

Autoinmunidad contra receptores cardiovasculares: implicaciones estructurales y funcionales

Autoimmunity against cardiovascular receptors: structural and functional implications

J. HOEBEKE

Laboratorio de Enzimología y Química de las Proteínas, URA1334 del CNRS, Facultad de Medicina,
Universidad François Rabelais, Tours, Francia

Laboratoire d'Enzymologie et de Chimie des Protéines, URA1334 du CNRS, Faculté de Médecine,
Université François Rabelais, Tours, France

Trabajo recibido para su publicación: 1/95 Aceptado: 1/95

Dirección para separatas (Requests for reprints to): Johan Hoebeke, M.D., Faculté de Médecine,
Université François Rabelais, Tours, France

A partir de la estructura supuesta de los receptores unidos a la proteína G, se ha predicho que la segunda asa extracelular de estos receptores es importante desde el punto de vista inmunológico y farmacológico. Los péptidos sintéticos análogos a esta estructura son el objetivo de autoanticuerpos en el suero de pacientes con cardiomiopatía dilatada o con enfermedad de Chagas. Estos anticuerpos, así como los anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra los péptidos sintéticos correspondientes, poseen propiedades símil agonistas. Aunque no existe evidencia directa que relacione la presencia de estos autoanticuerpos con la fisiopatología de las cardiomiopatías en las que se los encuentra, podrían ser marcadores para diferenciar una subpoblación clínica y terapéutica de pacientes con cardiomiopatías. *Rev Arg Cardiol* 1995; 63 (3): 221-230.

Palabras clave Receptores ligados a proteína G - Autoanticuerpos - Péptidos sintéticos - Cardiomiopatía dilatada - Enfermedad de Chagas

Starting from the putative structure of G protein coupled receptors, the second extracellular loop of these receptors was predicted to be an immunological and pharmacologically important domain. Synthetic peptides, corresponding to that domain were shown to be the target of autoantibodies in serum of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and with Chagas' disease. These antibodies, as well as polyclonal rabbit antibodies directed against the corresponding synthetic peptides, were shown to possess agonist-like properties. Although no direct evidence exists to link the presence of these autoantibodies to the physio-pathology of the cardiomyopathies in which they are found, they could be markers to differentiate a clinical and therapeutical subpopulation of patients with the disease. Rev Arg Cardiol 1995; 63 (3): 221-230.

Key words G protein coupled receptors - Autoantibodies - Synthetic peptides - Idiopathic dilated cardiomyopathy - Chagas' disease

I. ANALISIS ESTRUCTURAL DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LA PROTEINA G LIGADA A RECEPTORES CARDIOVASCULARES

La clonación y descripción exitosa de la secuencia del receptor β -adrenérgico del pulmón de hámster por el grupo de Lefkowitz (1) hizo posible por primera vez relacionar el conocimiento farmacológico sobre los β -adrenorreceptores, acumulado durante más de 30 años, con los hallazgos estructurales de los receptores proteicos. Por cierto, comparando la estructura primaria del receptor secuenciado por analogía con otras proteínas, fue claro que la estructura total del receptor β_2 -adrenérgico mostraba una homología importante con la rodopsina, el pigmento ocular, un fotorreceptor que traduce su señal a través de la transducina, una proteína reguladora dependiente de GTP (ligada a la proteína G). Desde que se supo que este fotorreceptor pertenecía a la misma familia de la bacteriorrodopsina, cuya estructura tridimensional ha sido analizada con alta resolución, (2) se planteó la hipótesis de que esta estructura (Figura 1) era el modelo para todos los receptores ligados a la proteína G. Actualmente se ha clonado y descrito la secuencia de más de 700 miembros de la familia de receptores ligados a la proteína G, y la secuencia primaria de cada uno de sus miembros parece ser compatible con la estructura de la bacteriorrodopsina. En la Tabla 1 se resumen los miembros más importantes de esta familia relacionada con la regulación cardiovascular.

La parte más importante de la molécula del receptor consiste en siete extensiones hidrofóbicas con una estructura alfa-helicoidal que forma un bolsillo hidrofóbico en la bicapa lipídica. Las hélices alfa se mantienen unidas por asas intra y extracelulares (Figura 2). En el receptor β_2 -adrenérgico, la porción N-

I. STRUCTURAL ANALYSIS OF THE FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE G PROTEIN COUPLED CARDIOVASCULAR RECEPTORS

The successful cloning and sequencing of the hamster lung β_2 -adrenergic receptor by Lefkowitz' group (1) made it for the first time possible to link the pharmacological knowledge gathered over more than 30 years on the β -adrenoceptors with the structural features of the receptor protein. Indeed, comparing the primary structure of the sequenced receptor for analogy with other proteins, it became clear that the overall structure of the β_2 -adrenergic receptor showed a striking homology with rhodopsin, the eye pigment, a photoreceptor which transduces its signal by means of transducin, a GTP dependent regulatory protein (G coupled protein). Since it was assumed that this photoreceptor belonged to the same family as bacteriorhodopsin, whose tridimensional structure had been analysed at high resolution, (2) the hypothesis was made that this structure (Figure 1) was the blueprint for all G-protein coupled receptors. Actually, more than 700 members of the so-called G-protein coupled receptor family have been cloned and sequenced and the primary sequence of every member of this family seems to be compatible with the bacteriorhodopsin structure. Table 1 summarizes the most important members of this family involved in cardiovascular regulation.

The main part of the receptor molecule consists of seven hydrophobic stretches with an alpha-helical structure which are forming a hydrophobic pocket in the lipid bilayer. The alpha-helices are held together by extra- and intracellular loops (Figure 2). In the β_2 -adrenergic receptor, the N-terminal domain contains two consensus sequences for glycosylation (Asn-X-Ser/Thr). Since glycosylation is a property of the extracellular domains of membrane proteins, it can be deduced that the N-terminal domain points out of the cell. From the existence of seven

Tabla 1
Receptores cardiovasculares pertenecientes a los receptores de membrana ligados a la proteína G

Ligandos no péptidos

Receptores alfa-adrenérgicos (1A, 1B, 2A, 2B)
Receptores β -adrenérgicos (β_1 , β_2)
Receptor colinérgico muscarínico (M2)
Receptores serotoninérgicos (5HT-1, 5HT-2, 5HT-4)
Receptores de adenosina (A1, A2)
Receptores de histamina
Receptores de leucotrienos
Receptores de prostaciclina
Receptores de prostaglandinas
Receptores de tromboxanos

Ligandos peptídicos

Receptor de angiotensina II
Receptores de endotelina
Receptores de bradikinina
Receptores de vasopresina

Table 1
Cardiovascular receptors belonging to the G protein coupled membrane receptors

Non-peptide ligands

Alpha-adrenergic receptors (1A, 1B, 2A, 2B)
 β -adrenergic receptors (β_1 , β_2)
Muscarinic cholinergic receptor (M2)
Serotonergic receptors (5HT-1, 5HT-2, 5HT-4)
Adenosine receptors (A₁, A₂)
Histamine receptors
Leukotriene receptors
Prostacyclin receptors
Prostaglandin receptors
Thromboxane receptors

Peptide ligands

Angiotensin II receptor
Endothelin receptors
Bradykinin receptors
Vasopressin receptors

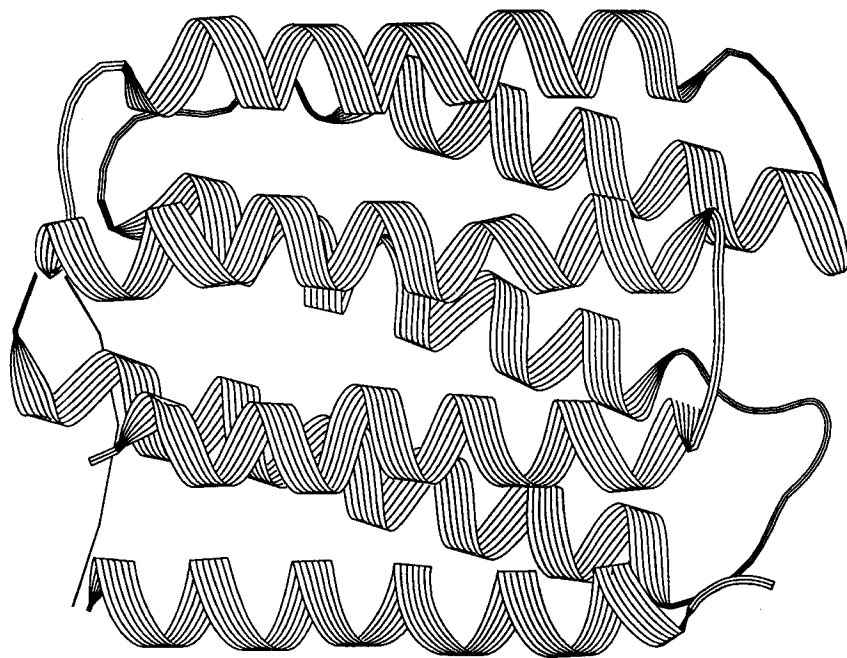


Fig. 1. Estructura de la bacteriorrodopsina. La estructura se construyó de las coordenadas del Brookhaven Protein Data Bank 1brd.PDB utilizando el programa RIBBON. (31) Las siete alfa-hélices adosadas a la membrana rodean un bolsillo hidrofóbico que hace de farmacofora. Las asas que unen las hélices son artefactos y no corresponden a la estructura real.

Fig. 1. Structure of bacteriorhodopsin. The structure was built from the coordinates of the Brookhaven Protein Data Bank 1brd.PDB using the RIBBON program. (31) The seven alpha-helices spanning the membrane are encompassing a hydrophobic pocket which is the putative pharmacophore. The loops linking the helices together are artifacts and do not correspond to a real structure.

terminal contiene dos secuencias aptas para la glucosilación (Asn-X-Ser/Tr). Como la glucosilación es una propiedad de la zona extracelular de las proteínas de la membrana, se puede deducir que la porción N-terminal apunta hacia el exterior de la célula. De la existencia de siete extensiones transmembra-

transmembrane stretches, it follows that the C-terminal domain is a cytoplasmic domain of the receptor. Glycosylation of the receptor is not essential for its function since receptors expressed in bacteria, which lack the glycosylation mechanisms, have the same pharmacological properties as mammalian receptors (3) and removal of the oligosaccharides

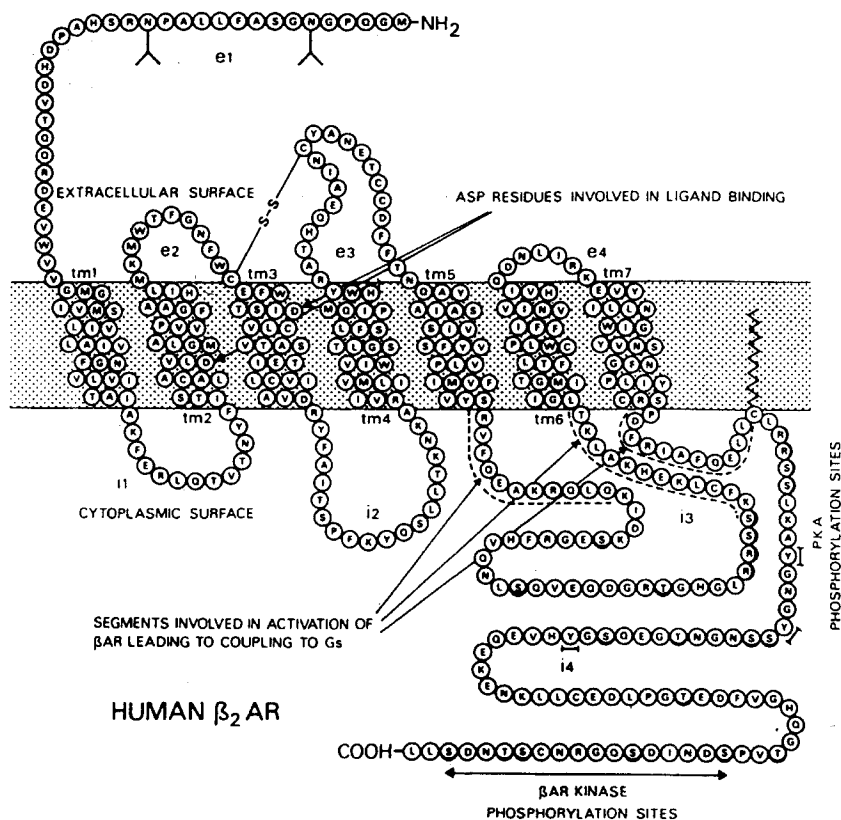


Fig. 2. Modelo del receptor β_2 -adrenérgico humano. La única cadena polipeptídica está adaptada al modelo de la bacteriorrodopsina mostrado en la Figura 1. El puente disulfuro, esencial para su actividad, que une la Cys¹⁰⁶ con la Cys¹⁸⁴, se representa -S-S-. Se indican los dos sitios de N-glicosilación en la porción amino-terminal de la proteína (A). Se indica el residuo Cys³⁴¹ palmitoilado, en la porción C-terminal intracelular (M). Los sitios potenciales de fosforilación están subrayados. Los sustratos de la tirosina quinasa, marcados (—), sólo están presentes en el receptor β_2 -adrenérgico. (Cita 32, con autorización.). Ref.: Human β_2 AR: receptor β_2 -adrenérgico humano; extracellular surface: superficie extracelular; cytoplasmic surface: superficie citoplásmica; ASP residues involved in ligand binding: residuos de ASP implicados en la unión del ligando; phosphorylation sites: sitios de fosforilación; segments involved in activation of β AR leading to coupling to Gs: segmentos comprometidos en la activación de receptores β AD que conducen a la unión a Gs; β AR kinase phosphorylation sites: sitios de fosforilación de la β_2 -AD quinasa.

Fig. 2. Model of the human β_2 -adrenergic receptor. The single polypeptide chain is arranged according to the model for bacteriorhodopsin as shown in Figure 1. The disulfide bond, essential for the activity, linking Cys¹⁰⁶ and Cys¹⁸⁴ together is represented by -S-S-. The two N-glycosylation sites in the amino-terminal portion of the protein are indicated (A). The palmitoylated Cys³⁴¹ residue at the intracellular C-terminal domain is indicated (M). Potential phosphorylation sites are underlined. The tyrosine kinase substrates, indicated by (—), are only present in the β_2 -adrenergic receptor. (Ref 32, with permission.)

nales se desprende que la porción C-terminal es una parte citoplasmática del receptor. La glucosilación del receptor no es esencial para su función, ya que receptores bacterianos, que carecen de mecanismos de glucosilación, tienen las mismas propiedades farmacológicas que los receptores mamíferos (3) y la remoción de los oligosacáridos por enzimas específicas no alteran sus propiedades funcionales. (4) La ausencia de carbohidratos, sin embargo, disminuye la densidad de receptores en la membrana celular, (5) sugiriendo un papel de la glucosilación en la dinámica celular.

El bolsillo generado por las siete hélices alfa transmembranales es la farmacofora del receptor. En particular, se ha demostrado que dos residuos de ácido aspártico cargados negativamente, presentes en la segunda y tercera porción transmembranal, son esenciales para la unión del ligando. (6) Esto sugiere que podrían tener un papel de contraiones para las catecolaminas cargadas positivamente. Otra característica esencial para la actividad del receptor es la existencia de un puente disulfuro, que une la segunda extensión extracelular con la tercera. Al cambiar por mutaciones puntuales las cisteínas serinas, no sólo se afecta dramáticamente la unión de los ligandos (7) sino también se interfiere con los mecanismos de desensibilización. (8)

La transducción de la señal después de la unión del ligando está en relación con la tercera y cuarta extensión intracelular. Se ha demostrado que un péptido correspondiente a la porción C-terminal de la tercera asa intracelular es capaz de activar a la proteína Gs. (9) La palmitoilación del residuo de cisteína cerca de la séptima región transmembranal en la porción C-terminal es muy importante para la estimulación de la adenilato ciclasa, probablemente induciendo un asa intracelular corta anclada a la membrana con el residuo palmitoil. (10)

Finalmente, la desensibilización de la función del receptor parece ser consecuencia de la fosforilación del receptor en la tercera y cuarta región intracelular. Concentraciones bajas de agonista conducen a la activación de la fosfoquinasa A (PKA). Esta quinasa fosforila dos sitios "blanco" en la porción C-terminal de la tercera región intracelular (Arg/Lis-Arg-X(X)-Ser/Tr). La ausencia de estos sitios en el receptor β_3 -adrenérgico (11) o en receptores que han mutado (12) previene totalmente la desensibilización a concentraciones bajas de agonistas. Esta desensibilización ha sido llamada heteróloga porque puede ser inducida por todos los efectores de la acumulación de AMPc que conducen a la activación de la PKA. Un segundo sitio de fosforilación está presente en la porción C-terminal de la proteína del receptor. Este es fosforilado por una quinasa específica del receptor β -adrenérgico (BARK) a altas concentraciones de agonista. Esto

by specific enzymes do not alter its functional properties. (4) Absence of carbohydrates, however, decrease the density of receptors at the cell membrane, (5) suggesting a role of glycosylation in cell trafficking.

The pocket generated by the seven transmembrane alpha-helices is assumed to be the pharmacophore of the receptor. In particular, two negatively charged aspartic acid residues, present in the second and third transmembrane domains, have been shown to be essential for ligand binding. (6) This suggests that they could play a role as counterions for the positively charged catecholamines. Another essential feature for receptor activity is the existence of a disulfide bridge, linking the second and third extracellular domains together. Changing by point mutations the cysteines to serines, not only dramatically affects ligand binding (7) but also interferes with the desensitization mechanisms. (8)

Transduction of the signal after ligand binding is related to the third and fourth intracellular domain. A peptide corresponding to the C-terminal of the third intracellular loop was shown to be able to activate the G_s protein. (9) Palmitoylation of the cysteine residue near the seventh transmembrane region in the C-terminal domains is very important for adenylate cyclase stimulation, probably by inducing a short intracellular loop anchored in the membrane with the palmitoyl residue. (10)

Finally, desensitization of receptor function seems to be the consequence of receptor phosphorylation of third and fourth intracellular domains. Low concentrations of agonist lead to activation of phosphokinase A (PKA). This kinase phosphorylates two consensus target sites at the C-terminal part of the third intracellular domain (Arg/Lys-Arg-X(X)-Ser/Thr). Absence of these sites in the β_3 -adrenergic receptor (11) or in mutated receptors (12) completely prevents desensitization at low agonist concentrations. This desensitization has been called heterologous because it can be induced by all effectors of cAMP accumulation leading to PKA activation. A second phosphorylation site is present at the C-terminus of the receptor protein. It is phosphorylated by a β -adrenergic receptor specific kinase (BARK) at high agonist concentrations. This leads to the so-called homologous desensitization. (13) Finally, tyrosine kinase phosphorylation consensus sequences are present on the C-terminal tail, which could be the targets of tyrosine kinase activity of the insulin receptor accounting by this mechanism for the desensitization induced by insulin in hamster smooth muscle cells. (14)

Sequence analysis has thus confirmed that the unique polypeptide chain of the β_2 -adrenergic receptor contains all structural requirements to explain ligand-binding, G_s coupling and desensitization of the receptor. Analogous features in the other G protein coupled receptors probably have the same functional role. The interrelation of these different properties will however necessitate a better knowledge about the three-dimensional structure of the receptor.

conduce a la llamada desensibilización homóloga. (13) Finalmente, secuencias adecuadas para la fosforilación de la tirosina kinasa están presentes en la cola C-terminal, las que podrían ser el "blanco" de la actividad de la tirosina kinasa del receptor de insulina, mecanismo probable de la desensibilización inducida por la insulina en las células musculares lisas del hamster. (14)

El análisis de la secuencia ha confirmado que la única cadena polipeptídica del receptor β_2 -adrenérgico contiene todos los requisitos estructurales para explicar la unión de ligandos, el acoplamiento Gs y la desensibilización del receptor. Hallazgos análogos en otros receptores ligados a la proteína G probablemente tengan el mismo papel funcional. La interrelación de estas diferentes propiedades necesitará, sin embargo, un mejor conocimiento acerca de la estructura tridimensional del receptor.

II. PROPIEDADES INMUNOLOGICAS DE LOS RECEPTORES LIGADOS A LA PROTEINA G

Para obtener una respuesta inmune humoral contra una proteína, son necesarias dos condiciones: 1) un fragmento de péptido, asociado a un componente del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), debe presentar un epítipo de célula T a una célula T helper, que reaccionará con proliferación y liberación de linfocinas capaces de estimular a las células B; 2) las células B deben estar presentes reconociendo un determinante antigénico o un epítipo de célula B en la misma proteína.

El reciente análisis estructural del complejo HLA-péptido con rayos X (15) ha confirmado que la interacción de un péptido inmunogénico con la molécula HLA depende de la presencia en la configuración inicial de distintos residuos de unión en por lo menos dos de los seis bolsillos receptores presentes en la última. Un programa de predicción basado en esta suposición nos permitió estudiar la presencia de fragmentos inmunogénicos en los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos y, así, producir péptidos sintéticos inmunogénicos derivados de la estructura primaria de estos receptores. (16, 17) Se utilizaron los mismos péptidos para evaluar la respuesta inmunodominante de la célula T helper en ratones inmunizados con las proteínas de los receptores. Se encontró que esta respuesta estaba dirigida contra un fragmento del péptido localizado en la segunda asa extracelular de los receptores. (18)

Los epítopos de célula B sobre las proteínas son básicamente conformacionales y se localizan en sitios de alta movilidad e hidrofilia (asa) en su superficie. En el caso de los receptores de proteína G, la mayor parte de la molécula, que tiene estructura alfa-helicoidal y está inmersa en la bicapa lipídica de la

II. IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF THE G PROTEIN COUPLED RECEPTORS

To obtain a humoral immune response against a protein, two conditions are necessary: 1) a peptide fragment, associated to a component of the major histocompatibility complex (HLA), must present a T cell epitope to a helper T cell which react by proliferation and release of lymphokines able to stimulate B cells; 2) B cells must be present recognizing an antigenic determinant or B cell epitope on the same protein.

The recent structural analysis of a HLA-peptide complex by X-ray analysis (15) has confirmed that the interaction of an immunogenic peptide with a HLA molecule depends on the presence of distinct anchor residues in the former fitting in at least two of the six receptor pockets present on the latter. A prediction program based on this assumption enabled us to study the presence of immunogenic fragments in the β_1 - and the β_2 -adrenergic receptors and, thus, to produce immunogenic synthetic peptides derived from the primary structure of these receptors. (16, 17) The same peptides were used to test the immunodominant T helper cell response in mice immunized with the receptor proteins. It was found that this response was directed against a peptide fragment located in the second extracellular loop of the receptors. (18)

B cell epitopes on proteins are mainly conformational and located in regions of high mobility and hydrophilicity (loops) at their surface. With regard to the G protein receptors, the major part of the molecule which is structured as alpha-helices and imbedded in the lipid bilayer of the cell membrane, is under native conditions totally inaccessible for antibodies. The intracellular domains are good antigens but only after permeabilisation can be antigenic targets on the intact cell. As already mentioned in the first chapter, the first and second extracellular loops of the β_2 -adrenergic receptor are functionally important. Since the first loop is very short and hydrophobic, the chance to raise antibodies against it are low. In contrast, the second extracellular loop is longer and highly hydrophilic. The presence of B cell epitopes on this loop is therefore very likely. Since this loop was also shown to contain an immunodominant T cell epitope when using the whole receptor as antigen, it was chosen as the most interesting target for antibodies with pharmacological and/or physiological effects on the receptor. Synthetic peptides corresponding to this loop in different cardiovascular G protein coupled receptors, were therefore used to study the presence of functional autoantibodies against those receptors in different cardiovascular diseases in which an autoimmune component was suspected and to raise antibodies which could have the same properties as the autoantibodies.

III. AUTOIMMUNITY AGAINST THE β -ADRENERGIC RECEPTORS

The first evidence suggesting that β -adrenergic receptors could be targets of autoantibodies was given by the group of Borda in Buenos Aires, who observed that the

membrana celular, es totalmente inaccesible a los anticuerpos en condiciones normales. Las porciones intracelulares son buenos antígenos, pero sólo después de la permeabilización de la membrana. Sólo las porciones extracelulares de los receptores pueden ser "blancos" antigénicos en la célula intacta. Como ya se mencionó antes, la primera y segunda asas del receptor β_2 -adrenérgico son funcionalmente importantes. Como la primera es muy corta e hidrofóbica, la posibilidad de generar anticuerpos contra ella es baja. En contraste, la segunda es más larga y muy hidrofílica. La presencia de epítopes de células B en esta asa es, por lo tanto, muy probable. Como también se demostró que este asa contiene un epítipo de célula T inmunodominante cuando se usa el receptor completo como antígeno, se la eligió como "blanco" más interesante para anticuerpos con efectos farmacológicos y/o fisiológicos sobre el receptor. Por lo tanto, se han utilizado los péptidos sintéticos correspondientes a este asa en diferentes receptores cardiovasculares ligados a la proteína G, para estudiar la presencia de autoanticuerpos funcionales contra dichos receptores en diferentes enfermedades cardiovasculares en las que se sospecha un componente autoinmune y para generar anticuerpos que puedan tener las mismas propiedades que los autoanticuerpos.

III. AUTOINMUNIDAD CONTRA LOS RECEPTORES β -ADRENERGICOS

La primera evidencia que sugirió que los receptores β -adrenérgicos podrían ser "blanco" de autoanticuerpos la proporcionó el grupo de Borda en Buenos Aires, quienes observaron que fracciones de IgG del suero de pacientes con enfermedad de Chagas eran capaces de estimular a los receptores β -adrenérgicos de manera similar a sus agonistas naturales. (19) Algunos años después, Wallukat y Wollenberger, utilizando como herramientas farmacológicas a cardiomiocitos de ratas recién nacidas, demostraron la existencia de IgG en sueros de pacientes con cardiomiopatía dilatada, que podían aumentar la frecuencia de latidos de estas células. Este efecto similar agonista fue bloqueado específicamente por antagonistas específicos de los receptores β_1 -adrenérgicos. (20) Estos resultados fueron confirmados bioquímicamente por Limas y colaboradores. (21)

En un esfuerzo por dar una base estructural a estas observaciones y partiendo de las propiedades inmunológicas de los receptores ligados a la proteína G, como se describió previamente, elegimos estudiar la presencia de autoanticuerpos contra los receptores β -adrenérgicos en el suero de pacientes con cardiomiopatía dilatada utilizando como antígenos a péptidos sintéticos correspondientes a la segunda asa extracelular de los receptores. Pudimos demos-

IgG fractions of sera of patients with Chagas' disease were able to stimulate β -adrenergic receptors in a similar way as the natural agonists. (19) A few years later, Wallukat and Wollenberger, using cardiomyocytes of neonatal rats as pharmacological tools, demonstrated the existence of IgG in sera of patients with dilated cardiomyopathy, which could increase the beating frequency of these cells. This agonist-like effect was specifically blocked by β_1 -adrenergic receptor specific antagonists. (20) These results were confirmed biochemically by Limas and coworkers. (21)

In an effort to give a structural basis to these observations and starting from the immunological properties of the G protein coupled receptors as described in previous chapter, we choose to study the presence of autoantibodies against the β -adrenergic receptors in sera of patients with dilated cardiomyopathy using synthetic peptides corresponding to the second extracellular loop of the receptors as antigens. We were able to show that 36% of patients sera recognized the peptide derived from the β_1 -adrenergic receptor. We could purify the autoantibodies from the IgG fraction of these patients and show that they inhibited in a non-competitive way the binding of a radioligand to the receptor. (22) We were also able to show that the purified autoantibodies induced a positive chronotropic effect in neonatal rat cardiomyocytes and that this effect was blocked by bisoprolol, a specific β_1 -blocker. Furthermore, we showed that the activity found in the IgG fractions of patients with dilated cardiomyopathy was completely abolished after adsorption of the autoantibodies on the synthetic peptide, suggesting that the pharmacological activities observed in these fractions were only due to antibodies recognizing the second extracellular loop of the β_1 -adrenergic receptors. (23)

To confirm the results obtained on the autoantibodies from patients with dilated cardiomyopathy, we induced antibodies in rabbits using the synthetic peptides as antigen. The polyclonal rabbit anti-peptide antibodies shared the pharmacological and physiological properties of the human autoantibodies: they non-competitively inhibited radioligand binding to the receptor and increased the beating frequency of neonatal rat cardiomyocytes. (24)

In view of the results obtained in patients with dilated cardiomyopathy, a collaborative effort was undertaken with the Cardiological Division of José M. Ramos Mejía Hospital, to study the presence of auto-anti β -adrenergic receptor antibodies in sera of patients with Chagas' disease. As summarized in Figure 3, approximately 40% of the patients showed a response against the peptide corresponding to the second extracellular loop of the β_1 -adrenergic receptor. In contrast, however, with dilated cardiomyopathy, a significant increase of the immune response against the same domain of the β_2 -adrenergic receptor was observed. (25) These results suggest that the autoantibodies with agonist-like activity against both subtypes of the β -adrenergic receptor as observed in sera of patients with Chagas' disease by Borda's group, (26) are directed against the second extracellular loop of the target receptors.

trar que el 36% de los sueros de pacientes reconocieron al péptido derivado del receptor β_1 -adrenérgico. Pudimos purificar los autoanticuerpos de la fracción IgG de estos pacientes y demostrar que ellos inhibían, de manera no competitiva, la unión del radioligando al receptor. (22) Pudimos también demostrar que los autoanticuerpos purificados produjeron un efecto cronotrópico positivo en cardiomiocitos de ratas recién nacidas y que este efecto fue bloqueado por el bisoprolol, un bloqueante β_1 específico. Mostramos además que la actividad encontrada en las fracciones de IgG de los pacientes con cardiomiopatía dilatada se abolía completamente después de la adsorción de los autoanticuerpos en el péptido sintético, sugiriendo que la actividad farmacológica observada en estas fracciones se debía únicamente a anticuerpos que reconocen a la segunda asa extracelular de los receptores β_1 -adrenérgicos. (23)

Para confirmar los resultados obtenidos con los autoanticuerpos de pacientes con cardiomiopatía dilatada, produjimos anticuerpos en conejos utilizando los péptidos sintéticos como antígeno. Los anticuerpos policlonales anti-peptídicos de conejo poseían las propiedades farmacológicas y fisiológicas de los autoanticuerpos humanos: inhibieron en forma no competitiva la unión de radioligandos al receptor e incrementaron la frecuencia de contracción en miocitos de ratas recién nacidas. (24)

En vista de los resultados obtenidos en pacientes con cardiomiopatía dilatada, se llevó a cabo un esfuerzo colaborativo con la División Cardiología del Hospital José M. Ramos Mejía, para estudiar la presencia de autoanticuerpos antirreceptores β -adrenérgicos en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas.

Como se ve en la Figura 3, aproximadamente el 40% de los pacientes mostró una respuesta contra el péptido correspondiente a la segunda asa extracelular del receptor β_1 -adrenérgico. En contraste, sin embargo, en la cardiomiopatía dilatada se observó un aumento significativo en la respuesta inmune contra la misma zona del receptor β_2 -adrenérgico. (25) Estos resultados sugieren que los autoanticuerpos con actividad tipo agonista contra ambos subtipos de receptores β -adrenérgicos, como los observados en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas por el grupo de Borda, (26) están dirigidos contra la segunda asa extracelular de los receptores "blanco".

La presencia de autoanticuerpos contra las mismas zonas de los receptores β -adrenérgicos en cardiomiopatías de orígenes bastante diferentes, sugiere que pueden participar en los síntomas fisiopatológicos comunes a ambas afecciones. Este conocimiento podría inducir a un tratamiento inmunológico específico de estos síntomas.

The presence of autoantibodies against the same domains of the β -adrenergic receptors in cardiomyopathies with quite different origins, suggests that they may participate in the common pathophysiological symptoms of the two diseases. This knowledge may lead to a specific immunological treatment of these symptoms.

IV. AUTOIMMUNITY AGAINST THE HEART MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR

While the β -adrenergic receptors are responsible for a positive chronotropic and inotropic effect on the heart by inducing production of cAMP, the heart muscarinic acetylcholine receptor (M2 acetylcholine receptor) is negatively linked to adenylate cyclase and thus induces a negative chronotropic and inotropic effect on the heart.

In view of the high structural homology between the adrenergic and the muscarinic receptors, a study was

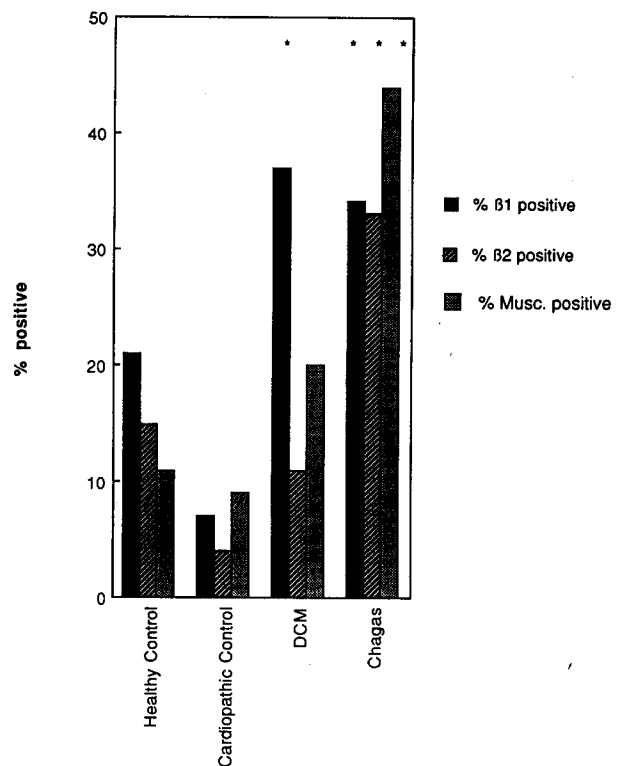


Fig. 3. Porcentaje de sueros positivos contra los péptidos correspondientes a la segunda asa extracelular de los receptores β_1 y β_2 adrenérgicos y del receptor cardíaco muscarínico de la acetilcolina. Una positividad significativamente mayor que la de los controles se indica con una estrella. El número de pacientes es de 66 controles sanos, 26 controles cardiopatas, 27 cardiomiopatías dilatadas idiopáticas y 61 chagásicos.

Fig. 3. Percentage of sera positive against the peptides corresponding to the second extracellular loop of the β_1 -, β_2 -adrenergic receptors and the heart muscarinic acetylcholine receptor. Positivity significantly higher than the controls is indicated with a star. The number of patients was respectively 66 for the healthy controls, 26 for the cardiopathic controls, 27 for the idiopathic dilated cardiomyopathy patients and 61 for the Chagas' patients.

IV. AUTOINMUNIDAD CONTRA RECEPTORES MUSCARINICOS DE ACETILCOLINA CARDIACOS

Mientras que los receptores β -adrenérgicos son responsables del efecto inotrópico y cronotrópico positivo en el corazón al inducir la producción de AMPc, el receptor muscarínico de acetilcolina del corazón (receptor M2 de acetilcolina) está vinculado negativamente a la adenil ciclasa, e induce un efecto cronotrópico e inotrópico negativo en el corazón.

En vista de la gran semejanza estructural entre los receptores adrenérgico y muscarínico, se llevó a cabo un estudio para saber si la segunda asa extracelular de estos últimos era también el "blanco" de una respuesta autoinmune. Se utilizó un péptido sintético correspondiente a la segunda asa extracelular del receptor M2 de acetilcolina para testear la presencia de autoanticuerpos antirreceptor en sueros de pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática. El porcentaje de pacientes positivos fue 39%. Más de la mitad de la población positiva reaccionó también contra el sitio correspondiente del receptor β_1 -adrenérgico. Los autoanticuerpos purificados de afinidad inhibieron la unión de radioligandos al receptor, confirmando la importancia funcional del epítipo reconocido. (27).

Los anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra el péptido sintético derivado del receptor M2 de acetilcolina fueron capaces de inhibir la unión del radioligando y la acumulación de AMPc estimulada por isoproterenol en las membranas de los cardiomiocitos y de disminuir la frecuencia de contracción en cardiomiocitos de ratas recién nacidas. Pueden ser descritos como anticuerpos tipo agonista. (28) Observaciones no publicadas de Gerd Wallukat confirman que los anticuerpos purificados de sueros de pacientes con cardiomiopatía dilatada poseen las mismas propiedades fisiológicas que los anticuerpos inducidos por el péptido en conejos.

En el mismo suero de pacientes chagásicos se investigó la presencia de autoanticuerpos contra el receptor M2 de acetilcolina. La Figura 3 ilustra los resultados obtenidos. Cerca del 50% de los pacientes chagásicos tenían autoanticuerpos contra el receptor M2 de acetilcolina, mientras que en el grupo con cardiomiopatía dilatada, estudiado bajo las mismas condiciones, la incidencia fue de sólo el 20%. (25) La poliespecificidad de la respuesta antirreceptor en pacientes con enfermedad de Chagas se reflejó así, no solamente por la aparición de autoanticuerpos antirreceptores β_1 y β_2 -adrenérgicos, sino también de autoanticuerpos contra los receptores M2 de acetilcolina. La funcionalidad de los autoanticuerpos antimuscarínicos en la enfermedad de Chagas fue confirmada recientemente por el grupo de Borda. (29)

V. CONCLUSIONES

Partiendo de la estructura supuesta de los recep-

undertaken to know if the second extracellular loops of the latter were also the target of an autoimmune response. A synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of the M2 acetylcholine receptor was used to screen sera of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy for the presence of anti-receptor autoantibodies. The percentage of positive patients was 39%. More than half of the positive population also reacted with the corresponding domain of the β_1 -adrenergic receptor. The affinity purified autoantibodies inhibited radioligand binding to the receptor, confirming the functional importance of the epitope recognized. (27)

Polyclonal rabbit antibodies directed against the synthetic peptide derived from the M2 acetylcholine receptor were able to inhibit radioligand binding, to inhibit isoproterenol stimulated accumulation of cAMP on cardiomyocyte membranes and to decrease beating frequency of neonatal rat cardiomyocytes. They can thus be described as agonist-like antibodies. (28) Unpublished observations by Gerd Wallukat confirm that the autoantibodies purified from sera of patients with dilated cardiomyopathy share the same physiological properties as the peptide induced rabbit antibodies.

The same sera of patients with Chagas' disease were also analysed for the presence of autoantibodies against the M2 acetylcholine receptor. Figure 3 illustrates the results obtained. Nearly 50% of the chagasic patients possessed autoantibodies against the M2 acetylcholine receptor while in the dilated cardiomyopathy patient population studied under the same conditions, the incidence was only 20%. (25) The polyspecificity of the anti-receptor response in patients with Chagas' disease was thus not only reflected in the occurrence of anti- β_1 - and anti- β_2 -adrenergic receptor autoantibodies but also in the occurrence of anti M2 acetylcholine receptor autoantibodies. The functionality of the anti-muscarinic autoantibodies in Chagas' disease was recently confirmed by Borda's group. (29)

V. CONCLUSIONS

Starting from the putative structure of G protein coupled membrane receptors, we were able to localize a functionally and immunologically important B cell epitope on the second extracellular loop of the β_1 -adrenergic receptor. We have shown that this loop is also functionally and immunologically important in the β_2 -adrenergic receptor and in the M2 heart acetylcholine receptor. We have thus coined this region, in analogy with the autoimmune target of autoantibodies against the nicotinic acetylcholine receptor in myasthenia gravis, (30) as a main immunodominant region of G protein coupled membrane receptors.

Although the auto-antibodies have properties which could, at least partially, explain the pathophysiology in dilated cardiomyopathy and Chagas' disease, no direct proof is available to conclude to their involvement in the development of those diseases. In view of the simultaneous

tores de membrana ligados a la proteína G, pudimos localizar un epítipo de células B funcional e inmunológicamente importante en la segunda asa extracelular del receptor β_1 -adrenérgico. Demostramos que esta asa es también funcional e inmunológicamente importante en los receptores β_2 -adrenérgico y M2 de acetilcolina cardíaco. Hemos llamado así a esta región, en analogía con el "blanco" autoinmune de los autoanticuerpos contra el receptor nicotínico de la acetilcolina en la miastenia gravis, (30) como la principal región inmunodominante de los receptores de membrana unidos a la proteína G.

Aunque los autoanticuerpos tienen propiedades que podrían, al menos parcialmente, explicar la fisiopatología de la cardiomiopatía dilatada y de la enfermedad de Chagas, no hay pruebas directas disponibles que avalen su participación en el desarrollo de ambas enfermedades. En vista de la presencia simultánea de autoanticuerpos contra los diferentes receptores cardiovasculares, debería llevarse a cabo un estudio más completo sobre todos los efectos fisiológicos de una mezcla de los diferentes autoanticuerpos.

Dos propuestas se están investigando actualmente para contestar a esta pregunta: 1) los anticuerpos monoclonales contra las segundas asas extracelulares, al compartir las propiedades de los autoanticuerpos, pueden utilizarse para estudiar la inducción de un proceso patológico autoinmune por transferencia pasiva; 2) pueden estudiarse ratones transgénicos que expresen receptores humanos para la producción de autoanticuerpos patogénicos. Si el papel fisiopatológico de los autoanticuerpos se confirmara, podría ser posible una nueva aproximación inmunoterapéutica, usando péptidos hapténicos para bloquear los sitios de unión de los anticuerpos en su interacción con los receptores "blanco".

Agradecimientos

Quisiera agradecer especialmente a la División Cardiología del Hospital Ramos Mejía (Dres. M. B. Rosebaum, M. V. Elizari y P. A. Chiale) y al grupo del CONICET que estudia la biología molecular del *Tripanosoma Cruzi* (Dr. M. Levin y Sra. I. Ferrari), quienes me introdujeron en el campo de la enfermedad de Chagas.

Este trabajo fue apoyado por el INSERM (Zona Norte-Sud) y Biotechnocentre (Francia).

Se agradece al Dr. Oswaldo Gutiérrez por la traducción de este trabajo; la palabra "linfocito T Helper" fue mantenida en el idioma original para su mejor reconocimiento ya que es así como figura en la literatura internacional.

BIBLIOGRAFIA

- Dixon RAE, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlmen HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, Mumford RA, Slater EE, Sigal IS, Caron MG, Lefkowitz RJ, Strader CD. Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 1986; 321: 75-79.
- Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckmann E, Downing KH. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high resolution electron-cryo-microscopy. *J Mol Biol* 1990; 213: 899-929.
- Marullo S, Delavier-Klutchko C, Eshdat Y, Strosberg AD, Emorine L. Human β -adrenergic receptor expressed in *E. coli* membranes retain their pharmacological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 7551-7555.
- Cervantes-Olivier P, Durieu-Trautmann O, Delavier-Klutchko C, Kaveri SV, Strosberg AD. The oligosaccharide moiety of

presence of autoantibodies against the different cardiovascular receptors, a more complete study should be performed on the overall physiological effect of a mixture of the different autoantibodies.

Two approaches are currently under investigation to answer that question: 1) monoclonal antibodies against the second extracellular loops, sharing the properties of the autoantibodies could be used to study the induction of a pathological autoimmune process by passive transfer; 2) transgenic mice expressing the human receptors could be studied for production of pathogenic autoantibodies. If the pathophysiological role of the autoantibodies could thus be confirmed, a new immunotherapeutic approach would be possible, using haptenic peptides to block the antibody combining sites for interaction with the target receptors.

- the β_1 -adrenergic receptor from turkey erythrocytes has a biantennary, N-acetyllactosamine containing structure. *Biochemistry* 1985; 24: 3765-3770.
5. Cervantes-Olivier P, Delavier-Klutcho C, Durieu-Trautmann O, Kaveri SV, Desmandril M, Strosberg AD. The β_2 -adrenergic receptors of human epidermoid carcinoma cells bear two different types of oligosaccharides which influences expression on the cell surface. *Biochem J* 1988; 250: 133-143.
 6. Strader CD, Sigal IS, Register RB, Candelore MR, Rands E, Dixon RAF. Identification of residues required for ligand binding to the β -adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4384-4388.
 7. Dixon RAF, Sigal IS, Candelore MR, Register RB, Scattergood W, Rands E, Strader CD. Structural features required for ligand binding to the β -adrenergic receptors. *EMBO J* 1987; 6: 3269-3275.
 8. Liggett SB, Bouvier M, O'Dowd BF, Caron MG, Lefkowitz RJ, De Blasi A. Substitution of an extracellular cysteine in the β_2 -adrenergic receptors enhances agonist-promoted phosphorylation and receptor desensitization. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 165: 257-263.
 9. Okamoto T, Murayama Y, Hayashi Y, Inagaki M, Ogata E, Nishimoto I. Identification of a Gs activator of the β_2 -adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. *Cell* 67: 723-730.
 10. O'Dowd BF, Hinatowitch M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M. Palmitoylation of the human β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 7564-7589.
 11. Emorine LJ, Marullo S, Briand-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutcho C, Strosberg AD. Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* 1989; 245: 1118-1121.
 12. Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation sites on two domains of the human β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* 1989; 265: 12657-12665.
 13. Bouvier M, Collins S, O'Dowd BF, Campbell PT, DeBlasi A, Kobilka BK, McGregor C, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 16786-16792.
 14. Hadcock JR, Port JD, Gelman MS, Malbon CC. Cross-talk between tyrosine kinase and G-protein linked receptors. *J Biol Chem* 1992; 267: 26017-26022.
 15. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-39.
 16. Guillet JG, Hoebeke J, Lengagne R, Tate K, Borrás-Herrera F, Strosberg AD, Borrás-Cuesta F. Haplotype specific homology scanning algorithm to predict T-cell epitopes from protein sequences. *J Mol Recognition* 4: 17-25.
 17. Tate K, Magnusson Y, Viguier M, Lengagne R, Hjalmarson Å, Guillet JG, Hoebeke J. Epitope analysis of T- and B-cell response against the human β_1 -adrenoceptor. *Biochimie* 1994; 76: 159-164.
 18. Tate K. Réponse immunitaire au récepteur β -adrénergique, une protéine membranaire. PhD thesis, Université Paris VII, 1991.
 19. Borda ES, Pascual J, Cossio PM, Vega M, Arana RM, Sterin-Borda L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to β -adrenoceptor of myocardium and modulates its activity. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 581-588.
 20. Wallukat G, Wollenberger A. Effects of the gammaglobulin fraction of patients with allergic asthma and dilated cardiomyopathy on chronotropic β -adrenoceptor function in cultured neonatal rat heart myocytes. *Biomed Biochim Acta* 1987; 46: 634-639.
 21. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Autoantibodies against β -adrenoceptors in human dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 1989; 64: 97-103.
 22. Magnusson Y, Marullo S, Höyer S, Waagstein F, Andersson B, Vahle A, Guillet JG, Strosberg AD, Hjalmarson Å, Hoebeke J. Mapping of a functional autoimmune epitope on the β_1 -adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1990; 86: 1658-1663.
 23. Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson Å, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy-characterization of antibodies against the β_1 -adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation* 1994; 89: 2760-2767.
 24. Magnusson Y, Wallukat G, Guillet JG, Hjalmarson Å, Hoebeke J. Functional analysis of rabbit anti-peptide antibodies which mimic autoantibodies against the β_1 -adrenergic receptor in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Autoimmunity* 1991; 4: 893-905.
 25. Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Levin MJ, Fu LX, Magnusson Y, Angvald E, Sjögren KG, Hoebeke J. Sera of chagasic patients recognize functional autoimmune epitopes on G protein coupled cardiovascular receptors. XX Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease. Caxambu, Brasil, 1993.
 26. Goin JC, Borda E, Segovia A, Sterin-Borda L. Distribution of antibodies against β -adrenoceptors in the course of human *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 197: 186-192.
 27. Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JÅ, Waagstein F, Hjalmarson Å, Hoebeke J. Localization of an autoimmune functional epitope on the second extracellular loop of human muscarinic receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1993; 91: 1964-1968.
 28. Fu LX, Wallukat G, Hjalmarson Å, Hoebeke J. Agonist-like activity of anti-peptide antibodies directed against an autoimmune epitope on the heart muscarinic acetylcholine receptor. *Receptors and Channels* 1994; 2: 121-130.
 29. Goin JC, Borda E, Pérez-Leirós C, Storino R, Sterin-Borda L. Identification of antibodies with muscarinic cholinergic activity in human Chagas' disease: Pathological implications. *J Auton Nerv Syst* 1994; 47: 45-52.
 30. Tzartos SJ, Kolka A, Walgrave SL, Conti-Tronconi BM. Localization of the main immunogenic region of human muscle acetylcholine receptor to residues 67-76 of the alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2899-2903.
 31. Priestle JP. *Ribbon J Applied Crystallography* 1988; 21: 572-576.
 32. Strosberg AD. Structure, function and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science* 1993; 2: 1198-1209.