

MUSK-İLİŞKİLİ MYASTHENİA GRAVİS'TE ANTİKOR VE SİTOKİN PROFİLİ

*THE ANTIBODY AND CYTOKINE PROFILE IN MUSK-ASSOCIATED
MYASTHENIA GRAVIS*

Hande Yüceer, Canan Ulusoy, Erdem Tüzün

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından desteklenmiştir (Proje No: 29790).

Sorumlu yazar: Erdem Tüzün
Yazışma adresi: İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı,
İSTANBUL
E-mail adres: drerdem@yahoo.com

ÖZET

Myasthenia gravis (MG) asetilkolin reseptörü (AChR) veya "muscle-specific receptor tyrosine kinase" (MuSK) antikoruyla ilişkili, kas zaafıyla karakterize otoimmün bir hastalıktır. MuSK antikorları ağırlıklı olarak IgG4 izotipindedir. MuSK ilişkili MG (MuSK-MG) gelişimini etkileyen immünglobülin (Ig) ve sitokinleri araştırmak amacıyla MuSK ilişkili deneysel otoimmün MG (MuSK-DOMG) modeli C57BL/6 farelerinde oluşturulmuştur.

Rekombinan insan MuSK proteini ve "complete Freund's adjuvant" (CFA) (MuSK+CFA, n=8) ile immünize farelerin immünopatolojik bulguları sadece CFA ile immünize (CFA, n=8) kontrol farelerle karşılaştırılmıştır. Kas zaafı, klinik skorlama, asma ve motor aktivite testleriyle değerlendirilmiştir. Serum anti-MuSK Ig izotip ve kompleman C3 seviyeleri ELISA ile, nöromusküler bileşke (NMB)'deki Ig ve kompleman depozitleri immünofloresan boyamayla, kas AChR ve MuSK miktarları immünofloresan boyama ve western blot ile değerlendirilmiştir. Serum ve lenf ganglionu hücrelerinin kültür üst sıvılarında sitokin düzeyleri ELISA ve çoklu boncuk yöntemiyle ölçülmüştür.

MuSK+CFA grubunda 7 farede (%87.5) kas zaafı gözlenirken, CFA grubunda yoktu. CFA grubuna göre, MuSK+CFA'da serum anti-MuSK Ig izotip ve C3 seviyeleri, NMB Ig izotip, C3, membran atak kompleksi (MAK) depozit sayıları yüksek, NMB'deki AChR düzeyleri düşüken MuSK benzerdi. IgG1 baskın anti-MuSK Ig izotipiydi. MuSK+CFA grubunda serumda IL-4, kültür üst sıvılarında IL-4, IL-10, IFN- γ düzeyleri artmıştı.

MuSK-MG'ye benzer şekilde MuSK-DOMG de komplemanı aktive etmeyen Ig izotipi IgG1 baskındır. NMB'de kompleman depozitlerinin görülmesi MuSK-MG patogenezinde kompleman aracılı membran hasarında rol oynar. IgG1, IL-4, IL-10 düzeylerindeki artış MuSK immünitesinde Th2 tipi yardımcı T lenfositlerini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Myasthenia gravis, sitokin, MuSK, hayvan modeli, kompleman

ABSTRACT

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease characterized by muscle weakness associated with acetylcholine receptor (AChR) or muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK)-antibodies. MuSK-antibodies are predominantly of IgG4 isotype. MuSK associated experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) model was established to investigate immunoglobulins (Ig) and cytokines related with MuSK associated MG (MuSK-MG).

Immunopathological findings of mice immunized with recombinant human MuSK protein and complete Freund's adjuvant (CFA) (MuSK+CFA, n=8) or only CFA (CFA, n=8) were compared. Muscle weakness was assessed with clinical scoring, inverted screen and motor activity tests. Serum anti-MuSK Ig isotype and complement C3 levels were measured by ELISA, neuromuscular junction (NMJ) Ig, complement deposits, AChR, MuSK levels were measured by immunofluorescence staining and western blot. Levels of cytokines in sera and supernatants of MuSK-stimulated lymph node cells were measured with ELISA and multiplex assays.

Seven mice (87.5%) from MuSK+CFA group and no mice from CFA group showed muscle weakness. MuSK+CFA group showed increased anti-MuSK Ig isotype and C3 levels, NMJ Ig isotype, C3 and membrane attack complex (MAC) deposit counts, decreased NMJ AChR and comparable MuSK levels. IgG1 was the dominant anti-MuSK Ig isotype. MuSK+CFA group showed increased IL-4 levels in sera, increased IL-4, IL-10, IFN- γ levels in supernatants.

Similar to MuSK-MG patients, non-complement activating IgG1 was the dominant Ig isotype. Nevertheless, NMJ complement deposits suggests that complement-mediated membrane damage might participate in MuSK-MG pathogenesis. Increased IgG1, IL-4, IL-10 levels suggest that Th2-type T-helper cells are involved in MuSK immunity.

Keywords: Myasthenia gravis, cytokine, MuSK, animal model, complement

GİRİŞ

Myasthenia gravis (MG), T hücrelerine bağımlı ve antikor aracılı otoimmün bir hastalıktır. MG olgularında, kolay yorulma, yutma güçlüğü ve nefes darlığı gibi klinik bulguların yanında, nörofizyolojik incelemelerde tipik olarak dekremental birleşik kas aksiyon potansiyeli yanıtı saptanır. Jeneralize MG olgularının yaklaşık %85-90'ında hastalık postsinaptik nikotinik asetilkolin reseptörü (AChR)'ne karşı gelişen antikorlara bağlı olarak ortaya çıkarken, geriye kalan MG olgularının bir kısmında "muscle specific receptor tyrosine kinase" (MuSK) antijenine karşı antikorlar saptanmıştır (1). Postsinaptik nöromusküler bileşke (NMB)'de bulunan MuSK proteinine karşı gelişmiş antikorlar yaklaşık 10 yıl önce Hoch ve arkadaşları tarafından bulunmuş, günümüze kadar geçen sürede bu antikorların AChR antikoruna negatif hastaların yaklaşık %40'ında bulunduğu saptanmış ve hücre kültürü, pasif transfer ve aktif immünizasyon çalışmaları ile MuSK antikorlarının da AChR antikorları gibi patojenik özellikler gösterdiği belirlenmiştir (2,3).

MG hastalarından elde edilen MuSK antikorları ile yapılan pasif transfer ve immünizasyon çalışmaları sonucunda agrin-MuSK-LRP4 etkileşiminin sadece fetal dönemde değil erişkinlerde de devam ettiği ve bu etkileşimin antikorlarla kesilmesi sonucunda NMB'nin ince yapısının bozulduğu anlaşılmıştır (4,5). Bununla uyumlu olarak başlıca komplemanı aktive eden IgG1 ve IgG3 izotiplerinden oluşan AChR antikorları ağırlıklı olarak bağlandıkları postsinaptik NMB'de kompleman aktivasyonuna bağlı membran yıkımı ile sinaptik iletiyi bozarken, başlıca komplemanı aktive edemeyen IgG4 izotipinden oluşan MuSK antikorları ağırlıklı olarak MuSK'un işlevini baskılamakta, bu da agrinin etkisini ortadan kaldırarak AChR'lerinin postsinaptik organizasyonunu bozmaktadır (6). Ayrıca MuSK antikorları henüz bilinmeyen mekanizmalarla uygulandıkları deney hayvanlarında presinaptik asetilkolin salgılanmasını da azaltmakta ve kas liflerinde atrofiye sebep olmaktadır (7).

Bu fizyopatolojik bulgularla uyumlu olarak MuSK antikor pozitif MG olgularında özellikle bulber alan kaslarında (dil, farinks ve interkostal kaslar gibi) atrofi görülmekte ve bazı olguların klinik bulguları çok ağır olduğundan ve sık miyastenik kriz geliştirdiklerinden daha yüksek dozda kortikosteroid ve daha sık plazmaferez tedavisine gereksinim göstermektedirler (3).

AChR ve MuSK antikorlarının patojenik özellikleri başlıca hayvan modelleri ile belirlenmiştir. Özellikle C57BL6 (B6) fare soyuyla yapılan çeşitli pasif transfer ve immünizasyon deneyleri sonucunda AChR ve MuSK antikorlarının MG'nin başlıca patojenik faktörü olduğu ortaya çıkmıştır (6,7).

MG'de yapılan çalışmalar bu hastalıkta sitokinlerin önemine işaret etmektedir (8). Miyastenik hastaların periferik kan sitokin ve mononükleer hücre düzeyleri üzerinde yapılan çalışmalar, AChR ilişkili MG'nin ağırlıklı olarak Tip 1 yardımcı T hücresi (Th1) tarafından salgılanan sitokinlerin (interferon (IFN)- γ , interleukin-2 (IL-2), tümör nekroze edici faktör (TNF)- α gibi) etkisiyle oluştuğunu düşündürmektedir. Bu sitokinlerin antijen sunumu, T ve B hücre proliferasyonu gibi işlevlerde etkili olabileceği bildirilmiştir. IL-17 salgılayan yardımcı T hücrelerinin oluşturduğu Th17 grubunun da MG patogeneziindeki rolü,

yapılan son çalışmalar ile belirlenmeye başlanmıştır. Th17 grubundaki hücrelerin MG'nin klinik şiddeti ile korelasyon gösterdiği ve immünite dengesinin regülatuar T hücrelerinden Th1 hücrelerine kaymasının Th17 hücreleri sayesinde olduğu ileri sürülmüştür (9). Bunun yanında Tip 2 yardımcı T hücresinden (Th2) salgılanan sitokinlerin de (IL-4, IL-5, IL-10 gibi) AChR'ye özgü B hücrelerinin proliferasyonunu ve anti-AChR antikorunu yapımını artırabileceği bildirilmiştir (8). MuSK ilişkili MG'nin gelişimini yönlendiren sitokinlerle ilişkili ise herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada anti-MuSK antikorlarının ortaya çıkmasında hangi sitokinlerin rol oynadığının in vitro ve in vivo yöntemlerle incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla rekombinan MuSK ile aktif immünizasyonun yapıldığı bir deneysel MG modeli ("experimental autoimmune myasthenia gravis", EAMG) oluşturuldu ve bu model MuSK antijeni ile tetiklenen immünolojik parametrelerin araştırılması amacıyla kullanıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Fareler

Çalışmalarda 18-20 gram ağırlığında 6-8 hastalık erkek ve dişi B6 fare kullanıldı. Hayvanlar İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Deneyler, MuSK ve CFA ile immünize edilen (MuSK-CFA) ve sadece CFA ile immünize edilen (CFA) fare gruplarından oluşturuldu. Her grup ağırlık, kas gücü, belirli bir sürede yürüme ve dinlenme yüzdeleri, yürüdükleri mesafe parametreleri bakımından incelenmiştir. Hayvanların diyet programları ve bakımı İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde (DETAE) gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiş (Proje No: 29790) ve İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 2012/116 no'lu kararıyla onaylanmıştır.

İmmünizasyon

İmmünizasyon işlemi öncesi anestezik olarak 1:5 oranında PBS ile sulandırılmış ketamin fare başına 20 μ L/ μ g kullanılmıştır. Anestezik madde farelere intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Pichia pastoris mantar soyunda rekombinan olarak üretilip afinite kromatografisi ile saflaştırılan insan MuSK proteininin ekstrasellüler kısmı (yaklaşık 80 kD) Patras Üniversitesi'nden Dr. Socrates Tzartos'dan 1,3 μ g/ μ L konsantrasyonunda temin edilmiştir. İmmünizasyon öncesinde proteinin saflığı jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. MuSK immünizasyonu yönteminin ve kullanılan immünojen miktarlarının belirlenmesinde önceki immünizasyon makalelerinden yararlanılmıştır (10). Tüm hayvanlara 28 gün arayla 3 defa MuSK-CFA veya sadece CFA immünizasyonu yapılmış ve son immünizasyondan 28 gün sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. MuSK proteini PBS içinde çözülerek CFA ile 1:1 oranında bir emülsiyon hazırlanmış ve bu emülsiyondan MuSK-CFA grubundaki farelere fare başına 40 μ g olacak şekilde toplam 200 μ L uygulanmıştır. Tüm enjeksiyon uygulamaları subkütan olarak yapılmıştır. Birinci immünizasyonda sağ ve sol ayak patisine ve sağ ve sol omuza, ikinci

ve üçüncü immünizasyonda ise iki (sağ ve sol) omuz ve iki (sağ ve sol) bacak bölgesine enjekte edilmiştir. Kontrol grubu olan CFA grubuna ise 1:1 oranında CFA ve PBS emülsiyonu hazırlanarak fare başına 200 µL olacak şekilde MuSK grubuyla aynı bölgelere ve 28 gün arayla 3 defa enjekte edilmiştir. 3. immünizasyondan 15 gün sonra tüm farelerden kuyruk veninden kan alınmış ve serumları ayrılmıştır.

Farelerin Klinik Durumlarının Değerlendirilmesi

Birinci immünizasyon sonrasında haftada bir, ikinci immünizasyon sonrasında haftada 2 veya 3, üçüncü immünizasyon sonrasında her gün farelerin klinik durumu kontrol edildi. Her grup hastalık insidansı, hastalık safhaları, ağırlık ve motor aktivite ve asma testleri ile ölçülen kas gücü parametreleri bakımından haftada 1 değerlendirildi.

EAMG farelerindeki klinik kas zaafı şu şekilde derecelendirilmektedir: safha 0, fare normal duruş, kas gücü ve harekete sahiptir; safha 1, dinlenme durumunda fare normaldir, 20-30 kez kafes kapağı ızgarasında pati ile tutunma egzersizi sonrasında kambur postür, kısıtlı hareket ve başını kaldırmada zorlanma gibi kas zaafının karakteristik özelliklerini gösterir; safha 2, fare egzersiz yapmadan düz zeminde yapılan gözlemlerde safha 1 belirtilerini gösterir; safha 3, safha 2'nin kas zayıflığı belirtileri yanında susuz ve can çekişir durumdadır; safha 4, ölüm. Hastalık belirtilerini gösteren hayvanların durumu takip edilmiş ve safha 3 gösteren fareler etik sebeplerden dolayı sakrifiye edilmiştir. Safha 1 ve üzerinde kas zaafı gösteren fareler miyastenik olarak kabul edilip hastalık insidansı belirlenmesinde kullanılmıştır.

İmmünizasyon öncesi ve deneylerin hayvan modeli kısmı bitene kadar haftada bir kere ağırlık ölçümleri yapıldı. İmmünizasyon öncesi ve deneylerin hayvan modeli kısmı bitene kadar haftada bir kere ağırlık ölçümleri yapıldı. Hayvanlar kafes ızgarasında 40 kere kuyruklarından çekilerek egzersiz yaptırıldı. Egzersizden sonra dinlenme olmadan ızgara ters çevrilerek 100 cm yükseklikten farelerin yer çekimine karşı ızgaraya tutunarak durmaları gözlemlendi. Eşik değer olan 5 dakika süresince duramayan fareler 20 kez kuyruklarından çekerek egzersiz yaptırılarak tekrar denendi. Beş dakika durabilen farelere bu tekrar yapılmadı.

Farelerin motor aktivitesi Commat Ltd. (Ankara, Türkiye) firmasının motor aktivite monitorizasyon cihazı ile ölçüldü. Bilgisayara bağlı olan kare şeklindeki alanın (45 x 45 cm) tabanı dokunma sensörlü olup farenin hareketlerini bilgisayara bir yazılım aracılığıyla aktarmaktadır. Bilgisayar programı tarafından, bu bilgi, alanın hangi taraflarında, ne kadar süre boyunca, kaç cm yürüdüğünü ve hareket ve dinlenme yüzdelerini kullanıcıya sunmaktadır. Deneye başlamadan önce tüm deney hayvanları 2 hafta süreyle motor aktivite alanına alıştıırıldı. Deney sırasında fareler bu alan içinde 5 dakika kadar tutulup hareketleri program aracılığıyla kayıt altına alındı.

Deneyin sonlandırılması

Son immünizasyondan 28 gün sonra fareler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiştir. Ekstremiteler kasları alınarak izopentan içinde sıvı azot ile dondurulmuştur. İnguinal, pop-

liteal ve aksiller lenf ganglionları toplanarak, hücre kültürü mediumu içinde lenf hücre süspansiyonları elde edilmiştir. İleri safhada kas zaafı sebebiyle deney sırasında sakrifiye edilmesi gereken farelerden sadece kas örnekleri alınmıştır.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA yöntemi ile MuSK-CFA ve CFA farelerinin serumlarında anti-MuSK IgG, IgG1, IgG2b, IgG3, IgM antikorları ve kompleman C3 miktarları ölçülmüştür. ELISA tablası, antikor ölçümler için rekombinan insan MuSK proteini ile veya C3 düzey ölçümü için anti-fare kompleman C3 antikor (Cappel, Solon, OH, ABD) ile kaplama solüsyonu (karbonat bikarbonat solüsyonu, pH 8.6) içinde kuyu başına 0,5 µg protein düşecek ve her bir kuyuda total hacim 100 µL olacak şekilde kaplanmış ve gece boyu +4 derecede inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün tabla bir kez %0,5 Tween 20-PBS solüsyonu ile yıkandıktan sonra PBS içinde %2 "fetal bovine serum" (FBS-PBS) solüsyonu ile her bir kuyuda total hacim 100 µL olacak şekilde oda sıcaklığında 2 saat bloklama yapılmıştır. Ardından %2 FBS-PBS solüsyonu içinde 1:1000 oranında sulandırılmış fare serumları her bir kuyuya 100µl olarak konulmuş ve 90 dakika +37 derecede inkübe edilmiştir. Tween-PBS solüsyonu ile yıkamadan sonra antikor ölçümleri için 1:5000 oranında sulandırılmış %2 FBS-PBS içinde HRP-konjuge sekonder antikorlar (keçi anti-fare IgG, IgG1, IgG2b, IgG3 ve IgM; bütün antikorlar Abcam, Cambridge, İngiltere) veya C3 ölçümü için 1:500 oranında sulandırılmış HRP-konjuge anti-fare C3 sekonder antikor (Cappel) her bir kuyuya 100 µL konulmuştur. Doksan dakika +37 derecede inkübasyonun ardından, tabla Tween-PBS solüsyonu ile yıkamıştır. Substrat olarak 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) her kuyuya 100 µL konulmuştur. On dakika sonra reaksiyonu durdurma solüsyonu olarak 2M H2SO4 100'er µL kuyulara konulmuştur. Hemen ardından 450 nm'de ELISA okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

İmmünfloresan boyama

Fare kas örneklerinde IgG, IgM, IgG1, IgG2b, C3 ve MAK (C5b-9) depozitleri incelenmiştir. Ayrıca alpha-bungarotoksin (α-BTx) bağlanma bölgeleri tayini ile AChR düzeyleri, anti-MuSK antikor bağlanma bölgelerinin tayini ile de MuSK düzeyleri yarı-kantitatif olarak ölçülmüştür.

Farelerin kas dokusu örnekleri hayvanlar sakrifiye olur olmaz nemli gazlı bez içine alınmıştır. Kas örnekleri izopentan içinde sıvı azota daldırılmış ve ardından immünohistokimya deneylerine kadar -80 derecede saklanmıştır. Kriyostat ile kas dokularından 7 µm'lik dondurma kesitler alınmıştır. Kesitler pozitif yüklü lamlara konularak deney zamanına kadar -20 derecede saklanmıştır. Her bir parametre için fare başına dört kas kesiti incelenmiştir.

Kas kesitleri -20 derece aseton içinde fiksasyon için 10 dakika bekletilmiştir. PBS ile yıkamanın ardından nemli olmasına dikkat edilen immünohistokimya kutusuna konulan preparatların üzerine bloklama için PBS içinde %5 FBS her bir örneğe 100 µl eklenerek 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından dokuların üzerine %5 FBS-PBS ile 1:500 oranında sulandırılmış rodamin konjuge α-BTx (Molecular Probes, Eugene, OR, ABD) ve 1:100

oranında sulandırılmış FITC ile konjuge anti-fare IgG, IgM, IgG1, IgG2b, C3 veya MAK (Abcam, Cambridge, İngiltere) karışımından 100'er µl dokuların üzerine konulmuştur. Gece boyunca 4 derecede inkübasyondan sonra PBS ile yıkama yapıp dokular 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Abcam) ile kapatılmıştır. Floresan mikroskopu altında kırmızı renkli rodamin konjuge α-BTx bağlanma bölgeleri ve yeşil renkli FITC konjuge antikor bağlanma bölgeleri sayılmıştır. Antikor bağlanma bölgelerinin sayıları α-BTx bağlanma bölgelerinin sayılarına bölünüp 100 ile çarpılarak kesit başına düşen antikor veya kompleman depozit oranları hesaplanmıştır.

İkinci deneyde ise dondurma kas kesitleri üzerinde aynı fiksasyon ve bloklama protokolü uygulanmış. Ardından rodamin konjuge α-BTx (1:500 dilüsyon) ile beraber tavşan anti-fare MuSK antikoru (Abcam) 1:100 oranında %2 FBS-PBS içinde sulandırılarak kesitlere uygulanmış ve gece boyunca 4 derecede inkübasyon yapılmıştır. Ertesi gün, kesitler yıkandıktan sonra, FITC ile konjuge keçi anti-tavşan IgG antikoru (PBS içinde 1:1000 oranında sulandırılmış) uygulanıp, 2 saat süreyle oda ısısında inkübasyon yapılmıştır. Ardından kesitler yıkayıp DAPI ile kapatılmıştır. Kas kesitlerinde bulunan AChR düzeyleri kırmızı renkli rodamin konjuge α-BTx bağlanma bölgelerinin sayılması, MuSK düzeyleri ise yeşil renkli anti-MuSK antikor bağlanma bölgelerinin sayılması ile yarı-kantitatif olarak yapılmıştır.

MuSK stimülasyonu ile lenf ganglionu hücrelerinin sitokin üretim düzeylerinin belirlenmesi

Farelerden elde edilen lenf ganglionlarından hücre süspansiyonları elde edildi. Kuyucuk başına 200000 adet hücre, kültür medyumuna içinde (0,2 mL RPMI 1640, %10 FBS, 25 mM HEPES solüsyonu, 30 µM merkaptotanol, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin) 96 kuyucuklu mikrotitre plakalarına eklendi ve rekombinan MuSK (5 µg/mL) ile veya sadece kültür medyumuyla inkübe edildi. Inkübasyon 37°C ve %5 CO2 ortamında 72 saat yapıldı. Sitokin üretiminin değerlendirilmesi amacıyla üst sıvılar toplandı ve analiz edilene kadar -80°C'de saklandı. Optimal MuSK konsantrasyonu ve inkübasyon süreleri ön çalışmalarda belirlendi. Her farenin ilgili sitokine ait sitokin indeksleri MuSK ile uyarılan hücrelerin üst sıvılarındaki sitokin konsantrasyonunun, sadece kültür medyumuyla inkübe edilen hücrelerin üst sıvılarındaki sitokin konsantrasyonuna bölünmesiyle elde edildi.

Sitokin düzeyleri için çoklu boncuk ve ELISA yöntemleri

Çoklu Boncuk ELISA yöntemi Milliplex Map Kit Mouse Cytokine/Chemokine kit (Millipore, Billerica, MA, ABD) talimatlarına göre yapılmıştır. Bu yöntemle IFN-γ, IL-10, IL-12, IL-17, IL-2, IL-4, IL-6 ve TNF-α seviyelerine MuSK ile uyarılmış lenf ganglionu hücre kültür üst sıvılarında bakılmıştır. Farelerin serum örneklerinde IL-4, IL-17 ve IFN-γ düzey ölçümleri fare sitokin ELISA kitleri (Peprotech, Rocky Hill, NJ, ABD) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda yapılmıştır.

Western Blot

Bu yöntem ile MuSK ekspresyonuna yarı kantitatif olarak bakılmıştır. Farelerden elde edilen kas örnekleri homojenizasyon ardından denatüre edilmiştir (100 °C, 5 dakika). Bu ör-

neklere ait 1 µg protein elektroforez kuyucuklarına yüklenerek akrilamid jelde yürütülüp, 45 µm polivinilidinden florid membranlara transfer edilmiştir (100 V, 80 dakika). Bloklamanın (TBS-T içinde %5 süt tozu, 90 dakika) ardından tavşan anti-fare MuSK antikoru ile oda ısısında 2 saat inkübasyon yapılmıştır (Abcam). PBS ile yıkamanın ardından HRP-konjuge ikincil keçi anti-tavşan antikoru (Abcam) ile 2 saat oda ısısında inkübasyon yapılmıştır. Sonuç immünoaktif kemilüminisans film ile ECL Western Blot substratı kullanılarak görüntülenmiştir. Bu yöntemle elde edilen bantların yoğunluğu bir dansitometre ve görüntü analiz yazılımı aracılığıyla (Vilber Lourmat Biotechnology, Marne-la-Vallée, Fransa) ölçülüp aynı kas dokusu homojenatından anti-aktin antikoru ile elde edilen bantın yoğunluğuna olan oranı hesaplanmıştır.

Akım sitometrisi

Farelerden elde edilen lenf ganglionu hücreleri (1×10⁶), 4°C'de, 30 dakika boyunca FITC veya PE ile konjuge CD4, CD8, CD19 ve CD11b antikorları ile inkübe edildikten sonra, %2 paraformaldehit ile fikse edildi ve akım sitometrisi cihazı ile sonuçlar elde edildi.

Kas patolojisi

Kas örnekleri izopentan içinde sıvı azotta şok donduruldu. Kriyostatta 7 mikrometrelilik kesitler alındıktan sonra H&E, sitokrom oksidaz (COX) ve süksinat dehidrogenaz (SDH) boyaları kullanılarak boyamalar yapıldı. Gomori'nin trikrom boyaması ile de "ragged red fibre" değerlendirmesi yapıldı (11).

İstatistik

Deney parametrelerinin anlamlılık düzeyi EAMG insidans karşılaştırmaları için Fisher'in kesin testi, EAMG klinik safha karşılaştırmaları için Mann Whitney U ve diğer karşılaştırmalar için Student t testi ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

İmmünizasyon ve klinik bulgular

MuSK-EAMG modeli 2. deney grubunda 8'i MuSK ve CFA, 8'i sadece CFA immünizasyonu ile uygulandı. Diğer klinik bulgularla uyumlu şekilde 2. immünizasyondan sonraki 3. ve 4. haftalarda MuSK-CFA ile immünize edilen farelerin ağırlıkları CFA ile immünize edilenlerinkine göre belirgin derecede düşüktü (Student's t-test ile *, p<0.05). Yeterli insidansla EAMG geliştiği için 3. immünizasyona gerek görülmedi.

Fareler izlenerek kas zaafı skorlandı (Evre 1-4), asma testi ile kas güçleri değerlendirildi ve EAMG insidansları kaydedildi. Fareler deneyin 56. gününde (8. hafta) sakrifiye edildi.

Deneyin sonunda MuSK-CFA ile immunize edilen farelerde EAMG insidansı %100 iken sadece CFA ile immunize edilen farelerde hastalık gelişmemiştir (tüm haftalarda Fisher'in kesin testi ile p<0.001) (Şekil 1a).

Kas zaafı evreleri (0, normal; 1, sadece egzersiz ile zaaf; 2, spontan zaaf; 3, kilo kaybı, solunum sıkıntısı, ileri hareketsizlik; 4, ölüm) EAMG insidansı ile paralel olarak 2. immünizasyon

yondan sonra artmaya başladı. İkinci immünizasyondan sonra 2 farede evre 2, 6 farede evre 4 zaaf gelişti. MuSK-CFA ile immünize farelerin ortalama hastalık evre skorları 2. immünizasyondan sonraki tüm haftalarda sadece CFA ile immünize edilen farelerden belirgin derecede yüksekti (Mann-Whitney U testi ile $*p<0.05$; $**p<0.01$; $***p<0.001$) (Şekil 1b). Asma testi ile kafes kapağında başaşağı asılı kalma süreleri değerlendirildi. En fazla 3 dakika bu şekilde durmaları beklenen farelerin, bu süreden önce düşmeleri durumunda asılı kalabildikleri süre kaydedildi. Her farenin asılı kalma süresi CFA grubunun ortalama asılı kalma süresine bölündü ve iki grubun bu yöntemle elde edilen oranları karşılaştırıldı. MuSK-CFA ile immünize farelerin 2. immünizasyondan sonraki 3. ve 4. haftalarda asma testi oranları CFA ile immünize edilenlere oranla belirgin derecede düşüktü (Student's t-test ile $*p<0.05$; $**p<0.01$), (Şekil 1c). Diğer klinik bulgularla uyumlu bir şekilde 2. immünizasyondan sonraki 3. ve 4. haftalarda MuSK-CFA ile immünize edilen farelerin ağırlıkları CFA ile immünize edilenlerinkine göre belirgin derecede düşüktü (Student's t-test ile $*p<0.05$) (Şekil 1d).

MuSK-EAMG modelinde serum IgG ve C3 düzeyleri

2. immünizasyondan 15 gün sonra elde edilen serum örneklerinde anti-MuSK IgG, IgG1, IgG2b, IgG3 ve IgM düzeyleri ölçüldü. MuSK-IgG, IgG1, IgG2b ve IgG3 düzeyleri MuSK-CFA ile immünize edilen farelerde CFA ile immünize edilenlere göre belirgin derecede yüksekti (Student's t-test ile $*p<0.05$, $***p<0.001$). Anti-MuSK IgM ise MuSK-CFA veya CFA ile immünize edilen farelerin serumlarında saptanmadı. Bu bulgunun IgM antikorlarının immünizasyondan kısa bir süre sonra ortaya çıkıp kaybolmasıyla ilgili olabileceği düşünüldü (Şekil 2).

Kas immünopatolojisi

Antikor veya kompleman depozitlerinin bulunduğu BTx-bağlanma bölgelerinin sayısının toplam BTx-bağlanma bölgelerinin sayısına oranı hesaplandı.

CFA ile immünize edilen farelerin NMB'lerinde kompleman ve IgG depozitleri bulunmazken, MuSK-CFA ile immünize edilenlerin NMB'lerinde değişen oranlarda IgG, IgG1, IgG2b, C3 ve MAC depozitleri gözlemlendi. Ne MuSK-CFA ne de CFA-immünize farelerde IgM depozitlerine rastlanmadı.

Kesitlerde bulunan AChR ve MuSK ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için sırasıyla BTx-bağlanma bölgeleri ve anti-MuSK antikor bağlanma bölgeleri sayıldı. Bu amaçla her farenin iki farklı kasından elde edilen dörder kesit kullanıldı. MuSK ile immünize edilen farelerin α -BTx bağlanma bölgeleri, sadece CFA ile immünize edilenlerden belirgin derecede azdı (*, Student's t-test ile $p=0.04$). Anti-MuSK ile yapılan incelemede ise MuSK-CFA ve CFA ile immünize edilen fareler arasında fark yoktu (Şekil 3a).

Ek olarak MuSK-CFA ve CFA ile immünize edilen farelerin kas MuSK düzeyleri western blot incelemesiyle karşılaştırıldı. Her farenin kas örnekleri homojenize edilerek, jel elektroforezinde yürütüldü ve kas proteinleri nitrosetuloz membranlara transfer edildi. Anti-MuSK antikoruyla yapılan immunoblot çalışmalarında MuSK'a ait öngörülen moleküler ağırlıkta (~100 kD) bantlar saptandı. Kantifikasyon amacıyla aynı membranlarda

beta-aktin antikoruna ile 50 kd civarında bantlar elde edildi. Bir yazılım yardımıyla her farenin kas örneğine ait MuSK ve beta-aktin bantlarının yoğunluğu ölçülerek iki bantın oranları hesaplandı. MuSK-CFA ve CFA ile immünize edilen fareler arasında MuSK/beta-aktin oranları arasında fark yoktu (Şekil 3b).

Genel olarak bu bulgular, MuSK immünizasyonunun AChR ekspresyonunda azalmaya sebep olurken MuSK ekspresyon düzeyini değiştirmediğini gösterdi ve daha önceki MuSK immünizasyon çalışmalarını destekler nitelikteydi.

Birinci MuSK immünizasyon çalışmasında olduğu gibi bu çalışmada da hematoksilen-eozin (H-E) boyası ile MuSK-CFA ile immünize edilen farelerde kas lifi atrofişi gözlemlendi. Bununla beraber kas örneklerinin süksinat dehidrogenaz (SDH) enzim ekspresyonlarının normal olması bu atrofünün mitokondrial işlev bozukluğuna bağlı olmadığını düşündürdü (Şekil 4).

Lenf ganglion hücre alt popülasyonları

Farelerin sakrifikasyonu ile elde edilen lenf ganglionu hücreleri süspansiyon haline getirilerek CD19 (B lenfosit belirteci), CD4, CD8 (T lenfosit belirteci) ve CD11b (dendritik hücre belirteci) antikorları ile inkübe edildi ve akım sitometrisi ile bu dört farklı hücre grubuna ait oranlar belirlendi. MuSK-CFA ve CFA ile immünize edilen fareler arasında bu temel hücre grupları arasında fark olmadığı ve dolayısıyla MuSK immünizasyonunun belli bir hücre alt grubunu özellikle aktive etmediği düşünüldü (Şekil 5).

Lenf ganglionu hücrelerine ait sitokin yanıtları

Sakrifiye edilen farelerin lenf ganglion hücreleri toplanarak tek hücre süspansiyonu şeklinde 96 kuyucuklu plaklara ekildi ve insan MuSK, fitohemaglutinin (PHA) (pozitif kontrol) varlığında veya sadece kültür medyumuna ile (negatif kontrol) 72 saat inkübe edildi. Ardından kültür üst sıvılarında sitokin düzeyleri çoklu boncuk yöntemiyle ölçüldü.

MuSK-CFA veya CFA ile immünize edilen farelerin lenf ganglionu hücrelerinin sitokin yanıtları arasında belirgin fark yoktu. Sadece MuSK ile immünize edilen farelerde daha yüksek IL-17 yanıtı saptandı ancak bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı.

Birinci ve ikinci immünizasyon çalışmasında MuSK EAMG modeli başarıyla uygulanmıştır. MuSK enjekte edilen farelerde klinik zaafın gelişmesi yanında serumda MuSK antikorlarının saptanması, NMB'de IgG ve kompleman depozitlerinin bulunması ve kas örneklerinde azalmış AChR ekspresyonunun gösterilmesi, MuSK immünizasyonunun, AChR ve MuSK antikoruna pozitif bulunan miyastenik hastalarinkine benzer mekanizmalarla nöromusküler bileşke hasarı yaptığını göstermektedir.

Ek olarak MuSK-CFA ve CFA ile immünize edilen farelerin kas MuSK düzeyleri western blot incelemesiyle karşılaştırıldı. Her farenin kas örnekleri homojenize edilerek, jel elektroforezinde yürütüldü ve kas proteinleri nitrosetuloz membranlara transfer edildi. Anti-MuSK antikoruyla yapılan immunoblot çalışmalarında MuSK'a ait öngörülen moleküler ağırlıkta (~100 kD) bantlar saptandı. Kantifikasyon amacıyla aynı membranlarda beta-aktin antikoruna ile 50 kd civarında bantlar elde edildi. Bir

yazılım yardımıyla her farenin kas örneğine ait MuSK ve beta-aktin bantlarının yoğunluğu ölçülerek iki bantın oranları hesaplandı. MuSK-CFA ve CFA ile immünize edilen fareler arasında MuSK/beta-aktin oranları arasında fark yoktu. Genel olarak bu bulgular, MuSK immünizasyonunun AChR ekspresyonunda azalmaya sebep olurken MuSK ekspresyon düzeyini değiştirmedini gösterdi ve daha önceki MuSK immünizasyon çalışmalarını destekler nitelikteydi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

MuSK ilişkili MG'yi AChR ilişkili MG'den ayıran başlıca klinik özellikler boyun, omuz ve bulber kasların ağırlıklı olarak tutulması, başta aksiyel kaslar ve dilde olmak üzere çeşitli kaslarda atrofi görülebilmesi, timusda hiperplazinin olmaması ve hatta bazı olgularda timusda atrofi görülebilmesi ve kolinesteraz inhibitör tedavisine yanıtızlık veya aşırı duyarlılıktır (12-15). MuSK ilişkili MG'de hastalığın erken dönemlerinde ağır klinik bulgular ve miyastenik kriz gelişebilmekte ve pek çok olguda yüksek dozda immünsüpresan tedaviye gereksinim duyulmaktadır (16,17).

Bu farklı klinik özelliklerin altında yatan immünopatolojik faktörler hakkındaki bilgimiz çok sınırlıdır. MuSK antikoru saptanan MG olgularının kendine özgü HLA alelleri (DR14, DQ5) ile ilişkili olması, MuSK antikörlerinin ağırlıklı olarak komplemanı aktive etmeyen IgG4 izotipinden olmaları ve antikörlerin kompleman aracılı NMB yıkımı yerine AChR ekspresyonunu engelleyerek etki etmeleri dikkat çeken özelliklerdir (12,18,19).

MuSK ilişkili MG'nin immünopatolojisinin araştırılabilmesi amacıyla aktif immünizasyon veya pasif transfer modelleri geliştirilmiştir. Pasif transfer çalışmalarında MuSK antikoru pozitif olgulardan elde edilen saflaştırılmış IgG örnekleri farelere uygulanırken, immünizasyon deneylerinde çeşitli tavşan, fare ve sıçan soylarına insan, fare ve sıçana ait rekombinan MuSK (ekstraselüler kısmı) proteinleri uygulanmıştır. Hem pasif transfer hem de immünizasyon modellerinde deney hayvanlarında kas zaafı gelişmiş ve kolinesteraz inhibitörleri ile kas zaafında geçici düzelme, NMB'de antikor birikimi ve elektromiyografi incelemelerinde ardışık elektrik uyarısına dekremental birleşik kas aksiyon potansiyeli yanıtı gibi MG'nin karakteristik özellikleri de oluşturulmuştur. Ayrıca, bu çalışmalar, MuSK ilişkili MG olgularında saptanan kas atrofisini ve kolinesteraz inhibitör aşırı duyarlılığını başarılı bir şekilde taklit etmiştir. Böylece, MuSK ilişkili MG modeli hem MuSK antikörünün hastalık oluşumunda rol oynadığını göstermiş hem de agrin-LRP4 ve MuSK etkileşiminin sadece intrauterin dönemde sinaps oluşumundan sorumlu olmadığını, hayat boyunca sinaps işlevlerinin sürdürülmesine katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur (20-30).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar MuSK antikörlerinin hem presinaptik hem de postsinaptik NMB yapılarına etki ederek hastalık oluşturduğunu göstermektedir. MuSK antikörünün bildirilmiş etki mekanizmaları MuSK'un membrandan hücre içine internalizasyonu, MuSK aracılı rapsin aktivasyonunun baskılanması, asetilkolin esteraz CoIQ-MuSK etkileşiminin önlenmesi ve presinaptik asetilkolin salgılanmasının azalmasıdır (31). Bu etkilerin sonucunda postsinaptik MuSK ekspresyonu

değişmezken AChR ekspresyonu azalmakta, NMB'de ileti bozulmakta ve buna bağlı kas zaafı gelişmektedir (26,27,29,30).

MuSK antikörlerinin etki mekanizmaları ile ilgili bilgiler giderek çoğalmakla beraber, bu antikörlerin oluşumunu sağlayan immünolojik faktörlerle ilgili bilgilerimiz çok sınırlıdır. Bu faktörlerin aydınlatılması amacıyla yaptığımız bu çalışmada, B6 farelerinin rekombinan insan MuSK proteininin ekstraselüler kısmı ile immünizasyonu sonrasında, farelerde %87.5 gibi yüksek bir insidansla kas zaafı gelişmiş ve farelerin NMB'lerinde kompleman ve antikor depozitleri ve serumlarında MuSK'a karşı antikörler saptanmıştır. Sadece CFA ile immünize edilen kontrol grubu farelerinde ise kas zaafı gelişmemiş ve NMB depozitleri veya serum MuSK antikörleri saptanmamıştır. Bu bulgular MuSK modelinin başarılı bir şekilde oturtulduğunu göstermektedir. EAMG insidans bulgumuz önceki MuSK immünizasyonu deneylerinde elde edilenlerle (%60 ile %100 arasında) benzerlik göstermektedir (20,24,26,29).

Modelin başarılı olduğunu gösteren diğer bir bulgu ise yaptığımız yarı kantitatif değerlendirmede MuSK ve CFA ile immünize edilen farelerde kas AChR ekspresyonunun sadece CFA ile immünize edilen farelere göre anlamlı düzeyde azalmış olmasıdır. MuSK ekspresyonu açısından ise MuSK-CFA ve CFA grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kas dokusunda MuSK ekspresyonu değişmezken, AChR ekspresyonunun azalması MuSK ilişkili MG modelinin karakteristik bir özelliğidir ve çeşitli MuSK ilişkili EAMG çalışmalarında bu bulgu gösterilmiştir (24,29,31). AChR ilişkili EAMG'de kas zaafı başlıca NMB'nin postsinaptik kısmında kompleman aracılı hasarlanma ve buna bağlı AChR ekspresyonunda azalma sonucunda gelişmektedir (12). MuSK ilişkili EAMG'de aynı mekanizmanın geçerli olması durumunda hem AChR hem de MuSK'un ekspresyon düzeylerinin azalması beklenirdi. MuSK immünizasyonu sonrasında sadece müsküler AChR düzeylerinin azalması, MuSK antikörlerinin, NMB yıkımından çok MuSK'un kas membranında AChR eksprese ettirme işlevini baskılayarak kas zaafına sebep olduğunu düşündürmüştür. MuSK ilişkili EAMG modeli geliştirilmiş deney hayvanlarının kas örneklerinde elektron mikroskopi incelemesi ile ağır bir yıkım gözlenmemesi bu görüşü doğrulamıştır (27). Ayrıca çeşitli çalışmalarda MuSK antikörlerinin farklı mekanizmalarla MuSK'un fizyolojik işlevlerini baskıladığı da gösterilmiştir (12,18,19).

MuSK ile immünize farelerin serum örneklerinde saptanan IgG'ler, önceki çalışmalarda olduğu gibi (24,26,29) hem komplemanı aktive etmeyen IgG1 hem de komplemanı aktive eden IgG2 ve IgG3 izotiplerine aittir. Hem immünize edilmemiş hem de AChR ile immünize edilmiş B6 farelerinde serumda düzeyi en yüksek olan baskın IgG izotipi IgG2b iken, IgG2a, IgG2c, IgG3 ve IgG1 izotiplerinin düzeyleri IgG2b'ye göre daha düşüktür. Ayrıca IgG2b dışındaki izotiplerin serum konsantrasyonları birbirine yakındır (32-34). Çalışmamızda ise MuSK ile immünize farelerde baskın IgG izotipi IgG1 idi ve IgG2b ve özellikle IgG3 düzeyleri IgG1'inkilere oranla çok daha düşüktü. Benzer şekilde MuSK ilişkili MG olgularında da komplemanı aktive etmeyen anti-MuSK IgG4 baskın izotip olarak olguların tamamında saptanırken, komplemanı aktive etmeyen anti-MuSK IgG1 %85-90 oranında saptanmakta ve anti-MuSK IgG1 düzeyleri,

anti-MuSK IgG4 düzeylerinden düşük bulunmaktadır (35). Bu bulgular immünizasyonla oluşturulan MuSK EAMG modelinin insan hastalığını başarıyla taklit ettiğini göstermektedir. Ayrıca MuSK ilişkili MG ve EAMG'de komplemanı aktive eden IgG izotiplerinin saptanması bu hastalıklarda kompleman aracılı patojenik mekanizmaların da rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Antikor bulguları ile uyumlu bir şekilde MuSK ile immünize edilen farelerin NMB'lerinde komplemanı aktive etmeyen IgG1 izotipleri yanında komplemanı aktive eden IgG2b ve IgM antikorları ve kompleman (C3 ve MAK) depozitleri saptadık. Bu bulgular da kompleman aracılı NMB yıkımının MuSK ilişkili MG'de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ancak, MuSK ile immünize edilen farelerin tamamının serumlarında kompleman aktive eden antikorlar ve NMB'lerinde komplemanı aktive eden antikorlar ve kompleman depozitleri saptanırken, MuSK antikoru pozitif MG hastalarının sadece %25 gibi küçük bir kesiminin NMB'lerinde kompleman depozitlerinin saptanması (36), MuSK antikoru saptanan MG olgularının serumlarından saflaştırılan IgG1-3 izotiplerinin farelere uygulanması sonucunda kas zaafı gelişmemesi (30) ve kompleman C3 veya C5 faktörü eksik farelerde MuSK immünizasyonu ile EAMG oluşturulabilmesi (26) bu varsayımı zayıflatmaktadır. Ayrıca NMB depozitlerinin varlığını gösteren yöntemimiz kantitatif bir yöntem olmadığından miyastenik farelerin NMB'lerindeki depozit miktarı konusunda bilgi vermemektedir. MuSK immünizasyonu sonrasında NMB'lerde biriken az miktarda kompleman faktörünün fonksiyonel bir değişikliğe yol açabilecek düzeyde kas membranı yıkımına sebep olmaması da mümkündür.

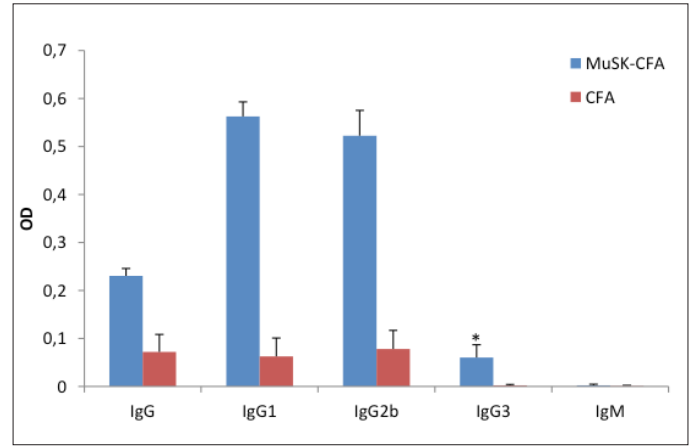
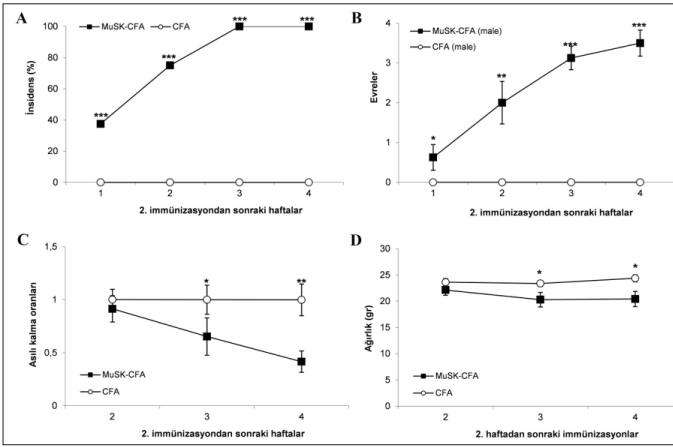
Çalışmamızın bir sınırlaması, uyguladığımız immünizasyon yönteminin farelerin %60 kadarında ötenaziye gerektirecek düzeyde şiddetli kas zaafına sebep olmasıdır. MuSK ilişkili MG olguları ile yapılan çalışmalarda ise olguların çoğunda bu düzeyde ağır kas zaafı bulunmamaktadır. Bu durum immünizasyonla oluşturulan MuSK EAMG modelinin muhtemelen ortalama bir MuSK ilişkili MG klinik tablosundan çok MuSK antikoru bağımlı miyastenik kriz tablosunu taklit ettiğini düşündürmektedir. MuSK ilişkili MG hastaları ile EAMG fareleri arasındaki kompleman ve antikor farklılıklarını bu faktöre bağlamak mümkündür. Bu varsayımın miyastenik kriz ile başvuran MuSK ilişkili MG olgularının serum ve kas örneklerinden elde edilen örneklerle yapılan çalışmalarla sınanması gerekmektedir.

Komplemanı aktive etmeyen IgG izotiplerinin üretimi hem insanda (IgG4), hem de farede (IgG1) Th2-tipi immünite tarafından kontrol edilmektedir. Benzer şekilde Th1-tipi immünite de komplemanı aktive eden IgG izotiplerini (insanda IgG1 ve IgG3, farede IgG2 ve IgG3) aktive etmektedir (37). MuSK ilişkili MG'de baskın izotipin IgG4 olması MuSK immünitesinin ağırlıklı olarak Th2-tipi immünite tarafından kontrol edildiğini düşündürmektedir. Bu varsayımı test etmek için yaptığımız çalışmamızda MuSK ile immünize edilen farelerin anti-MuSK IgG izotip dağılımını incelediğimizde Th2-tipi immünite ile üretilen uyarılan IgG1'in baskın izotip olduğunu saptadık. Bununla uyumlu olarak aynı farelerin serumlarında ve MuSK ile uyarıl-

mış lenf ganglionu hücrelerinin kültür üst sıvılarında Th2-tipi immünite ile ilişkili IL-4 ve IL-10'un CFA farelerine oranla daha yüksek olduğunu belirledik. Ayrıca, Th1-Th2 dengesinde Th2 baskınlığını değerlendirmek amacıyla kullanılan serum IL-4/IFN-gama konsantrasyon oranının MuSK-CFA ile immünize farelerde sadece CFA ile immünize farelere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterdik. Th1-tipi immünite ile ilişkili olduğu bilinen IL-12, TNF-alfa ve IL-2'nin kültür üst sıvılarındaki düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında MuSK-CFA ile immünize farelerde düzeylerin ya CFA grubu ile aynı ya da daha düşük olduğu gözlemlendi. Tek istisna olarak Th1 tipi sitokin olan IFN-gama'nın kültür üst sıvılarındaki düzeyi MuSK-CFA grubunda CFA grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Bu bulgular, MuSK'un bir antijen olarak hem Th1 hem de Th2-tipi immüniteyi uyardığını ama Th2 tipi immünite uyarısının daha baskın olduğunu ve bu sebeple MuSK ilişkili MG olgularında IgG4 izotipinin, MuSK'un EAMG modelinde ise IgG1 izotipinin baskın izotip olarak saptandığını düşündürmektedir. Farklı antijenlerin farklı Th-tipi immüniteleri etkinleştirdiği ve immünizasyon çalışmalarında otoantijen olarak kullanılan molekülün yapısının ortaya çıkan immün yanıtın özelliklerine yön verdiği bilinmektedir. Mikobakterium proteinleri ve ovalbumin ağırlıklı olarak Th1 tipi immüniteyi uyarırken, lipopolisakkaritlerin ön planda Th2 tipi immüniteyi etkin hale getirmesi buna bir örnek olarak gösterilebilir (38-40). Sonuçlarımız, benzer bir ayrımın, ağırlıklı olarak Th1 tipi sitokinlerin rol oynadığı AChR immünitesi (41,42) ile MuSK immünitesi arasında da olabileceğini düşündürmektedir.

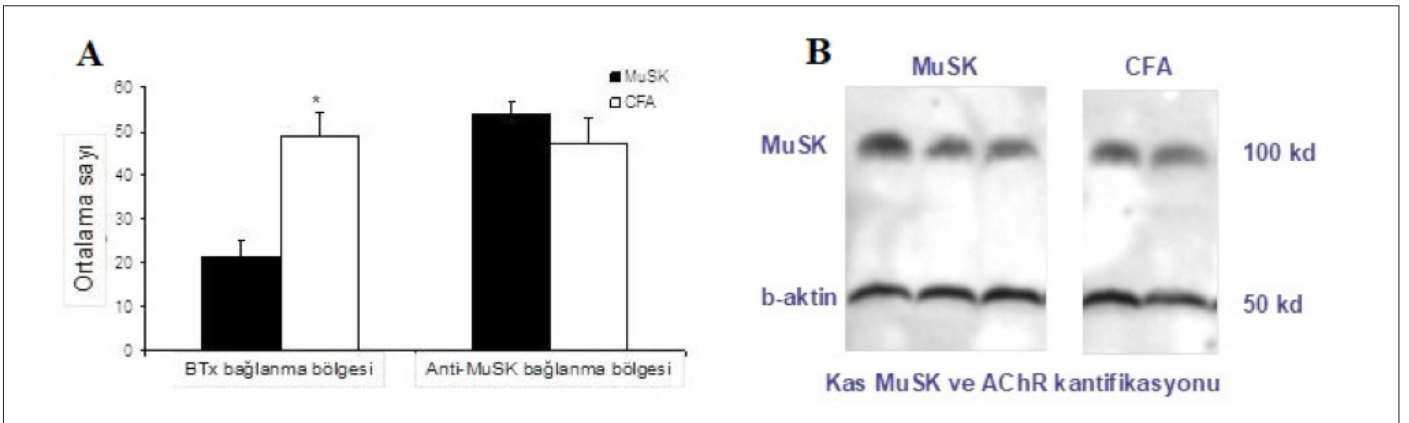
Sonuçlarımız ayrıca mikobakterium içeren ve Th1 tipi immüniteyi uyaran CFA'nın MuSK ilişkili EAMG modeli için uygun bir adjuvan olup olmadığı tartışmasını da gündeme getirmektedir. AChR ilişkili MG de ön planda Th1-tipi immünite ile ortaya çıktığından, AChR ilişkili EAMG modelinde Th1 tipi immüniteyi uyaran CFA'nın adjuvan olarak kullanılması bir sorun yaratmamaktadır (40,43). Ancak MuSK ilişkili MG'nin çalışmamızın düşündürdüğü şekilde ön planda Th2-tipi immünite ile gelişiyor olması durumunda CFA'nın adjuvan olarak kullanılmasının MuSK immünitesinin patogenezinin çalışıldığı deneylerde yanıltıcı sonuçlara yol açması mümkündür. Bu sebeple, MuSK ilişkili EAMG çalışmalarında, MuSK ve CFA ile immünize edilen farelerin sonuçlarının, kontrol grubu olarak Th2-tipi immüniteyi uyaran lipopolisakkarit gibi adjuvanların kullanıldığı grupların sonuçları ile karşılaştırılması gerekmektedir.

Özetle, çalışmamızın sonuçları MuSK immünitesinde ağırlıklı olarak Th2 tipi sitokinlerin ve daha geri planda Th1 tipi sitokinlerin etkinleştirdiğini düşündürmektedir. Gelecekteki çalışmalarda IL-4 veya IL-10 gibi Th2 sitokinlerini üretemeyen "knock out" fare soylarının MuSK immünizasyonu ile EAMG oluşumuna dirençli olduklarının gösterilmesi bu sonucu destekleyecektir. MuSK immünitesinin oluşumunda rol oynayan sitokinlerin belirlenmesi hem MuSK patogenezinin aydınlatılmasını sağlayacak hem de sitokin baskılanmasını temel alan immünoterapi yöntemleri için daha gerçekçi hedeflerin belirlenmesine yardımcı olacaktır.

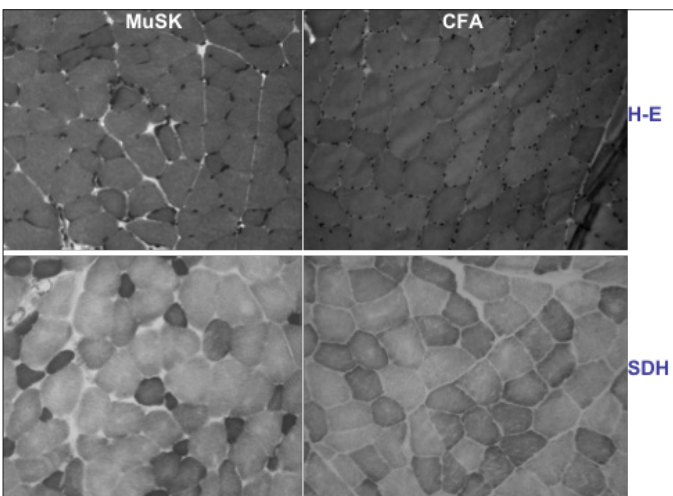


Şekil 1 a-d. MuSK-CFA ve sadece CFA ile immünize edilen farelerde insidans (a), evreler (b), asılı kalma oranları (c) ve ağırlık değerlerinin karşılaştırılması (d). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

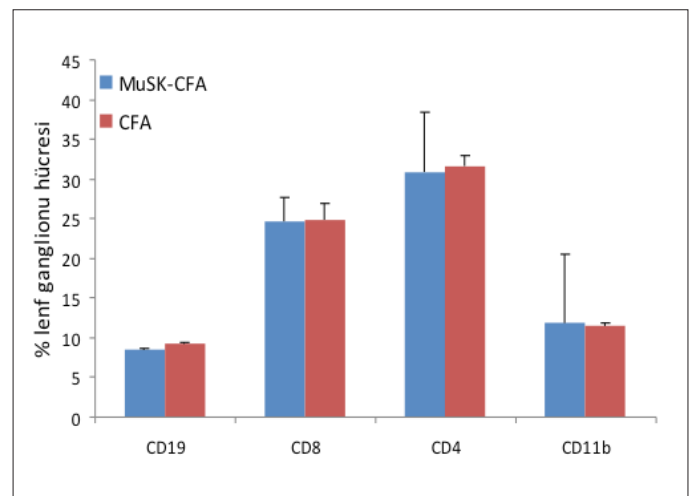
Şekil 2. MuSK-CFA ve sadece CFA ile immünize farelerde IgG, IgG1, IgG2b, IgG3 ve IgM değerlerinin karşılaştırılması. *p<0.05, ***p<0.001



Şekil 3. a, b. MuSK-CFA ve CFA ile immünize edilen farelerde BTx ve anti-MuSK antikor bağlanma bölgeleri (a), MuSK düzeylerinin western blot incelemesi (b)



Şekil 4. MuSK-CFA ile immünize edilen farelerde kas lifi atrofişi ve süksinat dehidrogenaz (SDH) enzim ekspresyonları



Şekil 5. MuSK-CFA ve CFA ile immünize edilen farelerde Lenf ganglion hücre alt popülasyonları

KAYNAKLAR

- [1]. Leite MI, Waters P, Vincent A. Diagnostic use of autoantibodies in myasthenia gravis. *Autoimmunity* 2011; 43(5-6):371-379.
- [2]. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A ve Vincent A. Autoantibodies to the receptor tyrosine kinase Musk in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nature Medicine* 2001; 7:365-368.
- [3]. Guptill JT ve Sanders DB. Update on muscle-specific tyrosine kinase antibody positive myasthenia gravis. *Curr Opin in Neurol* 2010; 23(5):530-535.
- [4]. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, et al. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011; 77(20):1819-1826.
- [5]. Wu H, Lu Y, Shen C, Patel N, Gan L, Xiong WC, et al. Distinct roles of muscle and motoneuron LRP4 in neuromuscular junction formation. *Neuron* 2012; 75(1):94-107.
- [6]. Klooster R, Plomp JJ, Huijbers MG, Niks EH, Straasheijm KR, Detmers FJ, et al. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain* 2012; 135(Pt 4):1081-1101.
- [7]. Viegas S, Jacobson L, Waters P, Cossins J, Jacob S, Leite MI, et al. Passive and active immunization models of Musk-Ab positive myasthenia: Electrophysiological evidence for pre and postsynaptic defects. *Exp Neurol* 2012; 234(2):506-512.
- [8]. Zhang G, Link H. Cytokines and the pathogenesis of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 1997; 20:543-551.
- [9]. Bai Y, Liu R, Huang D, La Cava A, Tang YY, Iwakura Y. CCL2 recruitment of IL-6-producing CD11b+ monocytes to the draining lymph nodes during the initiation of Th17-dependent B cell-mediated autoimmunity. *Eur J Immunol* 2008; 38(7):1877-1888.
- [10]. Richman DP, Nishi K, Ferns MJ, Schnier J, Pytel P, Maselli RA, Agius MA. Animal models of antimuscle-specific kinase myasthenia. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1274:140-147.
- [11]. Sundaram C, Meena AK, Uppin MS, Govindaraj P, Vanniarajan A, Thangaraj K, et al. Contribution of muscle biopsy and genetics to the diagnosis of chronic progressive external ophthalmoplegia of mitochondrial origin. *J Clin Neurosci* 2011; 18(4):535-538.
- [12]. Cavalcante P, Bernasconi P, Mantegazza R. Autoimmune mechanisms in myasthenia gravis. *Curr Opin Neurol* 2012; 25(5):621-629.
- [13]. Gilhus NE. Myasthenia and the neuromuscular junction. *Curr Opin Neurol* 2012 Oct; 25(5): 523-9.
- [14]. Cossins J, Belaya K, Zoltowska K, Konecny I, Maxwell S, Jacobson L, et al. The search for new antigenic targets in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1275:123-128.
- [15]. Evoli A, Padua L. Diagnosis and therapy of myasthenia gravis with antibodies to muscle-specific kinase. *Autoimmun Rev* 2013; 12(9):931-935.
- [16]. Kumar V, Kaminski HJ. Treatment of myasthenia gravis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011; 11(1): 89-96.
- [17]. Guptill JT, Sanders DB, Evoli A. Anti-MuSK antibody myasthenia gravis: clinical findings and response to treatment in two large cohorts. *Muscle Nerve* 2011; 44(1):36-40.
- [18]. Niks EH, Kuks JB, Roep BO, Haasnoot GW, Verduijn W, Ballieux BE, et al. Strong association of MuSK antibody-positive myasthenia gravis and HLA-DR14-DQ5. *Neurology* 2006; 66(11):1772-1774.
- [19]. Plomp JJ, Huijbers MG, van der Maarel SM, Verschuuren JJ. Pathogenic IgG4 subclass autoantibodies in MuSK myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1275:114-122.
- [20]. Xu K, Jha S, Hoch W, Dryer SE. Delayed synapsing muscles are more severely affected in an experimental model of MuSK-induced myasthenia gravis. *Neuroscience* 2006; 143(3):655-659.
- [21]. Shigemoto K, Kubo S, Jie C, Hato N, Abe Y, Ueda N, et al. Myasthenia gravis experimentally induced with muscle-specific kinase. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1132:93-98.
- [22]. Cole RN, Reddel SW, Gervásio OL, Phillips WD. Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Ann Neurol* 2008; 63(6):782-789.
- [23]. Cole RN, Ghazanfari N, Ngo ST, Gervásio OL, Reddel SW, Phillips WD. Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle-specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and myasthenia gravis in mice. *J Physiol* 2010; 588(Pt 17): 3217-3229.
- [24]. Punga AR, Lin S, Oliveri F, Meinen S, Rüegg MA. Muscle-selective synaptic disassembly and reorganization in MuSK antibody positive MG mice. *Exp Neurol* 2011; 230(2):207-217.
- [25]. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, et al. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology* 2011; 77(20):1819-1826.
- [26]. Mori S, Kubo S, Akiyoshi T, Yamada S, Miyazaki T, Hotta H, et al. Antibodies against muscle-specific kinase impair both presynaptic and postsynaptic functions in a murine model of myasthenia gravis. *Am J Pathol* 2012; 180(2):798-810.
- [27]. Richman DP, Nishi K, Morell SW, Chang JM, Ferns MJ, Wollmann RL, et al. Acute severe animal model of anti-muscle-specific kinase myasthenia: combined postsynaptic and presynaptic changes. *Arch Neurol* 2012; 69(4):453-460.

- [28]. Mori S, Yamada S, Kubo S, Chen J, Matsuda S, Shudou M, et al. Divalent and monovalent autoantibodies cause dysfunction of MuSK by distinct mechanisms in a rabbit model of myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 2012; 244(1-2):1-7.
- [29]. Viegas S, Jacobson L, Waters P, Cossins J, Jacob S, Leite MI, et al. Passive and active immunization models of MuSK-Ab positive myasthenia: electrophysiological evidence for pre and postsynaptic defects. *Exp Neurol* 2012; 234(2):506-512.
- [30]. Klooster R, Plomp JJ, Huijbers MG, Niks EH, Straasheijm KR, Detmers FJ, et al. Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice. *Brain* 2012; 135(Pt 4):1081-1101.
- [31]. Mori S, Shigemoto K. Mechanisms associated with the pathogenicity of antibodies against muscle-specific kinase in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev* 2013; 12(9):912-917.
- [32]. Klein-Schneegans AS, Kuntz L, Fonteneau P, Looor F. Serum concentrations of IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgA in C57BL/6 mice and their congenics at the *lpr* (lymphoproliferation) locus. *J Autoimmun* 1989; 2(6):869-875.
- [33]. Tüzün E, Scott BG, Yang H, Wu B, Goluszko E, Guigneaux M, et al. Circulating immune complexes augment severity of antibody-mediated myasthenia gravis in hypogammaglobulinemic RIIIS/J mice. *J Immunol* 2004; 172(9):5743-5752.
- [34]. Deng C, Goluszko E, Tüzün E, Yang H, Christadoss P. Resistance to experimental autoimmune myasthenia gravis in IL-6-deficient mice is associated with reduced germinal center formation and C3 production. *J Immunol* 2002; 169(2):1077-1083.
- [35]. Leite MI, Jacob S, Viegas S, Cossins J, Clover L, Morgan BP, et al. IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain* 2008; 131(Pt 7):1940-1052.
- [36]. Shiraishi H, Motomura M, Yoshimura T, Fukudome T, Fukuda T, Nakao Y, et al. Acetylcholine receptors loss and postsynaptic damage in MuSK antibody-positive myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2005; 57(2):289-293.
- [37]. Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988; 334(6179):255-258.
- [38]. Sano K, Haneda K, Tamura G, Shirato K. Ovalbumin (OVA) and Mycobacterium tuberculosis bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper (Th) cells toward a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20(6):1260-1267.
- [39]. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002; 196(12):1645-1651.
- [40]. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001; 70(6):849-860.
- [41]. Wang ZY, Okita DK, Howard JF Jr, Conti-Fine BM. Th1 cells of myasthenia gravis patients recognize multiple epitopes on the muscle acetylcholine receptor alpha subunit. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 841:329-333.
- [42]. Wang W, Ostlie NS, Conti-Fine BM, Milani M. The susceptibility to experimental myasthenia gravis of STAT6^{-/-} and STAT4^{-/-} BALB/c mice suggests a pathogenic role of Th1 cells. *J Immunol* 2004; 172(1):97-103.
- [43]. Tüzün E, Allman W, Ulusoy C, Yang H, Christadoss P. Novel animal models of acetylcholine receptor antibody-related myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1274:133-139.