

# Miyastenia Gravis Hastalarında HLA ile Asetil Kolin Reseptör Antikoru İlişkisi / HLA and Acetylcholine Receptor Antibody Relationship in Myasthenia Gravis Patients

İrem Fatma Aşan,<sup>1</sup> Ufuk Şener,<sup>1</sup> Pınar Bekdik,<sup>1</sup> Işıl Çoker,<sup>2</sup> Yaşar Zorlu<sup>1</sup>

T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji,<sup>1</sup> Biyokimya<sup>2</sup> Bölümü, İZMİR

## ABSTRACT

### HLA and Acetylcholine Receptor Antibody Relationship in Myasthenia Gravis Patients

**Scientific background:** Autoantibodies against the muscle acetylcholine receptor (AChR) play an essential role in the pathophysiology of autoimmune myasthenia gravis (MG). It is believed that the human leukocyte antigen (HLA) class II molecules are involved in the antibody production in MG because these molecules regulate immune responses to protein antigens by presenting antigenic peptides to CD4 helper T cells, which control the production of antibodies.

**Objective:** The aim of the present study was to examine the relationship between HLA haplotypes and AChR antibody in patients with myasthenia gravis.

**Materials and methods:** A total of 40 (22 female, 18 male) patients with MG were enrolled onto the study and underwent HLA typing and AChR antibody levels. The mean age was 45.4±16 years. The statistical analysis was performed by  $\chi^2$  test with Yates' correction to test the presence of an association.

**Results:** The presence of AChR antibodies was significantly associated with HLA CW6 ( $p<0.05$ ) and the absence of acetylcholine receptor antibodies was significantly associated with HLA B35 and HLA CW4 haplotypes ( $p<0.05$ ). HLA B8 haplotype which is a part of 8.1 ancestral hap-

lotype was more frequent in AChR antibody positive MG group but it was not statistically significant when corrected with Yates' ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** Our study demonstrates that the HLA CW6 and HLA B8 haplotypes have significant effects on AChR antibody production on myasthenia gravis patients and that further investigations with large population are required.

## ÖZET

**Bilimsel zemin:** Miyastenia graviste (MG) kas sinir kavşağındaki iletim bozukluğunun postsinaptik membrandaki nikotinik asetilkolin reseptörlerine (AChR) karşı gelişen otoantikörler nedeni ile oluştuğu bilinmektedir. MG hastalarında farklı insan lökosit antijeni (HLA) alt gruplarının ve AChR'lerine karşı gelişen otoantikör varlığının hastalığın değişik klinik görüntüleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

**Amaç:** Bu çalışma MG hastalarında AChR antikoru pozitifliği ile HLA haplotipleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amacı ile yapılmıştır.

**Gereç ve yöntemler:** Bu çalışmada 28 kadın ve 12 erkek MG hastasında (ortalama yaş: 45,4±16) ayrıntılı klinik değerlendirme sonrası AChR antikoru düzeyi çalışılmış ve HLA doku tipi tayini yapılmıştır. İstatistik değerlendirme  $\chi^2$  testi kullanılarak yapılmıştır.

**Sonuçlar:** AChR antikoru yüksek olan hastalarda HLA B35 ve HLA CW4 insidansları düşük, HLA CW6 insidansları yüksektir ( $p<0,05$ ).

**Keywords:** Myasthenia gravis, HLA, acetylcholine receptor antibody

## Yazışma Adresi/Address for Correspondence:

İrem Fatma Aşan  
İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği/İZMİR  
Tel: 0505 757 33 26  
fatmairem@yahoo.com

Dergiyeye Ulaşma Tarihi/Received: 16.01.2007  
Kesin Kabul Tarihi/Accepted: 19.01.2007

**Anahtar kelimeler:** Miyastenia gravis, HLA, asetilkolin reseptör antikoru

**Yorum:** Bizim çalışmamız AChR antikor pozitifliği ile HLA B35 ve HLA CW4 negatifliği ve HLA CW6 pozitifliği arasında yakın ilişkinin varlığına dikkat çekmektedir.

## GİRİŞ

Miyastenia gravis (MG) antikor aracılı otoimmün bir hastalıktır. MG'de nöromusküler ileti bozukluğunun nedeni postsinaptik membrandaki nikotinik asetil kolin reseptörlerine (AChR) karşı gelişen otoantikorlardır. AChR antikorları jeneralize MG'li hastaların %85'inde pozitiftir.<sup>1</sup>

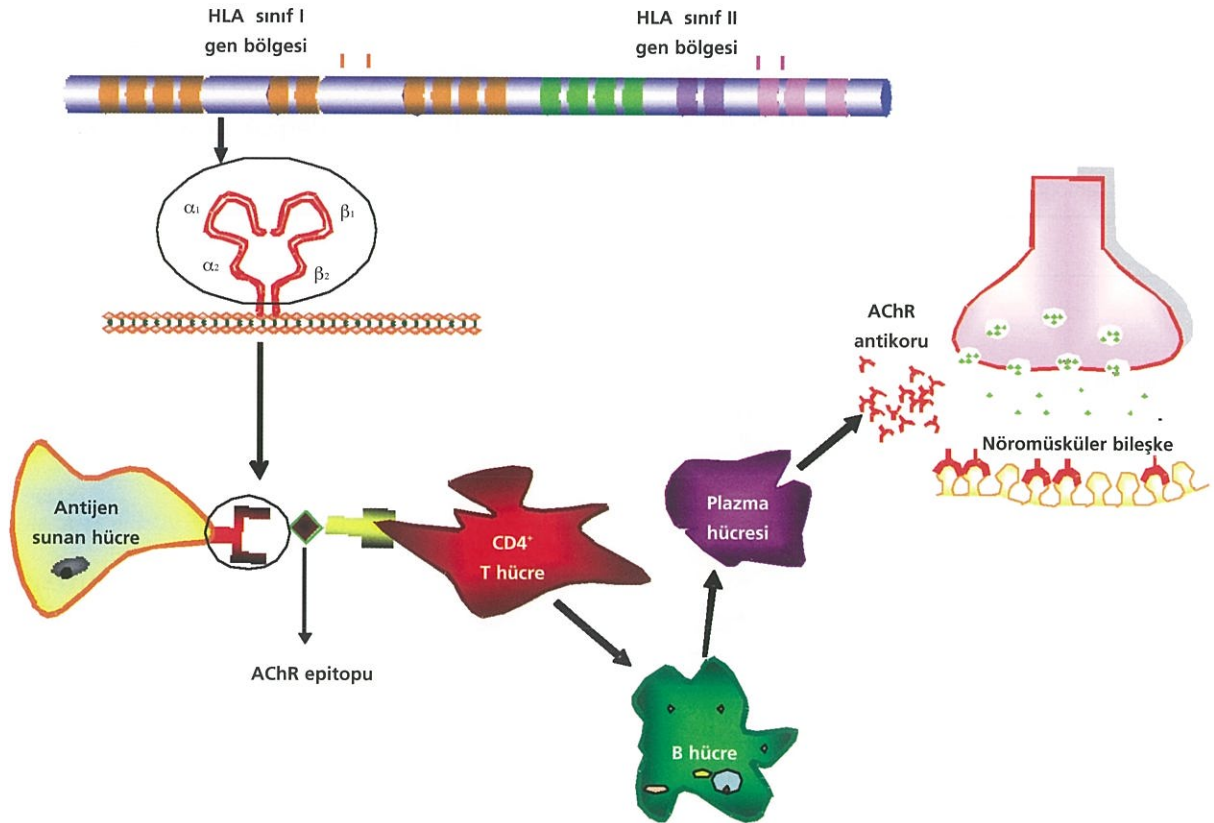
MG'de hastalığı başlatan faktör hastaların %90'ında belirlenememekte ise de, genetik bir yatkınlık olduğu ve çeşitli çevresel faktörlerin tetikleyici olduğu düşünülmektedir. MG genetik bir hastalık değildir, ancak bazı insan lökosit antijeni (HLA) tipleri ile birlikteliği olduğunu bildiren çalışmalar

yayınlanmıştır.<sup>2,3</sup> Özellikle sınıf II molekülleri AChR epitoplarının antikor oluşumunu kontrol eden CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücrelerine sunulmasını etkiler, bu nedenle HLA genlerinin MG'de antikor oluşumu ile ilgisi olduğu düşünülür (Şekil 1).<sup>4-9</sup>

Bu çalışmanın amacı AChR antikor varlığı ile HLA tipi arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

TCSB İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği Nöromusküler Hastalıklar Polikliniği'nde kayıtlı 103 MG hastası içinden 20 seronegatif hastamız olduğundan, seropozitif hastalar arasından örnekleme yöntemi ile 20 hasta seçildi. 40 MG hastası (28 kadın ve 12 erkek, ortalama yaş 46,2±16,8 [16-78]) ve 100 sağlıklı kontrol (44 kadın ve 56 erkek, ortalama yaş 37,4±13 [14-72]) çalışmaya alındı.



Şekil 1. Miyastenia graviste HLA ve AChR antikorları

MG tanısı klinik ve elektrofizyolojik kriterlere dayanılarak konuldu.<sup>1</sup> Hastalar Modifiye Osserman Sınıflamasına göre sınıflandı. <sup>10</sup> MG'nin 40 yaş altında başladığı hastalar erken başlangıçlı MG, MG'nin 40 yaş üzerinde başladığı hastalar geç başlangıçlı MG olarak gruplandı. Timus bezi radyolojik olarak görüntüledi. On sekiz hastada timektomi sonrası timus bezi histolojisi incelendi.

Doku tiplendirmesi için K<sub>3</sub>EDTA'lı tüpe 4 ml venöz kan alındı. Bu kandan Qiagen EZ 1 DNA Blood Kit (Qiagen Pty Ltd, Australia) kullanılarak DNA izole edildi. DNA örnekleri Olerup SSP™ DQ-DR SSP Combi Tray (Olerup SSP AB, Sweden) ile Corbett Research SSKT 011 Thermal Cycler kullanılarak amplifiye edildi. PCR ürünlerine agaroz jel elektroforez uygulandı. PCR ürünleri pozitif olan bantlar seçilerek SCORE 97 3-301 T programında değerlendirildi.

AChR antikor düzeyleri "Radio Immune Assay" yöntemi ile çalışıldı ve 0,4nM üzerindeki değerler pozitif olarak kabul edildi.

Seropozitif ve seronegatif MG gruplarının HLA genotip özellikleri SPSS 11,0 programı ile Pearson  $\chi^2$

testi ve Yates' düzeltmesi kullanılarak karşılaştırıldı. Odds oranı (OR) %95 güvenlik aralığı (%95 CI) ile hesaplandı.

## SONUÇLAR

Hastaların demografik özellikleri Tablo 1'de verildi.

Tüm MG hastaları sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında MG grubunda HLA A24, B51, DR7, DR17(3), DQ2, DQ5(1), DQ6(1), DQB1(02) genlerinin sıklığı anlamlı oranda yüksek ve HLA A24(9), B35, B52(5), BW6 ve DR4 genlerinin sıklığı anlamlı oranda düşüktü (p<0,05).

Sonuçlarımıza göre HLA CW6 ve B8 genotipleri seropozitif MG grubunda (sırasıyla p<0,05 ve p>0,05), HLA CW4 ve B35 genotipleri seronegatif MG grubunda (p<0,05) daha sıkı (Tablo 2).

## TARTIŞMA

MG ile HLA arasındaki ilişki 1970'lerin başlarında tanımlanmıştır. MG'nin ilk olarak HLA B8 ile, daha sonra da HLA A1, DR3 ve DW3 ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.<sup>11,12</sup> MG değişik irklarda farklı HLA tipleri

**Tablo 1.** Hastaların demografik özellikleri

	Seropozitif n	Seronegatif n	Toplam n (%)
<b>Cinsiyet</b>			
Kadın	12	16	28 (70)
Erkek	8	4	12 (30)
<b>Hastalık başlangıcında yaş</b>			
≤40	11	11	22 (55)
>40	9	9	18 (45)
<b>Klinik tip</b>			
Oküler	3	4	7 (17,5)
Jeneralize	17	16	33 (82,5)
<b>Modifiye Osserman Sınıflaması</b>			
I	3	4	7 (17,5)
IIa	8	10	18 (45)
IIb	9	4	13 (32,5)
III	0	0	0 (0)
IV	0	2	2 (5)
<b>Timik histoloji</b>			
Timektomi yapılmamış	11	11	22 (55)
Normal	4	4	8 (20)
Timik hiperplazi	5	4	9 (22,5)
Timoma	0	1	1 (2,5)

n: Hasta sayısı, %: Yüzde

**Tablo 2.** AChR antikor düzeyi ile anlamlı birliktelik gösteren HLA genotipleri

HLA	AChR Antikoru	p	p*	OR
B35	↓	0,018	0,048	
CW4	↓	0,008	0,023	
CW6	↑	0,013	0,034	3,1
B8	↑	0,037	0,096	5,7

\*: Düzeltilmiş p değerleri, ↓: Seronegatiflik ile ilişkili HLA genotipi, ↑: Seropozitiflik ile ilişkili HLA genotipi

ile ilişkili bulunmuştur.<sup>1</sup> Çin’de jeneralize MG’nin HLA BW46 ile ilişkisi bildirilmiştir.<sup>13</sup> Amerikalı zencilerde MG’nin HLA A1 ve B8 ile anlamlı ilişkisi olduğu saptanmıştır.<sup>14</sup> HLA B8 birlikteliği Amerikalılarda, Afrikalılarda ve Kafkasyalılarda daha fazladır.<sup>15,16</sup> HLA A1, B8 ve DR3 insidansı Kafkasyalı erken başlangıçlı MG hastalarında yüksektir.<sup>17</sup> Avrupalı Kafkasyalılarda MG’nin HLA B8 ve DR3 ile birlikteliği bilinmektedir.<sup>14,18</sup> Bilgen ve arkadaşlarının Türk toplumunda yaptığı 56 hastalık çalışmada HLA A28 ve B8 MG grubunda sağlıklı kontrollere oranla daha sık bulunmuştur.<sup>19</sup> Dönmez ve arkadaşlarının araştırmasında MG ile HLA DR3, B8, A1 ve A2 arasında ilişki saptanmıştır.<sup>20</sup> Akalın ve arkadaşları, Türk MG hastalarında HLA B38(16), DR1, DQ2, DQ7(3)’ün sağlıklı kontrollere göre anlamlı ölçüde yüksek bulunduğunu, ancak düzeltilmiş p değeri kullanıldığında bu anlamlılığın kaybolduğunu bildirmişlerdir.<sup>21</sup> Bu çalışmalar MG’nin bazı HLA tipleri ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir. Ancak birlikteliğin zayıflığı, etnik gruplar ve MG’nin klinik tipleri arasındaki farklılıklar nedeni ile MG’nin özgün bir HLA genotipi ile birlikteliği olduğunu söylemek hala zordur.<sup>14</sup>

Bizim çalışmamızda MG hastaları sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında MG grubunda HLA A24, B51, DR7, DR17(3), DQ2, DQ5(1), DQ6(1), DQB1(02) genlerinin sıklığı anlamlı oranda yüksek ve HLA A24(9), B35, B52(5), BW6 ve DR4 genlerinin sıklığı anlamlı oranda düşük bulunmuştur. HLA A24 ve B51 MG ile en güçlü birlikteliği göstermişlerdir. HLA A24 ve B51’in MG ile birlikteliği daha önceki çalışmalarda görülmemiş, ancak MG grubumuzda anlamlı derecede sık olan HLA DQ2 Akalın ve arkadaşlarının çalışmasında da MG ile ilişkili bulunmuştur.<sup>21</sup> Daha önce MG’nin sınıf II HLA genleri ile birlikteliği bildirilmiş ve bu birlikteliğin HLA DR’ye göre HLA DQ

için daha güçlü olduğu öne sürülmüştür.<sup>22,23,24</sup> Bizim çalışmamızda da DQ2, DQ5(1), DQ6(1), DQB1(02) allelleri MG grubunda kontrol grubundan daha sıklıkla

Çalışmamızda seronegatif ve seropozitif MG gruplarında HLA dağılımları incelenmiş ve sonuçlar Tablo 2’de gösterilmiştir. HLA genotipleri ile AChR antikoru arasındaki ilişkiyle ilgili yayınlanmış çalışmaların sonuçları Tablo 3’te sunulmuştur.<sup>13,15,18,20,25-31</sup> Bu çalışmalarda 8,1 ankestral haplotip adı da verilen HLA-A1-B8-DR3 haplotipi ve HLA DQ yüksek AChR antikoru düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur. Türk toplumunda ankestral haplotipin parçası olan HLA DR3’ün ve HLA DQ grubundan bazı allellerin MG’de seropozitiflik ile birlikteliği bildirilmiştir.<sup>20,31</sup> Çalışmamızda HLA CW6 seropozitif MG grubunda sık bulunmuştur. HLA B8 AChR antikoru pozitifliği ile anlamlı düzeyde birliktedir, ancak Yates’ düzeltmesi yapıldığında bu istatistiksel anlamlılık yok olmuştur (p>0,05). Çalışmamızdaki HLA B8 haplotipinin seropozitif MG ile birlikteliği daha önceki çalışmaların sonuçları ile uyumludur, ancak HLA CW6 birlikteliği daha önce bildirilmemiştir. HLA CW6 ile ilgili bu farklılık çalışma grubumuzun küçüklüğünden ve etnik faktörlerden kaynaklanıyor olabilir.

**Tablo 3.** AChR antikoru ile HLA genotipi arasındaki ilişki ile ilgili çalışma sonuçları

HLA	Referans Numarası
HLA B8 ve DRw3	25
HLA B8	26
HLA B8	15
HLA Bw46	13
HLA DRw8	18
HLA B8 ve DR3	27
HLA Bw46 ve Cx46	28
HLA-DR52a (DRB3*0101)	29
HLA DR3	20
HLA DQ ve A1B8DR3	30
HLA DQ A3 ve DQ B1(0302)	31

HLA genleri ile AChR antikoru arasındaki ilişki AChR antikorunun üretimini bloke etmeyi amaçlayan tedavi stratejileri açısından değerlidir ve yeni çalışmalarla bu ilişkinin araştırılması gerekmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. Vincent A, Palace J, Jones DH. Myasthenia gravis. *Lancet* 2001;357:2122-2128.
2. Lewis RA, Selwa JF, Lisak RP. Myasthenia gravis: Immunological mechanisms and immunotherapy. *Ann Neurol* 1995;37:51.
3. Conti-Fine BM, Diethelm-Okita B, Ostlie N, Wang W, Milani M. Immunopathogenesis of myasthenia gravis. In *Myasthenia Gravis and Related Disorders* (ed: Kaminski HJ). Humana Press New Jersey 1997 p:53.
4. Klein J, Sato A. The HLA system: First of two parts. *NEJM* 2000;343(10):702-710.
5. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 1993;11:403-450.
6. Nishimura Y, Oiso M, Fujisao S, Kanai T, Kira J, Chen YZ, Matsushita S. Peptide-based molecular analyses of HLA class II associated susceptibility to autoimmune disease. *Int Rev Immunol* 1988;17:229.
7. Lindstrom JM. Acetylcholine receptor structure. In *Myasthenia Gravis and Related Disorders* (ed: Kaminski HJ). Humana Press New Jersey 1997 p:32.
8. Hohlfeld R, Wekerle H. The Immunopathogenesis of myasthenia gravis. In *Myasthenia Gravis and Myasthenic Disorders* (ed: Engel A) Contemporary Neurology Series, vol. 56 New York, Oxford University Press, 1999, p:87-110.
9. Raju R, Spack E, David C. Acetylcholine receptor peptide recognition in HLA DR3 transgenic mice: in vivo response correlate with MHC peptide binding. *J Immunol* 2001;167:1118-1124.
10. Osserman KE, Genkins G. Studies in myasthenia gravis: Review of a twenty-year experience in over 1200 patients. *Mt Sinai J Med* 1971;38:497.
11. Gross WL, Kruger J, Stewart U, Hackell U, Kunze K. Immunoreactivity, HLA antigen frequencies and clinical disease course of myasthenia gravis. *Verh Dtsch Ges Inn Med* 1975;81:1178-1181.
12. Hammarstrom L, Smith E, Moller E, Franksson C, Matell G, Von Reis G. Myasthenia Gravis: Studies on HLA antigens and lymphocyte subpopulations in patients with myasthenia gravis. *Clin Exp Immunol* 1975;21(2):202-215.
13. Hawkins BR, Ip MS, Lam KS, Ma JT, Wy CL, Yeung RT, Dawkins RL. HLA antigens and acetylcholine receptor antibody in the subclassification of myasthenia gravis in Hong Kong Chinese. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986;49(3):316-319.
14. Christiansen FT, Pollack MS, Garlepp MJ, Dawkins RL. Myasthenia gravis and HLA antigens in American blacks and other races. *J Neuroimmunol* 1984;7(2-3):121-129.
15. Keeseey J, Naiem F, Lindstrom J, Roe D, Herrmann C, Walford R. Acetylcholine receptor antibody titer and HLA B8 antigen in myasthenia gravis. *Arch Neurol* 1982;39(2):73-77.
16. Compston DAS, Vincent A, Newsom-Davis J, Batchelor JR. Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain* 1980;103:579-601.
17. Ong B, Willcox N, Wordsworth P, et al. Critical role for the val<sup>66</sup> HLA DR  $\beta$  dimorphism in autoantigen presentation to human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7343-7347.
18. Kida K, Hayashi M, Yamada I, Matsuda H, Yoshinaga J, Takami S, Yashiki S, Sonoda S. Heterogeneity in myasthenia gravis: HLA phenotypes and autoantibody responses in ocular and generalized types. *Ann Neurol* 1987;21(3):274-278.
19. Bilgen H, Özdemir C, Serdaroğlu P, Deymeer F, Sönmez G, Çarın M. HLA antigens in myasthenia gravis. 1<sup>st</sup> Turkish National Congress of Neurology, Congress Book 1988 (15-18 October) p: 428-432.
20. Dönmez B, Özakbaş S, Öktem MA, Gedizlioğlu M, Çoker I, Genç E, İdman E. HLA genotypes in Turkish patients with myasthenia Gravis: Comparison with multiple sclerosis patients on the basis of clinical subtypes and demographic features. *Human Immunology* 2004;65:752-757.
21. Akalin MA, Altıntaş A, Yılmaz E, Erkol G, Erdoğan E, Baslo P. HLA phenotypes in myasthenia gravis. *Cerrahpaşa J Med* 2000;31(3):134-139.
22. Raju R, Zhan WZ, Karachunski P, Conti-Fine B, Sieck G, David C. Polymorphism at the HLA-DQ locus determines susceptibility to experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Neuroimmunol* 1998;160:4169.
23. Saruhan-Direskeneli G, Uyar FA, Bakar S, Eraksoy M: Molecular analysis of HLA- DRB1, -DQA1 and -DQB1 polymorphism in Turkey. *Tissue Antigens* 2000;55:171.
24. Conti-Fine BM, Protti MP, Bellone M, Howard JF. Genetic factors influencing the susceptibility to myasthenia gravis and experimental autoimmune myasthenia gravis. In *Myasthenia Gravis: The immunobiology of an autoimmune disease* (ed: Conti-Fine BM). Landes Bioscience 1997.
25. Naeim F, Keeseey JC, Herrmann C Jr, et al. Association of HLA B8, DRw3, and anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. *Tissue Antigens* 1978;12:381-386.
26. Keeseey J, Naeim F, Lindstrom J, Zeller E, Herrmann C, Walford R. Correlation between acetylcholine receptor antibody titer and HLA B8 and HLA Drw3 antigens in myasthenia gravis. *Trans Am Neurol Assoc* 1978;103:188-190.
27. Matej H, Nowakowska B, Kalamarz M et al. HLA antigens and susceptibility to myasthenia gravis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1987;35:795-801.
28. Xu W. HLA and acetylcholine receptor antibody in patients with myasthenia gravis. *Zhonghua Shen Jing Jing Shen Ke Za Zhi* 1992;25(3):150-153.
29. Hill M, Beeson D, Moss P, DPhil, Jacobson L, Bond A, Corlett L, Newsom-Davis J, Vincent A, Willcox N. Early-Onset myasthenia gravis: A recurring T-cell epitope in the adult-specific acetylcholine receptor  $\epsilon$  subunit presented by the susceptibility allele HLA-DR52a. *Ann Neurol* 1999;45:224-231.
30. Giraud M, Beaurain G, Eymard B, Tranchant C, Gajdos P and Garchon HJ. Genetic control of autoantibody expression in autoimmune myasthenia gravis: role of the self-antigen and of HLA-linked loci. *Genes and Immunity* 2004;5:398-404.
31. Saruhan-Direskeneli G, Kiliç A, Parman Y, Serdaroğlu P, Deymeer F. HLA-DQ Polymorphism in Turkish patients with myasthenia gravis. *Human Immunology* 2006;67:352-358.