

**Ανασυνδυσασμένα πολυπεπίδια του υποδοχέα
της ακετυλοχολίνης στην ανάπτυξη
αντιγονο-ειδικής θεραπείας της βαριάς
μυασθένειας με ανοσοπροσρόφηση
των αντι-υποδοχέα αντισωμάτων
των μυασθενικών ασθενών**

ΣΚΟΠΟΣ Η παθολογία του αυτοάνοσου νοσήματος βαριά μυασθένεια οφείλεται στα παραγόμενα αυτοαντισώματα έναντι του μυϊκού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Η πλάσμαφαίρεση αποτελεί μια σημαντική θεραπευτική αγωγή για τη μυασθένεια, αλλά απομακρύνει και πολύτιμα συστατικά του πλάσματος. Η εξωσωματική απομάκρυνση των αυτοαντισωμάτων με ανοσοπροσρόφηση σε υποδοχέα ακινητοποιημένο σε αδιάλυτο υπόστρωμα προσφέρει μια λύση, μοιλονότι η εφαρμογή αυτής της διαδικασίας για θεραπεία δυσχεραίνεται από την έλλειψη φυσικού υποδοχέα σε μεγάλες ποσότητες. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή ανασυνδυσασμένων εξωκυτταρικών περιοχών των υπομονάδων του υποδοχέα και η χρήση τους ως ειδικών ανοσοπροσροφητών των αυτοαντισωμάτων των μυασθενικών για μελλοδική εφαρμογή σε ειδική θεραπεία της βαριάς μυασθένειας. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε διαλυτή μορφή στο υπερκείμενο της καλλιέργειας του ζυμομύκητα *Pichia pastoris*, καθαρίστηκαν με τη χρήση Ni^{2+} -NTA αгарόζης και ελεγχθηκαν για τη διαλυτότητά τους με χρωματογραφία. Στη συνέχεια, αφού ακινητοποιήθηκαν σε CNBr-σεφαρόζη, χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοπροσρόφησης με 64 ορούς μυασθενικών. Τα αντισώματα που παρέμειναν στον ορό μετά την ανοσοπροσρόφηση υπολογίστηκαν με τη μέθοδο του ραδιοανοσοπροσδιορισμού. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Εκφράστηκαν και καθαρίστηκαν οι εξωκυτταρικές περιοχές (αμινοξέα ~1-210) των α, β, γ και ε υπομονάδων του υποδοχέα. Κάθε ανασυνδυσασμένη πρωτεΐνη είχε δομή που προσμοιάζε με αυτή της φυσικής υπομονάδας που βρίσκεται στο μυϊκό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Ακινητοποιημένη α1-210 σε CNBr-σεφαρόζη, που χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοπροσρόφηση αντισωμάτων από τους ορούς των ασθενών, απομάκρυνε κατά μέσο όρο 35% των αντισωμάτων. Ακινητοποιημένες β1-221, γ1-218 και ε1-219 σε CNBr-σεφαρόζη χρησιμοποιήθηκαν στο ίδιο set των 64 ορών μυασθενικών και απομάκρυναν κατά μέσο όρο 22%, 21% και 18% των αυτοαντισωμάτων, αντίστοιχα. Συνδυασμός των α1-210 και γ1-218 σε πειράματα ανοσοπροσρόφησης με 10 ορούς έδειξε ότι τα πολυπεπίδια δρουν αθροιστικά στην απομάκρυνση αυτοαντισωμάτων. Επώαση των πολυπεπτιδίων με ανθρώπινο πλάσμα έδειξε ότι τα ακινητοποιημένα πολυπεπίδια δεν πρωτεολύονται και δεν ελευθερώνονται από το υπόστρωμά τους (σεφαρόζη). Η τιτλοδότηση της ανοσοπροσροφητικής στήλης με ορό έδειξε ότι μικρή ποσότητα (1 μg) ακινητοποιημένης πρωτεΐνης σε στήλη μπορεί να απομακρύνει τουλάχιστον 2 pmoles αντι-υποδοχέα αντισωμάτων. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η συνδυασμένη χρήση όλων των ανασυνδυσασμένων εξωκυτταρικών τμημάτων των υπομονάδων αναμένεται να απομακρύνει την πλειονότητα των αυτοαντισωμάτων από τους περισσότερους ορούς μυασθενικών ασθενών, προσφέροντας έτσι τη δυνατότητα σχεδιασμού και εφαρμογής μιας νέας, αποτελεσματικής, αντιγονο-ειδικής θεραπείας για τη μυασθένεια.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2004, 21(6):546-555
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2004, 21(6):546-555

Κ. Κωστελίδου,¹
Λ. Ψαρίδη-Λιναρδάκη,¹
Ν. Τράκας,¹
Α. Μαμαλιάκη,¹
Σ.Ι. Τζάρτος^{1,2}

¹Τμήμα Βιοχημείας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα

²Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα

Recombinant polypeptides
of the acetylcholine receptor
in the development
of an antigen-specific therapy
for myasthenia gravis through
the immunoabsorption
of anti-receptor antibodies
from myasthenic patients

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ανασυνδυσασμένα πολυπεπίδια
Ανοσοπροσρόφηση
Βαριά μυασθένεια
Θεραπεία
Υποδοχέας της ακετυλοχολίνης

Παρά τη μεγάλη έκταση των γνώσεων που έχουν αποκτηθεί για τις αυτοάνοσες νόσους, οι μηχανισμοί πρόκλησης της αυτοανοσίας δεν έχουν ακόμη αποκαλυφθεί και οι διαθέσιμες θεραπείες είναι μη ειδικές και μέτριας αποτελεσματικότητας. Η βαριά μυασθένεια (myasthenia gravis) είναι μια πολύ μελετημένη αυτοάνοση νόσος, που επηρεάζει τουλάχιστον ένα στα 8000–10.000 άτομα και χρησιμεύει συχνά ως μοντέλο μελέτης αυτοάνοσης νόσου.¹ Το κύριο αντιγόνο έναντι του οποίου κατευθύνονται τα αυτοαντισώματα στη μυασθένεια είναι ο μυϊκός νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στη νευρομυϊκή σύναψη, ενώ σε μια μικρή υπο-ομάδα μυασθενικών υπεύθυνα είναι αντισώματα κατά της πρωτεΐνης MuSK, η οποία δρα έμμεσα στον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.²

Ο παθογόνος ρόλος των αντι-υποδοχέα αυτοαντισωμάτων αποδεικνύεται και από τη μεγάλη βελτίωση που παρατηρείται σε ασθενείς μετά από θεραπεία πλασμαφαίρεσης, τη θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά και από την ικανότητα αυτών των αντισωμάτων να προκαλούν πειραματική βαριά μυασθένεια. Οι τρόποι με τους οποίους τα αντι-υποδοχέα αντισώματα οδηγούν στην απώλεια των υποδοχέων ακετυλοχολίνης είναι (α) η αντιγονική τροποποίηση, όπου τα δισθενή αυτοαντισώματα διασυνδέουν γειτονικούς υποδοχείς στη μεμβράνη των μυϊκών κυττάρων και προκαλούν την ενδοκυττάρωση των υποδοχέων, (β) η ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος, όπου δημιουργείται τοπική λύση της κυτταρικής μεμβράνης, και (γ) η άμεση εμπλοκή των αντισωμάτων στη λειτουργία του ιοντικού καναλιού, μετά από αναστολή της πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης.³ Ο μηχανισμός όμως που ενεργοποιεί την αυτοάνοση απόκριση δεν είναι ακόμη γνωστός. Οι υπάρχουσες θεραπείες για τη μυασθένεια (χορήγηση αντιχολινεστεράσης και ανοσοκατασταλτικών μέσων, θυμεκτομή, πλασμαφαίρεση, ενδοφλέβια χορήγηση ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης)⁴ είναι μη ειδικές και μόνο μερικώς αποτελεσματικές. Η πλασμαφαίρεση αποτελεί μια αποτελεσματική, αν και προσωρινή θεραπεία, λόγω της γρήγορης κλινικής βελτίωσης που παρατηρείται μετά από την αφαίρεση των κυκλοφορούντων αντισωμάτων του ορού, αλλά απομακρύνει μη ειδικά και τα ωφέλιμα, μη παθογόνα αντισώματα, καθώς και άλλες χρήσιμες πρωτεΐνες.⁵ Η εκλεκτική, αντιγόνο-ειδική απομάκρυνση των ειδικών αυτοαντισωμάτων (ανοσοπροσρόφηση) και η επιστροφή του πλάσματος στον ασθενή αποτελεί μια πολύ ελκυστική θεραπευτική προσέγγιση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την κατασκευή μιας στήλης συγγένειας με υποδοχέα ή ανασυνδυασμένα τμήματα των υπομονάδων του, η οποία θα προσδένει ειδικά τα αντι-υποδοχέα αντισώμα-

τα. Εφόσον όμως ο φυσικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης είναι διαθέσιμος μόνο σε μικρές ποσότητες, η ειδική ανοσοπροσρόφηση μπορεί να επιτευχθεί μόνο με τη χρήση στηλών με ανασυνδυασμένα τμήματα του υποδοχέα.

Ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 290.000 kDa, αποτελούμενη από πέντε ομόλογες υπομονάδες με στοιχειομετρία α₂βγδ (εμβρυϊκός τύπος) ή α₂βεδ (ενήλικος τύπος).^{6,7} Η αμινοτελική εξωκυτταρική περιοχή της α υπομονάδας (αμινοξέα 1-210) περιέχει τις θέσεις σύνδεσης προσδετών⁸ και την κύρια ανοσογόνο περιοχή (Main Immunogenic Region, MIR). Η MIR αποτελεί την περιοχή πάνω στην οποία προσδένεται η πλειονότητα των αντι-υποδοχέα μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAbs) και ένα μεγάλο ποσοστό των αυτοαντισωμάτων στη βαριά μυασθένεια. Η έκφραση των υπομονάδων του υποδοχέα σε διάφορα συστήματα, βακτηριακά ή ευκαρυωτικά, είναι μη ικανοποιητική, λόγω της κακής διαμόρφωσης των μορίων στο χώρο ή της χαμηλής ποσότητας παραγωγής τους, αντίστοιχα.^{9,10} Το σύστημα έκφρασης του ζυμομύκητα *Pichia pastoris* συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των βακτηριακών συστημάτων (ευκολία, ταχύτητα και οικονομία) με εκείνα των ευκαρυωτικών συστημάτων (μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις).¹¹

Ο στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η παραγωγή στηλών με ακινητοποιημένα, ανασυνδυασμένα τμήματα των υπομονάδων του υποδοχέα, για τη χρήση τους ως ανοσοπροσροφητικών μέσων των παθογόνων αυτοαντισωμάτων από μυασθενικούς, στην προσπάθεια ανάπτυξης μιας θεραπείας για το αυτοάνοσο αυτό νόσημα. Κατά τη θεραπευτική εφαρμογή, το πλάσμα του ασθενούς θα περνά από στήλη ανοσοπροσροφητική και αφού αφαιρεθούν τα αντι-υποδοχέα αντισώματα θα επιστρέφεται στον ασθενή. Παρόμοια τεχνική εφαρμόζεται σήμερα με στήλες protein-A, στις οποίες όμως απομακρύνονται και όλες οι ανοσοσφαιρίνες του πλάσματος.¹² Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα έκφρασης *P. pastoris* και εκφράστηκαν, καθαρίστηκαν και χαρακτηρίστηκαν οι εξωκυτταρικές περιοχές των α, β, γ και ε υπομονάδων του ανθρώπινου υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Τα πολυπεπτίδια αυτά ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια σεφαρόζης, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για την απομάκρυνση μεγάλων ποσοτήτων αντισωμάτων από ορούς μυασθενικών. Επίσης, έγιναν πειράματα τιτλοδότησης της ανοσοπροσροφητικής στήλης και έλεγχος της σταθερότητας των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων μετά από επώαση με ανθρώπινο πλάσμα, ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα εφαρμογής τους στην κλινική πράξη.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Κλωνοποίηση των εξωκυτταρικών περιοχών των α, β, γ, και ε υπομονάδων του υποδοχέα

Η εξωκυτταρική περιοχή της α1 υπομονάδας (αμινοξέα 1-210, α1-210) ενισχύθηκε ενζυμικά με PCR από το cDNA που φέρει όλη την α υπομονάδα, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 5'-GCTGGCCTCGTCGAATTCTCCGAACATG-3' και 5'-GATGAAGTAGAGGTCTAGACGCTGCATGACG-3' (θέσεις *EcoRI* και *XbaI* υπογραμμισμένες). Μετά από πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα, το ενισχυμένο cDNA κλωνοποιήθηκε στο φορέα έκφρασης pPICZaA (Invitrogen San Diego, CA), κάτω από το σηματοδοτικό πεπτιδίο α-factor (για έκκριση των εκφραζόμενων πολυπεπτιδίων στο υπερκείμενο της καλλιέργειας) και κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή AOX, που επάγεται από τη μεθανόλη. Στο καρβοξυτελικό άκρο της, η πρωτεΐνη έφερε ένα πεπτιδίο του c-myc και έξι ιστιδίνες. Το εξωκυτταρικό τμήμα της β υπομονάδας, β1-222, ενισχύθηκε με PCR από το cDNA όλης της β υπομονάδας, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 5'-GCGGAATTCTCGGAGGCGGAGGGTCGAC-3' και 5'-ATAGTTTAGCGGCGCGCTCAATGGTGATGGTGATGGTGCTTGC GGCGGATGATGAG-3' (θέσεις *EcoRI* και *NotI* υπογραμμισμένες· ο δεύτερος εκκινητής έφερε και την αλληλουχία που κωδικοποιεί έξι ιστιδίνες στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης). Το ανασυνδυασμένο DNA κλωνοποιήθηκε στο φορέα pPIC9 (όπως ο pPICZa, χωρίς όμως την προσθήκη έξι ιστιδινών και του επιτόπου c-myc στα ένθετα τμήματα DNA). Οι εξωκυτταρικές περιοχές των γ (γ1-218) και ε (ε1-219) υπομονάδων ενισχύθηκαν με PCR από το cDNA της γ και ε υπομονάδας, αντίστοιχα, με τους εκκινητές 5' GGTGTAGATTCCGGAACCAAGGAGGAGCGC-3' και 5'-ATAGTTTAGCGGCGCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTTGC GCTGGA TGAGCAGG-3' για τη γ1-218 και 5'GGTGTAGAAITCAA GAACGAGGAACTGCG-3' και 5'-ATAGTTTAGCGGCGCGCTTAGTGATGGTGATGGTGATGCTTCCG GCGGATGATGAGCGA-G-3' για την ε1-219 (θέσεις *EcoRI* και *NotI* υπογραμμισμένες· οι δεύτεροι εκκινητές φέρουν αλληλουχία που κωδικοποιεί έξι ιστιδίνες). Τα δύο αυτά προϊόντα κλωνοποιήθηκαν σε τροποποιημένο pPIC9, έτσι ώστε η αλληλουχία FLAG να προστίθεται στο αμινοτελικό άκρο των εκφραζόμενων πολυπεπτιδίων. Οι προκύπτουσες κατασκευές έγιναν γραμμικές με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων ως εξής: α1-210 με *PmeI*, β1-222 με *SacI*, γ1-218 και ε1-219 με *SalI*, και με τα καθαρισμένα DNA μετασχηματίστηκαν GS115 κύτταρα *P. pastoris* με ηλεκτροδιάτρηση (Biorad GenePulser). Τα μετασχηματισμένα κύτταρα με α1-210 απλώθηκαν σε τρυβλία YPDS¹¹ με ζεοσίνη 100 μg/mL, ενώ κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με β1-221, γ1-218 ή ε1-219 απλώθηκαν σε τρυβλία RDB.¹¹ Τα τρυβλία επωάστηκαν για 3 μέρες στους 30 °C.

Παραγωγή πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα και καθαρισμός πρωτεϊνών

Αποικίες από τα μετασχηματισμένα κύτταρα εμβολιάστηκαν σε 4 mL υλικού BMGY (1% εκχύλισμα ζύμης, 2% πεπτόνη,

100 mM φωσφορικό κάλιο pH 6,0, 1,34% YNB, 4×10⁻⁵% βιοτίνη και 1% γλυκερόλη) και μεταφέρθηκαν 24 ώρες αργότερα σε 4 mL BMMY (BMGY με 0,5% μεθανόλη αντί γλυκερόλης) για την επαγωγική έκφραση πρωτεΐνης. Μετά από επαγωγική για 2 ημέρες (καθημερινή προσθήκη μεθανόλης 0,5% v/v) ελέγχθηκαν τα υπερκείμενα των καλλιεργειών για έκφραση πρωτεΐνης. Από κάθε δείγμα ελέγχθηκαν 100 μL μετά από ακινητοποίηση σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ως προς την πρόσδεση mAb έναντι της α1-210 (mAb198), β1-221 (mAb73), γ1-218 (mAb67) και ε1-219 (mAb αντι-FLAG, Sigma), για την επιλογή του κλώνου με την υψηλότερη απόδοση. Για μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργεια, τα υπερκείμενα από 2 L καλλιέργειας συμπυκνώθηκαν με χρήση του συστήματος υπερδιήθησης (Millipore) και, μετά από διαπίδυση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8, προστέθηκαν σφαιρίδια Ni²⁺-NTA αγαρόζης (QIAGEN) εξισορροπημένα με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Ο καθαρισμός έγινε ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή και οι πρωτεΐνες συλλέχθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8, με 500 mM NaCl και ιμιδαζόλιο. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με 12% SDS-ηλεκτροφόρηση και χρώση με Coomassie Brilliant Blue ή ανοσοστύπωση κατά Western με τα mAb198 (για α1-210), 73 (για β1-221), 67 (για γ1-218) και αντι-FLAG (για ε1-219). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών καθορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad).

ELISA και ραδιοανοσοπροσδιορισμός

Η ELISA πραγματοποιήθηκε όπως έχει περιγραφεί¹³ με 0,2 μg πρωτεΐνης (α1-210, β1-221, γ1-218 ή ε1-219) σε κάθε φρεάτιο. Η ανάπτυξη του χρώματος έγινε με υπόστρωμα TMB (100 μL ανά φρεάτιο) και λήξη των αντιδράσεων με 100 μL 0,2 M H₂SO₄. Η τεχνική του ραδιοανοσοπροσδιορισμού έγινε όπως έχει περιγραφεί.¹⁴

Παρασκευή σπηλών σεφαρόζης με ανασυνδυασμένα πολυπεπτιδία και ανοσοπροσρόφηση αντι-υποδοχέα αντισωμάτων από ορούς μασθενικών

0,25 mg ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (β1-221 ή γ1-218 ή ε1-219) αναμείχθηκαν με 1,25 mg BSA λευκωματίνη ορού βοοειδούς (BSA) (ως φορέας) και προσδέθηκαν σε 0,5 g ενεργοποιημένης CNBr-σεφαρόζης (Pharmacia) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την α1-210, χρησιμοποιήθηκαν 0,1 mg πρωτεΐνης με 8 mg BSA σε 0,5 g ενεργοποιημένης σεφαρόζης. Αντίστοιχη στήλη παρασκευάστηκε και με 1,5 mg BSA σε 0,5 g ενεργοποιημένης σεφαρόζης (αρνητικός μάρτυρας). Επωάστηκαν 4 μL ορού με 1 μg ακινητοποιημένης πρωτεΐνης σε στήλη σεφαρόζης και με την ίδια ποσότητα BSA σε στήλη, για 2,5 ώρες στους 4 °C. Μια ποσότητα από κάθε ορό (0,4–1 μL) χρησιμοποιήθηκε σε αντίδραση ραδιοανοσοπροσδιορισμού (έτσι ώστε στην αντίδραση να υπάρχουν 20 fmoles αντι-υποδοχέα αντισωμάτων). Η εκατοστιαία μείωση σε αντι-υποδοχέα αντισώματα μεταξύ του δείγματος που επωάστηκε με σφαιρίδια-BSA και εκείνου που επωάστηκε με σφαιρίδια με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ορίστηκε ως ανοσοπροσρόφηση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

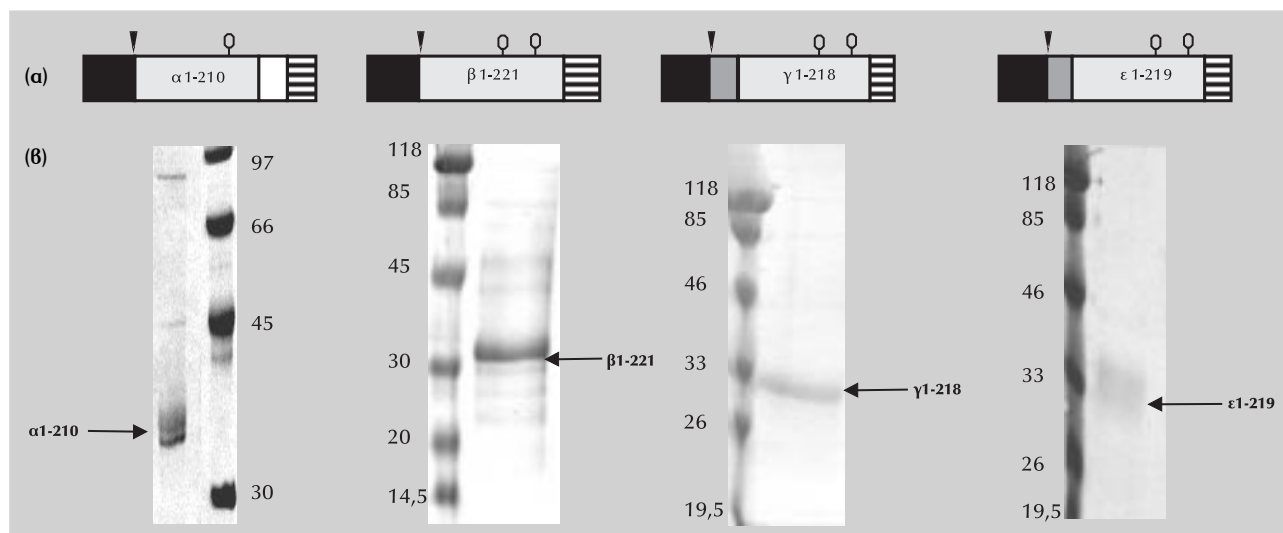
Έκφραση των εξωκυτταρικών περιοχών των α , β , γ και ϵ υπομονάδων του ανθρώπινου μυϊκού υποδοχέα ακετυλοχολίνης στο ζυμομύκητα *Pichia pastoris*

Εκφράστηκαν οι αμινοτελικές περιοχές των υπομονάδων α ($\alpha 1-210$), β ($\beta 1-221$), γ ($\gamma 1-218$) και ϵ ($\epsilon 1-219$) του ανθρώπινου μυϊκού υποδοχέα στο ζυμομύκητα *P. pastoris*. Όλες οι περιοχές ενισχύθηκαν ενζυμικά με τη χρήση PCR και τα προϊόντα κλωνοποιήθηκαν σε φορείς έκφρασης ειδικούς για την *P. pastoris*. Όλα τα πολυπεπίδια σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να φέρουν ένα τμήμα από έξι συνεχόμενες ιστιδίνες στο καρβοξυτελικό άκρο τους, για να διευκολύνεται η ειδική απομόνωσή τους με χρήση της Ni^{2+} -NTA αгарόζης, η οποία προσδένει ειδικά τις ιστιδίνες. Οι κατασκευές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό κυττάρων *P. pastoris*, απομονώθηκαν διάφορες αποικίες που ελέγχθηκαν για έκφραση πρωτεΐνης και επιλέχθηκε ο καλύτερος κλώνος (ως προς την απόδοσή του) για μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια. Μετά από καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας, απομονώθηκαν τα ανασυνδυασμένα πολυπεπίδια από το υπερκείμενο της καλλιέργειας με χρήση Ni^{2+} -NTA αгарόζης και έκλουση των πολυπεπτιδίων με αυξανό-

μενη συγκέντρωση ιμιδαζολίου (εικ. 1). Η απόδοση του συστήματος ήταν 0,2–0,3 mg/L καλλιέργειας για την $\alpha 1-210$ και 0,3–0,8 mg/L καλλιέργειας για τις $\beta 1-221$, $\gamma 1-218$ και $\epsilon 1-219$. Η διαλυτότητα των πολυπεπτιδίων καθορίστηκε με στήλες μοριακής διήθησης και χρωματογραφία υγρής φάσης. Η $\alpha 1-210$ είχε μορφή μονομερούς και ήταν στο σύνολό της διαλυτή. Η $\beta 1-221$ ήταν κατά 70% μονομερής με το υπόλοιπο 30% σε μορφή μικροσυσσωμάτων, ενώ τόσο η $\gamma 1-218$ όσο και η $\epsilon 1-219$ ήταν κατά το ήμισυ διαλυτές και το υπόλοιπο 50% βρισκόταν υπό μορφή μικροσυσσωμάτων (μη παρουσιαζόμενα αποτελέσματα).

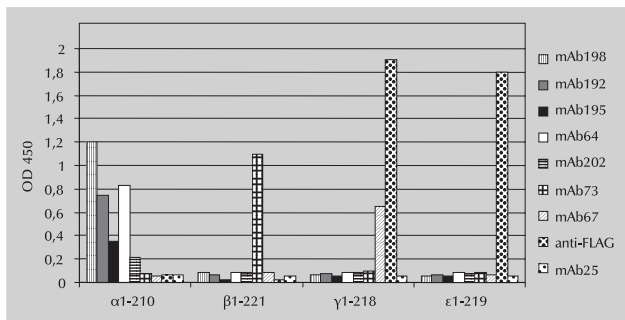
Χαρακτηρισμός των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων

Η σωστή αναδίπλωση των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων ήταν αναγκαία για την περαιτέρω χρήση αυτών των πολυπεπτιδίων σε στήλες ανοσοπροσρόφησης, δεδομένου ότι τα αντισώματα των μυασθενικών προσδένονται μόνο σε σωστής διαμόρφωσης υποδοχείς της ακετυλοχολίνης. Αυτή εξετάστηκε με τρεις τρόπους: (α) την ικανότητα πρόσδεσης του συνδέτη α -μπουγκαροτοξίνη (μόνο για την $\alpha 1-210$, η οποία διαθέτει θέσεις πρόσδεσης συνδετών), (β) την ικανότητα πρόσδεσης ορισμένων αντι-υποδοχέα mAb, των οποίων η πρόσδεση εξαρτάται από τη σωστή διαμόρφωση του υποδοχέα, με



Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων $\alpha 1-210$, $\beta 1-221$, $\gamma 1-218$ και $\epsilon 1-219$ με χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Ni^{2+} -NTA αгарόζης. (α) Σχηματική απεικόνιση των κατασκευών που χρησιμοποιήθηκαν για την έκφραση των εξωκυτταρικών περιοχών των $\alpha 1-210$, $\beta 1-221$, $\gamma 1-218$ και $\epsilon 1-219$ υπομονάδων του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Οι μαύρες περιοχές αντιστοιχούν στο πεπτίδιο α -factor, οι σκούρες γκρι στον επίτοπο FLAG, οι γκρι στα εξωκυτταρικά τμήματα των υπομονάδων, η λευκή περιοχή στο πεπτίδιο c -myc και οι περιοχές με τις οριζόντιες γραμμές στον επίτοπο των έξι ιστιδινών. Οι κύκλοι συμβολίζουν τις θέσεις γλυκοσυλίωσης κάθε πολυπεπτιδίου, ενώ τα βέλη απεικονίζουν το σημείο πέψης του α -factor. (β) Ηλεκτροφόρηση καθαρισμένων $\alpha 1-210$, $\beta 1-221$, $\gamma 1-218$ και $\epsilon 1-219$ με χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Ni^{2+} -NTA αгарόζης. Οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα με ιμιδαζόλιο. Τα εκλούσματα αναλύθηκαν με SDS-ηλεκτροφόρηση πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. Τα μοριακά βάρη των μαρτύρων σημειώνονται σε kDa.

τεχνική ELISA σε πλάκες που έφεραν ακινητοποιημένη την καθεμιά από τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, και (γ) την ικανότητα πρόσδεσης αντισωμάτων από ορούς μασθενικών σε σημασμένη πρωτεΐνη, με αντιδράσεις ραδιοανοσοκατακρήμνισης. Η α-μπουγκαροτοξίνη προσδέθηκε ειδικά στην α1-210 και η K_d υπολογίστηκε στα $5,1 \pm 2,4$ nM, δηλαδή μόνο μία τάξη μεγέθους χαμηλότερη από αυτή του φυσικού μορίου του υποδοχέα, ενώ δεν πρόσδεσε καμιά από τις β, γ ή ε, όπως ήταν αναμενόμενο. Ελέγχθηκαν επτά διαφορετικά mAb, ειδικά για τις εξωκυτταρικές περιοχές της α (mAb198, 192, 190, 202 και 64), της β (mAb73), της γ (mAb67 και αντι-FLAG) και της ε (mAb αντι-FLAG) υπομονάδας. Κάθε mAb προσδέθηκε ειδικά στο αντίστοιχο πολυπεπίδιο, όπως αναμενόταν: mAb198, 192, 190, 64 και 202 σε α1-210, mAb73 σε β1-221, mAb67 σε γ1-218 και αντι-FLAG σε γ1-218 και ε1-219 (εικ. 2). Επίσης, σε πειράματα ραδιοανοσοκατακρήμνισης με ορούς μασθενικών, το 67% από προηγούμενα χαρακτηρισμένους αντι-α ορούς πρόσδεσε ραδιενεργά σημασμένη α1-210, ενώ κανένας μη αντι-α ορός δεν προσδέθηκε, και το 26% από μη αντι-α ορούς πρόσδεσε ειδικά τη γ1-218. Συμπεραίνεται ότι τα παραπάνω πολυπεπίδια έχουν διαμόρφωση που προσεγγίζει αυτή του φυσικού υποδοχέα ακετυλοχολίνης.



Εικόνα 2. Πρόσδεση μονοκλωνικών αντισωμάτων στις ανασυνδυασμένες α1-210, β1-221, γ1-218 και ε1-219. Η πρόσδεση των αντισωμάτων στα πολυπεπίδια εξαρτάται από τη σωστή διαμόρφωση των μορίων στο χώρο. 0,2 μg καθαρισμένης πρωτεΐνης στρώθηκαν σε φρεάτια πλακών ELISA και ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα πρόσδεσης μονοκλωνικών αντισωμάτων, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικό-Μέθοδος». Τα μονοκλωνικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα αντι-α mAbs 198 (1ος στήλης, μαύρες ρίγες), 192 (2ος στήλης, γκρι), 195 (3ος στήλης, μαύρες), 64 (4ος στήλης, λευκές), 202 (5ος στήλης, οριζόντιες μαύρες γραμμές), το αντι-β mAb 73 (6ος στήλης, τετραγωνίδια), το αντι-γ mAb 67 (7ος στήλης, διαγώνιες μαύρες γραμμές) και το αντι-FLAG mAb, το οποίο προσδένεται τόσο στη γ1-218 όσο και στην ε1-219 (8ος στήλης, στίξη). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το mAb 25 (9ος στήλης, αραιή στίξη).

Ανοσοπροσρόφηση αντι-υποδοχέα αντισωμάτων από ορούς μασθενικών

Ανοσοπροσρόφηση με χρήση μεμονωμένων πολυπεπτιδίων. Τα καθαρισμένα πολυπεπίδια α1-210, β1-221, γ1-218 και ε1-219 ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια CNBr-σεφαρόζης. Παράλληλα, ακινητοποιήθηκε BSA για να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας. Ίση ποσότητα ορού από 64 διαφορετικούς μασθενικούς επωάστηκε με σεφαρόζη-(α1-210), σεφαρόζη-(β1-221), σεφαρόζη-(γ1-218), σεφαρόζη-(ε1-219) ή σεφαρόζη-(BSA). Ακολουθώντας, μια ποσότητα από τον ορό που επωάστηκε χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα ραδιοανοσοκατακρήμνισης για τη μέτρηση των μη προσροφημένων αυτοαντισωμάτων. Στον κάθε μασθενικό ορό που εξετάστηκε, αναμενόταν να σημειωθεί μείωση των αυτοαντισωμάτων στο δείγμα που επωάστηκε με στήλη που περιείχε ανασυνδυασμένο πολυπεπίδιο, σε σχέση με αυτό που επωάστηκε με στήλη BSA, ανάλογα με το ποσοστό των αυτοαντισωμάτων που είχε κάθε ορός έναντι κάθε υπομονάδας. Για παράδειγμα, οι γνωστοί ως ισχυρά αντι-α οροί αναμενόταν να έχουν σημαντική μείωση σε αριθμό αυτοαντισωμάτων μετά από επώαση με σεφαρόζη-(α1-210). Η ανοσοπροσρόφηση σε α1-210 κυμάνθηκε από 60–95% στο 20% των ορών που ελέγχθηκαν και από 20–60% στο 37% των ορών (κατά μέσο όρο 35% των αντισωμάτων προσροφήθηκαν από την α1-210) (εικ. 3α). Η β1-221 απομάκρυνε πάνω από 30% στο 20% των ορών και 15–30% στο 32% των ελεγμένων ορών (κατά μέσο όρο 22% των αντισωμάτων) (εικ. 3β). Αντίστοιχα, η γ1-218 απομάκρυνε κατά μέσο όρο 21% των αντισωμάτων (εικ. 3γ) και η ε1-219 απομάκρυνε κατά μέσο όρο 18% των αντισωμάτων (εικ. 3δ).

Ανοσοπροσρόφηση με χρήση συνδυασμού πολυπεπτιδίων. Μετά την επιτυχή χρήση των στηλών με ένα πολυπεπίδιο σε ανοσοπροσρόφηση, μελετήθηκε η αθροιστική δράση συνδυασμού πολυπεπτιδίων ακινητοποιημένων στην ίδια στήλη. Ίσες ποσότητες από α1-210 και γ1-218 ακινητοποιήθηκαν μαζί σε σφαιρίδια CNBr-σεφαρόζης, ενώ ίση ποσότητα από κάθε πρωτεΐνη ακινητοποιήθηκε και μόνη της σε σφαιρίδια. Παρόμοια στήλη παρασκευάστηκε και με BSA, για να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας. Ο συνδυασμός των α1-210 και γ1-218 σε πειράματα ανοσοπροσρόφησης με 10 ορούς έδειξε ότι απομακρύνεται ποσοστό αντισωμάτων περίπου ίσο με το άθροισμα των ποσοστών που απομακρύνονται από τη μεμονωμένη δράση της α1-210 ή της γ1-218 (εικ. 4). Για παράδειγμα, στον ορό No 1, η α1-210 απομάκρυνε μόνη της το 67% των αντισωμάτων και η γ1-218 το 30%, ενώ οι δύο υπομονάδες μαζί απομάκρυναν το 85%

των αντισωμάτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε ο ορός Νο 6, ο οποίος εμφάνισε 33% ανοσοπροσρόφηση με την α1-210, 25% με τη γ1-218 και 98% με τη συνδυασμένη χρήση των δύο υπομονάδων (εικ. 4). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε σε 4 επαναλήψεις του πειράματος και πιθανόν να οφείλεται σε συνεργιστική δράση των δύο πολυπεπτιδίων.

Ιδιότητες της ανοσοπροσροφητικής στήλης

Σταθερότητα των ακινητοποιημένων σε στήλη πολυπεπτιδίων κατά τη διάρκεια επώασης με ανθρώπινο πλάσμα. Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι ίσως είναι δυνατή η εφαρμογή μιας ανοσοπροσροφητικής στήλης με ανασυνδυασμένα τμήματα των υπομονάδων του ανθρώπινου AChR για θεραπεία. Ήταν όμως αναγκαίο να ελεγχθεί εάν το ανθρώπινο πλάσμα, υλικό πλούσιο σε πρωτεάσες, μπορούσε να οδηγήσει στην πρωτεόλυση των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων κατά τη διάρκεια της ανοσοπροσρόφησης και στην απελευθέρωση τμημάτων των πολυπεπτιδίων στο πλάσμα του ασθενούς. Ως αντιπροσωπευτική πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε η α1-210, η οποία μπορεί να σημανθεί ραδιενεργά με ¹²⁵I-α-μπουγκαροτοξίνη. Σε πειράματα επώασης σημασμένης α1-210 με ανθρώπινο πλάσμα ή BSA (70 mg/mL), τόσο σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες όσο και στους 37 °C για 5 ώρες, δείχθηκε ότι η α1-210 δεν υφίσταται πρωτεόλυση και δεν ελευθερώνεται από τη σεφαρόζη (πίν. 1). Αντίστοιχα πειράματα με σημασμένη γ1-218 υποδεικνύουν ότι και αυτή παραμένει σταθερή κατά την επώαση με ανθρώπινο πλάσμα. Εναλλακτικά πειράματα με μη σημασμένα, ακινητοποιημένα ή διαλυτά πολυπεπτιδία επίσης έδειξαν την πλήρη απουσία πρωτεόλυσης των πολυπεπτιδίων από το πλάσμα (μη παρουσιαζόμενα πειράματα).

Τιτλοδότηση της στήλης ανοσοπροσρόφησης. Τα πειράματα ανοσοπροσρόφησης στους 64 ορούς μυσθενικών πραγματοποιήθηκαν με συγκεκριμένη, χαμηλή ποσότητα ορού, που περιείχε σταθερή ποσότητα αντι-υποδοχέα αντισωμάτων (20 fmoles) μαζί με 1 μg ακινητοποιημένης πρωτεΐνης για τη σωστή σύγκριση των ανοσοπροσροφήσεων. Για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής σε θεραπεία, όμως, είναι απαραίτητο η στήλη να ανοσοπροσροφά μεγαλύτερες ποσότητες αυτοαντισωμάτων. Για τον προσδιορισμό της μέγιστης ποσότητας αντι-υποδοχέα αντισωμάτων που είναι ικανή να προσροφήσει μια ποσότητα πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδότησης με α1-210 (πίν. 2) και β1-221 (πίν. 3), στα οποία αυξανόμενες ποσότητες ορού επώαστηκαν με σταθερή ποσότητα ακινητοποιημένου πολυπεπτιδίου σε στήλη

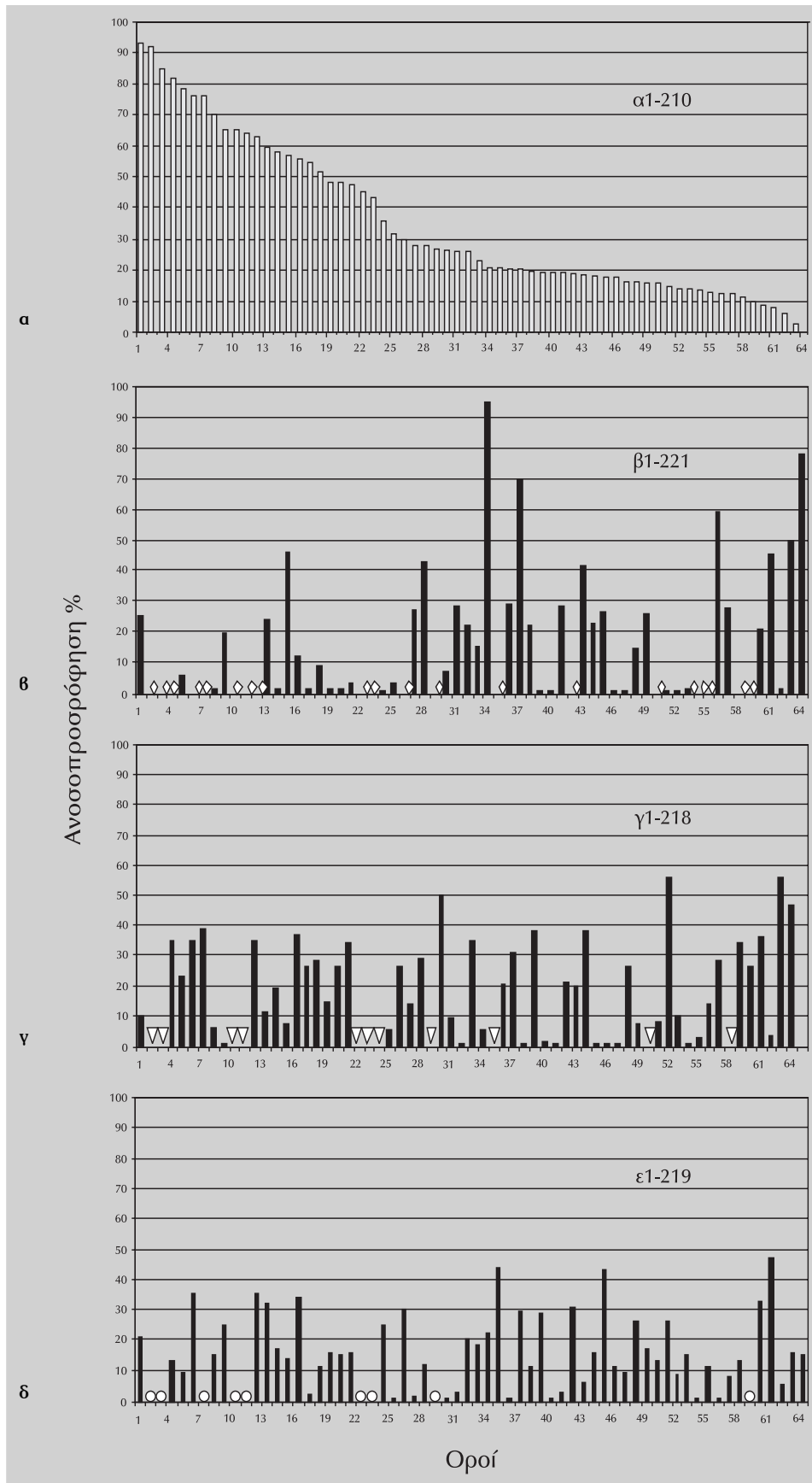
(πίν. 6). Δείχθηκε ότι 1 μg ακινητοποιημένης α1-210 ήταν ικανό να ανοσοπροσροφήσει μέχρι και 2 pmoles αυτοαντισωμάτων από τον ορό, ενώ 1 μg ακινητοποιημένης β1-221 μπορούσε να ανοσοπροσροφήσει περίπου 3,5-4 pmoles.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

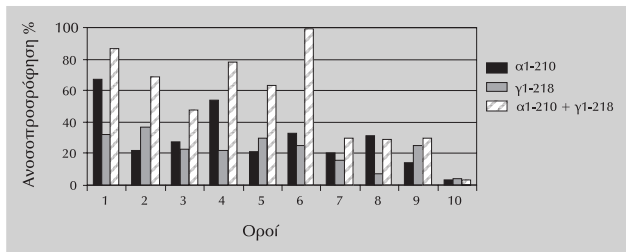
Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν τα εξωκυτταρικά τμήματα των α, β, γ και ε υπομονάδων του ανθρώπινου υποδοχέα της ακετυλοχολίνης και στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητά τους να χρησιμοποιηθούν ως ανοσοπροσροφητές αντισωμάτων από ορούς μυσθενικών, με σκοπό την εφαρμογή τους σε στήλες για θεραπευτικές προσεγγίσεις στη βαριά μυσθενία. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξωκυτταρικά τμήματα αντί ολόκληρων των υπομονάδων για δύο λόγους: (α) για να αποφευχθούν προβλήματα χρήσης πολυπεπτιδίων με μεγάλα υδρόφοβα τμήματα και (β) επειδή τα παθογόνα αντισώματα κατευθύνονται μόνο κατά της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα.

Τα εξωκυτταρικά τμήματα των υπομονάδων (α1-210, β1-221, γ1-218 και ε1-219) εκφράστηκαν στο ζυμομύκητα *P. pastoris* σε διαλυτή ή μερικώς διαλυτή μορφή, σε μέτρια αλλά ικανοποιητικά επίπεδα (μεταξύ 0,2-0,8 mg/L καλλιέργειας) (εικ. 1). Ο χαρακτηρισμός των πολυπεπτιδίων κυρίως ως προς την ικανότητά τους να προσδέουν mAbs των οποίων η πρόσδεση εξαρτάται απόλυτα από τη σωστή διαμόρφωση του μορίου έδειξε ότι αυτά φέρουν δομή παραπλήσια με εκείνη του ανέπαφου υποδοχέα (εικ. 2). Επιπλέον, η α1-210 προσδέθηκε ειδικά και με υψηλή συγγένεια ($5,1 \pm 2,4$ nM) στο συνδέτη α-μπουγκαροτοξίνη, ενώ, όπως αναμενόταν, καμιά από τις άλλες πρωτεΐνες δεν προσδέθηκε. Τέλος, αντισώματα από ορούς μυσθενικών προσδέθηκαν σε σημασμένη α1-210 και γ1-218, συνηγορώντας επίσης υπέρ της σωστής δομής των πολυπεπτιδίων.

Καθένα από τα τέσσερα πολυπεπτιδία είχε την αναμενόμενη σωστή αναδίπλωση και, ως εκ τούτου, έπρεπε να είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί ως ανοσοπροσροφητικό μέσο αυτοαντισωμάτων. Έτσι, καθεμιά από τις τέσσερις πρωτεΐνες ακινητοποιήθηκε σε αδιάλυτο υπόστρωμα και χρησιμοποιήθηκε για ανοσοπροσρόφηση αντι-υποδοχέα αντισωμάτων από 64 τυχαίους ορούς μυσθενικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η α1-210 απομακρύνει κατά μέσο όρο 35% των αυτοαντισωμάτων, με τις β1-221, γ1-218 και ε1-219 να απομακρύνουν διαφορετικά ποσοστά (22%, 21% και 18%, αντίστοιχα) από το μέσο μυσθενικό ορό (εικ. 3). Είναι σημαντικό να σημειωθεί



Εικόνα 3. Ανοσοπροσρόφηση αντι-υποδοχέα αυτοαντισωμάτων από ορούς μασθενικών με χρήση ακινητοποιημένων πολυπεπτιδίων α1-210 (α), β1-221 (β), γ1-218 (γ) και ε1-219 (δ) σε σφαιρίδια σεφαρόζης. Εξήντα τέσσερις οροί μασθενικών ελέγχθηκαν για την ικανότητα πρόσδεσής τους σε ολικό, ραδιενεργά σημασμένο ανθρώπινο υποδοχέα, σε πειράματα ραδιοανοσοπροσρόφησης μετά από δίωρη επώαση με σφαιρίδια σεφαρόζης στα οποία είχε ακινητοποιηθεί ένα από τα τέσσερα πολυπεπίδια (α1-210, β1-221, γ1-218 ή ε1-219) ή με σφαιρίδια σεφαρόζης στα οποία είχε ακινητοποιηθεί BSA (μάρτυρας). Οι οροί που δεν είχαν ελεγχθεί με β1-221, γ1-218 ή ε1-219 συμβολίζονται με ρόμβους, βέλη ή κύκλους, αντίστοιχα. Οι οροί τοποθετήθηκαν στον οριζόντιο άξονα κατά φθίνουσα ικανότητα προσρόφησης στον προσροφητή α1-210.



Εικόνα 4. Ανοσοπροσρόφηση αντι-υποδοχέα αυτοαντισωμάτων από ορούς μυασθενικών με συνδυασμένη χρήση πολυπεπτιδίων α1-210 και γ1-218 ακινητοποιημένων σε σφαιρίδια σεφαρόζης. Δέκα ορούς μυασθενικών ελέγχθηκαν για την ικανότητα πρόσδεσής τους σε ραδιενεργά σημασμένο ανθρώπινο υποδοχέα, σε πειράματα ραδιοανοσοκατακρήμνισης, μετά από δίωρη επώαση με σφαιρίδια σεφαρόζης στην οποία είχε ακινητοποιηθεί α1-210, γ1-218 ή και τα δύο πολυπεπίδια μαζί. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα ποσοστά των αντι-υποδοχέα αντισωμάτων που ανοσοπροσροφήθηκαν από τις τρεις στήλες. Η στήλη με τα δύο πολυπεπίδια είχε περίπου αθροιστική δράση. Η υπεραυξημένη δράση του συνδυασμένου ανοσοπροσροφητή στην περίπτωση του έκτου ορού ήταν σταθερά επαναλήψιμη.

ότι το άθροισμα των ανοσοπροσροφίσεων έναντι κάθε υπομονάδας για κάθε ελεγμένο ορό δεν ξεπέρασε σημαντικά το 100%, κάτι που συνηγορεί υπέρ της ειδικότητας της τεχνικής. Παρατηρήθηκαν ορούς που έδωσαν υψηλές τιμές ανοσοπροσρόφησης για μια υπομονάδα

(60–95%), καθώς όμως και ορούς με χαμηλή τιμή για όλες τις υπομονάδες. Η συνδυασμένη χρήση των πολυπεπτιδίων α1-210 και γ1-218 έδωσε αθροιστικό αποτέλεσμα ανοσοπροσρόφησης, σε σχέση με την ανοσοπροσρόφηση καθενός από τα πολυπεπίδια μόνων τους. Αυτό το αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι η συνδυασμένη χρήση όλων των υπομονάδων σε μια στήλη ανοσοπροσρόφησης αναμένεται να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της ανοσοπροσρόφησης των παθογόνων αυτοαντισωμάτων, έτσι ώστε η στήλη να είναι ικανή να απομακρύνει τη μεγάλη πλειονότητα των παθογόνων αυτοαντισωμάτων από το μέσο μυασθενικό ορό.

Η χρήση της στήλης για θεραπεία θα μπορούσε να οδηγήσει σε επιπλοκές, αν οι ακινητοποιημένες σε στήλη υπομονάδες πρωτεολύονταν από τον ορό του ασθενούς και ελευθερώνονταν στον ορό. Σε μια τέτοια περίπτωση, ο ασθενής θα επιβαρυνόταν με τα πρωτεολυτικά τμήματα των υπομονάδων, που θα μπορούσαν να δράσουν ως ανοσογόνα (αν και είναι πιθανό τα πολυπεπίδια να μην είναι ανοσογόνα, καθώς είναι ανθρώπινης φύσης και θα εισέρχονταν στον ασθενή ενδοφλεβίως). Επανελημμένα πειράματα, στα οποία σφαιρίδια σεφαρόζης με ραδιενεργά σημασμένα α1-210 (πίν. 1) ή γ1-218 επώαστηκαν με ανθρώπινο πλάσμα, έδειξαν ότι

Πίνακας 1. Σταθερότητα ακινητοποιημένης σημασμένης α1-210.

	Επώαση 0 ώρες	Επώαση 5 ώρες 37 °C	Επώαση 24 ώρες 30 °C
	(cpm στη σεφαρόζη μετά από επώαση και πλύση)		
Επώαση α1-210 με BSA ^a	9799 cpm	10098 cpm	9351 cpm
Επώαση α1-210 με πλάσμα ^b	9868 cpm	9954 cpm	9747 cpm

^aΡαδιενεργά σημασμένη α1-210 ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης επώαστηκε με BSA για 0 ώρες (μάρτυρας), 24 ώρες στους 30 °C και 5 ώρες στους 37 °C. Στο τέλος των αντιδράσεων, τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν και εκπλύθηκαν πριν από τη μέτρηση της ραδιενέργειας

^bΑκολούθησε το ίδιο πρωτόκολλο, όπως στο παραπάνω. Η ραδιενεργά σημασμένη, ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια α1-210, επώαστηκε με ανθρώπινο πλάσμα

Πίνακας 2. Τίτλοδοτίση της ανοσοπροσροφητικής στήλης α1-210.

Αυτοαντισώματα ορού (pmoles)	0,3	0,6	1,3	2,6	5,1	10,2
Ανοσοπροσρόφηση (%)*	62	60	56	50	36	20

*1 μg πρωτεΐνης α1-210 ακινητοποιημένης σε σεφαρόζη χρησιμοποιήθηκε με αυξανόμενη ποσότητα ορού (pmoles αυτοαντισωμάτων) για τον προσδιορισμό της μέγιστης ποσότητας αυτοαντισωμάτων που μπορούν να προσροφηθούν

Πίνακας 3. Τίτλοδοτίση της ανοσοπροσροφητικής στήλης β1-221.

Αυτοαντισώματα ορού (pmoles)	0,2	0,8	1,6	3,2	6,4	12,8
Ανοσοπροσρόφηση (%)*	80	77	75	76	69	41

*1 μg πρωτεΐνης β1-221 ακινητοποιημένης σε σεφαρόζη χρησιμοποιήθηκε με αυξανόμενη ποσότητα ορού (pmoles αυτοαντισωμάτων) για τον προσδιορισμό της μέγιστης ποσότητας αντισωμάτων που μπορούν να προσροφηθούν

δεν προκύπτουν πρωτεολυτικά τμήματα από τις υπομονάδες. Επομένως, συμπεραίνεται ότι οι στήλες ανοσοπροσρόφησης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία με ασφάλεια, χωρίς τον κίνδυνο υπερανοσοποίησης του ασθενούς.

Πειράματα τιτλοδότησης της στήλης έδειξαν ότι 1 μg ακινητοποιημένης πρωτεΐνης είναι ικανή να ανοσοπροσροφήσει 2–4 pmoles αντι-υποδοχέα αντισωμάτων. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, υπολογίζεται ότι μια στήλη με 2–5 mg πρωτεΐνης θα επαρκεί για την ανοσοπροσρόφηση των αντισωμάτων ενός μυασθενικού. Επιπρόσθετα, προκαταρκτικά πειράματα έχουν δείξει ότι είναι δυνατή η ανακύκλωση της ίδιας στήλης για τουλάχιστον 5 φορές, αν απομακρύνονται κάθε φορά τα προσροφημένα αντισώματα με χρήση χαμηλού pH. Θεωρώντας ότι οι στήλες θα ανακυκλώνονται, η αποτελεσματι-

κότητά τους θα αυξηθεί, επιτρέποντας την επιτυχή απομάκρυνση αυτοαντισωμάτων και από υψηλότιτλους ασθενείς. Προσπάθειες βελτίωσης της απόδοσης της έκφρασης των πρωτεϊνών σε επίπεδα μερικών mg/L καλλιέργειας, οι οποίες είναι σε εξέλιξη, θα κάνουν πιο εύκολη την παρασκευή στηλών με περίσσεια πολυπεπτιδίων, για την περαιτέρω βελτίωση της προτεινόμενης θεραπευτικής προσέγγισης.

Συμπερασματικά, στην εργασία αυτή παρουσιάζεται η ανάπτυξη μιας αντιγονο-ειδικής θεραπευτικής προσέγγισης για το αυτοάνοσο νόσημα βαριά μυασθένεια. Η εφαρμογή της προσέγγισης αυτής θα συμβάλει στην αποτελεσματική θεραπεία των μυασθενικών, αντικαθιστώντας έτσι σύγχρονες μη ειδικές θεραπείες με πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες και θα αποτελέσει μοντέλο για αντιγονο-ειδικές θεραπείες και άλλων αυτοάνοσων νόσων.

ABSTRACT

Recombinant polypeptides of the acetylcholine receptor in the development of an antigen-specific therapy for myasthenia gravis through the immunoadsorption of anti-receptor antibodies from myasthenic patients

K. KOSTELIDOU,¹ L. PSARIDI-LINARDAKI,¹ N. TRAKAS,¹ A. MAMALAKI,¹ S.J. TZARTOS^{1,2}

¹Department of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, Athens,

²Department of Pharmacy, University of Patras, Patras, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2004, 21(6):546–555

OBJECTIVE The pathology of the autoimmune disease myasthenia gravis is largely explained by autoantibodies produced against the human muscle acetylcholine receptor. Plasmapheresis offers a significant therapeutic option but it removes important plasma components. The specific extracorporeal removal of the autoantibodies using immunoadsorption on matrix-immobilized receptor offers a solution to the problem, which is however hindered by the limited available native receptor. The objective of this study was the production of extracellular recombinant domains of the receptor subunits, and their utilization as specific immunoadsorbents of autoantibodies from myasthenic sera, for future application in a specific therapy for myasthenia. **METHOD** The extracellular domains of the α , β , γ and ϵ subunits of the human acetylcholine receptor were expressed in *Pichia pastoris*, the proteins were purified by Ni²⁺-NTA agarose and their solubility was tested by gel filtration. Each subunit was immobilized on CNBr-sepharose and used in immunoadsorption experiments with 64 randomly chosen myasthenic sera. The autoantibodies which remained in the serum after immunoadsorption were quantified by radioimmunoassay. **RESULTS** The extracellular domains (amino acids ~1-210) of the α , β , γ and ϵ subunits of the human muscle acetylcholine receptor were expressed and purified. Each recombinant protein had a near-native structure resembling the structure found in the full-length subunit of the intact receptor. Protein α 1-210, immobilized on CNBr-sepharose, was used for the immunoadsorption of autoantibodies from 64 myasthenic sera and was shown to remove, on average, 35% of the antibodies. Correspondingly, β 1-221, γ 1-218 and ϵ 1-219, which had been immobilized on CNBr-sepharose could remove, on average, 22%, 21% and 18% of the autoantibodies, respectively. The combined use of α 1-210 and γ 1-218 in immunoadsorption experiments showed that the pathogenic autoantibodies could be removed in an additive fashion in 10 tested sera. Incubation of the polypeptides with human plasma showed that the immobilized proteins remained stable and did not dissociate from their insoluble matrix (sepharose). Moreover, the titration of the immunoadsorbent column with patient serum showed that a small quantity of immobilized protein (1 μ g) could remove at least

2 pmoles of anti-receptor antibodies. **CONCLUSIONS** These results suggest that the combined use of all subunits would remove the large majority of autoantibodies from most of the myasthenic sera, thus offering an option for the design and application of a novel, effective and antigen-specific therapy for myasthenia gravis.

Key words: Acetylcholine receptor, Immunoabsorption, Myasthenia gravis, Recombinant polypeptides, Therapy

Βιβλιογραφία

1. KARLIN A, AKABAS MH. Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 1995, 15:1231–1244
2. VINCENT A. Myasthenia gravis. *Lancet* 2001, 357:2122–2127
3. WILLCOX N. Myasthenia gravis. *Curr Opin Immunol* 1993, 5:910–917
4. MASSEY JM. Acquired myasthenia gravis. *Neurol Clin* 1997, 15:577–595
5. BATOCCHI AP, EVOLI A, DISCHINO C, TONALI P. Therapeutic apheresis in myasthenia gravis. *Ther Apheresis* 2000, 4:275–279
6. DEVILLERS-THIERY A, GALZI JL, EISELE JL, BERTRAND S, BERTRAND D, CHANGEUX JP. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channels. *J Membr Biol* 1993, 136:97–112
7. TZARTOS SJ, BARKAS T, CUNG MT, MAMALAKI A, MARRAUD M, ORLEWSKI P ET AL. Anatomy of the antigenic structure of a large membrane autoantigen, the muscle-type nicotinic acetylcholine receptor. *Immunol Rev* 1998, 163:89–120
8. ARIAS HR. Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res Brain Res Rev* 1997, 25:133–191
9. WEST AP, BJORKMAN PJ, DOUGHERTY DA, LESTER HA. Expression and circular dichroism studies of the extracellular domain of the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 1997, 272:25468–25473
10. TSOULOUFIS T, MAMALAKI A, REMOUNDOS M, TZARTOS SJ. Reconstitution of conformationally dependent epitopes on the N-terminal extracellular domain of the human muscle acetylcholine receptor alpha subunit expressed in *Escherichia coli*: implications for myasthenia gravis therapeutic approaches. *Int Immunol* 2000, 12:1255–1265
11. CREGG JM, CEREGHINO JL, SHI J, HIGGINS DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 2000, 16:23–52
12. LEVY J, DEGANI N. Correcting immune imbalance: the use of ProSORBA column treatment for immune disorders. *Ther Apheresis* 2003, 2:197–205
13. EMBO PRACTICAL COURSE. *Making antibodies in bacteria and on phage*. IRBM, Rome, 1991
14. LINDSTROM J, EINARSON B, TZARTOS SJ. Production and assay of antibodies to acetylcholine receptors. *Methods Enzymol* 1981, 74:432–460

Corresponding author:

S.J. Tzartos, Laboratory of Biochemistry, Hellenic Pasteur Institute, 121 Vas. Sofias Ave., Athens, Greece
e-mail: tzartos@mail.pasteur.gr