

PERBEDAAN WAKTU PAPARAN MENGUBAH POLA INTERAKSI MOLEKULAR ANTIGEN-RECEPTOR-ANTIBODI - Sebuah Contoh Penggunaan Model Kompleks Glikoprotein Virus (HHV-6B), *Host Receptor* dan Monoklonal Antibodi

Bernadette Dian Novita*)

*) Seluruh rangkaian penelitian ini dilakukan di Divisi Clinical Virology Kobe University Graduate School of Medicine

ABSTRACT

A binding interaction between a foreign glycoprotein molecule (antigen) and a receptor molecule on one or more antibodies (immunoglobulins) are the major soluble molecules produced to know the pattern of specific and avid of inhibition the antibody to virus replication, as effective defensive role for the antibody response. This antibody also has molecular competitive pattern of antibody – receptor to antigen complex bind. However, incubation time differences could alter the patterns of those interaction. An antibody that has got neutralizing effect and high index of binding affinity could be considered as anti virus candidate.

Keywords : *antigen-receptor-antibody interaction, binding affinity, time exposure*

ABSTRAK

Ikatan interaksi glikoprotein asing (antigen) dan molekul reseptor terhadap satu atau lebih antibodi (immunoglobulin) membentuk molekul *soluble* mayor yang dapat digunakan untuk memprediksi kemampuan antibodi tersebut menghambat replikasi antigen dan menghambat ikatan antigen pada reseptor. Perubahan lama waktu inkubasi dapat mengubah pola interaksi protein antigen-virus dan antibodi. Antibodi yang memiliki kemampuan *neutralizing* dan memiliki *binding affinity* yang tinggi terhadap virus dapat dipertimbangkan untuk dikembangkan sebagai kandidat antivirus.

Kata kunci : *interaksi antigen-reseptor antibodi, binding affinity, waktu paparan*

*) Departemen Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya
Email korespondensi novita@ukwms.ac.id

PENDAHULUAN

Virus dapat melakukan *attachment* dan masuk ke dalam sel *host* (misal makrofag, sel T), bila terdapat reseptor pada sel *host*¹⁻³. Penghambatan *attachment* dapat dilakukan, salah satunya dengan cara menghambat ikatan virus (antigen) pada reseptor.

Monoklonal antibodi memiliki kontribusi menetralkan dan peran penting dalam menghambat *attachment* virus pada reseptor^{4,5} HHV-6 variant A (HHV-6A, hal ini dibuktikan dengan hasil *neutralizing assay*. Interaksi yang mengikat glikoprotein asing (antigen), reseptor dan antibodi (immunoglobulin) merupakan molekul *soluble*

utama yang diproduksi untuk mengetahui pola interaksi ini. Interaksi antigen spesifik dan antibodi, merupakan repons imun yang berperan defensif. Mengetahui efek antibodi pada penghambatan replikasi virus dan pola kompetitif molekul antibodi - reseptor untuk mengikat kompleks antigen merupakan informasi penting.

Untuk mengetahui kemampuan antibodi dalam menghambat replikasi virus dan menghambat *attachment* virus pada *host* reseptor, maka terdapat beberapa hal yang perlu dilakukan pada penelitian *in vitro* yang kualitatif farmakokinetik adalah :

1. *Neutralizing assay* untuk menilai kemampuan netralisir antibodi terhadap virus
2. Afinitas ikatan molekul glikoprotein kompleks (antigen) dan molekul reseptor; serta afinitas molekul glikoprotein kompleks (antigen) dan molekul antibodi menggunakan *surface plasmon resonance* (SPR);
3. Kompetitif *assay* untuk mengetahui pola interaksi molekuler dalam beberapa rangkaian paparan waktu dan dideteksi menggunakan *western blot assay* (WBA). Kompetitif *assay* ini digunakan untuk mengetahui respons *immediate*, *intermediate* dan lambat terhadap ikatan molekul glikoprotein kompleks (antigen), molekul reseptor dengan atau tanpa molekul antibodi.

Metode, Hasil dan Interpretasi

Bahan : Medium *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) merupakan media yang mengandung *bicarbonate buffering system* dan digunakan untuk kultur sel pada penelitian ini; *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10% dan Interleukin-2 (2ng/mL); mamalian sel line - met-

allothionein 4 (MT4); virus, pada penelitian ini menggunakan HHV-6 strain HST yang dipropaganda dengan *cord blood mononuclear cells* (CBMCs); *host* reseptor CD134 yang diproduksi oleh Immunotech dan monoclonal antibodi, produksi G. Campadelli-Fiume, University of Bologna, Bologna, Italy, yang memiliki efek menghambat pertumbuhan virus⁵⁻⁷gH/gL/gQ1/gQ2, is a viral ligand for its cellular receptor, human CD46. However, whether complex formation or one component of the complex is required for CD46 binding and how the complex is transported in cells are open questions. Furthermore, in HHV-6-infected cells the gQ1 protein modified with N-linked glycans is expressed in two forms with different molecular masses: an 80-kDa form (gQ1-80K).

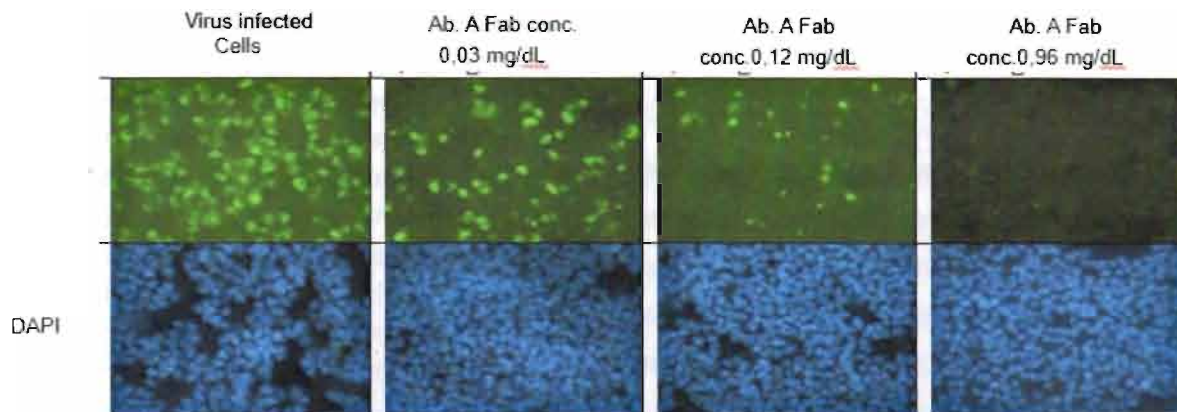
1. *Neutralizing assay*

Untuk menilai kemampuan netralisir antibodi terhadap virus maka dilakukan *neutralizing assay*. Prinsip kerja : antibodi dalam beberapa konsentrasi diinkubasikan dengan sel prokariotik yang telah diinfeksi virus kemudian dilakukan pengamatan setiap 24 jam selama 3 x 24 jam.

- Tahap 1 (Dialisis Antibodi): Antibodi yang hendak dinilai telah didialisis (*overnight dialysis*) menggunakan medium RPMI, kemudian diukur konsentrasi yang tersisa pasca dialisis. Konsentrasi ditentukan mulai yang terendah kemudian ditingkatkan. Antibodi yang memiliki daya hambat yang baik bila efeknya meningkat seturut dengan penambahan konsentrasi^{8,9}an oncogenic gammaherpesvirus, causes acute infectious mononucleosis (AIM).

- Tahap 2 (Persiapan mammalian sel): sel MT4 telah diregenasikan dan dipersiapkan 1×10^5 CFU.
- Tahap 3 (*Neutralizing assay*): kultur mengandung 1×10^5 CFU sel MT4, virus, antibodi. Setiap kultur *plate* mengandung 1 konsentrasi antibodi.

Hasil (Pembesaran mikroskop 100x)



Gambar 1 : Hasil *Neutralizing Assay*

Interpretasi hasil gambar 1: Proses infeksi berhasil, antibodi (Ab. A) memiliki efek neutralizing, terbukti dengan peningkatan konsentrasi, jumlah virus yang dapat menginfeksi sel mammalian berkurang atau virus gagal bereplikasi.

2. *Surface Plasmon Resonance (SPR)*

Tujuan untuk mengetahui kekuatan afinitas kompleks ikatan protein virus dengan protein reseptor dan protein virus dengan antibodi. Konsentrasi kompleks ligan-reseptor [LR] sama dengan produk $k + 1$ atau minus produk $k - 1$ ¹⁰⁻¹². Potensial antibodi yang pada saat *neutralizing assay* memberikan hasil penghambatan, kebanyakan memiliki afinitas ikatan mengganggu replikasi virus dibandingkan ikatan virus dengan reseptornya. Untuk SPR, protein reseptor, protein antibodi dan protein virus harus dipisahkan dari Fc.

CMR 5 merupakan bagian chip yang menilai afinitas ikatan, CMR5 berikatan dengan protein A yang kemudian diikat dengan protein virus ditambahkan protein reseptor atau protein antibodi.

Table 1 SPR : Complex glycoprotein (Antigen) to protein A in resonance chip

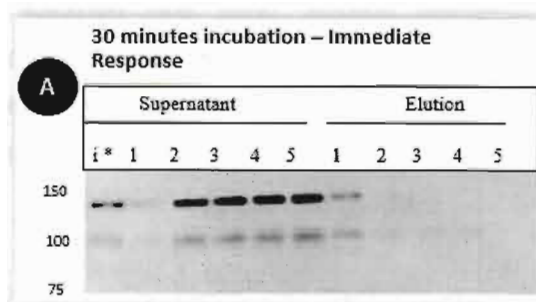
Analyte	kon (1/M.s)	Koff (1/s)	KD (nM)
Receptor	$1,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-2}$	14
Antibody A	$3,5 \times 10^3$	$6,6 \times 10^{-4}$	19
Antibody B	$8,5 \times 10^4$	$3,9 \times 10^{-4}$	46

Interpretasi hasil tabel 2: ikatan protein virus dengan protein reseptor lebih kuat dibandingkan ikatan protein virus dengan antibodi. Meskipun virus telah dihambat oleh antibodi, ikatan tersebut dapat digeser oleh protein reseptor. Salah satu faktor yang mempengaruhi adalah waktu paparan, hal ini yang dibuktikan pada langkah berikutnya.

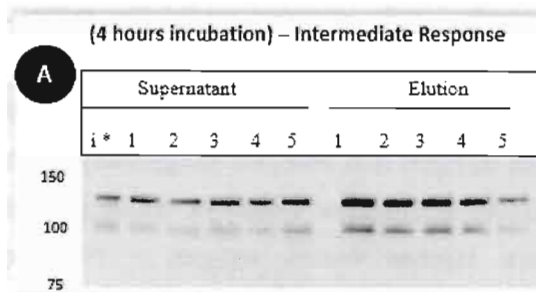
3. Kompetitif Assay

Kompetitif *assay* dilakukan untuk mengetahui pola interaksi molekuler protein antigen, protein reseptor dan protein antibodi dengan rangkaian paparan waktu (*time series*)^{10,13}California”, “title” : “The Pharmacological Basis of Therapeutics-Goodman & Gillman-Ed”, “type” : “book” }, “uris” : [“http://www.mendeley.com/documents/?uuid=26b07b11-47dc-46e2-ae20-6dbd2311101b”] }, { “id” : “ITEM-2”, “itemData” : { “DOI” : “10.1128/AAC.00153-08”, “ISSN” : “1098-6596”, “PMID” : “18591268”, “abstract” : “Intracellular concentrations of isoniazid and rifabutin resulting from administration of inhalable microparticles of these drugs to phorbol-differentiated THP-1 cells and the pharmacokinetics and biodistribution of these drugs upon inhalation of microparticles or intravenous administration of free drugs to mice were investigated. In cultured cells, both microparticles and dissolved drugs established peak concentrations of isoniazid (approximately 1.4 and 1.1 microg/10(6. Perbedaan waktu inkubasi bertujuan untuk mengetahui pola ikatan terhadap lama paparan *immediate* (30 menit), *intermediate* (4 jam) dan lambat (24 jam)^{10,14}California”, “title” : “The Pharmacological Basis of Therapeutics-Goodman & Gillman-Ed”, “type” : “book” }, “uris” : [“http://www.mendeley.com/documents/?uuid=26b07b11-47dc-46e2-ae20-6dbd2311101b”] }, { “id” : “ITEM-2”, “itemData” : { “DOI” : “10.1128/AAC.06059-11”, “ISSN” : “1098-6596”, “PMID” : “22330931”, “abstract” : “For drug-compliant patients, poor responses to tuberculosis (TB.

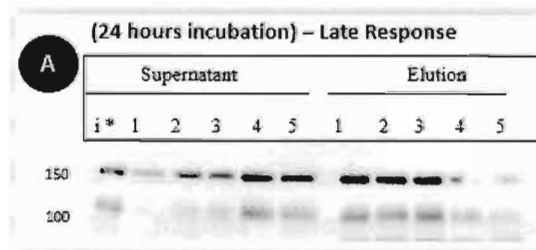
Protein antigen harus tetap memiliki Fc agar dapat berikatan dengan protein G, kemudian diinkubasi bersama protein reseptor tanpa Fc dengan waktu inkubasi yang sama. Setelah protein antigen dan reseptor dibuang dan protein G dicuci maka ditambahkan protein antibodi tanpa Fc dengan perbedaan waktu inkubasi. *Supernatant* dan *elution* (yang diambil dari sisa protein G) diperiksa menggunakan metode *wet transfer western blot assay* (WBA).



Bagan 1



Bagan 2



Bagan 3

Gambar 2 (Bagan 1-3): Determinasi Kompetitif Assay Antibodi menggunakan western blot untuk mengetahui pengaruh waktu inkubasi

i^* = input protein antigen ; A_1 = *negative control protein* (γ , *non neutralizing antibody*); A_{2-5} = *concentration dependent* of protein antibodi

Interpretasi hasil gambar 2:

- Bagan 1 : Antibodi dapat menghambat ikatan antigen terhadap reseptor pada waktu inkubasi singkat (30 menit)
- Bagan 2 dan 3: Hambatan antibodi tidak bertahan lama, setelah paparan dibuat lebih lama (dalam jam) pola berubah, beberapa antigen tidak lagi berikatan dengan antibodi. Hal ini terkait dengan afinitas ikatan protein antigen dan reseptor lebih besar dibanding dengan ikatan antibodi dan antigen (tabel 1).

Kesimpulan : Studi ini memberikan bukti kemampuan luarbiasa dari SPR dan WBA untuk mengetahui pola interaksi molekuler protein antigen - reseptor dan antibodi. Kemampuan kompetitif antibodi dalam menghambat ikatan antigen dan reseptor bergantung pada kekuatan afinitasnya. Hasilnya menunjukkan bahwa afinitas ikatan antigen – reseptor yang lebih kuat dibandingkan afinitas ikatan antigen - antibodi membuat interaksi menjadi tidak stabil. Berdasarkan hasil di atas dapat disimpulkan meskipun antibodi memiliki *neutralizing effect*, kekuatan afinitas menentukan kemampuan antibodi tersebut menghambat antigen berikatan dengan reseptor. Penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian pada Epstein-Barr Virus dan *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)^{15,16}. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengembangkan antibodi dengan kekuatan afinitas lebih besar dibandingkan ikatan antigen – reseptor.

Acknowledgment

Terima kasih pada Prof. Yasuko Mori, MD., PhD yang telah memperkenankan saya melakukan penelitian ini di laboratorium Divisi Clinical Virology Kobe University Graduate School of Medicine. Terima kasih pula saya ucapkan pada Huamin Tang, PhD, Mitsuhiro Nishimura, PhD, Akiko Kawabata PhD dan Aiko Wakata, PhD yang telah membimbing dan membantu saya dalam penelitian ini.

Daftar Referensi :

1. Abbas, A. K. & Lichtman, A. *Cellular and Molecular Immunology*. (Saunders, 2012).
2. Lopez-Cortes, L. F. *et al.* Efavirenz trough levels are not associated with virological failure throughout therapy with 800 mg daily and a rifampicin-containing antituberculosis regimen. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 1017–23 (2006).
3. Saleri, N. *et al.* Systemic exposure to rifampicin in patients with tuberculosis and advanced HIV disease during highly active antiretroviral therapy in Burkina Faso. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 469–72 (2012).
4. Oyaizu, H. *et al.* Complementation of the Function of Glycoprotein H of Human Herpesvirus 6 Variant A by Glycoprotein H of Variant B in the Virus Life Cycle. *J. Virol.* **86**, 8492–8498 (2012).
5. Tang, H. *et al.* Human herpesvirus 6 encoded glycoprotein Q1 gene is essential for virus growth. *Virology* **407**, 360–367 (2010).
6. Tang, H., Hayashi, M., Maeki, T., Yamaniishi, K. & Mori, Y. Human Herpesvirus 6 Glycoprotein Complex Formation Is Required for Folding and Trafficking

- of the gH/gL/gQ1/gQ2 Complex and Its Cellular Receptor Binding. *J. Virol.* **85**, 11121–11130 (2011).
7. Mori, Y., Yang, X., Akkapaiboon, P., Okuno, T. & Yamanishi, K. Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *J. Virol.* **77**, 4992–9 (2003).
 8. Ogembo, G. G. *et al.* A chimeric EBV gp350/220-based VLP replicates the virion B-cell attachment mechanism and elicits long-lasting neutralizing antibodies in mice. *J. Transl. Med.* **13**, (2015).
 9. Servat, E. *et al.* Identification of the critical attribute(s) of EBV gp350 antigen required for elicitation of a neutralizing antibody response in vivo. *Vaccine* **33**, 6771–6777 (2015).
 10. Brunton, L., Chapner, B. & Knollmann, B. *The Pharmacological Basis of Therapeutics-Goodman & Gillman-Ed.* (Mc Graw Hill Medical, 2011).
 11. Singhal, J. *et al.* Suppression of dendritic cell-mediated responses by genes in calcium and cysteine protease pathways during Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Biol. Chem.* **287**, 11108–21 (2012).
 12. Green, J. A. *et al.* Mycobacterium tuberculosis upregulates microglial matrix metalloproteinase-1 and -3 expression and secretion via NF-kappaB- and Activator Protein-1-dependent monocyte networks. *J. Immunol.* **184**, 6492–503 (2010).
 13. Verma, R. K., Kaur, J., Kumar, K., Yadav, A. B. & Misra, A. Intracellular time course, pharmacokinetics, and biodistribution of isoniazid and rifabutin following pulmonary delivery of inhalable microparticles to mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3195–201 (2008).
 14. Requena-Méndez, A. *et al.* Pharmacokinetics of rifampin in Peruvian tuberculosis patients with and without comorbid diabetes or HIV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 2357–63 (2012).
 15. Kanekiyo, M. *et al.* Rational Design of an Epstein-Barr Virus Vaccine Targeting the Receptor-Binding Site. *Cell* **162**, 1090–1100 (2015).
 16. Young, K. A., Herbert, A. P., Barlow, P. N., Holers, V. M. & Hannan, J. P. Molecular Basis of the Interaction between Complement Receptor Type 2 (CR2/CD21) and Epstein-Barr Virus Glycoprotein gp350. *J. Virol.* **82**, 11217–11227 (2008).