

## NEUROANTICORPI: ESPRESSIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI SPECIFICI IN CELLULE DEL SISTEMA NERVOSO \*

A. CATTANEO

Istituto di Neurobiologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma

**Riassunto.** - Sulla base dei risultati di recenti esperimenti in cui è stata studiata l'espressione di geni per immunoglobuline in cellule non-linfoidi, viene proposta in questo lavoro una nuova metodica sperimentale (neuroanticorpi) per lo studio del sistema nervoso centrale di mammifero, basata sulla secrezione locale da parte di cellule del sistema nervoso centrale stesso di anticorpi diretti contro molecole biologicamente attive agenti nell'ambiente neuronale extracellulare, quali neurotrasmettitori, neuropeptidi, fattori di crescita o loro recettori. Tale metodica sperimentale dovrebbe costituire un mezzo per poter interferire specificamente con funzioni nervose di selezionate popolazioni neuronali in un tessuto nervoso intatto.

**Summary** (Neuroantibodies: expression of specific monoclonal antibodies in cells of the nervous system). - On the basis of the results of recent experiments in which the expression of immunoglobulin genes in non-lymphoid cells has been studied, a new experimental strategy (neuroantibodies technique) for the study of the mammalian central nervous system (CNS) will be described, based on the local secretion by cells of the CNS themselves of monoclonal antibodies directed against biologically active molecules acting in the neuronal extracellular environment, such as neurotransmitters, neuropeptides, growth factors or their receptors. Such an experimental strategy should provide us with means to interfere specifically with neural functions of selected neuronal populations in an otherwise intact tissue.

### Introduzione

In questo lavoro verrà descritto un nuovo approccio sperimentale per lo studio del sistema nervoso, basato sull'espressione locale da parte di cellule del sistema nervoso stesso (neuroni o glia) di anticorpi monoclonali specifici, allo scopo di perturbare selezionate vie sinaptiche o sottopopolazioni cellulari (*neuroanticorpi*).

L'utilizzazione di anticorpi specifici per interferire con molecole e/o funzioni endogene in un tessuto od organi-

simo intatto non è nuova, basti citare come paradigmatico il classico esperimento della distruzione selettiva delle cellule del sistema nervoso simpatico (*immunosympatectomia*) ottenuta mediante iniezioni di anticorpi anti-NGF (nerve growth factor) [1]. Tuttavia, l'iniezione di anticorpi nel sistema nervoso centrale soffre di notevoli limitazioni, tra le quali la diffusibilità limitata, la vita media breve e la impossibilità di compiere esperimenti durante le fasi precoci dello sviluppo embrionale. L'approccio sperimentale che verrà illustrato nel seguito e di cui verranno descritti alcuni aspetti si propone di superare queste limitazioni. Esso si basa: a) sulla disponibilità di linee cellulari produttrici di anticorpi monoclonali (ibridomi) e b) sulle tecniche di trasferimento genico oggi disponibili. Una linea cellulare di ibridoma che produce un singolo anticorpo monoclonale la cui specificità antigenica sia di interesse può infatti essere utilizzata per isolarne non solo l'anticorpo in questione, ma anche le sequenze di DNA riarrangiate che codificano per l'anticorpo stesso. E' poi possibile, in linea di principio, trasferire tali sequenze di DNA in contesti cellulari differenti da quelli originari. In particolare, verrà esaminata la possibilità di trasferire sequenze di DNA codificanti per immunoglobuline specifiche in cellule del sistema nervoso (neuroanticorpi).

Prerequisito essenziale perché tale approccio risulti valido è che cellule non-linfoidi possano far fronte a tutti i complessi eventi biosintetici post-traduzionali che sono richiesti per assemblare e secernere nel mezzo extracellulare una molecola di anticorpo funzionale. Per saggiare questa possibilità, sono stati compiuti recentemente esperimenti intesi a studiare l'espressione delle immunoglobuline in cellule non-linfoidi [2]. A questo scopo, sono stati costruiti plasmidi in cui sequenze di DNA codificanti per la catena leggera e pesante di una immunoglobulina M (IgM) specifica per l'aptene nitrofenacetile (NP) sono poste sotto il controllo trascrizionale di un promotore inducibile con la temperatura; il DNA di questi plasmidi è stato introdotto per trasfezione in differenti linee cellulari non-linfoidi. Cloni cellulari stabilmente trasfettati sono stati derivati dalle diverse linee cellulari e caratterizzati per la capacità di assemblare, glicosilare e

\* Lavoro presentato al 1° Convegno Nazionale "Giovani Cultori delle Neuroscienze" (Roma, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 11-12 dicembre 1987) su invito del Comitato scientifico del convegno.

secernere immunoglobuline M capaci di riconoscere l'antigene corrispondente. Si è visto che tutte le cellule non-linfoidi studiate sono in grado di assemblare, glicosilare e secernere IgM, e che i livelli di secrezione sono molto variabili tra le varie cellule studiate, tra circa 5 ng/ml/10<sup>6</sup> cellule/giorno nel caso di trasfettanti di cellule HeLa, CHO, 3T3 e Rat1, a livelli 100 volte maggiori (500 ng/ml/10<sup>6</sup> cellule/giorno) per trasfettanti di cellule di glioma (C6) di feocromocitoma (PC12) o di plasmacitoma (J558L). Abbiamo anche osservato che la IgM secreta dal trasfettante di glioma C6 è pentamerica, come quella secreta da plasmacellule, nonostante l'assenza nel glioma stesso della catena polipeptidica J, fino ad oggi ritenuta responsabile della pentamerizzazione e secrezione della IgM.

## Risultati e discussione

Verranno descritte ora alcune proprietà aggiuntive dei cloni trasfettanti di glioma e di feocromocitoma. La Fig. 1 mostra la distribuzione intracellulare dell'anticorpo espresso da un clone trasfettante di glioma C6 dopo induzione termica, evidenziata mediante immunofluorescenza indiretta con anticorpi anti catena leggera  $\lambda$  (Fig. 1 A), anti catena pesante  $\mu$  (Fig. 1 B, sinistra) o anti-idiotipo (Fig. 1 B, destra), che riconoscono soltanto la catena pesante e leggera in associazione. Si vede che l'anticorpo è diffuso nel citoplasma, fin nelle parti più periferiche della cellula, dove si riconosce una distribuzione punteggiata che potrebbe corrispondere a vescicole di se-

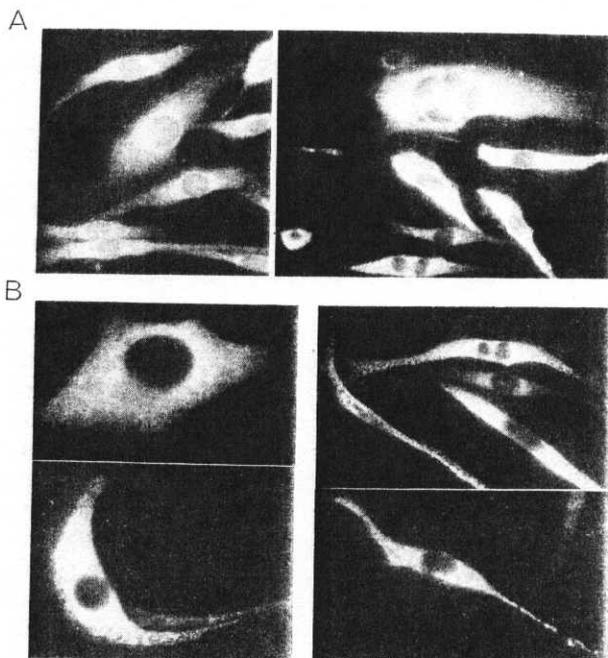


Fig. 1. - Distribuzione intracellulare della IgM in cellule trasfettanti C6  $\lambda$   $\mu$ . Le cellule sono state incubate per 45 min a 42 °C, e dopo 12 ore a 37 °C sono state fissate, permeabilizzate e incubate con anticorpi anti catena leggera  $\lambda$  di topo (A), anti catena pesante  $\mu$  di topo (B, sinistra) e anticorpo monoclonale Ac 38 (B, destra), diretto contro l'idiotipo dell'anticorpo espresso dal glioma.

crezione. È interessante osservare che si può sfruttare la inducibilità dell'espressione dell'anticorpo in queste cellule per studiare la cinetica della migrazione intracellulare di una proteina secretoria in una cellula a morfologia complessa quale il glioma o il feocromocitoma differenziato con NGF. Si può infatti indurre brevemente la sintesi di IgM e studiarne la distribuzione intracellulare a vari tempi dopo l'induzione: si può così dimostrare un accumulo nel tempo di anticorpi alla periferia della cellula, anche nelle sue regioni più distali, corrispondente a quelle molecole in procinto di essere secrete. Si noti pure che la secrezione di IgM nel glioma e nel feocromocitoma (così come nelle plasmacellule) segue la *via secretoria costitutiva* (e non quella regolata): non è possibile infatti osservare in tali cellule un aumento della secrezione indotto da ionofori del calcio o (nel caso delle PC12) da  $\alpha$ -latrotossina (dati non mostrati).

I livelli di mRNA per la catena pesante e leggera delle immunoglobuline nel trasfettante di glioma sono stati misurati mediante Northern blot (Fig. 2) e confrontati con quelli presenti in trasfettanti del plasmacitoma J558L, che esprimono costitutivamente una catena leggera  $\lambda$  endogena (parentale) ed una catena pesante  $\mu$  (trasfettata) inducibile termicamente. Si vede chiaramente che sia i livelli di mRNA per la catena leggera che quelli per la catena pesante in vari cloni trasfettanti di glioma sono molto inferiori a quelli corrispondenti del plasmacitoma. Si osservi che questo risultato non è causato da un differenziale dosaggio genico derivante da un diverso numero di copie del gene trasfettato integrato. Questo risultato, inoltre, sembrerebbe contrastare con il fatto che, come ricordato sopra, i livelli di anticorpo secreto dalle due linee cellulari sono confrontabili. Per approfondire le ragioni di questa apparente discrepanza, è stato compiuto l'esperimento mostrato in Fig. 3, in cui la quantità di anticorpo sintetizzato in 24 ore dai trasfettanti di glioma e di plasmacitoma e trattenuta *dentro la cellula* è stata confrontata con la quantità di anticorpo *secreta* dalle due cellule durante lo stesso periodo. Si vede chiaramente che: a) il plasmacitoma sintetizza effettivamente una maggiore quantità di catena pesante e leggera, in accordo con i maggiori livelli di mRNA per i due polipeptidi presenti nel plasmacitoma (Fig. 2) e che b) i livelli di anticorpo secreti dal glioma sono uguali (se non maggiori, in questo particolare esperimento) a quelli secreti dal plasmacitoma. Si conclude da questo esperimento che mentre nel caso del glioma il 50% delle molecole di anticorpo sintetizzate si trovano nel pool intracellulare ed il 50% vengono secrete, questo rapporto è completamente differente nel caso del plasmacitoma (che, vale la pena di ricordarlo, è la cellula fisiologicamente deputata alla secrezione delle immunoglobuline), in cui il pool intracellulare di catena pesante e leggera è 5 volte maggiore di quello secreto. Risultati simili sono stati ottenuti con i trasfettanti di feocromocitoma (dati non mostrati).

Appare dunque che l'efficienza secretoria di C6 glioma e di cellule PC12, per ciò che riguarda le immunoglobuline, è addirittura superiore a quella di un plasmacitoma. Sia le cellule C6 che PC12 derivano da tipi cellulari presenti nel sistema nervoso. I risultati ottenuti sulla loro efficienza di secrezione di anticorpi indicano che dovrebbe essere possibile indurre, mediante trasferimento delle

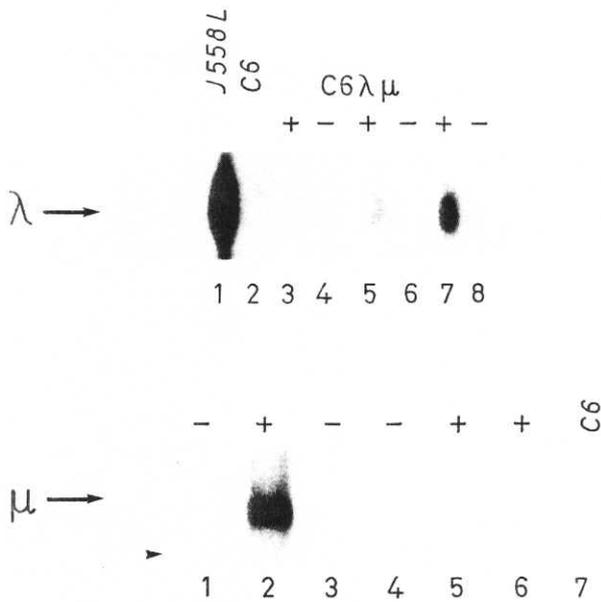


Fig. 2. - Analisi dei livelli di mRNA per catena leggera ( $\lambda$ ) e pesante ( $\mu$ ). RNA citoplasmatico totale è stato purificato da cellule di glioma C6, di plasmacitoma J558L (che esprime una catena leggera  $\lambda$  endogena) parentali e da cloni trasfettanti del glioma e del plasmacitoma. L'RNA è stato separato su un gel di agarosio e trasferito su carta di nitrocellulosa (Northern blot). I filtri di nitrocellulosa sono stati ibridizzati con sonde radioattive (marcate ad alta attività specifica con  $\alpha$ - $^{32}$ P-dATP mediante "nick-translation") specifiche per la catena leggera  $\lambda$  (sopra) e per la catena pesante  $\mu$  (sotto) di topo. I segni + e - si riferiscono all'induzione termica delle cellule. L'ordine degli RNA è il seguente. Sopra: 1: J558L, plasmacitoma parentale; 2: glioma C6, parentale; 3-8: cloni trasfettanti indipendenti di C6 glioma in cui la trascrizione dei geni trasfettanti è stata indotta (+) o non (-). Sotto: 1-2: cloni trasfettanti di J558L in cui la trascrizione del gene della catena pesante è stata (+) o non (-) indotta; 3-6: cloni trasfettanti di C6 glioma; 7: C6 glioma parentale.

sequenze di DNA opportune, la produzione di anticorpi specifici nel sistema nervoso centrale di un organismo allo scopo di interferire con la funzione e/o lo sviluppo di selezionate vie sinaptiche e sottopopolazioni neuronali.

Possiamo così sintetizzare le fasi principali della metodica dei neuroanticorpi, di cui è stata dimostrata la fattibilità in linea di principio:

1) isolamento mediante tecniche di clonaggio di DNA complementare (cDNA) delle sequenze di DNA codificanti per la catena pesante e leggera di uno specifico anticorpo a partire dall'mRNA di una linea di ibridoma che produce l'anticorpo in questione;

2) costruzione di plasmidi atti a permettere l'espressione delle sequenze di DNA in questione in cellule del

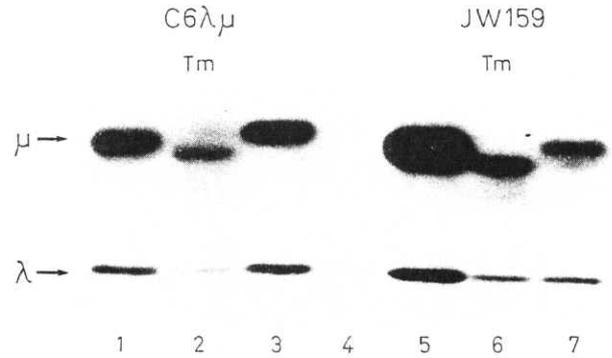


Fig. 3. - Cellule trasfettanti di C6 glioma (C6  $\lambda$   $\mu$ ) e del plasmacitoma J558L (JW159) sono state marcate metabolicamente con  $^{35}$ S-metionina per 24 ore e le molecole di anticorpo anti-NP presenti negli estratti cellulari (linee 1 e 5) e secrete durante tale tempo nei supernatanti (linee 3 e 7) sono state purificate per affinità con NP-Sepharose e separate su un gel riducente di poliacrilammide al 15%. Le linee 2 e 6 si riferiscono ai supernatanti delle rispettive cellule incubate con l'inibitore della glicosilazione tunicamicina (Tm). La linea 4 si riferisce ad un estratto di C6 passato su Sepharose in assenza di antigene.

sistema nervoso. In particolare, è possibile scegliere tra vari promotori (promotori inducibili, promotore del gene il cui prodotto si vuole bloccare con l'anticorpo, ecc.), ciascuno dei quali permette poi di porre delle domande sperimentali diverse e, in qualche misura, complementari;

3) espressione del particolare anticorpo prescelto nel sistema nervoso centrale di un organismo. Questa può essere ottenuta: a) mediante la creazione di topi transgenici, in cui cioè le sequenze di DNA per il particolare anticorpo sono inserite nella linea germinale di un topo e della sua discendenza, b) mediante trapianto in selezionate aree del sistema nervoso centrale di cellule nervose o gliali in cui siano state introdotte (con costrutti retrovirali opportunamente preparati) le sequenze di DNA per l'anticorpo in questione, c) mediante infezione diretta del sistema nervoso di un embrione con vettori retrovirali contenenti le sequenze di DNA per l'anticorpo desiderato, in modo simile a come fatto recentemente per introdurre il gene della beta-galattosidasi in cellule del sistema nervoso [3];

4) analisi neurobiologica degli organismi così ottenuti, fatta con modalità che dipendono dal particolare anticorpo prescelto.

Le fasi iniziali dell'approccio sperimentale delineato sopra sono attualmente in corso di svolgimento nel laboratorio dell'autore.

Ricevuto il 13 aprile 1988.

Accettato il 3 maggio 1988.

#### BIBLIOGRAFIA

1. LEVI-MONTALCINI, R. & BOOKER, B. 1960. Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve growth protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**: 384-391.
2. CATTANEO, A. & NEUBERGER, M.S. 1987. Polymeric immunoglobulin M is secreted by transfectants of non-lymphoid cells in the absence of immunoglobulin J chain. *EMBO J.* **6**: 2753-2758.
3. PRICE, J., TURNER, D. & CEPKO, C. 1987. Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 156-160.