

Universitatea de Medicina și Farmacie “Carol Davila” București

Facultatea de Medicină

Disciplina de Fiziopatologie și Imunologie

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**ASPECTE DE IMUNOGENETICĂ ÎN
SPONDILOARTRITELE SERONEGATIVE**

Conducător științific:

Prof. Dr. Constantin Bâră

Doctorand:

Laura Ioana Cherciu

BUCUREȘTI – 2016

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

A.	PARTEA I – PARTEA GENERALĂ	5
	INTRODUCERE	5
1.	SPONDILOARTRITELE SERONEGATIVE	8
1.1.	CRITERII DE CLASIFICARE	9
1.2.	EPIDEMIOLOGIE	13
1.3.	ETIOPATOGENIE	15
1.4.	TABLOUL CLINIC	20
1.4.1.	SPONDILITA ANCHILOZANTĂ	20
1.4.2.	ARTRITA PSORIAZICĂ	26
1.4.3.	ARTRITA REACTIVĂ	28
1.4.4.	ARTRITA DIN BOLILE INFLAMATORII INTESTINALE	30
1.4.5.	SPONDILOARTRITA JUVENILĂ	32
1.4.6.	SPONDILOARTRITA NEDIFERENȚIATĂ	34
1.5.	EXPLORĂRI PARACLINICE	35
1.5.1.	TESTE DE LABORATOR	35
1.5.2.	EXAMENE IMAGISTICE	36
1.6.	TRATAMENTUL ÎN SASN	40
1.6.1.	TRATAMENTUL SPONDILITEI ANCHILOZANTE	40
1.6.2.	TRATAMENTUL ARTRITEI PSORIAZICE	44
1.6.3.	TRATAMENTUL ARTRITEI REACTIVE	45
1.6.4.	TRATAMENTUL ARTRITEI ASOCIATĂ CU BII	46
1.6.5.	TRATAMENTUL SAND	47
2.	AMINOPEPTIDAZA RETICULULUI ENDOPLASMATIC 2	48
2.1.	INTRODUCERE	48
2.2.	FUNȚIILE ERAP2	51
2.3.	STRUCTURA ERAP2	55
3.	INTERLEUCHINA-1A	59
3.1.	FAMILIA INTERLEUCHINELOR (IL) 1	59
3.2.	IL-1A – FUNȚII, RECEPTORI, SEMNALE INTRACELULARE	62
4.	GENELE RECEPTORILOR IMUNOGLOBULIN-LIKE AI CELULELOR NATURAL KILLER (KIR)	66
4.1.	CELULELE NATURAL KILLER (NK)	66
4.2.	KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS (KIR)	69
4.3.	GENELE KIR ȘI SPONDILOARTRITELE SERONEGATIVE	73
B.	PARTEA A II-A – PARTEA SPECIALĂ	75
5.	OBIECTIVE	75
6.	BAZA DE DATE	77
6.1.	COLECȚIA DE ADN	78

6.2.	GENOTIPAREA HLA-B27	89
7.	ASOCIEREA POLIMORFISMELOR GENEI ERAP2 CU SPONDILOARTRITELE SERONEGATIVE LA PACIENȚII HLA-B27 NEGATIVI	96
7.1.	INTRODUCERE	96
7.2.	MATERIALE ȘI METODE	100
7.2.1.	LOTURILE DE PACIENȚI ȘI DE MARTORI	100
7.2.2.	GENOTIPAREA HLA-B27	102
7.2.3.	GENOTIPAREA POLIMORFISMELOR GENEI ERAP2	103
7.3.	ANALIZA STATISTICĂ	107
7.4.	REZULTATE	109
7.5.	DISCUȚII ȘI CONCLUZII	122
8.	POLIMORFISMELE GENEI IL1A LA PACIENȚII ROMÂNI CU SPONDILOARTRITE SERONEGATIVE	125
8.1.	INTRODUCERE	125
8.2.	MATERIALE ȘI METODE	128
8.2.1.	LOTURILE DE PACIENȚI ȘI DE MARTORI	128
8.2.2.	GENOTIPAREA POLIMORFISMELOR GENEI IL1A	130
8.3.	ANALIZA STATISTICĂ	134
8.4.	REZULTATE	135
8.5.	DISCUȚII ȘI CONCLUZII	142
9.	ALELELE KIR3DL1/KIR3DS1 INFLUENȚEAZĂ RISCUL DE SPONDILITĂ ANCHILOZANTĂ LA INDIVIZII HLA-B27 POZITIVI	145
9.1.	INTRODUCERE	145
9.2.	MATERIALE ȘI METODE	148
9.2.1.	LOTURILE DE PACIENȚI ȘI DE MARTORI	148
9.2.2.	SISTEMUL PCR-SSOP DE IDENTIFICARE A GENELOR KIR	149
9.3.	ANALIZA STATISTICĂ	154
9.4.	REZULTATE	155
9.5.	DISCUȚII ȘI CONCLUZII	158
	CONCLUZII	163
	REFERINȚE	167
	ANEXA I: LISTA TABELELOR ȘI FIGURILOR	I
	ANEXA II: LISTA LUCRĂRILOR PERSONALE	VIII
	ANEXA III: PUBLICAȚIILE PERSONALE	X
A.	INTERLEUKIN 1A GENE POLYMORPHISMS IN ROMANIAN PATIENTS WITH SERONEGATIVE SPONDYLOARTHROPATHIES.....	X
B.	THE ASSOCIATION OF ERAP2 GENE POLYMORPHISMS WITH SERONEGATIVE SPONDYLOARTHROPATHIES IN HLA-B27 NEGATIVE ROMANIANS.....	XVIII
C.	KILLER CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS GENES IN SERONEGATIVE SPONDYLOARTHROPATHIES.....	XXVIII

INTRODUCERE

De la lansarea Proiectului Genomului Uman (Human Genome Project) au trecut mai bine de 25 de ani. La finalizarea acestui eveniment remarcabil în istoria medicinei, în aprilie 2013, autorii proiectului afirmau că era genomică a devenit realitate (1); o eră genomică ce a permis identificarea cu ușurință a genelor responsabile pentru transmiterea bolilor genetice mendeliene, dar, poate mai important, o eră genomică în care elucidarea modului în care sunt organizate rețelele genice și proteice, stabilirea modului în care acestea contribuie la fenotipul microscopic (celular) sau macroscopic, este un obiectiv realizabil.

Astfel, în ultimii 10 ani o parte consistentă a cercetării științifice s-a dedicat identificării contribuției genetice în bolile considerate comune (cardiovasculare, metabolice, reumatice). Descifrarea factorului genetic pentru aceste boli, în care factorii de mediu sau de comportament au propria lor contribuție, nu este deloc ușoară: definirea unui genotip și fenotip valid biologic, cuantificarea expunerii la factorii non-genetici (de mediu sau de comportament), sunt doar câteva dintre probleme (1).

Cu toate acestea, proiecte ca HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/whatishapmap.html>) sau 1000 Genomes Project (2) au realizat o hartă a variantelor genetice comune și a variațiilor lor în diverse populații ale lumii. Ele oferă cercetătorilor informația necesară pentru a realiza conexiuni între diverse variante genetice și riscul de a dezvolta o anumită boală. De exemplu, 1000 Genomes Project a reconstruit genomul a peste 2 500 de indivizi din 26 de populații, identificând 84,7 milioane de polimorfisme mononucleotidice (single nucleotide polymorphisms – SNPs) (2).

Un polimorfism mononucleotidic reprezintă forma cea mai simplă de variație a ADN-ului genomic într-o populație, constând în variația unei singure perechi de baze (adenină-timină sau citozină-guanină) într-un anumit locus al secvenței ADN, cu condiția ca fiecare variantă alelică (genică) să aibă frecvența de minim 1% în acea populație (3). Alela sau varianta genică cu frecvența mai ridicată poartă denumirea de alela majoră, comună sau wild type, în timp ce alela cu frecvența mai scăzută poartă denumirea de alelă minoră sau variantă.

Identificarea inter-relației funcționale ce guvernează multiplele susceptibilități genetice ale unei boli multifactoriale oferă noi perspective etiopatogenice ce pot duce la o înțelegere mai exactă a mecanismelor care stau la baza ei. Însă nu numai variante genice implicate în susceptibilitatea de boală pot fi identificate. Descoperirea de variante alelice care influențează răspunsul la tratament (atât în privința succesului terapeutic, dar și al posibilelor reacții adverse) este un alt domeniu de cercetare foarte actual pe măsură ce medicina personalizată și farmacogenomica capătă din ce în ce mai multă importanță în medicina modernă (3).

Detectarea precoce a bolii poate fi un alt beneficiu rezultat din studiile genetice, dacă este identificat un profil biologic molecular al stadiilor precoce bazat pe analiza expresiei genice și proteice (1).

Genomica oferă posibilitatea unei înțelegeri mai exacte a căilor biologice/moleculare și, în ultimă instanță, a fiziopatologiei unei boli multi-genice, lucru ce deja contribuie la modul în care noile strategii terapeutice pentru o anumită boală sunt formulate. Ținte moleculare precise pot fi atinse acum cu ajutorul anticorpilor monoclonali, ce și-au dovedit eficacitatea în multiple boli autoimune sau în cancer. Dezvoltarea de teste genetice pentru depistarea predispoziției de boală este un alt beneficiu al studiilor genetice. Forma de boală, severitatea sau prognosticul ei pot avea o cheie genetică care se poate dovedi o informație utilă pentru medici în abordarea strategiilor terapeutice individualizate pentru fiecare pacient (3).

Spondiloartritele seronegative (SASN) sunt un grup de boli reumatice inflamatorii care prezintă similarități clinice dar și genetice, asocierea cu HLA-B27 fiind cea mai cunoscută dintre ele (4). De altfel, determinarea antigenului HLA-B27 este una dintre investigațiile paraclinice utile în diagnosticul acestui grup de boli. Deși considerate boli multi/oligogenice de mai mult timp (5), doar în ultimii 10 ani gene din afara complexului major de histocompatibilitate (CMH) au fost identificate ca fiind asociate cu boli aparținând acestui grup, în special cu spondilita anchilozantă (6, 7).

Această teza de doctorat și-a propus identificarea particularităților genetice ale spondiloartritelor seronegative la pacienții din România. În două studii caz-control au fost analizate mai multe polimorfisme mononucleotidice aparținând genelor *ERAP2* și *IL1A* la pacienți cu spondiloartrită seronegativă, un al treilea studiu investigând alelele *KIR3DL1/KIR3DS1* la pacienții HLA-B27 pozitivi cu spondilită anchilozantă (SA). Toate cele trei studii de asociere genetică au analizat gene a căror contribuție la riscul de spondiloartrită seronegativă și spondilită anchilozantă nu a mai fost cercetată în România.

OBIECTIVE

Așa cum reiese și din titlul acestei teze de doctorat, obiectivul propus a fost identificarea câtorva aspecte importante ce formează profilul imunogenetic al pacienților cu spondiloartrită seronegativă și în special al celor cu spondilită anchilozantă și artrită psoriazică, știut fiind faptul că aceste două patologii formează cel mai important contingent al pacienților cu SASN. Elementele imunogenetice urmărite constituie o premieră pentru populația noastră, ele nemaifiind investigate în România la pacienți cu SASN, SA sau artrită psoriazică (AP).

Numărul total de subiecți ce au fost incluși în studiile ce compun această lucrare a fost de 464, distribuiți după cum urmează: 271 pacienți ce au respectat criteriile de clasificare pentru SASN, dintre care: 158 pacienți diagnosticați cu SA, 100 pacienți diagnosticați cu AP, 13 pacienți diagnosticați cu spondiloartrită nediferențiată (SAND) și 193 martori sănătoși. La aceste loturi extinse de pacienți și de martori au fost investigate în două studii de asociere genetică de tip caz-control câteva polimorfisme mononucleotidice ale genelor *ERAP2* și respectiv *IL1A* în relație cu riscul de spondiloartrită seronegativă. Pentru două loturi mai reduse de pacienți și de martori a fost analizat impactul genelor *KIR* asupra riscului de SA.

Studiile din componența acestei teze de doctorat sunt:

- **ASOCIEREA POLIMORFISMELOR GENEI *ERAP2* CU SPONDILOARTRITELE SERONEGATIVE LA PACIENȚII HLA B27 NEGATIVI**
- **POLIMORFISMELE GENEI *IL1A* LA PACIENȚII ROMÂNI CU SPONDILOARTRITE SERONEGATIVE**
- **ALELELE *KIR3DL1/KIR3DS1* INFLUENȚEAZĂ RISCUL DE SPONDILITĂ ANCHILOZANTĂ LA INDIVIZII HLA-B27 POZITIVI**

O cercetare de asemenea anvergură a fost posibilă doar cu sprijinul unor instituții naționale (UMF "Carol Davila," București – Disciplina de Imunologie și Fiziopatologie din cadrul Facultății de Medicină, Spitalul "Dr. I. Cantacuzino", București – Departamentul de Reumatologie și Medicină Internă, Spitalul "Sfânta Maria", București – Departamentul de Reumatologie și Medicină Internă, Institutul Național de Transfuzii Sanguine "Prof. Dr. C.T. NICOLAU", București – Laboratorul HLA, Muzeul Național de Istorie Naturală "Grigore Antipa" București) și internaționale (Spitalul Municipal din Belfast, Irlanda de Nord – Laboratorul de Imunogenetică și Histocompatibilitate). Participarea cu lucrări de specialitate la conferințe și congrese internaționale, dar și publicarea în reviste naționale indexate în baze de date internaționale (CNCSIS B+) a asigurat diseminarea rezultatelor cercetării.

BAZA DE DATE, COLECȚIA DE ADN, GENOTIPAREA HLA-B27

Pacienții care au luat parte la cele trei studii care constituie teza de doctorat au fost internați și diagnosticați cu patologii de interes în două Clinici de Medicină Internă și Reumatologie din cadrul Spitalelor „Dr. I.C. Cantacuzino” și „Sfânta Maria”, din București între 2006 și 2015. Pentru a putea fi recrutați în studiu a fost nevoie ca pacienții cu SASN să îndeplinească criteriile ESSG (8) și respectiv criteriile ASAS pentru formele axiale și periferice de SASN (9-11), pentru pacienții admiși după anul 2011. Totodată, pacienții diagnosticați cu SA au respectat criteriile New York modificate 1984 (12) în timp ce pacienții cu AP au trebuit să îndeplinească criteriile CASPAR (13) pentru a fi admiși în studiu. Diagnosticul de spondiloartrită nediferențiată a fost susținut dacă pacienții au îndeplinit criteriile ESSG, respectiv ASAS pentru formele axiale și periferice de boală, dar nu au întrunit criteriile de clasificare specificate anterior pentru SA sau AP sau cele pentru artrită reactivă sau spondiloartrită asociată bolilor inflamatorii intestinale.

Subiecții ce au constituit lotul martor au fost selectați dintre potențialii donatori de măduvă osoasă hematogenă înregistrați de Institutului National de Transfuzii Sanguine „Prof. Dr. C. T. Nicolau”, București, fiind indivizi sănătoși fără antecedente personale de SASN. Toți participanții (pacienți, martori sănătoși) au semnat un formular de consimțământ informat, studiile având acordul comisiilor locale de etică.

Unul din cele două kituri comerciale, mi-Blood Genomic DNA Isolation Kit - Metabion, Germany și QIAamp DNA Blood Mini Kit Qiagen, Germany a fost utilizat pentru extracția ADN urmând protocolul specific fiecărui kit. Concentrația și puritatea ADN-ului genomic extras a fost evaluată cu ajutorul spectrofotometrului NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA).

Genotiparea HLA-B27 a fost realizată pentru 175 martori sănătoși (rata de genotipare = 90,67%), 158 pacienți cu SA (rata de genotipare 100%), 99 pacienți cu AP (99% rata de genotipare) și 13 pacienți cu SAND (100% rata de genotipare). Metoda utilizată a fost reacția de polimerizare în lanț cu primeri specifici secvenței (PCR-SSP: polymerase chain reaction with sequence specific primers) folosind două kituri comerciale: kitul HLA-B27-SSP low resolution (Olerup, Sweden) sau kitul AllSetTM Gold SSP B27 Low-Resolution Kit (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA).

ASOCIEREA POLIMORFISMELOR GENEI *ERAP2* CU SPONDILOARTRITELE SERONEGATIVE LA PACIENTII HLA-B27 NEGATIVI

INTRODUCERE

Spondiloartritele seronegative sunt boli inflamatorii reumatismale înrudite, a căror etiopatogenie complexă a început să fie elucidată în ultimii ani, pe măsură ce, din ce în ce mai multe studii de asociere genetică au identificat noi posibile gene candidat responsabile de influența riscului de boală. Spondiloartritele seronegative cuprind un nucleu central format din spondilita anchilozantă și artrita psoriazică cărora li se adaugă artrita reactivă, artrita asociată cu bolile inflamatorii intestinale, spondiloartrita juvenilă, uveita acută anterioară și spondiloartrita nediferențiată (14).

Tot mai multe studii recente de asociere genetică au început să identifice gene non-MHC care influențează riscul de a dezvolta spondiloartrite. Polimorfisme mononucleotidice aparținând genelor *ERAP1* și *IL-23R* (7, 15, 16) au fost raportate ca asociate cu SA și SASN de către studii de tip asociere genetică largă GWAS (Genome Wide Association Study). În prezent se consideră că gena *ERAP1* contribuie cel mai mult la suspiciunea de SA, după HLA-B27, având un risc atribuit de 26% (17). Însă asocierea *ERAP1* cu SA și cu SASN este strict limitată la indivizii HLA-B27 pozitivi (16, 18), fapt ce sugerează cooperarea moleculelor codificate de aceste gene în etiopatogenia SA.

Deși mai puțin studiată, există indicii că gena *ERAP2*, care codifică o altă aminopeptidază din reticulul endoplasmatic cu funcție similară și în același timp complementară *ERAP1*, se asociază cu SA. Încă din 2010 Tsui *et al.* identifică o combinație haplotipică a trei polimorfisme (rs27044[G] rs30187[T] rs2549782[T]), primele două aparținând genei *ERAP1* și ultimul aparținând genei *ERAP2*, ca fiind asociată cu SA familială (19). Un studiu foarte recent a raportat asocierea genei *ERAP2* cu spondilita anchilozantă la pacienții HLA-B27 pozitivi și negativi (20).

Obiectivul acestui studiu a fost investigarea a două polimorfisme mononucleotidice (rs2910686 și rs2248374) aparținând genei *ERAP2* în relație cu riscul de boală la pacienții români cu spondiloartrite seronegative.

MATERIALE ȘI METODE

Studiul de tip caz-control a inclus 139 martori sănătoși și 192 de pacienți cu spondiloartrită seronegativă, dintre care 80 pacienți SA, 99 pacienți AP și 13 pacienți SAND.

Lotul de martori sănătoși a fost compus din subiecți etnici români potențiali donatori de măduvă osoasă hematogenă aflați în evidența Institutului Național de Transfuzii Sanguine "Prof. Dr. C.T. NICOLAU", București. În lotul martor vârsta medie a fost 37,8 ani, cea mediană de 35,5 ani, iar raportul bărbați : femei = 71 : 68. Pacienții recrutați în acest studiu au fost diagnosticați în Departamentele de Reumatologie și Medicină Internă ale Spitalelor "Dr. I. Cantacuzino" și "Sfânta Maria" din București.

Cele două polimorfisme ale genei *ERAP2* (rs2248374 și rs2910686) au fost genotipate prin metoda RT-PCR ale cărei principii sunt descrise în capitolul următor. Kiturile comerciale TaqMan® Allelic Discrimination Assays (C__25649529_10 și C__26382310_10) au fost folosite pentru genotipare, în conformitate cu protocolul oferit de producător (Thermo Fisher Scientific Inc, Applied Biosystems™, Foster City, MA, USA) cu mici modificări.

Ambele polimorfisme localizate în introni au fost genotipate pentru toți participanții la studiu cu excepția unui pacient cu AP pentru care genotiparea polimorfismului rs2910686 nu a fost posibilă.

ANALIZA STATISTICĂ

Echilibrul Hardy-Weinberg (HWE) a fost evaluat cu ajutorul testului Pearson's chi-squared (Testul χ^2 - chi pătrat) și a testului Exact Fisher. Pachetul software PLINK 1.9 (21) a fost folosit pentru calculul statistic al celor două teste (testul χ^2 și testul Exact Fisher) folosite în evaluarea HWE. Estimarea haplotipurilor (combinațiile alelice posibile dintre cele două SNP studiate) s-a realizat cu programul software PLINK 1.9, iar testele de asociere dintre frecvențele haplotipice din loturile de pacienți și cele din loturile martor s-au realizat cu ajutorul testului testul Pearson's chi-squared folosind același program software PLINK 1.9 (21).

Au fost comparate frecvențele alelice și frecvențele genotipurilor pentru fiecare polimorfism investigat între loturile martor și loturile de pacienți. Asocierea statistică a fost evaluată cu ajutorul testului Exact Fisher. Estimarea linkage disequilibrium (LD) prin calcularea coeficientului r^2 , ce exprimă gradul de corelație dintre cele două perechi de loci s-a realizat de asemenea ajutorul programului PLINK 1.9.

REZULTATE

Atât lotul general de martori sănătoși cât și sublotul martorilor HLA-B27 negativi au fost în echilibru Hardy-Weinberg pentru ambele polimorfisme mononucleotidice studiate. HWE s-a menținut de asemenea pentru toate loturile și subloturile de pacienți atât pentru polimorfismul rs2248374 cât și pentru rs2910686. În urma estimării LD în lotul martorilor sănătoși a fost observată o tendință moderat-semnificativă de transmitere împreună a celor două alele ale polimorfismelor situate pe loci învecinați, valoarea r^2 fiind 0,67.

Într-o primă analiză a datelor obținute am comparat frecvențele alelice și cele ale genotipurilor între lotul general al martorilor sănătoși și lotul general de pacienți cu spondiloartrită seronegativă. Singura asociere marginală observată ($p = 0,08$) a fost pentru purtătorii alelei minore A aparținând polimorfismului rs2248374 (genotipurile AA și AG), care au fost mai numeroși în lotul pacienților SASN (77,6%) comparativ cu cel al martorilor (69%).

Când am comparat sublotul pacienților SA cu lotul martor general s-a observat frecvența alelei minore A (polimorfismul rs2248374) aproape identică în cele două loturi (45,6% în lotul SA și 45,7% în lotul martor), valoarea p fiind apropiată de 1 ($p = 0,99$). Frecvența alelei minore C (polimorfismul rs2910686) este 38,7% în lotul pacienților cu SA și 37,4% în lotul martor ($p = 0,78$). Frecvențele genotipurilor urmează același trend, de exemplu, pentru polimorfismul 2248374 frecvența genotipului GG (alela majoră) este 30% în lotul pacienților cu SA și 31% în lotul martor.

Rezultatele devin mai interesante însă, când analiza implică subloturi de pacienți fie complet, fie predominant HLA-B27 negativi.

Astfel, analizând lotul de pacienți cu artrită psoriazică, în care proporția de indivizi HLA-B27 negativi este 79,8%, s-au observat diferențe apreciable în frecvențele alelice și în distribuția genotipurilor pentru ambele polimorfisme. Valorile p sunt semnificative statistic pentru polimorfismul rs2248374 atât în ceea ce privește frecvența alelei minore A ($p = 0,04$), cât și pentru purtătorii alelei minore (genotipurile AA și AG) care au un risc mai mare de a dezvolta boala ($p = 0,02$). Pentru cel de-al doilea polimorfism (rs2910686), purtătorii alelei majore (genotipurile TT și CT), sunt mai numeroși în lotul martor (87,8%) decât în lotul pacienților cu AP (77,6%), diferență ce este semnificativă statistic ($p = 0,03$).

Asocieri, chiar mai puternice decât cele prezentate, sunt observate în sublotul de pacienți HLA-B27 negativi cu artrită psoriazică în comparație cu sublotul martorilor HLA-B27

negativi, confirmând asocierea polimorfismului rs2248374 cu AP la indivizii HLA-B27 negativi ($p = 0,02$) și a polimorfismului rs2910686 ($p = 0,03$). De asemenea, purtătorii alelei minore (genotipurile AA și AG) ce aparține polimorfismului rs2248374 prezintă un risc crescut de a dezvolta boala ($p = 0,02$). Pentru cel de-al doilea polimorfism, frecvența genotipurilor TT+CT (purtătorii alelei majore) este semnificativ scăzută în lotul pacienților HLA-B27 negativi cu AP (76,9%) comparativ cu cea din în lotul martorilor HLA-B27 negativi (89%), sugerând un efect protector al acestei alele.

Cele mai puternice asocieri de până acum au fost obținute pentru polimorfismul rs2248374 ($p = 0,01$) în cazul analizei subplotului SASN HLA-B27 negativ versus lotul martor HLA-B27 negativ, atestând asocierea polimorfismului cu SASN la indivizii HLA-B27 negativi. Mai mult, genotipul GG s-a dovedit a avea efect protector împotriva bolii comparat cu genotipul AA ($p = 0,01$). De altfel, acest efect protector al genotipului GG a fost observat nu numai în lotul pacienților SASN HLA-B27 negativi, ci și pentru loturile pacienților cu AP generali, neselectați ($p = 0,04$) și a celor HLA-B27 negativi ($p = 0,02$). Indivizii homozigoți pentru alela protectivă G a polimorfismului rs2248374 sunt aceia la care nivelele proteice ale ERAP2 sunt absente ca urmare a degradării ARN-ului mesager (22).

Și în cazul celui de-al doilea polimorfism *ERAP2* (rs2910686) frecvența alelei minore C a fost semnificativ crescută (46,5%) în lotul SASN HLA-B27 negativ comparativ cu lotul martor HLA-B27 negativ (36%). Purtătorii alelei majore T (genotipurile TT+CT) sunt mai puțin numeroși în lotul pacienților HLA-B27 negativi cu SASN (78%) comparativ cu lotul martorilor HLA-B27 negativi (89%), având o susceptibilitate mai scăzută la SASN HLA-B27 negative ($p = 0,02$).

Analiza haplotipurilor reconstruite ale celor două polimorfisme genotipate a avut rezultate oarecum așteptate în funcție de loturile de pacienți în care aceasta s-a realizat. Astfel, pentru loturile generale SASN/martori, SA/martori nu a fost observată o distribuție diferită a frecvenței haplotipurilor reconstruite. În schimb pentru loturile de pacienți SASN HLA-B27 negativi și martori HLA-B27 negativi haplotipul AC al alelelor minore a fost factor de risc pentru SASN ($p = 0,019$), în timp ce haplotipul alelelor majore GT a fost factor de protecție ($p = 0,009$).

Și analiza haplotipurilor reconstruite rs2248374|rs2910686 în loturile pacienților cu artrită psoriazică arată asocierea dintre acestea și boală, în special în subploturile HLA-B27 negative, atât pentru haplotipul de risc AC ($p = 0,26$) cât și pentru cel protector GT ($p = 0,015$).

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

Acesta este primul studiu care investighează polimorfisme mononucleotidice aparținând genei *ERAP2* într-un lot de pacienți cu spondiloartrită seronegativă din România. De altfel, deși polimorfisme *ERAP2* au fost investigate în loturi de pacienți cu SA, boala Crohn sau uveită anterioară, nu sunt studii internaționale care să analizeze relația genei *ERAP2* cu un lot general de SASN. Rezultatele prezentate dovedesc asocierea celor două polimorfisme investigate, în special a SNP-ului rs2248374, cu spondiloartrita seronegativă în sublotul de pacienți HLA-B27 negativi. Mai mult, polimorfismul rs2248374 se asociază cu artrita psoriazică (lotul comun – HLA-B27 pozitiv și negativ), în timp ce ambele variante genice *ERAP2* influențează riscul de AP la indivizii HLA-B27 negativi de origine română. Genotipul homozigot GG al polimorfismului rs2248374 oferă protecție împotriva SASN la indivizii HLA-B27 negativi și împotriva AP, atât pentru sublotul HLA-B27 negativ, cât și pentru lotul AP comun, neselectat. Analiza haplotipurilor reconstruite a relevat asocierea cu SASN, în sublotul pacienților HLA-B27 negativi, și cu AP, atât în lotul general/neselectat, cât și în lotul selectat HLA-B27 negativ, haplotipul alelelor minore AC fiind factor de risc pentru patologii în cauză, în timp ce haplotipul alelelor majore GT este protectiv.

Variante genice ale *ERAP2* au fost descrise în diverse studii genetice ca asociate cu patologii apropiate sau aparținând grupului de spondiloartrite seronegative, ca de exemplu: bolile inflamatorii intestinale în general (23) și boala Crohn în particular (24), uveita acută anterioară (25), corioretinopatia birdshot (o formă rară de uveită autoimună) (26) și psoriazisul (27). Polimorfisme ale genei *ERAP2* au mai fost de asemenea extensiv studiate în patogeniza preeclampsiei. Contribuția *ERAP2* la această patologie congenitală a sarcinii a fost confirmată în diverse populații: australiană, norvegiană (28), africano-americană (29) și ciliană (30). Un studiu singular asociază polimorfismele *ERAP2* cancerului pulmonar în populația Yunnan Han din China (31).

Inițial, interesul pentru gena *ERAP2* în SA a fost doar secundar celui acordat genei *ERAP1* a cărei asociere fermă cu SA a devenit evidentă în urmă cu aproape zece ani (7). Ulterior, asocierea s-a dovedit a fi limitată doar la indivizii HLA-B27 pozitivi (32). Recent, această asociere restricționată HLA-B27 a *ERAP1* cu SA, dar și cu SASN a fost confirmată de grupul nostru și în România (18).

Recent, un studiu realizat de IGAS (International Genetics of AS Consortium) pe cohorte extinse (peste zece mii de pacienți cu SA și peste cincisprezece mii de martori sănătoși)

a identificat cu ajutorul tehnicii immunochip microarray asocierea genei *ERAP2* cu SA (33). Trei polimorfisme *ERAP2* au fost asociate cu SA, asociere ce a fost limitată la pacienții HLA-B27 negativi: rs2549782 (determină modificarea activității enzimaticice), rs2248374 (genotipul protectiv GG determină nivele zero ale *ERAP2*) și rs2910686. Ultimele două polimorfisme au fost genotipate de noi în acest studiu. Din păcate dimensiunea lotului nostru de pacienți nu a făcut posibilă o analiză a polimorfismelor la pacienții SA HLA-B27 negativi. Însă rezultatele noastre în ceea ce privește asocierea acestor polimorfisme cu pacienții SASN HLA-B27 negativi, cu pacienții AP neselectați (aproape 80% HLA-B27 negativi) și cu sublotul pacienților AP HLA-B27 negativi sunt concordante cu cele raportate de IGAS. Într-adevăr, în studiul nostru asocierea polimorfismelor *ERAP2* rs2248374 și rs2910686 cu spondiloartrita seronegativă este restricționată la indivizii HLA-B27 negativi. Mai mult, asocierea este mai puternică în sublotul pacienților cu artrită psoriazică HLA-B27 negativ decât în cel general (neselectat).

În 2015, Robinson *et al.* analizează subloturile de pacienți și de martori HLA-B27 pozitivi de origine europeană din studiul IGAS și identifică asocierea *ERAP2* cu SA și la pacienții HLA-B27 pozitivi (20), asociere pe care studiul nostru nu a reprodus-o. Dacă se confirmă asocierea *ERAP2* cu toți pacienții SA, indiferent de prezența antigenului HLA-B27, atunci va crește considerabil numărul pacienților care pot beneficia de potențialele imunoterapii de tipul inhibitorilor de aminopeptidază, ce blochează *ERAP2*, și care sunt în prezent în cercetare (34).

Identificarea asocierii genei *ERAP1* cu SA a reprezentat probabil cel mai important eveniment de la descoperirea în anii 70 a asocierii HLA-B27 cu SA. Cu toate acestea, *ERAP1* a continuat să ofere explicații etiopatogenice pacienților HLA-B27 pozitivi, datorită restricției de asociere menționate, și prea puține explicații au fost oferite pacienților HLA-B27 negativi. Identificarea *ERAP2* printre genele ce contribuie la riscul SA, AP și SASN la indivizii HLA-B27 negativi este un eveniment semnificativ în clarificarea mecanismelor de apariție a acestor boli la acest subgrup de pacienți. Unele variante genice ale *ERAP2* influențează decisiv activitatea enzimatică a acesteia și, în consecință, vor influența procesarea antigenelor și modalitatea de generare a epitopilor (35) care vor fi expuși pe molecule MHC clasa I, altele decât HLA-B27. Înțelegerea consecințelor funcționale, uneori dramatice, ale polimorfismelor *ERAP2* este obligatorie pentru înțelegerea predispoziției de boală la pacienții HLA-B27 negativi, dar și pentru dezvoltarea unor soluții terapeutice noi de care aceștia ar putea beneficia.

POLIMORFISMELE GENEI *IL1A* LA PACIENȚII ROMÂNI

CU SPONDILOARTRITE SERONEGATIVE

INTRODUCERE

Spondilita anchilozantă (SA) și artrita psoriazică (AP) sunt reprezentantele cele mai importante ale grupului spondiloartrite seronegative (SASN), grup ce mai include artrita reactivă, spondiloartrita asociată bolilor inflamatorii intestinale, uveita acută anterioară, spondiloartrita juvenilă și spondiloartrita nediferențiată (SAND) (36). Artrita inflamatorie axială și periferică asimetrică reprezintă caracteristica clinică a acestor boli reumatismale înrudite, iar asocierea apropiată cu antigenul leucocitar uman B27 (human leucocyte antigen, HLA-B27) reprezintă cea mai recunoscută trăsătură genetică (37, 38).

În ultimii 15 ani (5) a devenit clar că trebuie să existe și alte gene, din afara complexului major de histocompatibilitate (major histocompatibility complex, MHC), care contribuie la riscul genetic al SA și AP. Câteva regiuni cromozomiale (1p, 2q, 6p, 9q, 10q, 16q și 19q) au fost identificate într-una dintre primele scanări genomice pe scară largă (genome-wide scans) efectuate vreodată, indicând prezența unor factori genetici de susceptibilitate non-MHC în SA (39). De atunci, gena *ERAP1* (endoplasmic reticulum aminopeptidase - aminopeptidazei reticulului endoplasmic) și gena *IL 23R* (receptorului interleuchinei 23) au fost identificate ca fiind candidate viabile de câteva studii de asociere genetică largă (genome-wide associations studies, GWAS) (7, 15), pe când implicarea clusterului de gene ale familiei *IL-1* în susceptibilitatea de SA a rămas mai puțin certă (40, 41).

Polimorfismele genei *IL1A* au fost corelate cu predispoziția de boală în spondiloartritele seronegative ca grup, precum și cu AS în particular (42), iar concentrațiile serice ale IL-1 α au fost mai crescute în forma activă de spondiloartrită asociată bolilor inflamatorii intestinale comparativ cu formele inactive de boală (43).

Scopul acestui studiu a fost să investigheze dacă două polimorfisme mononucleotidice ale genei *IL1A*, rs17561 și rs1800587 influențează riscul de boală la pacienții români cu spondiloartrite seronegative. De asemenea, au fost analizate separat subgrupurile de pacienți cu SA și AP în relație cu cele două variante genice ale *IL1A*.

MATERIALE ȘI METODE

Cohortele caz-control selectate pentru acest studiu au inclus un total de 400 de subiecți caucazieni, de origine română: 240 de pacienți cu SASN (58,3% SA și 41,7% pacienți cu AP) și 160 de martori sănătoși. Pacienții cu SA au fost diagnosticați conform criteriilor New York din 1984 modificate (12), în vreme ce criteriile de clasificare pentru artrita psoriazică (Classification Criteria for Psoriatic Arthritis, CASPAR) (13) și cele ale Societății Internaționale de Evaluare a Spondiloartritelor (Assessment of SpondyloArthritis international Society, ASAS) (10, 11) au fost utilizate pentru diagnosticul pacienților cu AP în Departamentele de Reumatologie și Medicină Internă ale Spitalelor "Dr. I. Cantacuzino" și "Sfânta Maria" din București. Subiecții incluși în lotul martor sunt potențiali donatori de măduvă osoasă hematogenă sănătoși care nu prezintă simptome și nu au istoric de SASN, selecționați de Institutul Național de Transfuzie Sangvină "Prof. Dr. CT Nicolau", București. Studiul a avut aprobarea comisiilor locale de etică și toți subiecții recrutați au semnat un consimțământ informat.

Pacienții SASN și martorii sănătoși au fost genotipați pentru două polimorfisme mononucleotidice aparținând genei *IL1A* care au fost alese pe baza rezultatelor unor studii anterioare de asociere genetică și meta-analize. Genotiparea celor două polimorfisme a fost realizată cu ajutorul a două kituri TaqMan® Allelic Discrimination Assays (C___9546471_10 și C___9546481_20, Thermo Fisher Scientific Inc, Applied Biosystems™, Foster City, MA, USA), utilizând aparatul 7300 Real Time PCR System aflat în dotarea laboratorului Disciplinei de Fiziopatologie și Imunologie a Facultății de Medicină, UMF "Carol Davila", București și respectând protocoalele producătorului.

ANALIZA STATISTICĂ

Echilibrul Hardy–Weinberg (HWE) a fost testat pentru ambele SNP-uri în grupul de martori ajutorul testului exact Fisher. Frecvențele alelice și ale genotipurilor pentru fiecare SNP au fost comparate între lotul de pacienți cu SASN și martori dar și între sublotul de SA și AP și lotul martor. Pachetul software PLINK 1.9 (21) a evaluat potențialul de asociere aplicând testul Exact Fisher, iar valori ale $p \leq 0.05$ au fost considerate semnificative statistic. Cu același software s-a calculat frecvența haplotipurilor, a fost evaluat echilibrul Hardy–Weinberg și a fost estimat linkage disequilibrium (LD).

REZULTATE

Echilibrul Hardy–Weinberg a fost observat în grupul de control pentru polimorfismul rs1800587. O derivație minoră a fost observată pentru polimorfismul rs17561 ($p = 0,03$). Rata de genotipare a fost de 97,5% pentru polimorfismul rs17561 (la un număr de 5 pacienți cu SA și la un pacient cu AP genotiparea nu a fost posibilă) și de 99,6% pentru polimorfismul rs1800587 (doar la un singur pacient cu SA genotiparea nu a fost posibilă). Estimarea LD pentru cele două polimorfisme mononucleotidice ale *IL1A* a identificat o tendință de înaltă corelație între cei doi loci în populația noastră, valoarea r^2 fiind 0,75.

Pentru polimorfismul rs17561 [-340G/T] frecvența alelei minore a fost similară în lotul SASN general (31,4%) comparativ cu lotul martor (32,8%), analiza statistică confirmând lipsa de asociere ($p = 0,67$). De asemenea purtătorii alelei minore T (genotipurile TT și GT) nu au prezentat nici o diferență în ceea ce privește predispoziția pentru boală ($p = 0,42$). Rezultate similare s-au profilat și pentru cel de-al doilea polimorfism al genei *IL1A* investigat, rs1800587 [C-889T]. Frecvența alelei minore T a fost 29,1% la pacienții SASN și 29,7% în lotul martorilor sănătoși ($p = 0,85$), în timp ce purtătorii alelei minore T au prezentat același risc de a dezvolta boala ca și purtătorii genotipului CC ($p = 0,74$).

Analiza separată a cazurilor de spondiloartrită HLA-B27 pozitive a avut același rezultat. Pentru ambele polimorfisme *IL1A* frecvența alelelor minore a prezentat mici variații între lotul de martori sănătoși și (32,8% pentru rs17561 și 29,7% pentru rs1800587) și lotul de pacienți (32,3% pentru rs17561 și 31,8% pentru rs1800587) care s-au tradus în valori ale p mai mari de 0,05 ($p = 0,89$ pentru rs17561 și $p = 0,57$ pentru rs1800587), în timp ce purtătorii alelelor minore au avut o distribuție similară în cele două cohorte (Tabelul 8.5). Astfel, pentru polimorfismul rs17561 genotipurile TT+GT au avut o frecvență de 58,7% în lotul martor și 56,9% în lotul SASN HLA-B27 pozitiv ($p = 0,75$), iar pentru polimorfismul rs1800587 frecvența genotipurilor TT+CT a fost de 50,7% pentru martori și 53% pentru pacienții HLA-B27 pozitivi. O examinare ulterioară a fiecărui subgrup de pacienți cu spondilită anchilozantă, respectiv cu artrită psoriazică împotriva grupului de martori sănătoși a fost realizată. Frecvențele alelelor minore pentru ambele polimorfisme investigate în subgrupul pacienților cu SA (32,2% pentru polimorfismul rs17561 și 31,8% pentru polimorfismul rs1800587) au fost foarte apropiate de cele identificate în lotul martorilor sănătoși (32,8% pentru polimorfismul rs17561 și 29,7% pentru polimorfismul rs1800587), astfel încât nici o asociere cu susceptibilitatea de boală nu a fost observată ($p = 0,87$).

Analiza genotipurilor în sublotul pacienților cu SA a avut rezultatele așteptate. Frecvența genotipurilor purtătoare ale alelei minore T (TT și GT) pentru polimorfismul rs17561 în lotul de pacienți cu SA a fost 56,3%, adică foarte apropiată de cea prezentă în lotul martor 58,7%, pacienții purtători ai alelei minore având același risc de a dezvolta SA ca și indivizii sănătoși ($p = 0,67$). Pentru polimorfismul rs1800587 frecvențele sumate ale genotipurilor TT și CT au fost de 51,1% în lotul de pacienți SA și de 50,1% în lotul martor, prin urmare ambele loturi au avut același risc de a dezvolta spondilită anchilozantă ($p = 0,93$).

Pentru sublotul pacienților cu artrită psoriazică frecvențele alelelor minore ale celor două polimorfisme mononucleotidice prezintă variații minime față de cele ale grupului de control, iar această distribuție s-a oglindit și în frecvențele genotipurilor. Astfel, deși frecvențele alelelor minore T ale celor două polimorfisme investigate (30,3% pentru polimorfismul rs17561 și 27% pentru polimorfismul rs1800587) au fost mai mici în lotul pacienților cu artrită psoriazică decât în cel al martorilor sănătoși (32,8% pentru polimorfismul rs17561 și 29,7% pentru polimorfismul rs1800587), aceasta nu s-a tradus într-o diferență semnificativă statistic ($p = 0,55$ pentru polimorfismul rs17561 și $p = 0,50$ pentru polimorfismul rs1800587).

Pentru polimorfismul rs17561 purtătorii alelei minore (genotipurile TT și GT) în lotul pacienților AP au reprezentat 52,5% în timp ce în lotul martorilor sănătoși procentul a fost mai ridicat 58,7%, însă fără să atingă pragul de semnificație statistică ($p = 0,32$). În mod similar frecvențele genotipurilor care conțin alela minoră a rs1800587 au fost mai scăzute în lotul de pacienți (46%) față de cel al martorilor (50,7%), dar fără semnificație statistică ($p = 0,46$).

Analiza suplimentară a subgrupului de pacienți SA HLA-B27 pozitivi sau analiza separată a subloturilor de pacienți SASN și martori distribuiți pe sexe a urmat același patern de neasociere între polimorfismele *IL1A* investigate și SASN/SA. Analiza haplotipurilor a arătat o distribuție aproape identică a combinațiilor haplotipice a polimorfismelor studiate, din care au rezultat valori similare ale frecvenței haplotipurilor în lotul pacienților cu spondiloartrită seronegativă comparativ cu cele din lotul martor. Analiza separată a subloturilor de pacienți cu SA și AP a avut, cum era de așteptat, rezultate cvasi-identice. Frecvența haplotipului alelelor minore a fost 29,4% pentru pacienții cu SA, 25,7% pentru pacienții cu AP și 28,1% în lotul martor, prin urmare, acest haplotip nu se constituie factor de risc nici pentru SA ($p = 0,71$), nici pentru AP ($p = 0,55$). Frecvența haplotipului alelelor majore (GC) ale polimorfismelor rs17561|rs1800587 a fost apropiată în loturile de pacienți (66,4% pentru SA și 68,1% pentru AP) comparativ cea din lotul martor (65,6%), și nu se constituie ca factor protectiv pentru nici una dintre cele două patologii ($p = 0,83$ pentru SA și $p = 0,54$ pentru AP).

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

Acesta este primul studiu de asociere genetică realizat în România care investighează legătura dintre variantele genice ale *IL1A* și spondiloartrita seronegativă. Rezultatele noastre arată că polimorfismele genei *IL1A* investigate (rs17561 [-340G/T] și rs1800587 [C-889T]) nu influențează predispoziția de boală pentru pacienții români cu spondiloartrite seronegative în general, și nici cu spondilită anchilozantă sau artrită psoriazică în special.

Informațiile în ceea ce privește cluster-ul genic *IL1* localizat la nivelul cromozomului 2q14 ca locus de susceptibilitate pentru SA și AP au fost oarecum controversate încă de la primele studii genetice care l-au investigat în relație cu aceste patologii (40, 41, 44). Mai multe studii de asociere genetică largă (7, 17), inclusiv cel mai recent International Genetics of Ankylosing Spondylitis Consortium GWAS (45) nu au detectat acest locus ca fiind printre cele asociate cu SA, deși loci localizați pe cromozomul 2q11, și care găzduiesc genele *IL1R1* și *IL1R2*, au arătat asocieri sugestive cu spondilita anchilozantă în populații europene (45).

Cu toate acestea, există multiple studii de asociere genetică și meta-analize care par să implice polimorfisme mononucleotidice aparținând genelor *IL1A*, *IL1B* sau *IL1RN* ca reprezentând un factor de risc pentru SA, AP și SASN în general în variate populații. Unul dintre cele mai citate studii în literatură a examinat trei populații canadiene și a identificat mai multe polimorfisme aparținând cluster-ului genic *IL-1* ca fiind asociate cu riscul de SA. Autorii studiului au identificat, printre altele, trei polimorfisme aparținând genei *IL1A* (rs3783550, rs3783543 și rs3783526) ca fiind asociate cu SA, însă polimorfismele investigate de noi, rs17561 și rs1800794, nu s-au numărat printre cele care s-au asociat cu riscul de boală (46). În mod similar, polimorfismul *IL1A* rs1800587 [-889C/T] nu a fost asociat cu SA într-un studiu realizat pe o cohortă de pacienți HLA-B27 pozitivi din Iran, cu toate că polimorfismul rs2234650 aparținând genei *IL1R* a influențat riscul de a dezvolta SA (47).

Una dintre primele meta-analize care a abordat acest subiect, și care a inclus șase studii și pacienți din nouă populații, a investigat complexul genic *IL-1* în raport cu susceptibilitatea de boală pentru SA și a raportat printre polimorfismele relevante unul dintre SNP-urile aparținând *IL1A* investigate și de noi, rs1800587 [C-889T] (48). O meta-analiză prospectivă care a încercat să determine contribuția cluster-ului genic *IL-1* la susceptibilitatea de a dezvolta SA în diferite populații a identificat trei variante genice *IL1A* (rs17561, rs2856836, rs1894399) ca având o înaltă asociere cu SA (49).

Primul studiu care a implicat polimorfisme ale genei *IL1A* în artrita psoriazică a identificat SNP-ul rs1800587 [C-889T] ca factor de risc pentru boală (50). Doi ani mai târziu, Rahman *et al.* au raportat existența a două regiuni din cadrul complexului genic *IL-1* ce contribuie independent la riscul de artrită psoriazică: gena *IL1A* (rs3783547, rs3783543 și rs17561) și o regiune ce se întinde de la secvența terminală a *IL1B* și trece prin *IL-1F7* și *IL-1F8* până la *IL-1F10* (51).

Monnet *et al.* au fost primii care au raportat faptul că polimorfisme ale genei *IL1A* sunt asociate cu SASN ca întreg, și cu SA în particular (42). Gena *IL1A* pare să influențeze de asemenea și fenotipul SA, în special severitatea sacroiliitei (42). O variație semnificativă a nivelurilor serice ale IL-1 α și IL-1Ra la pacienții cu spondiloartrită activă asociată cu bolile inflamatorii intestinale comparativ cu forma inactivă de boală a fost descrisă (43), deși un studiu mai recent nu a descoperit nici o diferență statistică în distribuția frecvenței alelice și a genotipurilor mai multor polimorfisme aparținând *IL1A*, *IL1B* și *IL1RN* între lotul de pacienți cu boală inflamatorie intestinală și lotul de martori sănătoși (52).

Rezultatele raportate în literatură privind implicarea complexului genic *IL-1* în susceptibilitatea de boală pentru SASN și SA sunt discordante în multe situații. Mai mult, agenții terapeutici care blochează IL-1, așa cum este Anakinra, un IL1-Ra recombinat, aprobat pentru tratamentul pacienților cu poliartrită reumatoidă, au arătat o eficacitate limitată la pacienții cu SA (53) și AP (54), în timp ce pentru tratamentul SASN nu există în prezent studii care să le evalueze eficacitatea (55). Este posibil ca anumite discrepanțe dintre studii să se datoreze design-ului acestora sau datorită puterii statistice limitate a unora dintre ele (56), dar un motiv mai probabil pentru existența atâtor rezultate contrastante poate fi eterogenitatea bolii însăși. Spondiloartritele sunt boli genetice multifactoriale, iar factorii genetici implicați în susceptibilitatea de boală pot fi diferiți de la o populație la alta, ceea ce poate explica de ce studii de asociere genetică cu rezultate negative, așa cum este cel de față, pot coexista cu studii care au raportat asocieri pozitive. În orice caz, una din ipotezele propuse a fost aceea că clusterul genic *IL-1* contribuie la etiopatogenia SASN în strânsă legătură cu celelalte variante genice non-MHC identificate mai ferm ca influențând susceptibilitatea de boală (*ERAP1*, *IL-23R*) (56), dar numai studii ulterioare vor putea preciza cu exactitate rolul complexului genic *IL-1*, și în special al genei *IL1A*, în patogeniza spondiloartritelor seronegative.

ALELELE KIR3DL1/KIR3DS1 INFLUENȚEAZĂ RISCUL DE SPONDILITĂ ANCHILOZANTĂ LA INDIVIZII HLA-B27 POZITIVI

INTRODUCERE

Spondilita anchilozantă este poate cea mai cunoscută dintre bolile acestei familii și cu potențialul invalidant cel mai ridicat. Deși cel mai important semn pentru acest grup de afecțiuni este dursalgiile cu caracter inflamator, alte elemente clinice pot fi de asemenea asociate, de exemplu, afectarea articulară periferică (oligoartrită, entezită) sau manifestări extra-articulare (uveită, dactilită, psoriazis, boală inflamatorie cronică intestinală) (37, 38, 57). În spondilita anchilozantă, afectarea axială este forma de prezentare cea mai frecventă, afectând articulațiile sacroiliace și coloana vertebrală pe toată lungimea sa.

Asocierea SA, precum și a celorlalte boli din grupul SASN, cu HLA-B27 este documentată încă din anul 1973 (4, 58, 59). În ultimii ani însă, s-a remarcat faptul că similitudinile genetice comune pacienților cu SASN, reflectate în profilul clinic și etiopatogenic comun, nu sunt limitate la complexul major de histocompatibilitate, ci că pot include de asemenea și gene non-MHC, cum ar fi: *ERAP1*, *IL23R* și complexul de gene *KIR* (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) (39, 56, 60-62).

Genele *KIR* sunt localizate pe brațul lung (q) al cromozomului 19 în poziția 13.4 (63) unde există cel puțin 15 locusuri genice (13 gene *KIR* și 2 pseudogene – *KIR2DP1* și *KIR3DP*) (64, 65). Moleculele *KIR* au capacitatea unică de a nuanța răspunsul imunitar prin activarea sau inhibarea celulelor NK și a anumitor limfocite T (66) în urma interacțiunii lor cu moleculele MHC I. Faptul că HLA-B27, a cărui importanță în SA și SASN este universal recunoscută, este un ligand predilect pentru genele *KIR*, în special pentru gena *KIR3DL1/KIR3DS1*, justifică interesul crescând acordat complexului genic *KIR* în relație cu riscul de SA/SASN.

Obiectivul nostru a fost investigarea existenței unei posibile asocieri între alelele *KIR3DL1/KIR3DS1* și susceptibilitatea de spondilită anchilozantă la indivizii HLA-B27 pozitivi din România.

MATERIALE ȘI METODE

Un număr de 80 subiecți au fost incluși în acest studiu, 47 pacienți cu spondilită anchilozantă și 33 martori sănătoși. Ambele loturi au fost formate numai din indivizi HLA-B27 pozitivi de origine română.

Diagnosticul de spondilită anchilozantă a avut la bază criteriile New York modificate 1984 (12), pacienții provenind din Departamentele de Reumatologie și Medicină Internă ale Spitalelor "Dr. I. Cantacuzino" și "Sfânta Maria" din București. Pacienții cu SA au avut vârsta medie 37,1 ani, vârstă mediană 35 ani și un raport bărbați : femei = 38 : 9.

Indivizii incluși în lotul martor au fost selectați dintre potențialii donatori de organe din baza de date a Institutului Național de Transfuzii Sanguine "Prof. Dr. C.T. NICOLAU", București. Aceștia nu au prezentat semne sau simptome sugestive pentru boli reumatismale cu caracter inflamator la momentul recrutării în studiu, și nici nu au descris antecedente personale sau heredocolaterale de spondilită anchilozantă. Vârsta medie pentru lotul de martori sănătoși a fost de 31,8 ani, vârstă mediană a fost 31 ani iar raportul bărbați : femei a fost aproape egal 17 : 16. La momentul recrutării în studiu subiecții au semnat un formular de consimțământ informat pentru studii genetice. De asemenea, derularea acestui studiu s-a făcut cu acordul comisiilor de etică locale.

Identificarea variațiilor alelice ale *KIR3DL1/KIR3DS1* s-a realizat cu ajutorul unei metodologii denumite PCR-SSOP ce se bazează pe reacția de polimerizare în lanț (PCR) și pe folosirea unor sonde oligonucleotidice specifice secvenței (SSOP – Sequence Specific Oligonucleotide Probes), metodologie elaborată de un grup de cercetători nord irlandezi sub îndrumarea profesorului Derek Middleton (67-69). De altfel, cele 80 de probe ADN au fost genotipate în Laboratorul de Imunogenetică și Histocompatibilitate al Spitalului Municipal din Belfast, Irlanda de Nord.

ANALIZA STATISTICĂ

Frecvențele alelice și frecvențele genotipurilor au fost comparate între lotul de pacienți și lotul martor cu ajutorul testului χ^2 (chi-pătrat) și a testului Exact Fisher utilizând programul software IBM SPSS Statistics, versiunea 23.

REZULTATE

În loturile noastre au fost identificate opt variante alelice ale genei inhibitoare *KIR3DL1* (*KIR3DL1*00101*, **01502*, **002*, **004*, **005*, **007*, **008*, **009*) și doar o singură variantă alelică pentru gena cu rol activator (*KIR3DS1*013*). Alelele *KIR3DL1*007* și *KIR3DL1*009* au fost întâlnite doar în lotul martorilor sănătoși, dar și aici cu frecvență scăzută (1,51% pentru *KIR3DL1*007* și respectiv 3,03% pentru *KIR3DL1*009*). Distribuția frecvențelor alelice în lotul martor și în lotul pacienților cu SA este reprezentată grafic în figura 1. Alela activatoare *KIR3DS1*013* este mai frecventă în lotul martor, sugerând un rol protectiv față de SA la indivizii HLA-B27 pozitivi ($p = 0,030$ pentru testul Pearson's Chi-Square, respectiv $p = 0,037$ în cazul testului Exact Fisher).

Două alele *KIR3DL1* sunt mai frecvente în lotul pacienților cu SA: *KIR3DL1*00101* și *KIR3DL1*004*, însă semnificația statistică este atinsă doar pentru cea de pe urmă ($p = 0,03$). Prin urmare, prezența *KIR3DL1*004* se asociază cu susceptibilitate crescută pentru SA la subiecții HLA-B27 pozitivi.

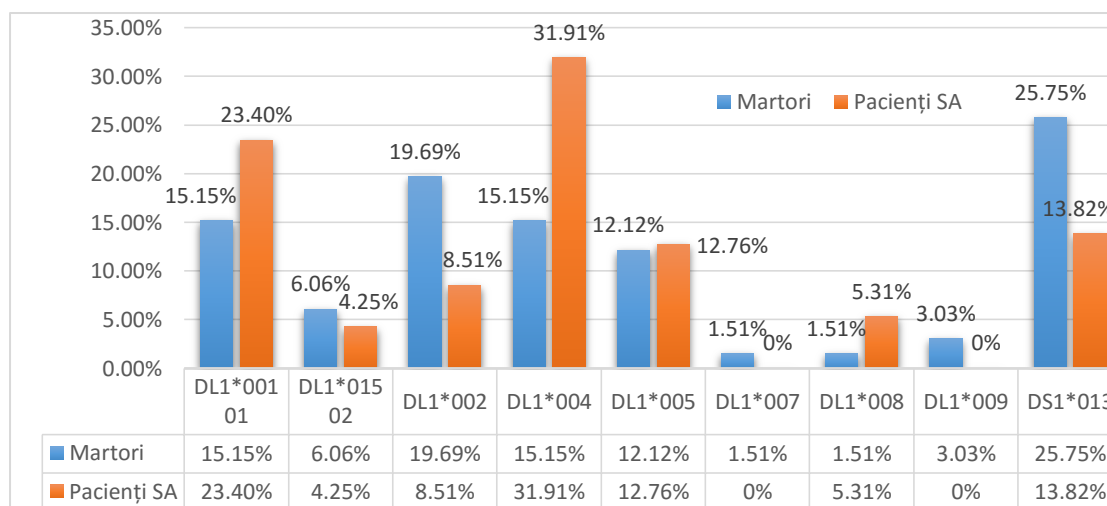


Figura 1. Distribuția frecvențelor alelice ale *KIR3DL1/KIR3DS1* în cele două loturi.

Analiza distribuției genotipurilor relevă o tendință de asociere cu SA în cazul genotipului *KIR3DL1/3DL1* prezent în număr mai ridicat în rândul pacienților cu SA (72,34%) comparativ cu lotul martor (51,52%). Valoarea $p = 0,056$ poate fi considerată ca fiind caracteristică pentru asocierile marginale.

Este posibil ca un lot mai larg de pacienți și de martori să releve o asociere statistic semnificativă. Celelalte două genotipuri (*KIR3DL1/3DS1* și *KIR3DS1/3DS1*) nu influențează riscul de spondilită anchilozantă la indivizii HLA-B27 pozitivi ($p = 0,1$ pentru genotipul heterozigot și $p = 0,230$ pentru genotipul homozigot activator).

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

Rezultatele noastre sugerează un rol protectiv al alelei activatoare *KIR3DS1*013*, care este mai frecventă în lotul martor (25,75%) comparativ cu lotul pacienților HLA-B27 pozitivi cu spondilita anchilozantă (13,82%) ($p = 0,03$), în timp ce alela inhibitoare *KIR3DL1*004* este factor de risc pentru această boală la indivizii HLA-B27 pozitivi unde atinge o frecvență dublă (31,91%) față de cea din lotul martor (15,15%) ($p = 0,025$).

În 2001, un prim studiu de asociere genetică largă (genome wide association study, GWAS) a descris o asociere puternică între SA și locusurile non-MHC de pe cromozomul 19q, unde sunt localizate genele *KIR* (39), asociere care a fost confirmată ulterior de o meta-analiză a trei investigații de scanare a întregului genom în căutarea unor asocieri cu SA (62). Dată fiind relația receptor – ligand între moleculele codificate de anumite gene *KIR* (*KIR3DL1*, *KIR3DL2* și posibil *KIR3DS1*) și cele codificate de alelele *HLA-B*, e rezonabil să presupunem o contribuție sinergică a acestor două locusuri înalt polimorfe cu SA (70, 71).

Unul dintre primele studii caz-control de asociere genetică care au investigat genele *KIR* în SA a implicat două populații caucaziene HLA-B27 pozitive (spaniolă și azoreană-portugheză) (72). Alela inhibitoare *KIR3DL1* a fost mai puțin exprimată la pacienții cu SA comparativ cu grupurile de control în ambele populații, sugerând un efect protectiv împotriva dezvoltării afecțiunii, în timp ce alela activatoare *KIR3DS1* a avut o expresie crescută (72). Același grup a raportat în 2010 (73) și 2015 (74) rezultate similare pe studii efectuate într-o cohorta populațională spaniolă mai extinsă.

Gena *KIR3DL1/3DS1* a devenit un punct de interes pentru mai multe studii realizate în populații din Asia, unde s-a descoperit a fi înalt polimorfică, fiind identificate 10 alele *KIR3DL1* și 6 alele *KIR3DS1* (75). Un studiu care a înrolat un număr mic de pacienți și de martori din populații asiatice (China și Thailanda) a descoperit că genele activatoare *KIR* se asociază cu SA (76). Analiza genotipului *KIR* a arătat frecvențe scăzute ale *3DL1/3DL1* la pacienți cu SA versus grupul de control, în timp ce *3DL1/3DS1* a prezentat o creștere semnificativă a frecvenței la pacienții cu SA din ambele populații (76). Alte studii de asociere genetică efectuate tot în populații din Asia, au raportat nu doar asocierea alelei *KIR3DS1* cu o susceptibilitate crescută pentru SA, dar și a *KIR2DL5* și *KIR2DS1* în prezența alelelor *HLA-C* de grup 2 (77, 78). Un studiu mai recent care a investigat contribuția genei *KIR3DS1/3DL1* la patogenia SA în câteva populații din China a confirmat creșterea frecvenței alelei activatoare *KIR3DS1* la pacienți cu SA versus martori (79).

Levinson *et al.* au investigat genele *KIR* la pacienții HLA-B27 pozitivi cu uveită acută anterioară cu și fără SASN axială (80). Rezultatele raportate au fost similare celor raportate de noi, fiind observată o frecvență scăzută pentru genele activatoare *KIR3DS1*, *KIR2DS1* și *KIR2DS5* la pacienții cu uveită asociată cu SASN axială. Mai mult, combinația inhibitoare *KIR3DL1+HLA-Bw4* a fost mult mai frecventă în lotul de pacienți comparativ cu lotul martorilor ($p = 2.73 \times 10^{-28}$, $p(c) = 8.2 \times 10^{-27}$) (80). Aceste descoperiri pot sta la baza unei ipoteze interesante sugerate de către Levinson *et al.*: o expresie scăzută a genelor *KIR* activatoare ar putea fi cauza nedeclanșării unui răspuns din partea celulelor NK pentru a elimina stimulul antigenic, și astfel persistența acestora devine factorul ce contribuie decisiv la patogenia SA/SASN (80). Deși nu toate rezultatele prezentate sunt concordante, majoritatea studiilor confirmă implicarea genelor *KIR*, în special a genei *KIR3DL1/KIR3DS1* în SA/SASN, mai ales în anumite populații.

Interacțiunea dintre *KIR3DL1/KIR3DS1* sau *KIR3DL2* cu HLA-B27 poate fi un element cheie în patogenia SA. *KIR3DL1* și posibil *KIR3DS1* sunt capabile să recunoască și să lege atât complexul heterodimeric clasic $\beta 2$ microglobulina/lanțuri grele HLA-B27, care prezintă peptide self bacteriene, virale și tumorale limfocitelor T CD8+, cât și complexul homodimeric format doar din lanțurile grele HLA-B27 (fără $\beta 2m$) (81). *KIR3DL2* atașează doar complexe homodimerice HLA-B27 formate din lanțuri grele (81-83), despre care se știe că sunt exprimate pe suprafața celulelor prezentatoare de antigen în SA (84), independent de prezența peptidelor antigenice (81). Anumite peptide virale s-au dovedit a fi inhibitoare ale recunoașterii HLA-B*2705 de către *KIR3DL1* (85), și astfel diminuează semnalele inhibitoare transmise celulelor NK. Prin urmare, un dezechilibru între genele/alelele *KIR* activatoare și inhibitoare în prezența anumitor alele *HLA-B27*, de exemplu B*2705, poate contribui la patogenia SA (70).

Una dintre ipotezele propuse a fost că limitarea secreției de IFN- γ produs de celulele NK secundar recunoașterii receptoriale a lanțurilor grele libere de către *KIR3DL2* ar putea promova diferențierea limfocitelor proinflamatoare Th17 care are loc în SA/SASN (83). A fost raportată stimularea supraviețuirii, proliferării celulare și a producției de IL-17 de către limfocitele T *KIR3DL2+* CD4+ în urma interacțiunii dintre *KIR3DL2* și lanțurile grele libere ale HLA-B27 (86).

Aceste rezultate subliniază importanța *KIR* și a complexei lor relații cu moleculele MHC clasa I, în special cu HLA-B27, această întâlnire unică putând fi punctul decisiv, pivotal care decide tipul de răspuns imuno-inflamator întâlnit în SA/SASN.

CONCLUZII

Identificarea profilului genetic al spondiloartritelor seronegative, începută încă din anii '70, când a fost descoperită asocierea cu HLA-B27, a intrat în ultimii 10 ani într-o etapă accelerată, în care acest proces a beneficiat din plin de remarcabilele progrese tehnice ale secolului XXI. Perfectarea tehnicilor de investigație genetică a permis, printre altele, descoperirea de asocieri genetice noi în spondilita anchilozantă și în spondiloartritele seronegative. Acestea au revoluționat modul în care înțelegem astăzi etiopatogenia acestor bolii și inter-relația dintre multipli factori care stau la baza răspunsului imun patologic ce caracterizează acest grup de patologii. De asemenea, aceste noi asocieri pot reprezenta cheia unor soluții terapeutice viitoare.

Studiile realizate în diverse regiuni ale globului au relevat particularitățile genetice ale spondiloartritelor seronegative în diverse populații, înregistrând diferențe ce pot fi uneori semnificative. Cele trei studii din componența acestei teze de doctorat au avut ca scop caracterizarea grupului de spondiloartrite seronegative din punct de vedere imunogenetic în populația noastră.

A. Asocierea polimorfismelor genei ERAP2 cu spondiloartritele seronegative la pacienții HLA B27 negativi

- 1.** Acesta este primul studiu care investighează polimorfisme mononucleotidice aparținând genei *ERAP2* într-un lot de pacienți cu spondiloartrită seronegativă din România.
- 2.** Rezultatele obținute dovedesc asocierea celor două polimorfisme investigate, rs2248374 și rs2910686, în special a SNP-ului rs2248374, cu spondiloartrita seronegativă, dar doar pentru indivizii HLA-B27 negativi.
- 3.** Polimorfismul rs2248374 se asociază cu artrita psoriazică în lotul general/neselectat ce cuprinde indivizii HLA-B27 pozitivi și negativi, în timp ce ambele polimorfisme *ERAP2* influențează riscul de apariție a artritei psoriazice la indivizii HLA-B27 negativi. Genotipul homozigot GG al polimorfismului rs2248374 are rol protectiv la indivizii HLA-B27 negativi împotriva SASN și împotriva AP; pentru AP protecția este extinsă și în lotul general/neselectat.
- 4.** Haplotipurile reconstruite sunt factor de risc (AC) sau factor protector (GT) pentru SASN, în sublotul pacienților HLA-B27 negativi, și pentru AP, atât în lotul general/neselectat, cât și în lotul selectat HLA-B27 negativ.

5. Identificarea *ERAP2* printre genele ce contribuie la riscul SA, AP și SASN la indivizii HLA-B27 negativi este foarte importantă pentru înțelegerea mecanismelor de apariție a acestor patologii în acest subgrup specific de pacienți, oarecum trecut cu vederea. Aceasta pentru că până în prezent explicațiile fiziopatologice a fost centrate de HLA-B27, iar după descoperirea asocierii genei *ERAP1* cu SA, ce s-a dovedit a fi limitată la pacienții HLA-B27 pozitivi, investigația științifică a continuat să fie centrată pe înțelegerea patogeniei la acest grup de pacienți.

6. În schimb, *ERAP2* începe să ofere răspunsuri pacienților HLA-B27 negativi. Unele variante genice ale *ERAP2* influențează activitatea enzimatică a moleculei și, în consecință, vor influența procesarea antigenelor și modalitatea de generare a epitopilor care vor fi expuși pe molecule MHC clasa I, altele decât HLA-B27.

7. Pe viitor, înțelegerea consecințelor funcționale, uneori dramatice, ale polimorfismelor *ERAP2* este obligatorie pentru înțelegerea predispoziției de boală la pacienții HLA-B27 negativi, dar și pentru dezvoltarea unor soluții terapeutice noi de care aceștia ar putea beneficia.

8. Inhibitorii de aminopeptidaze, în prezent în curs de dezvoltare, pot avea un potențial terapeutic real nu numai în AS dar și în restul SASN, prin modularea procesării și a prezentării antigenice ce controlează în cele din urmă răspunsul imun celular adaptativ.

B. Polimorfismele genei *IL1A* la pacienții români cu spondiloartrite seronegative.

1. Acesta este primul studiu caz-control realizat în România care a investigat asocierea genetică dintre polimorfismele mononucleotidice aparținând genei *IL1A* și spondiloartrita seronegativă.

2. Rezultatele noastre arată că cele două polimorfisme investigate (rs17561 [-340G/T] și rs1800587 [C-889T]) aparținând genei *IL1A* nu influențează predispoziția de boală pentru pacienții români cu spondiloartrite seronegative în general, cu spondilită anchilozantă sau artrită psoriazică în special, indiferent de statusul HLA-B27 al acestor pacienți.

3. Datele din literatură privind complexul genic *IL-1* și riscul de SASN, SA și AP nu sunt întotdeauna concordante, și este posibil ca aceasta să se datoreze eterogenității acestor patologii genetice multifactoriale în diverse populații.

4. Studii viitoare care să implice loturi mai largi de subiecți din diverse regiuni ale globului sunt necesare pentru a putea înțelege contribuția complexului genic *IL-1* și al genei *IL1A* la dezvoltarea spondiloartritelor seronegative.

C. Alelele *KIR3DL1/KIR3DS1* influențează riscul de spondilită anchilozantă la indivizii HLA-B27 pozitivi

- 1.** Potențiala influență a alelelor *KIR3DL1/KIR3DS1* asupra riscului de a dezvolta spondilită anchilozantă nu a mai fost studiată până în prezent la indivizii HLA-B27 pozitivi de origine română.
- 2.** Rezultatele noastre descriu un rol protectiv al alelei activatoare *KIR3DS1*013*, a cărei frecvență este superioară în lotul martor (25,75%) față de cel al pacienților HLA-B27 pozitivi cu spondilită anchilozantă (13,82%) ($p = 0,03$).
- 3.** De asemenea, alela inhibitoare *KIR3DL1*004* se comportă ca factor de risc pentru dezvoltarea SA la indivizii HLA-B27 pozitivi unde atinge o frecvență dublă (31,91%) față de cea din lotul martor (15,15%) ($p = 0,025$).
- 4.** Rezultatele din literatura de specialitate sunt contradictorii. Este posibil ca acest lucru să se datoreze particularităților genetice ale populațiilor în care studiile au fost realizate.
- 5.** Sunt necesare studii viitoare, pe loturi mai extinse de pacienți, pentru confirmarea rezultatelor obținute de noi în aceste cohorte restrânse.

În pregătirea celei de-a 9-a conferințe privind viitorul medicinei genomice (The 9th Future of Genomic Medicine Conference) din martie, 2016 din San Diego, California, Prof. Dr. Eric Topol, editorul șef al Medscape, spunea: "*Impactul genomicii în medicină este din ce în ce mai mare. Aceasta este o forță de neoprit. Fiți receptivi și îmbrățișați această eră. Deja schimbă medicina și va continua să o facă pe o scară mult mai mare și mai impresionantă.*"

Într-adevăr, fiecare studiu de asociere genetică are potențialul de a aduce informații noi cu privire la fondul genetic al bolilor multi/oligogenice, de a identifica factorii ce contribuie la etiopatogenia lor, și oferă calea prin care medicina va deveni mai precisă, mai individualizată, nu numai din punct de vedere diagnostic, dar și terapeutic.

LISTA LUCRĂRILOR PERSONALE

Articole în jurnale:

1. **Laura Ioana Cherciu**, Marius Cherciu, Luis Ovidiu Popa, Mihai Bojincă, Monica Irina Duțescu, Violeta Bojincă, Constantin Bără, Olivia Mihaela Popa. *Interleukin 1A* gene polymorphisms in Romanian patients with Seronegative Spondyloarthropathies. Romanian Journal of Rheumatology – Volume XXV No. 1, 2016, p. 20 - 26, ISSN 1843-0791, (categoria B+ CNCSIS).
2. **Laura Ioana Cherciu**, Marius Cherciu, Luis Ovidiu Popa, Mihai Bojincă, Monica Irina Duțescu, Violeta Bojincă, Constantin Bără, Olivia Mihaela Popa. The association of *ERAP2* gene polymorphisms with seronegative spondyloarthropathies in HLA-B27 negative Romanians, Romanian Journal of Rheumatology – Volume XXV No. 2, 2016, p. 78 – 86, ISSN 1843-0791, (categoria B+ CNCSIS).
3. **Laura Ioana Cherciu**, Marius Cherciu, Mihai Bojinca, Constantin Bără, Olivia Mihaela Popa. Killer cell Immunoglobulin-like Receptors Genes in Seronegative Spondyloarthropathies, Research and Science Today. No. 1(11)/2016, p. 112 - 131, ISSN-p: 2247 – 4455, (categoria B+ CNCSIS).
4. Marius Cherciu, **Laura Ioana Cherciu**, Mihai Bojincă, Teodora Serban, Constantin Bără, Olivia Mihaela Popa. Interleukin (IL) 12, IL-23 and IL-23 Receptor in Ankylosing Spondylitis Pathophysiology. Romanian Journal of Rheumatology – Volume XXIV No. 1, 2015, p. 5 - 15, ISSN 1843-0791, (categoria B+ CNCSIS).
5. Popa M. Olivia, Cherciu Marius, **Cherciu I. Laura**, Dutescu I. Monica, Bojinca Mihai, Bojinca Violeta, Bara Constantin, Popa O. Luis. *ERAP1* and *ERAP2* genes variations influence the risk of Psoriatic Arthritis in Romanian population. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis – *submitted*, ISSN 0004-069X (categoria ISI, Current impact factor: 3.18).
6. Marius Cherciu, Mihai Bojincă, **Laura Ioana Cherciu**, Constantin Bără, Olivia Mihaela Popa. Endoplasmic Reticulum Amino Peptidase 1 (*ERAP1*) in Ankylosing Spondylitis. Romanian Journal of Rheumatology, Volume XXIV, No. 1, 2015, p. 27 - 33, ISSN 1843-0791, (categoria B+ CNCSIS).

Participări la conferințe:

1. **L. Cherciu**, A. Ciobanu, R. Caisan, C. Bara, S. Tuta, I. Popescu, R. Sfrent-Cornatean. IL-6 gene polymorphism (-174G/C) in Romanian patients with ischemic stroke - results from a pilot study, The European Human Genetics Conference 2014, 31 May – 3 June, Milan, Italy.
2. **Laura I. Cherciu**, Luis O. Popa, Mihai Bojinca, Monica I. Dutescu, Violeta Bojinca, Marius Cherciu, Ruxandra Caisan, Constantin Bara, Olivia M. Popa. *IL1A* gene polymorphisms in Romanian patients with ankylosing spondylitis. The 30th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, EFI 2016, May 6 – 9, Kos, Greece.
3. Olivia M. Popa, **Laura I. Cherciu**, Marius Cherciu, Monica I. Dutescu, Mihai Bojinca, Violeta Bojinca, Teodora Serban, Constantin Bara, Luis O. Popa. *ERAP2* variants influence the risk of Psoriatic Arthritis in HLA-B27-negative patients. 10th East-West Immunogenetics Conference (EWIC) 2016, April 21 – 23, Wrocław, Poland.
4. Popa M. Olivia, Cherciu M., **Cherciu I. Laura**, Dutescu I. Monica, Bojinca Mihai, Ulea Lorena, Bara Constantin, Munteanu Iulian, Popa O. Luis. *ERAP2* gene polymorphisms influence the risk of Psoriatic Arthritis in Romanian population. The 30th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference, EFI 2016, May 6 – 9, Kos, Greece.

Referinte

- Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. A vision for the future of genomics research. *Nature*. 2003;422(6934):835-47.
- Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
- Attia J, Ioannidis JP, Thakkinian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, et al. How to use an article about genetic association: A: Background concepts. *Jama*. 2009;301(1):74-81.
- Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet*. 1973;1(7809):904-7.
- Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2000;59(11):883-6.
- The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC)The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC), Reveille JD, Sims AM, Danoy P, Evans DM, Leo P, et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42(2):123-7.
- Burton PR CD, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al, for The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium (TASC). Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet*. 2007;39(11):1329-37.
- Dougados M, van der Linden S, Juhlin R, Huitfeldt B, Amor B, Calin A, et al. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis and rheumatism*. 1991;34(10):1218-27.
- Rudwaleit M, Landewe R, van der Heijde D, Listing J, Brandt J, Braun J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(6):770-6.
- Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, Listing J, Akkoc N, Brandt J, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(6):777-83.
- Rudwaleit M, van der Heijde D, Landewe R, Akkoc N, Brandt J, Chou CT, et al. The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(1):25-31.
- van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis and rheumatism*. 1984;27(4):361-8.
- Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(8):2665-73.
- Zochling J, Brandt J, Braun J. The current concept of spondyloarthritis with special emphasis on undifferentiated spondyloarthritis. *Rheumatology*. 2005;44(12):1483-91.
- The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) RJ, et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42(2):123-7.
- Evans DM, Spencer CC, Pointon JJ, Su Z, Harvey D, Kochan G, et al. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet*. 2011;43(8):761-7.
- Reveille JD, Sims AM, Danoy P, Evans DM, Leo P, Pointon JJ, et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42(2):123-7.
- Cherciu M, Popa LO, Bojinca M, Dutescu MI, Bojinca V, Bara C, et al. Functional variants of ERAP1 gene are associated with HLA-B27 positive spondyloarthritis. *Tissue antigens*. 2013;26(10):12158.
- Tsui FW, Haroon N, Reveille JD, Rahman P, Chiu B, Tsui HW, et al. Association of an ERAP1 ERAP2 haplotype with familial ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(4):733-6.
- Robinson PC, Costello ME, Leo P, Bradbury LA, Hollis K, Cortes A, et al. ERAP2 is associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-positive and HLA-B27-negative patients. 2015;74(8):1627-9.
- Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*. 2015;4:7.
- Andres AM, Dennis MY, Kretzschmar WW, Cannons JL, Lee-Lin SQ, Hurler B, et al. Balancing selection maintains a form of ERAP2 that undergoes nonsense-mediated decay and affects antigen presentation. *PLoS genetics*. 2010;6(10).
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491(7422):119-24.
- Franke A, McGovern DP, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet*. 2010;42(12):1118-25.
- Robinson PC, Claushuis TA, Cortes A, Martin TM, Evans DM, Leo P, et al. Genetic dissection of acute anterior uveitis reveals similarities and differences in associations observed with ankylosing spondylitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ)*. 2015;67(1):140-51.
- Kuiper JJ, Van Setten J, Ripke S, Van TSR, Mulder F, Missotten T, et al. A genome-wide association study identifies a functional ERAP2 haplotype associated with birdshot chorioretinopathy. *Human molecular genetics*. 2014;23(22):6081-7.
- Tsoi LC, Spain SL, Knight J, Ellinghaus E, Stuart PE, Capon F, et al. Identification of 15 new psoriasis susceptibility loci highlights the role of innate immunity. *Nat Genet*. 2012;44(12):1341-8.
- Johnson MP, Roten LT, Dyer TD, East CE, Forsmo S, Blangero J, et al. The ERAP2 gene is associated with preeclampsia in Australian and Norwegian populations. *Human genetics*. 2009;126(5):655-66.
- Hill LD, Hilliard DD, York TP, Srinivas S, Kusanovic JP, Gomez R, et al. Fetal ERAP2 variation is associated with preeclampsia in African Americans in a case-control study. *BMC medical genetics*. 2011;12:64.

30. Vanhille DL, Hill LD, Hilliard DD, Lee ED, Teves ME, Srinivas S, et al. A Novel Haplotype Structure in a Chilean Population: Implications for ERAP2 Protein Expression and Preeclampsia Risk. *Molecular genetics & genomic medicine*. 2013;1(2):98-107.
31. Zhou J, Ma Q, Guo C, Shi L, Yao Y, Yu J, et al. [A study on the relationship between endoplasmic reticulum aminopeptidase2 genetic polymorphisms and non-small cell lung cancer in Yunnan Han population]. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*. 2014;37(12):909-14.
32. The Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC) ED, et al. Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nat Genet*. 2011;43(8):761-7.
33. Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, Leo P, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nat Genet*. 2013;45(7):730-8.
34. Zervoudi E, Saridakis E, Birtley JR, Seregin SS, Reeves E, Kokkala P, et al. Rationally designed inhibitor targeting antigen-trimming aminopeptidases enhances antigen presentation and cytotoxic T-cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(49):19890-5.
35. Evnouchidou I, Birtley J, Seregin S, Papakyriakou A, Zervoudi E, Samiotaki M, et al. A common single nucleotide polymorphism in endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 induces a specificity switch that leads to altered antigen processing. *J Immunol*. 2012;189(5):2383-92.
36. Zochling J, Smith EU. Seronegative spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(6):747-56.
37. Braun J, Sieper J. [Spondyloarthritis]. *Z Rheumatol*. 2010;69(5):425-32.
38. Landewe RB, van der Heijde DM. [The recognition of patients with spondyloarthritis. New classification criteria]. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2011;155(30-31).
39. Laval SH, Timms A, Edwards S, Bradbury L, Brophy S, Milicic A, et al. Whole-genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of non-MHC genetic-susceptibility loci. *American journal of human genetics*. 2001;68(4):918-26.
40. Djouadi K, Nedelec B, Tamouza R, Genin E, Ramasawmy R, Charron D, et al. Interleukin 1 gene cluster polymorphisms in multiplex families with spondylarthropathies. *Cytokine*. 2001;13(2):98-103.
41. van der Paardt M, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, Baudoin P, Kostense PJ, Alizadeh BZ, et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2002;41(12):1419-23.
42. Monnet D, Kadi A, Izac B, Lebrun N, Letourneur F, Zinovieva E, et al. Association between the IL-1 family gene cluster and spondyloarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(6):885-90.
43. Vounotrypidis P, Kouklakis G, Anagnostopoulos K, Zezos P, Polychronidis A, Maltezos E, et al. Interleukin-1 associations in inflammatory bowel disease and the enteropathic seronegative spondylarthritis. *Auto- immunity highlights*. 2013;4(3):87-94.
44. Timms AE, Crane AM, Sims AM, Cordell HJ, Bradbury LA, Abbott A, et al. The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *American journal of human genetics*. 2004;75(4):587-95.
45. International Genetics of Ankylosing Spondylitis C, Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, et al. Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nature genetics*. 2013;45(7):730-8.
46. Maksymowych WP, Rahman P, Reeve JP, Gladman DD, Peddle L, Inman RD. Association of the IL1 gene cluster with susceptibility to ankylosing spondylitis: an analysis of three Canadian populations. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(3):974-85.
47. Mahmoudi M, Amirzargar AA, Jamshidi AR, Farhadi E, Noori S, Avraee M, et al. Association of IL1R polymorphism with HLA-B27 positive in Iranian patients with ankylosing spondylitis. *European cytokine network*. 2011;22(4):175-80.
48. Wu Z, Gu JR. [A meta-analysis on interleukin-1 gene cluster polymorphism and genetic susceptibility for ankylosing spondylitis]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2007;87(7):433-7.
49. Sims AM, Timms AE, Bruges-Armas J, Burgos-Vargas R, Chou CT, Doan T, et al. Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(9):1305-9.
50. Ravindran JS, Owen P, Lagan A, Lewis J, Korendowych E, Welsh K, et al. Interleukin 1alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor gene polymorphisms in psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2004;43(1):22-6.
51. Rahman P, Sun S, Peddle L, Snelgrove T, Melay W, Greenwood C, et al. Association between the interleukin-1 family gene cluster and psoriatic arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(7):2321-5.
52. Lopez-Hernandez R, Valdes M, Campillo JA, Martinez-Garcia P, Salama H, Bolarin JM, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokine gene single-nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *International journal of immunogenetics*. 2015;42(1):38-45.
53. Bennett AN, Tan AL, Coates LC, Emery P, Marzo-Ortega H, McGonagle D. Sustained response to anakinra in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2008;47(2):223-4.
54. Jung N, Hellmann M, Hoheisel R, Lehmann C, Haase I, Perniok A, et al. An open-label pilot study of the efficacy and safety of anakinra in patients with psoriatic arthritis refractory to or intolerant of methotrexate (MTX). *Clinical rheumatology*. 2010;29(10):1169-73.
55. Bruner V, Atteno M, Spanò A, Scarpa R, Peluso R. Biological therapies for spondyloarthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*. 2014;6(3):92-101.
56. Tsui FW, Tsui HW, Akram A, Haroon N, Inman RD. The genetic basis of ankylosing spondylitis: new insights into disease pathogenesis. *The application of clinical genetics*. 2014;7:105-15.
57. Zochling J, Smith EU. Seronegative spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24(6):747-56.
58. Caffrey MF, James DC. Human lymphocyte antigen association in ankylosing spondylitis. *Nature*. 1973;242(5393):121.

59. Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *The New England journal of medicine*. 1973;288(14):704-6.
60. Colbert RA, DeLay ML, Klenk EI, Layh-Schmitt G. From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. *Immunological reviews*. 2010;233(1):181-202.
61. Brown MA. Genetics and the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Current opinion in rheumatology*. 2009;21(4):318-23.
62. Carter KW, Pluzhnikov A, Timms AE, Miceli-Richard C, Bourgain C, Wordsworth BP, et al. Combined analysis of three whole genome linkage scans for Ankylosing Spondylitis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2007;46(5):763-71.
63. Wende H, Colonna M, Ziegler A, Volz A. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 1999;10(2):154-60.
64. Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. KIR genes. *Transplant immunology*. 2005;14(3-4):135-42.
65. Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:217-51.
66. Falco M, Moretta L, Moretta A, Bottino C. KIR and KIR ligand polymorphism: a new area for clinical applications? *Tissue antigens*. 2013;82(6):363-73.
67. Middleton D, Williams F, Cullen C, Mallon E. Modification of an HLA-B PCR-SSOP typing system leading to improved allele determination. *Tissue antigens*. 1995;45(4):232-6.
68. Halfpenny IA, Middleton D, Barnett YA, Williams F. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity: IV. KIR3DL1/S1. *Human immunology*. 2004;65(6):602-12.
69. Crum KA, Logue SE, Curran MD, Middleton D. Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue antigens*. 2000;56(4):313-26.
70. Diaz-Pena R, Blanco-Gelaz MA, Lopez-Larrea C. KIR genes and their role in spondyloarthropathies. *Advances in experimental medicine and biology*. 2009;649:286-99.
71. Breban M, Costantino F, Andre C, Chiocchia G, Garchon HJ. Revisiting MHC genes in spondyloarthritis. *Current rheumatology reports*. 2015;17(6):516.
72. Lopez-Larrea C, Blanco-Gelaz MA, Torre-Alonso JC, Bruges Armas J, Suarez-Alvarez B, Pruneda L, et al. Contribution of KIR3DL1/3DS1 to ankylosing spondylitis in human leukocyte antigen-B27 Caucasian populations. *Arthritis research & therapy*. 2006;8(4):R101.
73. Diaz-Pena R, Vidal-Castineira JR, Alonso-Arias R, Suarez-Alvarez B, Vicario JL, Solana R, et al. Association of the KIR3DS1*013 and KIR3DL1*004 alleles with susceptibility to ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(4):1000-6.
74. Diaz-Pena R, Vidal-Castineira JR, Mulero J, Sanchez A, Queiro R, Lopez-Larrea C. Activating killer immunoglobulin-like receptors genes are associated with increased susceptibility to ankylosing spondylitis. *Clinical and experimental immunology*. 2015;180(2):201-6.
75. Deng Z, Zhen J, Zhu B, Zhang G, Yu Q, Wang D, et al. Allelic diversity of KIR3DL1/3DS1 in a southern Chinese population. *Human immunology*. 2015;76(9):663-6.
76. Diaz-Pena R, Blanco-Gelaz MA, Suarez-Alvarez B, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A, Alonso-Arias R, et al. Activating KIR genes are associated with ankylosing spondylitis in Asian populations. *Human immunology*. 2008;69(7):437-42.
77. Jiao YL, Ma CY, Wang LC, Cui B, Zhang J, You L, et al. Polymorphisms of KIRs gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. *Journal of clinical immunology*. 2008;28(4):343-9.
78. Jiao YL, Zhang BC, You L, Li JF, Zhang J, Ma CY, et al. Polymorphisms of KIR gene and HLA-C alleles: possible association with susceptibility to HLA-B27-positive patients with ankylosing spondylitis. *Journal of clinical immunology*. 2010;30(6):840-4.
79. Wang S, Li G, Ge R, Duan Z, Zeng Z, Zhang T, et al. Association of KIR genotype with susceptibility to HLA-B27-positive ankylosing spondylitis. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*. 2013;23(3):538-41.
80. Levinson RD, Martin TM, Luo L, Ashouri E, Rosenbaum JT, Smith JR, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptors in HLA-B27-associated acute anterior uveitis, with and without axial spondyloarthropathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(3):1505-10.
81. Kollnberger S, Chan A, Sun MY, Chen LY, Wright C, di Gleria K, et al. Interaction of HLA-B27 homodimers with KIR3DL1 and KIR3DL2, unlike HLA-B27 heterotrimers, is independent of the sequence of bound peptide. *European journal of immunology*. 2007;37(5):1313-22.
82. Cauli A, Piga M, Dessole G, Porru G, Floris A, Vacca A, et al. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and HLA-class I heavy chains in ankylosing spondylitis. *Drug development research*. 2014;75 Suppl 1:S15-9.
83. Wong-Baeza I, Ridley A, Shaw J, Hatano H, Rysnik O, McHugh K, et al. KIR3DL2 binds to HLA-B27 dimers and free H chains more strongly than other HLA class I and promotes the expansion of T cells in ankylosing spondylitis. *J Immunol*. 2013;190(7):3216-24.
84. Kollnberger S, Bird L, Sun MY, Retiere C, Braud VM, McMichael A, et al. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis and rheumatism*. 2002;46(11):2972-82.
85. Stewart-Jones GB, di Gleria K, Kollnberger S, McMichael AJ, Jones EY, Bowness P. Crystal structures and KIR3DL1 recognition of three immunodominant viral peptides complexed to HLA-B*2705. *European journal of immunology*. 2005;35(2):341-51.
86. Bowness P, Ridley A, Shaw J, Chan AT, Wong-Baeza I, Fleming M, et al. Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *J Immunol*. 2011;186(4):2672-80.