Maastricht University

Experimental autoimmune myasthenia gravis : antibodies, idiotypes, and anti-idiotypes

Citation for published version (APA):

Verschuuren, J. J. G. M. (1989). *Experimental autoimmune myasthenia gravis : antibodies, idiotypes, and anti-idiotypes*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse. https://doi.org/10.26481/dis.19890101jv

Document status and date:
Published: 01/01/1989

DOI:
10.26481/dis.19890101jv

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.

Download date: 25 Apr. 2024

Summary and conclusions

Myasthenia gravis is an autoimmune disease characterized by an antibody mediated attack to the postsynaptic muscle membrane resulting in impairment of the neuromuscular function. Antibodies to the nicotinic acetylcholine receptor play a central role in the pathogenesis of myasthenia gravis, as demonstrated by (passive) transfer of the disease from mother to neonates or to experimental animals and the beneficial effect in human disease by removing antibodies by plasmapheresis. Specific manipulation of the production of autoantibodies directed at the acetylcholine receptor would be a major therapeutical breakthrough. Detailed information should be available regarding the experimental model for myasthenia gravis in order to study the results of new immunomodulatory strategies.
Therefore, one aim of the studies described in this thesis was to optimize the rat model of experimental autoimmune myasthenia gravis. Secondly, the possibility of regulation of the production of anti-acetylcholine receptor antibodies by idiotype-anti-idiotype interactions was analysed.

Chapter 1 reviews the literature on myasthenia gravis and experimental autoimmune myasthenia gravis. The structure and distribution of the acetylcholine receptor is described, for this molecule is known to be the most important antigen in myasthenia gravis, in terms of clinically relevant autoantibodies. Detailed information about the structure of this molecule is now available; the acetylcholine receptor of fish, mammals and man has been cloned, and the exact amino acid sequence is known. The antigenic determinants of the acetylcholine receptor have been mapped. The more than hundred monoclonal antibodies available recognize several distinct regions on the acetylcholine receptor, including the acetylcholine binding site. The majority of both monoclonal and natural occurring serum antibodies, however, bind to an extracellular epitope, the so called main immunogenic region. The role of T cells in myasthenia gravis and experimental autoimmune myasthenia gravis has been studied. These lymphocytes are involved in cytotoxic activities and in regulating the immune response. A number of T cell antigenic determinants on the acetylcholine receptor has been identified and found to be different from those recognized by B cells.
Human myasthenia gravis is reviewed briefly, and experimental autoimmune myasthenia gravis is discussed in more detail. Especially, the rat model of chronic experimental autoimmune myasthenia gravis, induced by the immunization with Torpedo acetylcholine receptor is discussed, as this model has been used in the studies described in this thesis. Immunization with Torpedo AChR induces a chronic form of disease which closely resembles human myasthenia gravis in almost every detail, except for the thymic abnormalities, which are only seen in man. Pathomorphology of the neuromuscular junction and mechanisms for attack of the muscle

endplate are similar in man and animal. The destruction is mediated by antibodies and in chronic experimental autoimmune myasthenia gravis and human myathenia gravis cellular infiltrates in muscle are rarely seen. The autoantibodies have been shown to diminish the amount of acetylcholine receptors at the endplate by antigenic modulation and complement mediated destruction of the muscle membrane, and to block the acetylcholine receptor function by direct binding.

In chapter 2 the relation between anti-acetylcholine receptor antibodies, the amount of acetylcholine receptors in muscle and clinical condition is studied in more detail. In contrast to what might be expected, the loss of acetylcholine receptor by itself does not completely account for the differences in clinical condition between myasthenic animals, since no good correlation between these two parameters was found. Previous studies suggested that the amount of acetylcholine receptor not bound to antibody determines the clinical condition, as in man and rat variable amounts of acetylcholine receptor (extracted from muscle biopsy or carcass) can be shown to be complexed with antibody. We showed, however, that a large amount of acetylcholine receptor-antibody complexes are formed in vitro during the extraction of the acetylcholine receptor from muscle, and that there is a very good correlation between the serum anti-acetylcholine receptor antibody titer and the amount of acetylcholine receptor-antibody complexes. Therefore, it is concluded that far less acetylcholine receptors are complexed in vivo than has been reported previously. Using an improved method for measuring acetylcholine receptor-antibody complexes no relation between antibody free acetylcholine receptors and disease severity could be detected.
In addition, the presence of anti-acetylcholine receptor antibodies capable of blocking the acetylcholine binding site was analysed. Blocking antibodies were found to be present in similar amounts in the serum of both severely ill myasthenic rats and rats without symptoms of disease.

In chapter 3 stimulated single fiber electromyography is used to detect early signs of experimental autoimmune myasthenia gravis in the rat. Weight loss, clinical symptoms and decrement studies have been used sofar for the evaluation of disease severity in myasthenic rats. From studies in man this electrophysiological technique was known to be more sensitive than decrement studies, as with this technique neuromuscular disturbances can be detected before impulse blocking occurs, thus before decrement can be seen. We tested the sensitivity of stimulated single fiber electromyography for the detection of abnormal neuromuscular function, and compared the findings with decrement studies, clinical symptoms, anti-acetylcholine receptor antibody titers, acetylcholine receptor content and acetylcholine receptor-antibody complexes in muscle.

Stimulated single fiber electromyography was found to be a sensitive diagnostic test in chronic experimental autoimmune myasthenia gravis. Abnormal jitter developed in 7 out of 8 rats immunized with Torpedo acetylcholine receptor, and always preceded decrement of the compound muscle action potential and the development of clinical signs. The severity of abnormalities found by stimulated single fiber electromyography was not proportional to the acetylcholine receptor loss from the gluteus medius muscle, which was used for the electromyographical studies, nor from the carcass. Similar to the results discussed in chapter 3, this again suggests that the total amount of acetylcholine receptor loss found in muscle is not the only factor responsible for impaired neuromuscular transmission. Therefore, probably other factors contribute also to the abnormal jitter, like variation in structural characteristics of the postsynaptical area, or distribution of acetylcholine or acetylcholine receptors in the enlarged synaptic cleft, or allosteric blocking of acetylcholine receptor function by bound antibodies.

Chapter 4 introduces the second part of this thesis. It describes the terminology of the idiotypes and anti-idiotypes, and the idiotype network theory of Jerne. Analysis of the structure of an immunoglobulin makes it possible to distinguish several antigenic determinants on the different parts of the immunoglobulin. The isotype of an immunoglobulin determines its class and subclass (e.g. IgG_1), and is located on the constant region of the molecule. Allotypes refer to determinants only present on immunoglobulins of certain subgroups of a population. Idiotypes are associated with antigenic determinants expressed on the variable region domains (V region) of immunoglobulins. An idiotype consists out of a collection of idiotopes. An idiotope can be formed by the V_H region, the V_L region, or by a combination of both V regions. Idiotopes can be categorized according to their localization, prevalence, crossreactivity, or functional properties. An important category of idiotopes are 'crossreactive idiotopes'. Crossreactive idiotopes are determinants that are shared by different immunoglobulins, and they are important in linking antibodies into an idiotype-anti-idiotype network. This linkage can be established by anti-idiotype antibodies, which bind to the idiotype determinants of an antibody. In 1974 Jerne first proposed that idiotypes and anti-idiotypes were interconnected in a network which plays a crucial role in the regulation of the immune response. Naturally occurring anti-idiotype antibodies have been detected in patients suffering from autoimmune diseases, including myasthenia gravis, and numerous studies now support a regulatory function of anti-idiotype antibodies.
Several idiotype pathways have been proposed as an explanation for the induction of myasthenia gravis. For example, a virus binding the acetylcholine receptor could induce antibodies carrying specific idiotopes. Complementary anti-idiotype antibodies could be structurally similar to the binding site of the virus and therefore be able to bind the acetylcholine receptor. In this way an autoimmune attack against the

receptor could be elicited. On the other hand micro-organisms could share antigenic determinants with the acetylcholine receptor, instead of being complementary. Then, antibodies directed at these micro-organisms would also bind the receptor. This hypothesis circumvents the need for anti-idiotypes, and postulates that antibodies with similar fine specificity, and probably similar idiotypes, are used in the response against antigenic determinants on both certain micro-organisms and the acetylcholine receptor.
Crossreactive idiotopes may be of therapeutical interest. In some studies these idiotopes are readily demonstrable in myasthenia gravis and in experimental autoimmune myasthenia gravis, while others could not find sharing of idiotopes among anti-acetylcholine receptor antibodies. The use of differing monoclonal and polyclonal anti-acetylcholine receptor antibodies and anti-idiotypes makes comparison between these studies quite difficult. Almost all studies analyse idiotopes related to the antigen binding site of the immunoglobulin, but no analysis is made of the idiotopes related to framework residues. In experimental autoimmune myasthenia gravis several anti-idiotype therapies have been tried. Results reached by these therapies are very different, some studies show a substantial suppression of the anti-acetylcholine receptor antibody titer, while others do not. However, all studies were performed in adult animals, although it is known that neonatal, administration of anti-idiotype antibodies can result in more profound and long lasting effects.
We studied the crossreactive idiotopes, associated with the antigen binding site, and those associated with the framework residues of a serie of well-characterized monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies. Anti-idiotype antibodies against these idiotopes were tested for their regulatory properties in neonatal rats.

Chapter 5 describes the analysis of five anti-acetylcholine receptor monoclonal antibodies and two control myeloma proteins. The idiotype profile of three of these monoclonal antibodies, directed at the main immunogenic region, may be of interest, because these monoclonals are capable of inducing experimental autoimmmune myasthenia gravis, and about 50% of the anti-acetylcholine receptor antibodies is directed at this main immunogenic region. We were able to identify crossreactive idiotopes associated with the antigen binding site of these monoclonal antibodies directed at the main immunogenic region. In addition, sharing of framework related idiotopes was found between all 5 anti-acetylcholine receptor antibodies. The sharing of binding site related idiotopes can be explained by the fact that these monoclonals, all three directed at the main immunogenic region, bind to overlapping regions on the acetylcholine receptor and therefore share conformational structures in their binding sites. Sharing of framework related idiotopes can not be explained by similarities in the structure of the antigen binding site, as crossreactive idiotopes are found on antibodies of totally different specificity. However, it could be explained by assuming that in response to autoantigens a restricted number of V_H gene families is used.

Sharing of idiotopes among antibodies of the same V_H gene family, but of different specificity, has been described. In fact, these crossreactive idiotopes can be seen as V_H gene markers.
Although crossreactive idiotopes could readily be demonstrated on the anti-acetylcholine receptor monoclonal antibodies, it was quite difficult to demonstrate their presence in serum of myasthenic rats. No crossreactive idiotopes could be demonstrated when inhibition assays were used; only by direct binding of the anti-idiotypes to the affinity purified anti-acetylcholine receptor antibodies could crossreactive idiotopes in myasthenic serum be demonstrated. Less than 0.1% of the anti-Torpedo acetylcholine receptor antibodies was found to be idiotype positive.
In addition to the polyclonal anti-idiotype antibodies, with which the above described analysis was performed, monoclonal anti-idiotypes were prepared against anti-acetylcholine receptor monoclonal antibody 65. One of these monoclonals bound to an idiotope in the antigen binding site of monoclonal 65, and another to a framework related idiotope. A monoclonal anti-idiotype recognizing a crossreactive idiotope on anti-acetylcholine receptor antibodies could be useful in the analysis of the idiotype profile of an anti-acetylcholine receptor immune response, and might be helpful in anti-idiotype manipulations of the idiotype-anti-idiotype network in myasthenia gravis. However, we did not find a monoclonal anti-idiotype binding to a crossreactive idiotope.

In chapter 6 the in vivo effects of neonatal administration of varying doses of anti-idiotype antibodies on the serum titer of anti-acetylcholine receptor antibodies, idiotype expression, and weight was studied in experimental autoimmune myasthenia gravis. Polyclonal affinity purified anti-idiotype antibodies directed at anti-acetylcholine receptor monoclonal antibody 65 were administred in dosages varying from the nanogram to the microgram range. Monoclonal anti-idiotype antibodies were tested in nanogram doses. No reproducible effect on the anti-acetylcholine receptor antibody titers or weight could be obtained during these experiments, although in 1 out of 4 experiments administration of a nanogram dosage of anti-iditype antibodies led to an enhanced antibody response after imunization with acetylcholine receptor. Similarly, adoptive transfer of spleen cells from rats pretreated with a nanogram dosage of anti-idiotype antibodies resulted in an increased antibody response against acetylcholine receptor after immunization.
It has been demonstrated that anti-idiotype manipulations can result in altered idiotype expression, without affecting the total antibody response against a given antigen. Therefore, the idiotype expression was analysed, using the assay system as described in chapter 5. No enhanced idiotype expression was found, as again less than 0.1% of the anti-Torpedo acetylcholine receptor antibodies was idiotype positive.

Many variables determine the succes or failure of anti-idiotype manipulation, including age, the time interval between administration of anti-idiotype and the induction of disease, the dosage, and the isotype. Although it is not possible to test all combinations, we analysed polyclonal and monoclonal anti-idiotype antibodies in varying dosages, and studied the total antibody response as well as the idiotype expression. From these experiments we conclude that the polyclonal immune response against the acetylcholine receptor is idiotypically quite heterogeneous, in spite of the extensive crossreactivity that can be found at the level of monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies. Secondly, in vivo administration of polyclonal or monoclonal anti-idiotypes does not suppress the serum antibody level against the acetylcholine receptor, nor influences the idiotype profile of the immune response. Third, the idiotype mediated manipulaton of the immune response against large antigens, like the acetylcholine receptor, is clearly more complicated than that against small haptens, and more sensitive techniques, like adoptive transfer models, might be helpful in analysing the possibilities of anti-idiotype treatment in myasthenia gravis in more detail.

SAMENVATTING

Samenvatting

Myasthenia gravis is een autoimmuun ziekte, die gekarakteriseerd wordt door schade aan de postsynaptische spiermembraan, welke veroorzaakt wordt door antilichamen. Antilichamen gericht tegen de nicotine acetylcholine receptor spelen een centrale rol in de pathogenese van myasthenia gravis. Dit wordt duidelijk gedemonstreerd door het feit dat een zwangere de ziekte kan overdragen aan haar kind, of door het feit dat serum van een patient de ziekte kan overbrengen naar proefdieren en door het therapeutisch effekt van plasmaferese. Mogelijkheden om specifiek de produktie van deze auto-antilichamen te kunnen controleren en manipuleren zou een grote therapeutische doorbraak betekenen. Daarom is het belangrijk om over gedetailleerde informatie te beschikken aangaande het experimentele diermodel voor myasthenia gravis, om zodoende resultaten van nieuwe immuunmodulerende therapieën optimaal te kunnen beoordelen.
Doel van de studies, beschreven in dit proefschrift, was ten eerste om het rat model van experimentele autoimmuun myasthenia gravis te optimaliseren. Ten tweede werden de mogelijkheden tot regulatie van de anti-acetylcholine receptor antilichaam produktie middels idiotype-anti-idiotype interakties onderzocht.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de literatuur met betrekking tot myasthenia gravis en experimentele autoimmune myasthenia gravis. De struktuur en lokalisatie van de acetylcholine receptor wordt beschreven, aangezien het bekend is dat dit molekuul het meest belangrijke antigeen is in myasthenia gravis, waartegen de klinisch relevante antilichamen zijn gericht. Veel informatie over de struktuur van dit molekuul is nu beschikbaar; de acetylcholine receptor van vis, zoogdier, en mens is nu gekloneerd, en de exacte aminozuur volgorde is bekend. De antigene determinanten op de acetylcholine receptor zijn in kaart gebracht en meer dan honderd monoklonalen, met verschillende bindingsplaatsen op de receptor waaronder de acetylcholine bindingsplaats, zijn beschikbaar. Het merendeel van zowel de monoklonalen als in het serum vóórkomende antilichamen bind echter aan één extracellulaire determinant, de zogenaamde "main immunogenic region". De rol van T cellen in myasthenia gravis en experimentele myasthenia gravis wordt bestudeerd. Deze lymfocyten zijn betrokken bij cytotoxische aktiviteiten en bij de regulatie van de immunologische respons. Een aantal epitopen op de acetylcholine receptor, welke door T cellen herkend worden, is inmiddels geanalyseerd en deze epitopen bleken verschillend te zijn van de determinanten die door B cellen herkend worden.
Humane myasthenia gravis wordt kort besproken en meer aandacht wordt gegeven aan experimentele autoimmuun myasthenia gravis. Vooral het rat model van experimentele autoimmuun myasthenia gravis, opgewekt door immunisatie met acetylcholine receptor van de vis 'Torpedo californica', wordt belicht, aangezien dit model gebruikt is in de studies beschreven in dit proefschrift. Immunisatie met Torpedo acetylcholine receptor

induceert een chronische ziekte, die in bijna ieder detail overeenkomt met het humane ziektebeeld, met uitzondering van de thymus afwijkingen die alleen bij de mens gezien worden. Pathomorfologie van de neuromusculaire overgang en mechanismen die leiden tot schade aan de eindplaat zijn gelijk in mens en dier. De destructie wordt veroorzaakt onder invloed van antilichamen en zowel in humane myasthenia gravis als in het chronische dierlijke equivalent worden zelden cellulaire infiltraten gezien. Het is aangetoond dat onder invloed van de aanwezigheid van antilichamen de hoeveelheid acetylcholine receptoren op de eindplaat afneemt door processen als antigene modulatie en destructie van de spiermembraan door complement, en dat de antilichamen alleen al door binding in staat zijn de funktie van de acetylcholine receptor te blokkeren.

In hoofdstuk 2 wordt de relatie tussen anti-acetylcholine receptor antilichamen, de hoeveelheid acetylcholine receptoren in de spier en de klinische toestand in detail bestudeerd. In tegenstelling tot wat men zou verwachten, kunnen verschillen in de klinische toestand tussen myasthene ratten niet geheel verklaard worden door alleen te kijken naar het verlies van acetylcholine receptoren, aangezien er geen significante correlatie bestaat tussen de klinische toestand en het receptor verlies. Eerdere studies suggereerden dat de hoeveelheid acetylcholine receptor waaraan geen antilichaam gebonden is de klinische toestand bepaalt, aangezien bij mens en rat een wisselende hoeveelheid acetylcholine receptor gecomplexeerd bleek te zijn met antilichaam. Echter, wij tonen aan dat een groot deel van de acetylcholine receptor-antilichaam complexen in vitro gevormd worden gedurende de extractie van de acetylcholine receptoren uit de spier, en dat er een zeer goede relatie bestaat tussen de serum titer van anti-acetylcholine receptor antilichamen en de hoeveelheid complexen. Zodoende kan geconcludeerd worden dat veel minder acetylcholine receptoren in vivo antilichamen gebonden hebben dan eerder verondersteld werd. Met gebruik van een verbeterde methode voor het bepalen van acetylcholine receptor antilichaam complexen wordt geen relatie *gevonden tussen antilichaam vrije receptor en de mate van ziekte. Tot slot wordt de rol* onderzocht van anti-acetylcholine receptor antilichamen die in staat zijn de acetylcholine bindingsplaats te blokkeren. Even veel blokkerende antilichamen werden gevonden in het serum van myasthene ratten met en zonder symptomen van ziekte.

In hoofdstuk 3 wordt het gebruik van "single fiber" electromyografie voor de vroege opsporing van tekenen van experimentele myasthenia gravis in de rat beschreven. Tot dusver zijn gewicht, klinische symptomen en decrement van de spierpotentiaal gebruikt om de klinische toestand in myasthene ratten te evalueren. Uit studies in de mens is bekend dat deze electrofysiologische techniek gevoeliger is dan studie van decrement van de spierpotentiaal, aangezien hiermee verstoringen in de neuromusculaire signaaloverdracht ontdekt kunnen worden vóórdat blokkering van de impuls optreedt. De sensitiviteit van single fiber electromyografie voor het detecteren van een abnormale

neuromusculaire funktie werd getest, en vergeleken met de bevindingen uit decrement studies, klinische symptomen, anti-acetylcholine receptor antilichaam titers, acetylcholine receptor en acetylcholine receptor-antilichaam complexen in de spier.
Vastgesteld werd dat single fiber electromyografie een sensitieve diagnostische test is in chronische experimentele autoimmuun myasthenia gravis. In zeven van de acht ratten die geïmmuniseerd waren met Torpedo acetylcholine receptor ontwikkelde zich een abnormale jitter, en dit ging altijd vooraf aan decrement van de samengestelde spierpotentiaal en het begin van klinische symptomen.
De omvang van de afwijkingen, die gevonden werden bij single fiber electromyografie, was niet proportioneel aan het verlies van acetylcholine receptor uit de gluteus medius spier, welke was gebruikt voor de electromyografische studies, noch met de hoeveelheid receptor in het gehele karkas. Evenals de resultaten beschreven in hoofdstuk 3, suggereert ook deze bevinding dat het totale verlies aan acetylcholine receptor niet de enige faktor is die verantwoordelijk gesteld kan worden voor een gestoorde neuromusculaire transmissie. Daarom dragen waarschijnlijk ook andere faktoren bij tot een abnormale jitter, zoals variatie in de struktuur van de postsynaptische membraan, of verdeling van acetylcholine of acetylcholine receptoren in een vergrote synaptische spleet, of allosterische blokkade van de receptor funktie door binding van antilichamen.

Hoofdstuk 4 introduceert het tweede deel van dit proefschrift. Het beschrijft de terminologie van de idiotypes en de anti-idiotypes, en de idiotype netwerk theorie van Jerne
Door analyse van de struktuur van een immunoglobuline is het mogelijk diverse antigene determinanten te onderscheiden op verschillende delen van het molekuul. Het isotype van een immunoglobuline bepaalt zijn klasse en subklasse (bijvoorbeeld IgG_1), en is gelokaliseerd op het constante deel van het molekuul. Determinanten die alleen aanwezig zijn op immunoglobulines van bepaalde subgroepen in een populatie bepalen het allotype. Idiotypes zijn geassocieerd met antigene determinanten die op de variabele regio (V regio) van het immuunglobuline tot expressie worden gebracht, en een idiotype bestaat uit een verzameling idiotopen. Een idiotoop kan gevormd worden door de V_H regio, de V_L regio of door een combinatie van beide V regio's. Idiotopen kunnen worden ingedeeld op basis van hun localisatie, prevalentie, kruisreaktiviteit, of funktionele eigenschappen. Een belangrijke categorie van idiotopen zijn de kruisreagerende idiotopen. Kruisreagerende idiotopen zijn determinanten die gedeeld worden door verschillende immunoglobulines en deze zijn belangrijk voor de verbinding van antilichamen in een idiotype-anti-idiotype netwerk. Deze verbinding kan tot stand gebracht worden door anti-idiotype antilichamen die de idiotype determinanten van een antilichaam herkennen. In 1974 stelde Jerne als eerste voor dat idiotypes en anti-idiotypes onderling zijn verbonden in een netwerk dat een belangrijke rol speelt in de regulatie van de immunologische respons. Vrij circulerende anti-idiotype antilichamen zijn aangetroffen bij patienten die lijden aan autoimmuun ziekten, waaronder myasthenia

gravis, en talrijke studies ondersteunen nu een regulatoire rol voor anti-idiotype antilichamen. Verschillende idiotype interakties zijn naar voren gebracht als verklaring voor de inductie van myasthenia gravis. Een virus dat aan de acetylcholine receptor bindt zou, bijvoorbeeld, antilichamen kunnen induceren gericht tegen zijn bindingsplaats aan de receptor. Complementaire anti-idiotype antilichamen hiertegen zouden struktureel weer gelijk kunnen zijn aan de bindingsplaats van het virus en daardoor aan de acetylcholine receptor zelf kunnen binden. Op deze manier zou een autoimmuunreaktie tegen de receptor op gang kunnen komen. Aan de andere kant zouden micro-organismen bepaalde antigene determinanten met de receptor gemeenschappelijk kunnen hebben. Antilichamen gericht tegen deze microorganismen zouden dus ook in staat zijn zich aan de receptor te binden.
Kruisreagerende idiotopen kunnen therapeutisch belangrijk zijn. Sommige studies laten zien dat deze idiotopen gemakkelijk aan te tonen zijn in myasthenia gravis en in experimentele autoimmuun myasthenia gravis, terwijl andere de aanwezigheid van deze idiotopen niet hebben kunnen vaststellen. Het gebruik van verschillende monoklonale en polyklonale anti-acetylcholine receptor antilichamen en anti-idiotypes maakt de vergelijking van deze studies tamelijk moeilijk. Bijna alle studies analyseren idiotopen op de antigeen bindingsplaats, en maken geen analyse van de idiotopen gerelateerd aan daarbuiten gelegen "framework" determinanten. In experimentele autoimmuun myasthenia gravis zijn diverse anti-idiotype therapieën geprobeerd. De resultaten hiervan zijn zeer verschillend. Sommige studies tonen een aanzienlijke verlaging van de antilichaam titer, terwijl andere dit niet laten zien. Al deze studies weren verricht in volwassen dieren, maar het is bekend dat toediening van anti-idiotype antilichamen aan pasgeboren dieren een sterker en langer durend effekt teweeg kan brengen.
Wij bestudeerden de kruisreaktieve idiotopen geassocieerd met de antigeen bindingsplaats, en die geassocieerd met de "framework" determinanten van een serie goed gekarakteriseerde monoclonale anti-acetylcholine receptor antilichamen. De regulatoire eigenschappen van deze anti-idiotype antilichamen werden getest middels toediening aan pasgeboren ratten.

Hoofdstuk 5 beschrijft de analyse van vijf monoklonale anti-acetylcholine receptor antilichamen en twee controle myeloom antilichamen. Het idiotype profiel van drie van deze monoklonale antilichamen, gericht tegen de "main immunogenic region", kan belangrijk zijn omdat deze monoklonalen in staat zijn experimentele autoimmuun myasthenia gravis te induceren. Bovendien is ongeveer 50% van de anti-acetylcholine receptor antilichamen gericht tegen deze
"main immunogenic region". Het was mogelijk om kruisreagerende idiotopen geassocieerd met de antigeen bindingsplaats van deze drie monoklonalen te identificeren. Daarenboven werden gerelateerde kruisreaktieve idiotopen gevonden op alle vijf anti-acetylcholine receptor monoklonalen. Het voorkomen van antigeen bindingsplaats gerelateerde idiotopen kan verklaard worden door het feit dat deze mono-

klonalen alle drie gericht tegen de "main immunogenic region", binden aan elkaar overlappende regio's op de acetylcholine receptor en daarom bepaalde conformaties in hun bindingslaats gemeenschappelijk hebben. Het voorkomen van kruisreactieve "framework" gerelateerde idiotopen op antilichamen met verschillende specificiteit kan niet worden verklaard door overeenkomsten in de struktuur van de antigeen bindingsplaats. Het zou echter verklaard kunnen worden door aan te nemen dat in de immuunrespons tegen auto-antigenen een beperkt aantal V_H gen families wordt gebruikt. Het voorkomen van dezelfde idiotopen op antilichamen van eenzelfde V_H gen familie, maar, met een verschillende specificiteit is beschreven. In feite kunnen deze kruisreactieve idiotopen opgevat worden als V_H gen markers.
Alhoewel kruisreagerende idiotopen aangetoond konden worden op anti-acetylcholine receptor monoklonalen, was het moeilijk om de aanwezigheid van deze idiotopen in het serum van myasthene ratten te bepalen. Geen kruisreagerende idiotopen konden worden aangetoond indien gebruik gemaakt werd van inhibitie testen; slechts in een direkte bindingtest van anti-idiotypes aan affiniteits gezuiverde anti-acetylcholine receptor antilichamen konden kruisreagerende idiotopen in sera van myasthene ratten worden aangetoond. Minder dan 0.1% van de anti-Torpedo acetylcholine receptor antilichamen bleek idiotype positief te zijn.
Behalve polyklonale anti-idiotype antilichamen, waarmee de bovenstaande analyses zijn gedaan, werden ook monoklonale anti-idiotypes antilichamen bereid tegen anti-acetylcholine receptor monoklonaal 65. Eén van deze monoklonalen herkent een idiotoop in de antigeen bindingsplaats van monoklonaal 65, en een ander is gericht tegen een "framework" gerelateerde idiotoop. Een monoklonaal anti-idiotype, dat een kruisreagerende idiotoop herkent op anti-acetylcholine receptor antilichamen, zou nuttig kunnen zijn in de analyse van het idiotype profiel van een antilichaam respons tegen de anti-acetylcholine receptor. Ook zou een dergelijk monoklonaal behulpzaam kunnen zijn in anti-idiotype manipulaties van het idiotype-anti-idiotype netwerk in myasthenia gravis. Tot dusver echter vonden wij geen monoklonaal anti-idiotype dat bindt aan een kruisreagerende idiotoop.

In hoofdstuk 6 werden de in vivo effekten onderzocht van neonatale toediening van verschillende doses anti-idiotype antilichamen op de serum titer van anti-acetylcholine receptor antilichamen, idiotype expressie en gewicht. Affiniteits gezuiverde polyklonale anti-idiotype antilichamen gericht tegen anti-acetylcholine receptor monoklonaal 65 werden in verschillende doses toegediend, te weten vanaf nanogram tot microgram hoeveelheden. Monoklonale anti-idiotype antilichamen werden alleen getest in nanogram dosis. Geen reproduceerbaar effekt op de anti-acetylcholine receptor titer of gewicht kon worden verkregen in deze experimenten, alhoewel in één van de vier experimenten toediening van een nanogram dosis polyclonaal anti-idiotype tot een verhoogde antilichaam respons na immunisatie met acetylcholine receptor leidde. "Adoptive transfer" van miltcellen van ratten die neonataal behandeld waren met een

nanogram dosis anti-idiotype antilichamen resulteerde na immunisatie in een verhoogde antilichaam produktie tegen de acetylcholine receptor. Het is aangetoond dat anti-idiotype manipulatie kan resulteren in een veranderde idiotype expressie, zonder de hoogte van de totale antilichaam respons tegen een bepaald antigeen te verstoren. Daarom werd ook de idiotype expressie geanalyseerd met gebruik van de test zoals die beschreven staat in hoofdstuk 5. Er werd geen verhoogde idiotype expressie gevonden, en opnieuw was minder dan 0.1% van de anti-Torpedo acetylcholine receptor antilichamen idiotype positief.

Vele variabelen bepalen het al dan niet slagen van anti-idiotype manipulatie, waaronder leeftijd van de ontvanger, het tijdsinterval tussen toediening van het anti-idiotype en induktie van de ziekte, en de dosis en het isotype van het anti-idiotype. Hoewel het niet mogelijk is om alle combinaties te testen, analyseerden wij polyklonale en monoklonale anti-idiotype antilichamen in verschillende doses. Ook werd zowel de totale antilichaam respons, als ook de idiotype expressie bestudeerd. Uit deze experimenten kan geconkludeerd worden dat de polyklonale immuunrespons tegen de acetylcholine receptor idiotypisch tamelijk heterogeen is, ondanks de uitgebreide kruisreaktiviteit die gevonden werd op het niveau van de monoklonale anti-acetylcholine receptor antilichamen. Ten tweede, in vivo toediening van polyklonale of monoklonale anti-idiotypes onderdrukt noch de serum antilichaam titer, noch het idiotype profiel. Ten derde, idiotype manipulatie van de immuunrespons tegen een groter antigeen, zoals de acetylcholine receptor, is duidelijk ingewikkelder dan dat tegen kleine haptenen. Meer gevoelige technieken, zoals adoptive transfer modellen zouden behulpzaam kunnen zijn bij de analyse van de mogelijkheden van anti-idiotype behandeling van myasthenia gravis.