

APLICACIONES DE FLIM-FRET Y DE MICROSCOPIA DE FUORESCENCIA 3D EN INMUNOHEMATOLOGÍA

APPLICATIONS OF FLIM-FRET AND 3D FLUORESCENCE MICROSCOPY IN IMMUNOHEMATOLOGY

B. Riquelme*^{1,2}, N. de Isla*³, D. Dumas*³, J. Valverde^{1,2}, J.F. Stoltz³

¹Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531 - (2000), Rosario

²Instituto de Física Rosario (IFIR), CONICET-UNR, Argentina

³Méc. Ingénierie Cellulaire et Tissulaire - UMR CNRS 7563 et IFR 111, Fac. Medicina, UHP Nancy 1, Francia
e-mail: riquelme@ifir.ifir.edu.ar

Mediante la técnica de FRET se caracterizó la aglutinación de glóbulos rojos (GR) usando fluoróforos localizados en la membrana celular (DiI) y fluoróforos (Alexa488TM) combinados por marcado secundario con anticuerpos monoclonales anti-Glicoforina A, B y C (GPA, GPB y GPC). El análisis por FLIM fue utilizado para discriminar la señal de FRET de las moléculas cuando había superposición de su emisión espectral. Se extrajeron los lípidos de la membrana de GR con Triton X-100 y se analizaron las interacciones GP-citoesqueleto por microscopía de fluorescencia 3D. Dada las propiedades fluorescentes en los GR del par Alexa488TM (donor) y DiI (acceptor), se espera observar un FRET efectivo cuando hay aglutinación de GR. FLIM en estado dinámico permite evaluar el mecanismo subyacente del proceso de transferencia de energía en los GR aglutinados. Los resultados demuestran que para excitación a 780nm, sólo se observa FLIM-FRET desde el fluoróforo Alexa488TM al DiI para los anti-GPB, con una distribución de tiempo de vida en el rango de los picosegundos, no observándose un FRET efectivo para los anti-GPA. La microscopía de imágenes fluorescentes 3D mostró interacciones tanto entre el citoesqueleto con las GPC como con las GPB pero no con las GPA. Estos resultados revelados sólo por estas técnicas, comprueban la importancia de la reactividad específica de los anticuerpos monoclonales utilizados con las Glicoforinas A, B o C.

Palabras claves: confocal, multifotón, FLIM, FRET, globulos rojos, glicoforina, citoesqueleto

FRET technique has been developed to characterize the red blood cell (RBC) agglutination based on the interaction of fluorophores (Alexa488TM, DiI) located in the RBC membrane or combined to secondary antibody directed against the anti glycophorins A, B and C monoclonal antibodies. Combined intensity (spectral) and Lifetime (FLIM) Imaging was used to discriminate the FRET signal of molecules on their different lifetimes whereas their emission spectral overlap. Furthermore, GP-cytoskeleton interactions were analyzed by 3D-fluorescence microscopy after lipid extraction with Triton X-100 in red cell. In view of the fluorescence properties depicted in RBC for the pair of fluorophore Alexa-488TM (donor) and DiI (acceptor), it may be expected that upon agglutination of RBC, effective FRET should be observed. FLIM in dynamic-state provides a discrimination of molecules in their fluorescence lifetime, which allows evaluating the underlying mechanism of energy transfer process in the agglutinated erythrocytes. The results demonstrate that's upon excitation at 780 nm the FLIM-FRET from Alexa488TM to DiI for the anti-GPB monoclonal antibodies only with a lifetime distribution in the picosecond range. 3D-fluorescence microscopy images showed interactions between GPC or GPB and cytoskeleton and did not show interactions between GPA and cytoskeleton. All together, these results only revealed by FRET-FLIM and 3D-fluorescence microscopy strongly support the importance of the specific reactivity with Glycophorin A B or C.

Keyword: confocal, multiphoton, FLIM, FRET, red blood cell, glycophorin, cytoskeleton

I. INTRODUCCIÓN

Un problema frecuente en inmunohematología es definir la calidad de los MoAb, la cual está relacionada con la constante de asociación y con su especificidad.

Las Glicoforinas son proteínas transmembranales presentes en la membrana de los glóbulos rojos (GR) cuyo segmento extracelular es rico en glúcidos, en particular el ácido siálico. En la membrana de los GR existen cuatro Glicoforinas principales: Glicoforina A (GPA), Glicoforina B (GPB), Glicoforina C (GPC) et Glicoforina D (GPD), las que representan el 2% del

total de las proteínas eritrocitarias y contribuyen al 60% de la carga negativa de los GR, por lo cual cumplen un papel importante (principalmente la GPA) en las fuerzas de repulsión entre los GR. Esta repulsión es indispensable ya que, en su ausencia, los GR se agregarían y perturbarían el flujo circulatorio.

Entre los métodos físicos de investigación en biología, la fluorescencia, por su gran sensibilidad de análisis y sus resoluciones (espectral, espacial, temporal y de orientación) ofrece posibilidades muy interesantes para el análisis de células o de tejidos. La microscopía de fluorescencia es el único medio de investigación actual que posee una resolución

* Estos autores han contribuido en partes iguales a este trabajo por lo cual deben considerarse como primeros autores.

espacial suficiente para precisar la distribución de la sonda fluorescente. La técnica de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging) es una modalidad del análisis de imágenes de fluorescencia que puede proveer importante información diferenciada entre diferentes estados del material biológico analizado. Los recientes desarrollos de láseres ultrarrápidos y detectores de bajo costo, permiten que por microscopia multifotón se realicen mediciones de FRET (fluorescence resonance energy transfer), las cuales pueden proveer una importante información de la adhesión célula-célula mediada por anticuerpos específicos.

En el presente trabajo, se estudiaron anticuerpos monoclonales (MoAb) específicos anti-glicoforina (anti-GP) utilizados como anticuerpos primarios para la aglutinación de glóbulos rojos. Mediante la técnica de FRET se caracterizó la aglutinación de los GR usando fluoróforos localizados en la membrana celular (DiI) y fluoróforos (Alexa488TM) combinados por marcado secundario con MoAb anti-GPA, GPB y GPC. El análisis por FLIM fue utilizado

para discriminar la señal de FRET de las moléculas cuando había superposición de su emisión espectral. Se analizaron también las interacciones GP-citoesqueleto por microscopía de fluorescencia 3D en GR en los cuales se habían extraído previamente los lípidos de la membrana de GR con Triton X-100.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Muestras de sangre

Se utilizaron GR de sangre provenientes de dadores sanos, extraídas por venipuntura en recipientes con EDTA como anticoagulante. Las muestras fueron almacenadas a 4°C y analizadas dentro de las 24 horas de extraídas.

II.2. Anticuerpos monoclonales

Se utilizaron anticuerpos monoclonales (MoAb) que reconocen epitopes situados en las diferentes Glicoforinas eritrocitarias (GPA, GPB y GPC) descritos en la Tabla 1.

TABLA 1. Características de los anticuerpos monoclonales utilizados en este estudio

Anticuerpo	Especificidad	Serología Anti-	Concentración (µg/ml)	Especie & Clase	Epitope
NaM167-8A2 (3-16)	GPA (débil) + GPB	GPA + GPB	55	mIgG1	GPA: 1-9 GPB: 1-9
NaM228-2E2 (3-17)	GPA + GPB (débil)	EnaTS	43	mIgG2b	GPA: 34 - 38
NaM26-3F4 (3-46)	GPAN (débil) + GPB	EnaFS	65	mIgG1	GPA: 49 - 52 GPB: 34 - 37
NaM10-6G4 (3-47)	GPA	EnaTS	5.3	mIgG2a	GPA: 38 - 43
64-5B11	GPC	Ge4	34	mIgG	Necesita Met ¹
64-7F11	GPC	Ge4	27	mIgG	GPC: 16-20

II.3. Protocolo de marcado para el análisis por FLIM-FRET

La membrana de los GR fue marcada con DiI 3,3'-diiodo-5,6-dipropil-1,2,3-tetrazolocarboyanine perclorato (2.15 mM, Molecular Probes, $\lambda_{ex} = 549$, $\lambda_{em} = 565$). Los GR marcados con DiI fueron aglutinados mediante los MoAb, y revelados por marcado secundario con anticuerpos combinados con Alexa488TM ($\lambda_{ex} = 495$, $\lambda_{em} = 519$)

II.4. Protocolo de marcado para el análisis de la interacción de las glicoforinas con el citoesqueleto

Los GR fueron incubados con los MoAb anti-glicoforinas específicos y revelados por MoAb secundarios combinados con Alexa488TM. Las células fueron fijadas con PAF 1% in PBS durante 20 minutos, resuspendidas en una solución de PBS/BSA y tratadas con TMA-DPH (1-[4-(Trimethylamino) phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene, $\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 430$ nm) durante 10 minutos. Luego se dejó que las células se adhirieran a un portaobjetos de vidrio y se observaron en microscopía

de fluorescencia. Se agregó a continuación una solución de PBS con Triton X-100 1% y Palloidin-Alexa633TM ($\lambda_{ex} = 632$ nm, $\lambda_{em} = 647$ nm). Las imágenes se registraron luego de 30 minutos de incubación para asegurar la delipidación de la membrana .

II.5. Microscopía Confocal

Se utilizó un microscopio de fluorescencia Leica Microsystems TCS SP2-AOBS, acousto-optical beamsplitter, Láser de Argón (457nm, 476nm, 488nm, 514nm), láser de HeNe (543nm y 633nm), Obj.: x63 de inmersión en aceite, NO: 1,32. FLIM: láser Ti-zafiro bombeado por un láser continuo de argón (Mira 900F-Verdi 8W, Coherent, pinhole fully opened, beam expander 3), ancho de pulso desde 120 fs, velocidad de repetición de 76 MHz, SPC-730 TCSPC Imaging module (Becker&Hickl, Berlin) interfaced (signals, Line Clock, Frame Sync), fotomultiplicador de alta sensibilidad R6357 Hamamatsu. SPC Software para análisis de imágenes, Becker&Hickl GmbH.

III. RESULTADOS

III.1. Aplicación de FIM-FRET para caracterizar anticuerpos

El tiempo de vida de fluorescencia promedio del fluoróforo aislado (Alexa488TM) es de alrededor de 4,13 ns. Cuando el fluoróforo Alexa488TM está combinado con el MoAb secundario (IgG), su tiempo de vida de fluorescencia promedio está en el rango del nanosegundo (1,7 a 2,2 ns) pero por arriba de la transferencia de energía; el que debe estar en los picosegundos (350 a 750 ps). El tiempo de vida reducido del Alexa488TM (indirectamente combinado con los MoAb 3-16 y 3-46) indica una interacción molecular con el DiI incorporado en la membrana del GR (Figura 1). El requerimiento de proximidad para la ocurrencia de FRET no fue encontrado para los MoAb 3-47 y 3-17. El contraste en los tiempos de vida de fluorescencia es un indicador confiable para las variaciones espaciales de la asociación donador-aceptor.

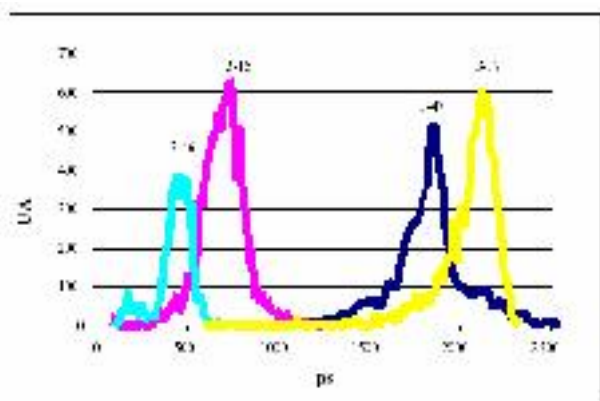


Figura 1. Histograma temporal mostrando la distribución de tiempo de vida de fluorescencia de Alexa488TM combinado indirectamente a diferentes MoAb (ajuste bi-exponencial).

III.2. Colocalización receptor-citoesqueleto luego de la extracción de lípidos de la membrana del GR

Para analizar las interacciones entre las Glicoforinas y el citoesqueleto de los GR, se utilizó la microscopia de fluorescencia 3D. El objetivo fue analizar la fluorescencia ligada a los receptores membranales luego de la delipidación de la membrana de GR con un detergente no iónico, el Triton X-100. Si una proteína transmembranal no esta unida al citoesqueleto, a medida que los lípidos de la membrana se solubilizan, la proteína se escapará de la estructura que la contiene. Al contrario, si una proteína esta unida al citoesqueleto, permanecerá unida, aun cuando los lípidos de la membrana de GR sean solubilizados. La presencia de fluorescencia debido a las Glicoforinas luego de la solubilización de la membrana indicarían entonces una interacción entre las glicoproteínas y el citoesqueleto.

La Figura 2 muestra las imágenes obtenidas luego de tratar las muestras con distintos MoAb anti-GPC (a,

b), anti-GPB (c, d) y anti-GPA (e, f). Para los MoAb anti-GPC y anti-GPB se observa el color verde en las imágenes, indicando la presencia de Alexa488TM unido indirectamente a las GPC o GPB e indicando una interacción entre la GPC o la GPB y el citoesqueleto del GR. Por el contrario, no se observa la presencia de Alexa488TM para las muestras incubadas con MoAb anti-GPA indicando que no existe interacción entre la GPA y el citoesqueleto.

IV. DISCUSION

Los MoAb dirigidos contra los epitopes presentes en las Glicoforinas de GR (GPA, GPB, GPC) fueron caracterizados mediante el uso de técnicas basadas en la microscopía de fluorescencia

Se utilizó la técnica de FLIM como un fenómeno independiente de la concentración de fluoróforo y del photobleaching, para discriminar las señales de FRET entre Alexa488TM unido por marcado secundario a las Glicoforinas eritrocitarias y el DiI intercalado entre los lípidos de la membrana de GR.

Además, se utilizó la microscopía de fluorescencia 3D para analizar las interacciones entre las Glicoforinas (marcadas con Alexa488TM por marcado secundario) y el citoesqueleto. Para ello se desarrolló una técnica en la cual la intensidad de fluorescencia del Alexa488TM es medida como una función del tiempo, en GR adheridos a un portaobjetos, a los cuales se les extraen los lípidos de la membrana con Triton X-100.

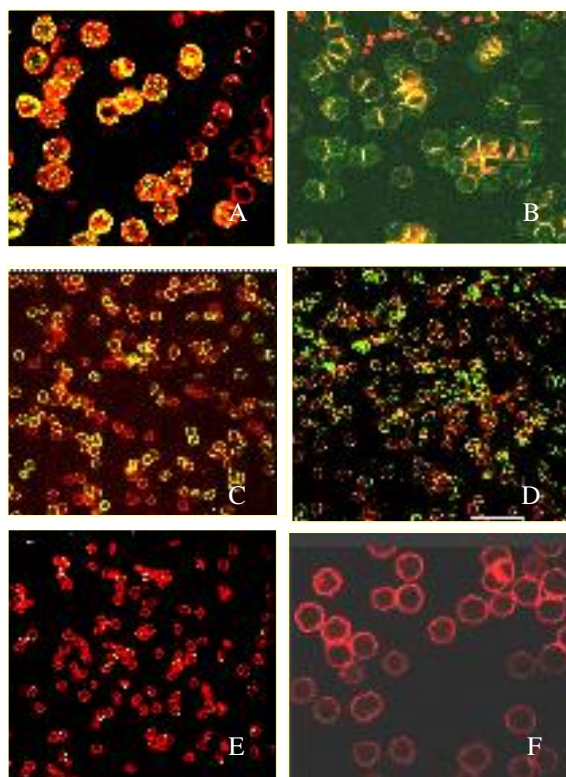


Figura 2. Colocalización receptor - citoesqueleto de GR luego de la delipidación de la membrana plasmática: A) ant-GPC, B) anti-GPC, C) ant-GPB, D) anti-GPB, E) anti-GPA, F) anti-GPA.

Los resultados revelados sólo por estas técnicas, comprueban la importancia de la reactividad específica de los MoAb utilizados con las Glicoforinas A, B o C. Las técnicas aquí desarrolladas pueden aplicarse a la caracterización de MoAb dirigidos contra diferentes sitios de las Glicoforinas eritrocitarias. Estos métodos podrían también aplicarse a la caracterización de diversos MoAb dirigidos contra otros antígenos de la membrana de glóbulo rojo.

REFERENCIAS

- 1 - Dumas D, Riquelme B, de Isla N. *Leica Microsystem* 7, 2-6 (2003).
- 2 - Riquelme B, Dumas D, Valverde J, Rasia R., and Stoltz J. *Proceedings of SPIE* (2003).
- 3 - Riquelme B, de Isla N, Valverde J R, Stoltz, JF and Rasia R *Vox Sanguinis*, **83**(2), 153 (2002).
- 4 - de Isla, N. *Etude des Interactions Antigènes-Anticorps par des techniques optiques. Application aux protéines de surface érythrocytaires*. Tesis doctoral UHP Nancy1, 2003.