

Human hepatocellular membrane antigens : studies on PLC/PRF/5 cells

Citation for published version (APA):

de Koning, R. W. (1985). *Human hepatocellular membrane antigens : studies on PLC/PRF/5 cells*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19850315rk>

Document status and date:

Published: 01/01/1985

DOI:

[10.26481/dis.19850315rk](https://doi.org/10.26481/dis.19850315rk)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

SUMMARY

In this thesis the usefulness of PLC/PRF/5 cells, derived from a well differentiated human hepatocellular carcinoma, for studies of liver disease is explored. These studies focussed mainly on membrane antigens. After the identification of a number of wellknown antigens on PLC/PRF/5 cells, we attempted to induce polyclonal and monoclonal antibodies against these cells, looking for the emergence of hepatocellular carcinoma specific antibodies which might be useful for diagnosis or therapy. In a parallel series of experiments the usefulness of PLC/PRF/5 cells for the detection of liver membrane reactive antibodies was evaluated.

Chapter I contains a review of the literature of selected clinicopathological and cytopathological aspects of hepatocellular carcinoma (HCC). It appears that HCC is heterogeneous from an epidemiological, etiological and pathological point of view. Problems related to diagnosis and screening are discussed. The results of the available therapeutic regimens were disappointing. Tumour specific antigens could be useful for the diagnosis and for follow-up evaluation of therapeutic procedures. Such antigens would also provide the opportunity to raise specific anti-tumour antibodies which could be conjugated with toxins such as ricin. From reviewing of the available literature it becomes clear that it is virtually impossible to raise tumour specific antibodies by conventional methods. The discovery of the monoclonal antibody (McAb) technique intensified the search for tumour specific antigenic determinants. This approach seems to be the only possible way to identify tumour specific antigens, which could then be used for diagnostic tests and therapeutic procedures of superior efficacy. The results of monoclonal antibody studies on other types of cancer justified moderate optimism.

In *Chapter II* the literature on liver membrane antibodies (LMA) in inflammatory liver disease is reviewed. Autoantibodies to cytoplasmic organ non-specific antigens have been shown to be of diagnostic value in inflammatory liver diseases. In the last decade autoantibodies reacting with liver cell membrane antigens were detected. These antigens were proven to be partly species-specific, partly species-non-specific. In the formation of liver membrane antibodies in inflammatory liver diseases probably multiple antigen systems play a part. This would explain the variability in the literature concerning the pathogenetic significance of LMA. In spite of their diversity, these antibodies have appeared to be of important diagnostic value.

In *Chapter III* the results of a study on the occurrence of various membrane antigens on PLC/PRF/5 cells are reported. Whereas on normal human hepatocytes HLA class I antigens are sparsely displayed, we detected intense expression of HLA class I antigens on the cell membrane of PLC/PRF/5 cells. We also found expression of virus coded hepatitis B surface antigen (HBsAg) in the membrane of a majority of the PLC/PRF/5 cells. In line with data from the literature, it is suggested that integra-

tion of the HBV genome in PLC/PRF/5 cellular DNA has a pivotal role in the increased HLA density as well as in the expression of additional antigens at the A locus. In a minority of cells the capping of HLA antigen resulted in cocapping of HBsAg. This observation suggests that these antigens may be physically associated in the cell membrane. The significance of this finding is not clear.

On PLC/PRF/5 cells we also found the OKT9 antigen, which is present on many rapidly dividing normal and malignantly transformed cells. Recent studies have demonstrated that the antigen is in fact the transferrin receptor, also present on normal hepatocytes. However, it has been established that rapidly dividing cells show enhanced expression of this receptor protein.

In *Chapter IV* attempts to induce antibodies against PLC/PRF/5 cells are reported. Conventional as well as hybridoma methods were applied. For the induction of polyclonal antibodies we attempted to reduce the response of non-specific surface antigens on PLC/PRF/5 cells by masking of these antigens through incubation with an antiserum against normal human liver cells. These incubated PLC/PRF/5 cells were used for immunization. Purification of the obtained antiserum was attempted by extensive immune adsorption with HBsAg, human lymphocytes and liverhomogenates. After adsorption, immunoreactivity against hepatitis B viral antigens, human lymphocytes and hepatocytes was nearly absent. Low-affinity immunoreactivity with PLC/PRF/5 cells remained however. Reactivity was also observed with another hepatocellular carcinoma, but appeared to be predominantly cytoplasmic. Furthermore, cytoplasmic cross-reactivity with testicular and prostatic tissue as well as with ovarian and colonic carcinoma cells was demonstrated. This approach did not provide tumour specific antibodies which might be useful for diagnosis or therapy. We turned therefore to the hybridoma methodology. Several hybridomas producing monoclonal antibodies (McAb) against various membrane antigens on PLC/PRF/5 cells were obtained. After six fusions only one McAb (VI-196) remained which did not show crossreactivity with a panel of viral and fetal antigens neither with neoplastic cell lines of non-hepatocellular origin nor with normal human and rat hepatocytes. Testing by immunofluorescence on frozen sections of six human hepatocellular carcinoma specimens showed no immunoreactivity. This disappointing finding can be explained by insensitivity of the immunofluorescence technique on frozen sections, by reduction of the immunoreactivity of antigen(s) due to fixation of the sections or to antigenic heterogeneity of HCC.

McAb VI-235 reacted with PLC/PRF/5 cells but also with normal human liver cells. However, no reactivity with the other cell types used for specificity testing was found. This McAb therefore appeared to react with an antigen occurring only on human (normal as well as neoplastic) hepatocytes. McAb I-28 reacted only with hepatocytes of human as well as of rat origin. McAb VI-133 reacted with an antigen on bile canaliculi. Finally, McAb VI-191 showed immunoreactivity with an epitope of the hepatitis B surface antigen. Summarizing, out of six fusions we obtained one McAb with a PLC/PRF/5 cell restricted immunoreactivity.

Chapter V describes two studies concerning the use of PLC/PRF/5 cells for the detection of liver membrane antibodies in chronic inflammatory liver disease.

The first is a pilot study, evaluating the feasibility of an assay with PLC/PRF/5 cells as substrate for the detection of liver membrane reactive antibodies by immunofluorescence. Ten sera of patients with various types of chronic liver disease were tested in a conventional liver membrane antibody (LMA) assay on rabbit hepatocytes and tested again on PLC/PRF/5 cells. A close correlation was found between the immunofluorescence results obtained with the two different substrates. Visual reading of immunofluorescence preparations was compared with flowcytometric analysis of identically processed cell suspensions. With these different methods the results were mostly the same. It was concluded that PLC/PRF/5 cells could be a valuable new substrate for detection of liver membrane antibodies and that flowcytometry could be a valuable method for objective and quantitative analysis of the results.

In the second study the PLC/PRF/5 cell assay was tested by visual as well as flowcytometric reading on 91 sera of patients with various forms of chronic inflammatory liver disease. The immunoglobulin class of PLC/PRF/5 cell reactive antibodies was determined. The same sera were also tested in a conventional LMA assay on rabbit hepatocytes. In the conventional assay 12 sera were positive. Only 5 of these sera were also positive in the PLC/PRF/5 cell assay. An additional 20 sera showed reactivity only on PLC/PRF/5 cells. Of these 20 sera 5 contained antibodies against HBsAg. In the remaining 15 sera mainly IgM antibodies reacted with PLC/PRF/5 cells. With the exception of drug induced hepatitis, positive samples were found in all disease categories. A positive correlation was found between visual reading and flowcytometric analysis.

It was concluded that in the PLC/PRF/5 cell assay antibodies are detected against antigens which do not occur on rabbit hepatocytes. Whether or not these antigens are relevant liver specific membrane antigens or, on the contrary, ubiquitous antigens such as HLA, remains to be established. These findings underline the need for further characterization of the antigens which are recognized by liver membrane antibodies. In *Chapter VI* our results are discussed in the context of the literature.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt de bruikbaarheid van PLC/PRF/5 cellen voor studies betreffende leverpathologie nagegaan. Deze cellen zijn geïsoleerd uit een goed gedifferentieerd menselijk hepatoma. In eerste instantie werden een aantal bekende antigenen op PLC/PRF/5 cellen geïdentificeerd. Vervolgens werden polyclonale en monoclonale antistoffen tegen PLC/PRF/5 cellen geproduceerd om daarmee hepatoma specifieke antistoffen te verkrijgen, die van diagnostisch en therapeutisch belang kunnen zijn. Tenslotte werd de bruikbaarheid van PLC/PRF/5 cellen wat betreft het opsporen van levermembraan reactieve antistoffen geëvalueerd.

Hoofdstuk I geeft een literatuuroverzicht van enige geselecteerde klinisch pathologische en cytopathologische aspecten van hepatomen (Hepatocellulair Carcinoom, HCC). Hepatomen blijken in epidemiologisch, etiologisch en pathologisch opzicht heterogeen te zijn. Problemen ten aanzien van diagnostiek en screening worden besproken. De resultaten van de bestaande behandelingswijzen zijn pover.

Tumor-specifieke antigenen kunnen van nut zijn voor de diagnostiek en voor de evaluatie van therapie. Dergelijke antigenen zouden ook de mogelijkheid scheppen tumor-specifieke antistoffen te vervaardigen, waaraan toxinen, zoals ricine, verbonden kunnen worden. Uit literatuuronderzoek is gebleken, dat het zeer moeilijk is om met conventionele methoden tumor specifieke antistoffen te maken.

De ontdekking van de hybridoma techniek gaf een nieuwe impuls voor onderzoek naar tumor-specifieke antigene determinanten. Deze techniek lijkt de enige mogelijkheid om tumor-specifieke antigenen te identificeren en zodoende een doorbraak in diagnostiek en therapie van HCC te forceren. Resultaten, behaald met monoclonale antistoffen bij het bestuderen van andere tumoren, wettigden een gematigd optimisme.

In *Hoofdstuk II* wordt de literatuur over levermembraan antistoffen (LMA) bij verschillende hepatitisen besproken. Auto-antistoffen, gericht tegen niet-orgaan specifieke cytoplasma-antigenen, blijken waardevol te zijn bij de diagnostiek van leverontstekingen. Tijdens het afgelopen decennium zijn auto-antistoffen tegen levercelmembraanantigenen ontdekt. Deze antigenen bleken deels species-specifiek, deels species-aspecifiek te zijn. Waarschijnlijk spelen meerdere antigenen een rol bij het ontstaan van levermembraanantistoffen bij leverontstekingen. Dit kan een verklaring zijn voor de bestaande verschillen van inzicht betreffende het pathologisch belang van LMA. Niettegenstaande deze diversiteit zijn deze antistoffen van diagnostisch belang gebleken.

Hoofdstuk III geeft de resultaten weer van een studie aangaande het voorkomen van membraanantigenen op de PLC/PRF/5 cel. We ontdekten een uitgesproken expressie van HLA klasse I antigenen op de PLC/PRF/5 celmembraan; dit in tegenstelling

tot een geringe expressie op normale levercellen. Tevens werd het hepatitis B oppervlakte antigeen (HBsAg) op het membraan van een meerderheid van de PLC/PRF/5 cellen aangetroffen. In overeenstemming met literatuurgegevens wordt gesuggereerd, dat de integratie van het hepatitis B virus (HBV) genoom in het DNA van de PLC/PRF/5 cel een centrale rol speelt bij de toegenomen HLA dichtheid, alsook bij de expressie van additionele antigenen ter hoogte van het A locus. Bij een klein percentage van de cellen resulteerde „capping” van HLA in „cocapping” van HBsAg. Deze bevinding suggereert, dat deze antigenen structureel met elkaar verbonden kunnen zijn in de celmembraan. De betekenis hiervan is vooralsnog niet duidelijk.

Ook het OKT9 antigeen bleek op de PLC/PRF/5 cel aanwezig. Eerder werd dit antigeen aangetroffen in verscheidene, snel delende, normale en kwaadaardig ontaarde cellijnen. Bij recent onderzoek bleek dit antigeen de transferrine receptor te zijn, die ook op normale levercellen wordt aangetroffen. Het bleek echter dat snel delende cellen in verhoogde mate dit receptor eiwit bevatten.

In *Hoofdstuk IV* worden pogingen beschreven om antistoffen tegen PLC/PRF/5 cellen te vervaardigen. Hierbij werd zowel van conventionele als van hybridisatie methoden gebruik gemaakt. We probeerden niet-specifieke oppervlakte antigenen te bedekken met antistoffen gericht tegen normale menselijke levercellen. ‘Gemaskerde’ PLC/PRF/5 cellen werden gebruikt om een konijn te immuniseren. Door uitgebreid adsorberen met HBsAg, menselijke lymfocyten en leverhomogenaten werd getracht een zo zuiver mogelijk antiserum te vervaardigen. Tegen de genoemde antigenen bleek na de adsorbtieprocedure nagenoeg geen immuunreactiviteit meer te bestaan. De PLC/PRF/5 cellen reageerden daarentegen nog steeds, zij het in mindere mate. Cytoplasma-aktiviteit was ook aanwezig in een ander hepatoom. Bovendien bleek kruisreactiviteit aantoonbaar met testis- en prostaatweefsel én met ovarium- en coloncarcinoomcellen. Deze benaderingswijze bleek derhalve geen tumor-specifieke antistoffen op te leveren, die bruikbaar zijn bij diagnostiek of behandeling van HCC. Vervolgens hebben we ons op de hybridisatie-techniek gericht. Er werden verscheidene hybridomata verkregen, die monoclonale antistoffen (McAb) vormden tegen verscheidene membraanantigenen op PLC/PRF/5 cellen. Na 6 fusies hielden we één monoclonaal antistof, McAb VI-196, over, die niet kruisreageerde met een serie van virale en foetale antigenen noch met andere tumorcellijnen noch met normale menselijke levercellen of die van de rat. Er bleek ook geen reactiviteit te bestaan bij immunofluorescentie onderzoek van vriescoupees van biopsieën van 6 verschillende menselijke hepatomen. Deze teleurstellende bevinding kan mogelijk verklaard worden door een te geringe gevoeligheid van de gebruikte techniek. Ook kunnen antigenen door fixatie beschadigd zijn en kan heterogeniteit van HCC een rol gespeeld hebben.

McAb VI-235 reageerde alleen met PLC/PRF/5 cellen en met normale menselijke levercellen die voor het specificiteitsonderzoek werden gebruikt. Dit McAb lijkt derhalve te reageren met een antigeen dat uitsluitend op humane (normale en kwaadaardige) levercellen voorkomt. McAb I-28 reageerde alleen met levercellen van zowel de mens

als de rat. Een McAb (VI-133) toonde een reactie met een antigene determinant op galcanaliculi. McAb VI-191 reageerde met een epitoom van hepatitis B antigeen (HBsAg).

Samenvattend verkregen we bij 6 fusies één McAb met een reactiepatroon dat beperkt is tot PLC/PRF/5 cellen.

In *Hoofdstuk V* worden 2 studies weergegeven, die betrekking hebben op het gebruik van PLC/PRF/5 cellen bij het opsporen van levermembraan antistoffen bij leverontstekingen. Aanvankelijk werd in een oriënterend onderzoek van 10 testsera een nauwe relatie gevonden tussen de immunofluorescentie uitkomsten van de conventionele test waarbij konijnlevercellen werden gebruikt en de PLC/PRF/5 celttest.

Voorts bleken immunofluorescentiemicroscopie en flowcytometrie van gelijke celsuspensies nagenoeg dezelfde resultaten op te leveren.

Uit het bovenstaande werd geconcludeerd, dat PLC/PRF/5 cellen een waardevol nieuw substraat voor het opsporen van levermembraan-antistoffen kunnen vormen en dat flowcytometrie een aanwinst is door de mogelijkheid de fluorescentie-gegevens te objectiveren en kwantificeren.

In de tweede studie werden 91 sera van patiënten met verschillende leverontstekingen op het voorkomen van membraan-reaktieve antistoffen onderzocht middels de conventionele alsook de PLC/PRF/5 celttest. Twaalf sera waren positief met de conventionele test. Slechts 5 van deze waren ook positief met de PLC/PRF/5 celttest. Twintig sera waren alleen positief met de PLC/PRF/5 celmethode. Van deze 20 sera bleken er 5 antistoffen tegen HBsAg te bevatten. Het merendeel van de resterende 15 sera bleek IgM antistoffen te bevatten. Met uitzondering van medicamenteuze leverontstekingen werden positieve uitslagen gevonden bij alle onderzochte hepatitisiden. Ook in deze studie werd een goede correlatie tussen microscopische beoordeling en flowcytometrisch onderzoek gevonden.

De conclusie is, dat met de PLC/PRF/5 celttest antistoffen worden gevonden tegen antigenen die niet voorkomen op konijnlevercellen. Of deze antigenen voor de pathologie relevante lever-specifieke membraanantigenen zijn óf daarentegen aspecifieke, zoals HLA, moet nog nader bestudeerd worden. Deze bevindingen benadrukken het belang van verdere karakterisering van de antigenen die reageren met sera van patiënten met de onderscheiden vormen van hepatitis.

In *Hoofdstuk VI* worden onze resultaten in samenhang met die uit de literatuur besproken.