула определяемых мономерные молекулы IgM. С помощью проточной цитофлуориметрии оценена гетерогенность клеточных популяций по суммарному содержанию IgM, включая цитоплазматические и мембранно-связанные формы. Результаты исследования показали, что линия RPMI 1788 отличается от трех остальных высоким уровнем секреции IgM. Среди многочисленных производных сублиний Namalva описаны штаммы, не синтезирующие IgM, а также штаммы, обладающие разным уровнем продукции и секреции этого Ig [9, 10]. Полученные данные указывают на принадлежность изученной популяции к варианту со сравнительно высоким уровнем секреции IgM. Сведения о синтезе IgM клетками NC-37 приведены впервые.

Опубликованные данные о продукции J цепи клетками линий Namalva, RPMI 1788 и Raji носят качественный характер [17], а сведения о линии NC-37 отсутствуют.

В настоящей работе впервые для изучения коллекционных клеточных линий были использованы методы, основанные на применении МкАт против J цепи человека. Применение проточной цитофлуориметрии позволило оценить степень однородности популяций клеток, синтезирующих J цепь. Впервые разработанная иммунометрическая система определения J цепи, имеющая порог детекции 10 пг/мл, позволила обнаруживать антиген в клетках с низким уровнем синтеза. Поскольку каждая пентамерная молекула IgM содержит одну молекулу J цепи, а гексамерные молекулы не несут J цепь, соотношение весовых количеств IgM и J цепи позволяет выявить преобладание пентамерных или гексамерных форм среди секретируемых молекул IgM. Проведенный расчет показал, что среди молекул IgM, синтезируемых клетками Namalva и NC-37 доминируют пентамеры, тогда как в продуктах секреции клеток RPMI 1788 преобладают полимерные формы, лишенные J цепи, которые, по всей видимости, являются гексамерами.

Многие аспекты структуры и функционирования в организме антител класса IgM изучены недостаточно. Например, лишь недавно предложена новая пространственная модель пентамера IgM, которая постулирует не планарную, а грибовидную форму этой молекулы [18]. Не ясно, синтезируются ли гексамеры IgM в нормальном организме и выполняют ли они какую-либо физиологическую функцию. До недавнего времени не были известны Fc-

рецепторы, которые, подобно рецепторам других Ig [19, 20] обеспечивают взаимодействие IgM с клетками иммунной системы. В последние годы описаны два рецептора, один из которых связывает IgM и IgA (Fc μ R), а другой – только IgM (Fc μ). Первый экспрессирован преимущественно на фолликулярных дендритных клетках и В-клетках маргинальной зоны лимфатических узлов, второй представлен на Т- и В- лимфоцитах [21, 22]. Из этого следует, что участие IgM в целом ряде иммунологических процессов обеспечивается механизмами, которые еще предстоит изучить. Показано также, что представления о преходящем характере продукции IgM при иммунном ответе и об отсутствии IgM-памяти подлежат ревизии [23, 24]. Наконец, получены данные об участии естественных IgM-антител в поддержании иммунологической толерантности [25, 26] и в реализации некоторых форм противоопухолевого иммунитета [27].

Перечисленные сведения позволяют ожидать развития исследований механизмов продукции и функционирования IgM. Постоянные клеточные линии, продуцирующие молекулы IgM, могут служить объектами исследований в этой области, а в перспективе – основой создания линий-продуцентов препаратов IgM с полезными свойствами. Преимущество линий, изученных в настоящей работе, состоит еще и в том, что они детально охарактеризованы кариотипически [28] и, судя по имеющимся данным, не контаминированы клетками посторонних штаммов.

Авторы выражают благодарность за помощь в исследовании клеток на проточном цитофлуориметре Мамай И.Н. и Киселевой Л.Н., а также Смирновой Т.Д. за ценные советы и содействие в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 08-04-00513.

Список литературы

1. **Woof J.M., Mestecky J.** Mucosal immunoglobulins. *Immunol. Revs.* 2005, 206: 64–82.
2. **Koshland, M.E.** The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Ann. Rev. Immunol.* 1985, 3: 425–453.
3. **Morrison S.L., Koshland M.E.** Characterization of the J chain from polymeric immunoglobulins (IgA-IgM immunological specificity-primary structure). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972, 69: 124–128.
4. **Randall T.D., Brewer J.W., Corley R.B.** Direct evidence that J chain regulates the polymeric structure of IgM in antibody-secreting B cells. *J. Biol.Chem.* 1992, 267: 18002–18007.
5. **Климович В.Б., Самойлович М.П., Климович Б.В.** Проблема J-цепи иммуноглобулинов (обзор литературы). *Журнал эволюционной биохимии и физиологии.* 2008, 44: 131–143.

6. **Niles M.J., Matsuuchi L., Koshland M.E.** Polymer IgM assembly and secretion in lymphoid and nonlymphoid cell lines: evidence that J chain is required for pentamer synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1995, 92: 2884–2888.
7. **Randall T.D., Parkhouse R.M.E., Corley R.B.** J chain synthesis and secretion of hexameric IgM is differentially regulated by lipopolysaccharide and interleukin 5. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1992, 89: 962–966.
8. **Braathen R., Hohman V.S., Brandzaeg P., Johansen F.E.** Secretory antibody formation: conserved binding interactions between J chain and polymeric Ig receptor from humans and amphibians. *J. Immunol.* 2007, 178: 1589–1597.
9. **Gui K., Middleton P. G., Docherty L. J. M., De Angeli C. L., Steel C.** MHC class II antigen and immunoglobulin expression in spontaneous phenotypic variants of the Burkitt's lymphoma cell line Namalwa. *Immunology.* 1986, 59: 603–610.
10. **Middleton P.G., Steel C.M.** Variant sublines of the human B-lymphoma cells Namalwa are at different stages of differentiation. *Immunology.* 1987, 61: 383–386.
11. **Dospkei C. L., Livingston G. K., Schumaran B. L., Srivastava A. K.** Structural and numerical chromosomal aberrations in a metabolically competent human lymphoblast cell line (MCL-5). *Mutagenesis.* 1998, 13: 275–280.
12. **Климович В.Б., Самойлович М.П., Крутецкая И.Ю., Грязева И.В., Шмидт Е.Н., Котова Т.С.** Получение и иммунохимическая характеристика моноклональных антител против IgM человека. *Биотехнология.* 1997, 4: 40–46.
13. **Самойлович М.П., Грязева И.В., Климович В.Б., Артемьева А.К., Писарева М.Н., Климович В.Б.** Моноклональные антитела против J-цепи полимерных иммуноглобулинов. *Российский иммунологический журнал.* 2008, 2(11): 398–404.
14. **Nakane P.K., Pierce G.B.** Enzyme-labelled antibodies. Preparation and application for localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 1966, 14: 929–931.
15. **Джонсон Дж.** Методы иммунофлуоресценции. В кн.: *Антитела.* М., Мир, 1991, 2: 268–300.
16. **Kobayashi K., Vaerman J. P., Bazin H., Le Bacq-Verheyden A. M., Heremans J. F.** Identification of J-chain in polymeric immunoglobulins from a variety of species by cross-reaction with rabbit antisera to human J-chain. *J. Immunol.* 1973, 111: 1590–1594.
17. **Benjamin D., Magrath I., Maguire R., Janus C., Todd H.D., Parsons R.G.** Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type. *J. Immunol.* 1982, 129: 1336–1342.
18. **Czajkowsky DM, Shao Z.** The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009, 106: 14960–14965.
19. **Nimmerjahn F., Ravetch J.V.** Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* 2007, 96: 179–204.
20. **Климович В.Б., Самойлович М.П.** Иммуноглобулин А (IgA) и его рецепторы (обзор литературы). *Медицинская иммунология.* 2006, 8: 483–500.
21. **Kikuno K., Kang D-W., Tahara K., Torii I., Kubagawa H.M., Ho K., Baudino L., Nishizaki N. Shibuya A., Kubagawa H.** Unusual biochemical features and follicular dendritic cell expression of human Fcα/μ receptor. *Eur. J. Immunol.* 2007, 37: 3540–3550.
22. **Kubagawa H., Oka S., Kubagawa Y., Torii I., Takayama E., Kang D-W., Gartland G.L., Bertoli L.F., Mori H., Takatsu H., Kitamura T., Ohno H., Wang J-Y.** Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcμR) in humans. *J. Exp. Med.* 2009, 206: 2779–2793.

23. **Dogan I., Bertocci B., Vilmont V., Delbos F., Mégret J., Storck S., Reynaud C-A., Weill J-C.** Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology*. 2009, 10: 1292–1300.
24. **Racine R., Winslow G.M.** IgM in microbial infections: Taken for granted? *Immunol. Letters*. 2009, 125: 79–85.
25. **Boes M.** Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol*. 2000, 37: 1141–1149.
26. **Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette B.C, Marshak-Rothstein A, Chen J.** Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000, 97: 1184–1189.
27. **Vollmers H., Brandlein S.** Natural antibodies and cancer. *New Biotechnology*. 2009, 25: 294–298.
28. **Мамаева С.Е.** Атлас хромосом постоянных клеточных линий человека и животных. М., Мир, 2002. 236 с.