

Fersk forskning om MG

Denne artikkelen ble publisert i **Journal of Neuroimmunology (JNI)** 27. mai 2010. For referanseliste og materiale og metode henvises til originalartikkelen. Alle rettigheter tilhører JNI. Originalartikkelen fokuserer på å finne nye, potensielt sykdomsmodifiserende stoffer hos pasienter med myastenia gravis. Forskningen var støttet av «Fondet for forskning om muskelsykdommer», donert i regi av Foreningen for Muskelsyke

Tekst av: Geir Helgeland

Abstrakt

Myastenia Gravis (MG) er en autoimmun sykdom der pasientene utvikler autoantistoffer mot proteiner i tverrstripet muskulatur (f.eks. Acetylkinolin reseptor og Muskelspesifikk kinase) som fører til lammelser i disse musklene. Okulær MG (OMG) er en undertype av MG som kun affiserer øyemusklene. Patogenesen bak denne undertypen er ikke kjent. Heat Shock Protein 70 (Hsp70) spiller en rolle i immunregulering. Antistoffer mot dette proteinet er assosiert med flere autoimmune sykdommer, og den biologiske betydningen av proteinet har blitt vist in vivo. Vi har derfor undersøkt konsentrasjonen av anti-Hsp70-antistoffer i sera fra 35 OMG og 94 pasienter med generalisert MG (GMG) vha. ELISA-metoder. Konsentrasjonene av antistoffene ble sammenlignet med serumkonsentrasjoner fra pasienter med multiple sklerose (MS), Guillain-Barré syndrom (GBS) og friske kontroller.

Vi fant at MG pasientene hadde signifikant høyere konsentrasjoner av anti-Hsp70-antistoffer enn både MS pasienter og friske kontroller. Pasienter med GBS hadde høyere nivåer enn alle de andre gruppene. Det var ingen forskjell mellom GMG og OMG pasientene. Våre resultater tyder på at pasienter med MG og GBS har eller har hatt økt eksponering for Hsp70-antigener. Likhetene mellom GMG og OMG styrker hypotesen om at OMG er en systemsykdom, som for GMG.

Introduksjon

Myastenia gravis (MG) er en autoimmun sykdom der pasientene plages med svakhet i viljestyrt muskulatur, samt pustemusklene. I de fleste tilfellene er sykdommen forårsaket av sirkulerende antistoffer mot Acetylkinolin reseptor (AChR) av nikotinerg type på utsiden av muskelcellene, men i noen tilfeller er antistoffer mot Muskelspesifikk kinase (MuSK) årsaken. En undergruppe av MG pasienter har bare symptomer fra øyemusklene og kan oppleve dobbeltsyn og hengende øyelokk og er derfor kalt okulær MG (OMG). Årsaken til denne utelukkende affeksjonen av øyemusklene er ikke kjent. Om lag 40 % av OMG-pasienter har målbare nivåer av anti-AChR-antistoffer ved konvensjonelle målemetoder, men følsomheten er høyere ved bruk av cellekulturbaserte metoder. Skjønt dette er bare vist i sera fra GMG pasienter, og ikke i OMG sera.

Antistoffer mot Hsp70 finnes i sera fra pasienter med sensorisk-nevrontalt hørselstap, systemisk lupus erytematosus, juvenil idiopatisk artritt og MG. Disse studiene har fokusert på tilstedeværelsen av antistoffer og ikke forsøkt å avdekke en evt. rolle i sykdomsutviklingen. I dyreforsøk er det vist at når anti-Hsp70 appliseres sammen med et allergi-fremkallende antigen, utvikles det ikke allergi, men heller toleranse mot det allergifremkallende antigenet. Denne toleransen var lokalisert til immuncellene og kunne overføres til andre forsøksdyr.

Heat shock proteinene (Hsp) er delt inn i klasser ihht. vekt. De spiller en viktig rolle som «chaperones» da de bidrar til korrekt protein-folding. De fleste Hsp er uttrykt i lave nivåer i de fleste typer eukaryote celler, men de kan oppreguleres ved cellulært stress, som f.eks. ved økt temperatur, radioaktiv stråling, oksidativt stress og andre patologiske stimuli. I tillegg til å fungere som «chaperones», innehar de en viktig posisjon i antigenpresentasjon og kryss-presentasjon, og de kan fungere som cytokiner til å indusere produksjonen av pro-inflammatoriske cytokiner og fremme modning av dendritiske celler.

Hsp70 antas å være involvert i utviklingen av flere autoimmune sykdommer, deriblant Behcets sykdom, Graves sykdom og MS. Proteinets evne til å fremme antigenpresentasjon har blitt vist i eksperimentelt induisert diabetes mellitus, og økte nivåer har blitt påvist lokalt i eksperimentell autoimmun nevritt, en Guillain-Barré-syndrom (GBS) modell.

Hsp70 synes derfor å inneha viktige funksjoner i utviklingen av toleranse. Antistoff-mediert hemming av dets funksjon kan tenkes å endre immunresponsen mot antigener som blir presentert av antigenpresenterende celler. I denne studien har vi undersøkt hvorvidt pasienter med generalisert og okulær MG har endrede nivåer av anti-Hsp70, sammenlignet med friske kontroller og pasienter med MS og GBS.

Resultater

De 129 MG-pasientene bestod av 66 menn og 63 kvinner. Gjennomsnittlig alder ved inklusjon (\pm SD) var 57,1 år (\pm 17,7). 94 (73 %) av pasientene hadde GMG, mens 35 (27 %) hadde en ren okulær fenotype (OMG). Pasienter klassifisert som OMG hadde verken elektrofysiologiske eller kliniske tegn til affeksjon av muskulatur i armer eller bein. Av de 94 GMG-pasientene hadde 36 målbare nivåer av antistoffer mot AChR, 53 pasienter var negative, mens data manglet på 5. OMG-gruppen hadde 16 anti-AChR positive, 18 negative og 1 ukjent. Anti-Hsp70-konsentrasjonen passet ikke med normalfordelingskurven for noen av gruppene.

GMG og OMG gruppene var ikke forskjellige mhp. alder ($p=0,37$), kjønn ($p=0,42$) eller anti-AChR-antistoff status ($p=0,54$). Ingen signifikant forskjell i AChR-antistoff status ble funnet når pasienter med tidlig sykdomsdebut (33 %) ble sammenlignet med de med sen debut (66 %) i hele MG-gruppen. Det var heller ingen forskjell i forekomst av antistoffer mellom GMG- og OMG-undergruppene og mellom menn og kvinner. Anti-Hsp70-nivåene var like i anti-AChR-positive og -negative pasienter.

Både GMG- og OMG-pasientene hadde økte nivåer av anti-Hsp70 sammenlignet med friske kontroller ($p<0,001$) (med respektive medianverdier 271,0, 333,0, 171,9 μ g/ml), og sammenlignet med MS-pasienter ($p=0,0004$) (medianverdi for MS-gruppen 209,1 μ g/ml). Vi fant ingen forskjell mellom MS-pasienter og friske kontroller ($p=0,45$). GBS-pasientene hadde median anti-Hsp70-konsentrasjon på 471,8 μ g/ml. Dette var signifikant høyere enn både friske kontroller ($p<0,001$), MG-pasienter ($p=0,0044$) og MS-pasienter ($p<0,001$).

Det ble ikke funnet korrelasjon mellom pasientenes alder ved inklusjon og nivåer av anti-Hsp70-antistoffer i MG-gruppen (data ikke presentert).

Diskusjon:

Vi har vist at pasienter med MG og svekkelse av øyemusklene har økte sirkulerende nivåer av anti-Hsp70 antistoffer sammenlignet med friske kontroller og pasienter med MS. Disse økte antistoffnivåene reflekterer sannsynligvis pågående eller tidligere økt eksponering for Hsp70-antigener, enten fritt sirkulerende eller bundet til cellemembraner. Våre resultater indikerer derfor økt eksponering for Hsp70 i utviklingen av MG.

OMG affiserer bare et lite antall muskler, og pasientene med denne subtypen har som oftest milde symptomer sammenlignet med pasienter med GMG. Det er interessant at pasientene likevel har økte nivåer av anti-Hsp70, selv uten målbare verdier av anti-AChR. Dette gir støtte til teorien om at OMG er en systemsykdom. Økte verdier av anti-Hsp70 hos OMG pasienter uavhengig av anti-AChR-status tyder på en felles patogenetisk mekanisme for disse gruppene.

47 % av våre OMG pasienter hadde målbare verdier av anti-AChR antistoffer, i likhet med hva som er tidligere beskrevet for denne pasientgruppen. Overraskende nok var bare 38,3 % av GMG-pasientene positive for anti-AChR; i tydelig kontrast til et forventet nivå på mellom 80 og 90 %. Dette funnet kan forklares ved at pasientene som ble rekruttert til denne studien var blitt henviset til en nevro-

oftalmologisk avdeling med primært øyesymptomer. I de tilfellene der pasienten hadde generaliserte symptomer, var disse symptomene milde. Videre fant vi ingen forskjell mellom anti-AChR positive og -negative OMG og GMG pasienter. Over halvparten av MG pasienter som var antatt å være seronegative etter å ha blitt testet for anti-AChR antistoffer med konvensjonelle ELISA-metoder, hadde lav-affinitets-antistoffer mot AChR som kunne påvises i et cellekulturbasert oppsett. Det er derfor rimelig å anta at mange av våre anti-AChR negative pasienter har lav-affinitets-antistoffer mot AChR.

Vi fant videre at GBS-pasienter hadde økte nivåer av anti-Hsp70 sammenlignet med alle de andre gruppene. Økte nivåer av anti-Hsp70 antistoffer har tidligere blitt demonstrert i cerebrosplinalvæskene fra pasienter med akutt og ubehandlet GBS når disse ble sammenlignet med pasienter med motornevronsykdom, men ingen forskjell ble påvist når sera fra GBS ble sammenlignet med friske kontroller. De divergerende resultatene i vår og den tidligere studien kan skyldes metodologiske forskjeller, da vi målte konsentrasjonen av total (IgG, IgA og IgM) immunoglobulin, mens den andre studien målte bare nivåer av IgG. I en dyremodell av GBS er det blitt funnet oppregulering av IL-12 mRNA og infiltrasjon av Hsp70-positive immunceller i isjiasnerven. Disse resultatene korrelerte med sykdomsaktivitet og infiltrasjon av Toll-like reseptor 2 positive celler. Hsp70 kan binde til Toll-like reseptor 2 med påfølgende aktivering av IL-12 promotoren. IL-12 er involvert i regulering av Th1/Th2-balansen, der økt uttrykk favoriserer en Th1-respons. Forandringer i Hsp70-signalering gjennom antistoff-binding av Hsp70 kan tenkes å forskyve immunresponsen mot Th2, og på den måten bidra til en annerledes patogenese og sykdomsfenotype.

Vi var ikke i stand til å undersøke sammenhengen mellom anti-Hsp70 nivåer og sykdomsintensitet. Alle prøvene fra GBS-pasientene ble samlet inn innen et par uker etter sykdomsdebut, før noen behandling ble gitt og under aktiv fase av sykdommen. MG pasientene

hadde en relativt lett sykdomsfenotype der symptomene hovedsakelig affiserte øyemusklene. Vår påvisning av at nivåer av anti-Hsp70 er økt i både GBS og MG, men ikke MS, tyder på antistoffene mot Hsp70 ikke er sykdomsspesifikke. Skjønt, de kan reflektere pågående autoimmun sykdomsaktivitet i det perifere nervesystemet og en pågående eller tidligere økt eksponering for Hsp70-antigener.



Forsker Geir Helgeland

Fakta

Artikkelen som er gjengitt er en del av mitt doktorgradsprosjekt der vi i MG-forskningsgruppen undersøker serum fra pasienter etter forekomst av faktorer som muligens kan bidra i sykdomsutviklingen.

Disse faktorene eksisterer i tillegg til antistoffer som vanligvis finnes hos MG-pasienter. Vår hypotese er at disse faktorene kan påvirke utviklingen eller vedlikehold av sykdommen, og at en kartlegging av disse faktorene muligens kan åpne for alternative behandlingsmetoder.

I denne artikkelen har vi funnet at MG-pasienter har økte nivåer av antistoffer mot et stress-protein kalt Heat Shock Protein 70. Det er vist at dette proteinet har en immunologisk funksjon, og vi foreslår at antistoffer som binder seg til dette proteinet kan påvirke funksjonen og immunsystemet.