

Lovro Lamot^{1,2}
Mandica Vidović²
Marija Perica²
Lana Tambić Bukovac²
Miroslav Harjaček²

¹ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zagreb ♦ Hrvatska

² Reumatološka ambulanta
Dječja bolnica Srebrnjak
Zagreb ♦ Hrvatska

Genetska podloga različitih oblika spondiloartritisa

Genetic predisposition for various forms of spondyloarthritis

Zaprimljeno:
6. svibnja 2014.
Prihvaćeno:
29. lipnja 2014.

Adresa za dopisivanje:
dr. sc. Lovro Lamot, dr. med.
Dječja bolnica Srebrnjak
Srebrnjak 100 ♦ 10000 Zagreb ♦ Hrvatska
lovro.lamot@gmail.com

Sažetak

Već dugo je poznato da postoji snažna veza između spondiloartritisa i HLA-B27 antigena, a nekoliko istraživanja pokazalo je da slična veza postoji i za HLA-B7 antigen. No, cjelokupna MHC-regija odgovorna je za manje od pola rizika, zbog čega su provedena i mnoga druga istraživanja koja su za cilj imala otkriti utjecaj ostalih gena na razvoj bolesti. U mnogim od tih istraživanja upotreblja-

vale su se različite metode visoke propusnosti, a među otkrivenim genima ističu se geni koji sudjeluju u procesuiranju antigena te geni koji kodiraju različite citokine. Zbog svega navedenog može se zaključiti kako bolesti iz skupine spondiloartritisa pripadaju poligenским bolestima u kojima su prisutni autoinflamatorni i autoimunosni mehanizmi.

Ključne riječi

spondiloarthritis; autoimunosne bolesti; autoinflamatorne bolesti; genski izražaj; genetska podloga

Summary

In addition to the long-established association of HLA-B27 antigen and spondyloarthritis, several studies have shown a similar association with HLA-B7 antigen. But since the whole MHC region carries less than half of the risk for the development of the disease, the main goal of many recently performed researches, which implemented various high-throughput methods, was to discover

the influence of genes outside the MHC region on disease development. The results showed that genes closely linked to spondyloarthritis participate in antigen processing and coding of various cytokines. This can lead to the conclusion that diseases from the spondyloarthritis group are polygenic, affected by both autoinflammatory and autoimmune mechanisms.

Keywords

spondyloarthritis; autoimmune diseases; autoinflammatory diseases; gene expression; genetic predisposition

Uvod

Istraživanje genetske podloge različitih bolesti pod velikim je utjecajem dostupne tehnologije (1). S obzirom na to da se ankilozantni spondilitis (AS), psorijatični artritis (PsA) i upalna bolest crijeva (IBD) često otkrivaju u istog bolesnika ili u članova iste obitelji, već dugo se zna da geni sudjeluju u razvoju spondiloartritisa (SpA). Provede-

Uloga HLA-genotipa

HLA-sustav je glavni kompleks tkivne srodnosti (engl. major histocompatibility complex, skraćena MHC) u ljudi (2). Ovaj sustav sadržava velik broj međusobno povezanih gena koji se nalaze na kratkom kraku kromosoma 6 (6p21). Nasljeđuju se kao HLA-haplotip mendelskim tipom nasljeđivanja od svakog roditelja, a dijele se u tri razreda. Geni HLA-razreda I. i II. odgovorni su za sintezu antigena HLA, a geni HLA-razreda III. odgovorni za sintezu komponenti komplekta, citokina kao što su čimbenik nekroze tumora - alfa (engl. tumor necrosis factor - alpha, skraćena TNF- α) i HSP (engl. heat shock protein) te nekih drugih proteina uključenih u imunološki odgovor. Molekule razreda I. građene su od glikoziliranog teškog lanca koji kodiraju HLA-geni razreda I. (A, B i C) te kovalentno vezanog β 2 mikroglobulina (skraćena β 2m) koji kodira gen smješten na kromosomu 15. Teški lanac ima tri izvanstanične domene (α 1, α 2 i α 3), transmembransku regiju i unutarstanične domene. Izvanstanične domene α 1 i α 2 tvore dio na koji se veže peptid i sadrže varijabilni slijed aminokiselina koje određuju antigensku specifičnost, dok α 3 domena zajedno s β 2m tvori konstantni dio koji slični imunoglobulinu. Molekule razreda II. su heterodimeri koje kodiraju HLA-geni razreda II. (DR, DP i DQ), a sastoje se od dva nekovalentno povezana glikozilirana polipeptidna lanca, α i β . Oba lanca imaju izvanstanični dio sastavljen od dvije domene (α 1 i α 2 ili β 1 i β 2), kratku transmembransku regiju i unutarstaničnu domenu. Domene α 1 i β 1 imaju varijabilni slijed aminokiselina i tvore dio na koji se veže peptid, dok α 2 i β 2 domene tvore konstantni dio koji slični imunoglobulinu. Molekule razreda I. izražene su na površini gotovo svih stanica s jezgrom, predočavaju endogene antigene sintetizirane unutar same stanice, a kompleks koji nastaje prilikom toga prepoznaju CD8 limfociti T. Nasuprot tome, molekule razreda II. izražene su samo na stanicama koje predočavaju antigene (engl. antigen presenting cells, skraćena APC), a predočavaju egzogene proteine koji endocitozom ulaze u stanicu, gdje se razgrađuju i stvaraju kompleks s molekulama razreda II. Navedeni kompleks zatim se prenosi na površinu stanice gdje ga prepoznaju CD4 limfociti T. Zahvaljujući polimorfizmu u dijelu koji veže peptid, HLA-molekule mogu prikazati različite peptide, a ovisno o redoslijedu

na istraživanja pokazala su da najvažniju ulogu pri tome imaju geni HLA-sustava (engl. human leukocyte antigen system), no tek je nedavni razvoj metoda visoke propusnosti omogućio otkrivanje uloge gena izvan tog sustava, poput gena uključenih u unutarstanično procesiranje antigena te gena koji kodiraju različite citokine.

aminokiselina, serološki se dokazuje antigenska specifičnost za oba razreda. Međutim, istraživanja su pokazala da je HLA-polimorfizam mnogo veći nego što se to može dokazati serološkim metodama pa su se razvile molekularne metode kojima se dokazuje određeni gen i njegov alel. HLA-molekule imaju važnu ulogu u presađivanju organa, a povezane su i s mnoštvom različitih bolesti, osobito imunološki uvjetovanih.

Već dugo je poznato da postoji snažna veza između spondiloartritisa i HLA-B27 antigena. HLA-B27 antigen predstavlja obitelj blisko povezanih proteina koji se nalaze na površini stanica i koji su kodirani različitim alelima, a nazivaju se podtipovima HLA-B27. Većina ovih podtipova karakterizirana je zamjenom nukleotida u egzonomima 2 i 3 koji kodiraju α 1 i α 2 domene dijela na koji se veže peptid, a smatra se da ih je velik dio nastao iz vrlo rasprostranjenog HLA-B2705 podtipa (3). Do danas je diljem svijeta zabilježeno stotinjak različitih podtipova HLA-B27 (<http://hla.alleles.org/alleles/class1.html>). HLA-B2704, HLA-B2705, HLA-B2702 i HLA-B2707 pokazuju snažnu povezanost s AS-om, dok je povezanost HLA-B2706 i HLA-B2709 slabija (4). U većini etničkih grupa, HLA-B27 je prisutan u 90 do 95 % bolesnika s AS-om, u 60 % bolesnika s PsA-om i artritisom povezanim s IBD-om, u 60 do 80 % bolesnika s ReA-om te u 20 do 25 % bolesnika s nediferenciranim SpA-om (5).

Povezanost HLA-B27 antigena sa SpA-om u djece slična je kao i u odraslih, tako da je HLA-B27 antigen prisutan u 60 do 80 % bolesnika s juvenilnom spondiloartritisom (jSpA) (6). Istraživanje provedeno u Velikoj Britaniji pokazalo je da čak 74 % djece u koje je prema kriterijima Međunarodne lige reumatoloških udruženja (engl. International League of Associations for Rheumatology, skraćena ILAR) postavljena dijagnoza artritisa povezanog s entezitisom (engl. enthesitis-related arthritis, skraćena ErA) ima HLA-B27 antigen (7). Istraživanje provedeno u Latviji pokazalo je da u djece s juvenilnim idiopatskim artritisom (engl. juvenile idiopathic arthritis, skraćena JIA) postoji osam različitih podtipova HLA-B27 antigena, da je najčešći HLA-B2705 i da se najčešće javlja u bolesnika s ErA-om (8).

Direktna etiopatogenetska uloga HLA-B27 u razvoju SpA-a demonstrirana je na eksperimentalnom modelu

transgeničnih štakora koji su izražavali HLA-B27 s ljudskim $\beta 2m$ (B27/h $\beta 2m$) (9). Još uvijek nisu sasvim jasni mehanizmi kojima HLA-B27 molekula sudjeluje u razvoju bolesti. S obzirom na to da se antigeni u sklopu HLA-B27 predočavaju CD8 limfocitima T, smatralo se da predočavanje određenih bakterija aktivira CTL koji posljedično pokazuje križnu reaktivnost s vlastitim peptidima (10). Takav koncept „artrogenih peptida” na SpA gleda kao na autoimunostnu bolest, no ozbiljno je ugrožen nakon što su dva istraživanja pokazala da odsutnost funkcionalnih CD8 limfocita T ne sprječava razvoj bolesti u B27/h $\beta 2m$ štakora (11, 12). Nedavno su predložene dvije alternativne hipoteze prema kojima HLA-B27 ima važnu ulogu u započinjanju odgovora prirodnog imunološkog sustava. Prva hipoteza polazi od zapažanja da je HLA-B27 molekula sklona stvaranju homodimera na površini stanice (13). HLA-B27 dimere prepoznaju receptori NK stanica slični imunoglobulinima (engl. killer cell immunoglobulin-like receptors, skraćeni KIR) te leukocitni receptori slični imunoglobulinima (engl. leukocyte immunoglobulin-like receptors, skraćeni LILR) koji se, osim na NK stanicama, nalaze i na limfocitima T, što dovodi do aktivacije stanica i stvaranja proupalnih medijatora (14). Nažalost, ova hipoteza ne može objasniti zašto druge HLA-B molekule ili podtipovi HLA-B27 molekula, koji također stvaraju homodimere, nisu povezani sa SpA-om (15). Prema drugoj hipotezi, HLA-B27 molekule sklone su pogrešnom smatanju (engl. misfolding), što prouzročuje stres u endoplazmatskom retikulumu stanice i dovodi do tzv. odgovora na nesmotani protein (engl. unfolded protein response, skraćeni UPR) (16). Takav odgovor u endoplazmatskom retikulumu prouzročuje indukciju proteina koji olakšavaju smatanje drugih proteina, tzv. šaperona, te aktivaciju NF- κ B signalnog puta, što pak naposljetku dovodi do povećanog stvaranja proupalnih citokina (17). Eksperiment na HLA-B27 transgeničnim miševima, koji služe kao životinjski model za proučavanje SpA-a, pokazao je da krivo smatanje HLA-B27 molekule i posljedični odgovor u makrofagima posredstvom TLR-a (engl. Toll like receptors) dovodi do pojačanog stvaranja IL-23 (18). Slično je pokazano i na ljudskim dendritičkim stanicama u kojima dolazi do pojačanog stvaranja IL-23 nakon stimulacije TLR-a u uvjetima stresa u endoplazmatskom retikulumu (17). No, treba napomenuti da je nedavno provedeno istraživanje pokazalo da pojačano stvaranje IL-23, potaknuto lipopolisaharidima (skraćeni LPS),

u makrofagima bolesnika s AS-om nije bilo povezano s UPR-om, što dovodi u pitanje ulogu UPR-a potaknutog HLA-B27 molekulom u SpA-u (19). Ipak, na osnovi svega iznesenoga možemo zaključiti da posredstvom HLA-B27 molekule u SpA-u dolazi do nakupljanja stanica prirodnog imunološkog sustava na mjestima koja su izložena bakterijama ili mehaničkom stresu, zbog čega se na SpA treba gledati više kao na autoinflamatornu nego autoimunostnu bolest (20).

Nekoliko istraživanja pokazalo je da slična veza sa SpA-om postoji i za HLA-B7 antigen (21, 22). Regija amino-kiselina na poziciji 63-71 u HLA-B27 molekuli sudjeluje u stvaranju najmanje tri različita epitopa zajednička B27 i B7 molekuli, a koja nose nazive ME1, GSP5.3 i GS145.2 (23). Zastupljenost HLA-B7 antigena u sveukupnom stanovništvu Hrvatske jest 9,67 %, a HLA-B27 antigena 6 % (24). Jedini podtip HLA-B7 antigena zabilježen među stanovništvom Hrvatske jest B0702, a najzastupljeniji podtip HLA-B27 jest B2705, koji ima 3,55 % stanovništva Hrvatske (25). U istraživanju provedenom u Hrvatskoj, u kojem je sudjelovalo 74 djece s različitim oblicima jSpA-a, a od kojih je 45 zadovoljilo ILAR-ove kriterije za ErA, HLA-B27 antigen imalo je 31 djeteta s jSpA-om (41,8 %), HLA-B7 26 djece (35,1 %), a oba antigena imalo je šestoro djece s jSpA-om (8,1 %) (26). Molekularnom analizom otkrivena su tek dva podtipa HLA-B27 među bolesnicima s jSpA-om: B2702 (19,35 %) i B2705 (80,65 %).

Unatoč tome što se SpA tradicionalno povezuje s HLA-genima razreda I., pokazano je da su i HLA-geni razreda II. uključeni u razvoj i tijek bolesti (27, 28). Nadalje, pokazalo se da HLA-geni razreda II., osim središnje uloge u stečenom, imaju i važnu ulogu u prirodnom imunološkom odgovoru tako što moduliraju odgovor TLR-a na odgovarajuće ligande (29).

Naposljetku, važno je naglasiti da manje od 5 % ljudi s HLA-B27 antigenom razvije SpA (30). S druge strane, 20 % ljudi s HLA-B27 antigenom koji su u rodu s nekim kome je postavljena dijagnoza AS-a razvit će SpA (31). Istraživanja u kojima su sudjelovale cijele obitelji bolesnika oboljelih od SpA-a pokazala su da se samo oko 40 % ukupnog rizika za razvoj SpA može pripisati HLA-B27 antigenu, dok je cjelokupna MHC-regija odgovorna za oko 50 % rizika (30). Sve navedeno upućuje na to da su osim gena iz MHC-sustava i drugi geni odgovorni za razvoj ove bolesti te da je riječ o klasičnoj poligenoskoj bolesti.

Uloga gena izvan MHC-sustava

Za otkrivanje genetske podloge bolesti proteklih se godina sve više upotrebljavaju metode visoke propusnosti (engl. high throughput methods). Za razliku od tradicionalnih metoda molekularne biologije kojima se detaljno prou-

čavao jedan gen ili protein, metodama visoke propusnosti moguće je istodobno proučavati velik broj gena, njihovih transkripata, proteina ili nekih drugih bioloških elemenata. U otkrivanju genetske podloge spondiloartritisa,

Tablica 1. **Genetski čimbenici koji utječu na razvoj AS-a, PsA-a i IBD-a (32)**

Table 1. **Genetic factors shared between susceptibility to AS, PsA and IBD (32)**

Geni, funkcionalni putevi i bolesti	Ankilozantni spondilitis	Psorijatični artritis	Upalna bolest crijeva	
			Crohnova bolest	Ulcerozni kolitis
Unutarstanično procesuiranje antigena	■ HLA-B27 ■ ERAP1	■ HLA-Cw6 ■ ERAP1	■ ERAP2	■ HLA-DRA
Autofagija	-	-	■ IRGM	■ IRGM
TH17 odgovor	■ IL23R ■ IL12B ■ STAT3 ■ PTGER4	■ IL23R ■ IL12B	■ IL23R ■ IL12B ■ STAT3 ■ JAK2 ■ PTGER4 ■ PUS10 ■ IL18RAP	■ IL23R ■ IL12B, ■ STAT3 ■ JAK2 ■ IL18RAP ■ PUS10
NF-κB put	■ CARD9	■ REL	■ REL ■ CARD9	■ REL ■ CARD9
Imunološki odgovor	■ IL1R2 ■ ORMDL3	■ DEFB4 ■ IL2/IL21 ■ PTPN22 ■ TYK2	■ DEFB4 ■ IL2/IL21 ■ NKX2-3 ■ ORMDL3 ■ PTPN22 ■ TNFRSF6B ■ TYK2	■ IL2/IL21 ■ IL1R2 ■ NKX2-3 ■ ORMDL3 ■ TNFRSF6B
Geni nejasne povezanosti s imunološkim sustavom	■ CDKAL1 ■ KIF21B	■ CDKAL1	■ CDKAL1 ■ KIF21B ■ MST1 ■ PSMG1	■ MST1 ■ PSMG1

većina takvih istraživanja bila je usmjerena na bolesnike s AS-om. Tako se pokazalo da u razvoju AS-a, osim gena unutar MHC-regije, određenu ulogu imaju i geni povezani s unutarstaničnom pregradnjom antigena, poput gena ERAP1, geni koji utječu na diferencijaciju TH17 limfocita, poput gena IL23R, IL12B, STAT3 i PTGER4, te geni povezani s NF-κB putem, poput gena CARD9 (32). Uloga tih gena opažena je i u istraživanjima u kojima su sudjelovali bolesnici s postavljenom dijagnozom PsA-a te IBD-a (tablica 1). Nadalje, pokazalo se da su u razvoj IBD-a uključeni i geni koji imaju određenu funkciju u autofagiji,

kao što je gen IRGM. Od svih navedenih gena, na razvoj SpA-a najviše bi mogao utjecati ERAP1 gen. Produkt je tog gena aminopeptidaza koja se nalazi u endoplazmatском retikulumu, a ima važnu ulogu u pripremi peptida koji se predočavaju u sklopu MHC-molekula razreda I. Polimorfizmi navedenog gena stoga bi mogli biti odgovorni za pogrešno predočavanje peptida u sklopu MHC-molekule razreda I. Osim toga, pokazalo se da ERAP1 gen ima povećan izražaj u dendritičkim stanicama bolesnika s postavljenom dijagnozom AS-a, što također potvrđuje ulogu ovog gena u razvoju AS-a.

Istraživanja genskog sadržaja

S obzirom na mnoštvo različitih fizičkih, biokemijskih i razvojnih čimbenika koji utječu na prepisivanje nekog gena na putu do stvaranja proteina i konačnih fenotipskih obilježja, prilikom proučavanja neke bolesti potrebno je ispitati i izražaj gena, odnosno stvaranje specifičnih molekula prijenosne ribonukleinske kiseline (engl. messenger RNA, skraćenica mRNA). Za to se danas koriste različite metode visoke propusnosti kojima je moguće analizirati sveukupni transkriptom, odnosno sve molekule mRNA koje se nalaze u nekoj stanici. Vrlo često to se postiže korištenjem malih pločica na kojima se nalaze tisuće oligonukleotida specifičnih za mRNA gena

koji kodiraju proteine. Takve pločice nazivaju se DNA čipovi, a najpoznatijima pripadaju čipovi američke tvrtke Affymetrix. Osim toga, molekule mRNA moguće je i sekvencionirati. S obzirom na visoku cijenu DNA čipova te na još višu cijenu sekvencioniranja, ove metode još uvijek nisu široko dostupne. Tako je do danas proveden tek manji broj istraživanja u kojima je učinjena analiza genskoga izražaja u bolesnika sa SpA-om (tablica 2). Dva takva istraživanja provedena su prije više od deset godina, u njima je sudjelovao mali broj bolesnika i napravljena je analiza izražaja malog broja gena (33, 34). Istraživanja provedena u proteklih nekoliko godina pokazala

Tablica 2. Istraživanja genskoga izražaja u bolesnika s različitim oblicima SpA-a

Table 2. Gene expression profiling studies in patients with various forms of SpA

Istraživanje	Važni geni	Izvor mRNA	Dg	P (N)
Analiza izražaja 588 gena izoliranih iz mononuklearnih stanica periferne krvi bolesnika sa SpA-om (33).	MND, MRP8, MRP14, JAK3, MAP kinase p38, TNFR2/p75, CCR1, CXCR4, Integrin beta 1, IL1 beta, IL-8	PBMC	RA	6
			SpA	7
			PsA	6
Otkrivanje patogeneze SpA-a na osnovi analize genskoga izražaja mononuklearnih stanica sinovijalne tekućine (34).	MCP-1, IL-8, IL-1beta, EMAP-II, IFN-Y, TNF alpha, BiP	SFMC	RA	5
			SpA	5
Uvid u patogenezu aksijalnih SpA-a na osnovi analize genskoga izražaja (35).	ALOX12, BCL6, CLU, CR1, DEFA4, GRB10, IL1R1, IL1R2, MAPK14, NCR3, NLRP2/NALP2, PTGS1/COX1, SELP, SLPI, SOD2, SPARC/SPOCK2, THBD, THBS1, TREM1, BMP6, CTNNAL1, KREMEN1, PCSK6	WB	SpA	18
Analiza genskoga izražaja cjelokupnog genoma i RT-PCR ispitivanje uloge RGS1 gena kao potencijalnog biomarkera za nediferencirane SpA (36).	RGS1	PBMC	uSpA	28
			AS	21
Analiza genskoga izražaja otkriva smanjen izražaj gena povezanih s imunološkim sustavom u bolesnika s AS-om (37).	NR4A2, TNFAIP3, CD69	PBMC	AS	18
Analiza genskog izražaja stanica pune krvi u bolesnika s ankilozantnim spondilitisom pokazuje pojačan izražaj TLR4 i TLR5 gena (38).	TLR4, TLR5	WB	AS	16
Analiza genskog izražaja stanica pune krvi bolesnika s AS-om otkriva nove gene koji potencijalno pridonose upali i oštećenju tkiva (39).	BCL11B, DNMT1, CDC25B, CLSTN1, VAMP5, DOCK10, SPARC/SPOCK2, ITGB7, MCM3, CX3CR1, PTPN1, EP300, PPP2R1A, CLEC4D	WB	AS	18
Analiza genskoga izražaja u bolesnika s JIA-om i jSpA-om: geni za proangiogene ELR ⁺ kemokine povezani su s tijekom bolesti (40).	STAT1, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8	PBMC	jSpA	6
		SFMC		5
Analiza genskoga izražaja stanica periferne krvi specifičnih za različite podtipove novonastalog JIA-a (41).	Hb α (HbA1/A2, HbA2) i β (HbB)	PBMC	ErA	28
Analiza genskoga izražaja mononuklearnih stanica sinovijalne tekućine upućuje na disregulaciju gena prirodene imunosti u bolesnika s ErA-om (44).	Granzyme H, KLRF1, NKG7, KIR3DL3, CD1c, CD1d, CD244, CXCR3, CXCR7, CXCR16, CD248, FAIM3, CD163	PBMC	ErA	17
		SFMC		7

AS ankilozantni spondilitis ankylosing spondylitis ErA artritis povezan s entezitisom enthesitis-related arthritis jSpA juvenilni spondiloartritis juvenile spondyloarthritis PBMC mononuklearne stanice periferne krvi peripheral blood mononuclear cells PsA psorijatični artritis psoriatic arthritis RA reumatoidni artritis rheumatoid arthritis SpA spondiloartritis spondyloarthritis SFMC mononuklearne stanice sinovijalne tekućine synovial fluid mononuclear cells uSpA nediferencirani spondiloartritis undifferentiated spondyloarthritis WB puna krv whole blood

su da se na osnovi analize genskoga izražaja mogu pouz-
dano razlikovati bolesnici sa SpA-om od zdravih osoba
(35 - 39). Pokazalo se da u bolesnika sa SpA-om povećan
izražaj imaju geni koji sudjeluju u prirodnom imuno-
loškom sustavu (SPARC, SLPI, NLRP2), zatim geni za

receptore IL-1 te geni koji sudjeluju u pregradnji kosti-
ju (35). Nadalje, pokazalo se da izražaj gena RGS1 može
poslužiti kao prediktivni čimbenik za AS, a još bolje za
nediferencirani oblik SpA-a (36). Osim toga, pokazalo
se da u bolesnika s AS-om postoji smanjen izražaj gena

povezanih s imunološkim odgovorom (NR4A2, TNFA-IP3, CD69), što može poslužiti kao snažni prediktivni čimbenik za AS (37). K tome se pokazalo da u bolesnika s AS-om povećan izražaj imaju geni za TLR4 i TLR5, što potvrđuje važnost različitih podvrsta TLR-a i odgovora na gram-negativne bakterije u patogenezi SpA-a (38). Naposljetku, nedavno provedeno istraživanje pokazalo je da u bolesnika s AS-om postoji povećan izražaj gena SPOCK2 i EP300, čiji produkti sudjeluju u metabolizmu kosti i hrskavice (39).

Među prvim istraživanjima u kojima je analiziran izražaj gena u bolesnika s jSpA-om bilo je istraživanje provedeno 2004. godine (40). U tom istraživanju sudjelovalo je 26 bolesnika s postavljenom dijagnozom kroničnog artritisa prema ACR-ovim dijagnostičkim i klasifikacijskim kriterijima te 15 osoba odgovarajuće dobi i spola koji su poslužili kao zdrave kontrole. Od toga je pet bolesnika imalo oligoartikularni oblik bolesti, 15 poliarartikularni, a šest je imalo postavljenu dijagnozu jSpA-a. Svim bolesnicima i zdravim kontrolama učinjena je analiza izražaja gena mononuklearnih stanica periferne krvi (engl. peripheral blood mononuclear cells, skraćenica PBMC), a u deset bolesnika s poliarartikularnim oblikom bolesti, pet s oligoartikularnim i pet s jSpA-om učinjena je i analiza genskoga izražaja mononuklearnih stanica sinovijalne tekućine (engl. synovial fluid mononuclear cells, skraćenica SFMC). Za analizu je korišten Affymetixov U95Av2 čip sa 12 651 skupom proba. Dobiveni rezultati pokazali su da u PBMC-u bolesnika s poliarartikularnim oblikom bolesti postoji razlika u izražaju 342 gena u odnosu na zdrave kontrole. Provedena ontološka analiza pokazala je da je većina tih gena povezana s regulacijom stanica imunološkog sustava, signalnim putevima (JAK-STAT), metabolizmom i degradacijom proteina te angiogenezom. Unatoč malom broju bolesnika s jSpA-om, pokazalo se da u PBMC-u ovih bolesnika također postoji statistički znatna razlika u genskomu izražaju ($P \leq 0,05$) za gene CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8 i STAT1. Produkti su CXCL gena kemokini povezani s angiogenezom i mogu se kategorizirati kao angiogeni ili angiostatski, ovisno o prisutnosti ili odsutnosti ELR-motiva (glutaminska kiselina, lizin i arginin). Daljnja analiza genskoga izražaja ovih gena u PBMC-u i SFMC-u svih bolesnika pokazala je znatno povećan izražaj četiri angiogena gena (CXCL1, CXCL2, CXCL3 i CXCL8) u PBMC-u bolesnika s poliarartikularnim oblikom bolesti u usporedbi s izražajem u bolesnika s oligoartikularnim oblikom bolesti i s izražajem u zdravih osoba. Izražaj spomenutih gena u SFMC-u bio je podjednako povećan u svim oblicima bolesti u usporedbi s izražajem u PBMC-u zdravih kontrola. S druge strane, izražaj tri angiostatska gena (CXCL9, CXCL10 i CXCL11) u SFMC-u bolesnika s poliarartikularnim oblikom bio je povećan u usporedbi s izražajem u PBMC-u zdravih kontrola, no smanjen u usporedbi s izražajem u

SFMC-u oligoartikularnih bolesnika. CXCL10 također je bio manje izražen u SFMC-u bolesnika s jSpA-om u usporedbi s izražajem u SFMC-u bolesnika s oligoartikularnim oblikom bolesti. Za gene CXCL3 i CXCL8 učinjena je i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real-time polymerase chain reaction, skraćenica RT-PCR) analiza u bolesnika s poliarartikularnim oblikom bolesti koja je potvrdila rezultate dobivene na čipu. Među nedostatke ovog istraživanja ubrajamo prije svega malen broj bolesnika s jSpA-om koji nisu odabrani prema ILAR-ovim kriterijima, korištenje PBMC-a i SFMC-a za izolaciju mRNA, zatim malen broj skupova proba na korištenoj pločici te neprovođenje potvrde dobivenih rezultata u većeg broja bolesnika i za veći broj gena. Osim toga, za ontološku klasifikaciju gena korištena je zastarjela baza. Ipak, ovo istraživanje ukazalo je na ulogu CXCL kemokina i JAK-STAT signalnog puta u razvoju JIA-a i jSpA-a.

U drugom istraživanju, koje je provedeno u pet centara i trajalo je dvije godine, sudjelovalo je 136 djece s postavljenom dijagnozom JIA-a te 59 odgovarajućih zdravih kontrola (41). Svi bolesnici klasificirani su prema ILAR-ovim kriterijima, tako da je 28 djece imalo ErA, 43 perzistentni oligoartritis, 45 RF negativni poliartritis, a 21 dijete imalo je sistemski oblik JIA-a. Prije sakupljanja uzoraka ni jedan od sudionika istraživanja nije bio liječen lijekovima koji mijenjaju tijek bolesti (engl. disease-modifying antirheumatic drug, skraćenica DMARD) ni biološkim lijekovima. Također ni jedan od sudionika nije imao postavljenu dijagnozu neke druge upalne bolesti osim JIA-a. Analiza genskog izražaja obavljena je s pomoću Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 čipa, a pokazala je da postoji razlika u izražaju 5671 gena. U bolesnika s ErA-om 148 gena pokazalo je razliku u izražaju, u bolesnika s perzistentnim oligoartritisom 703, u bolesnika s RF negativnim poliartritisom 608, a u bolesnika sa sistemskim oblikom bolesti 4643 gena. Samo 6 gena pokazalo je razliku u izražaju u svim oblicima bolesti (APPBP2, ZNF230, ZND451, C15orf17, C14orf012, MMD). U 14 bolesnika sa sistemskim oblikom bolesti i 15 zdravih kontrola provedena je potvrda dobivenih rezultata s pomoću RT-PCR-a. Četiri gena za koja je GeneChip analiza pokazala da imaju veću zastupljenost u bolesnika sa sistemskim oblikom bolesti (haptoglobin, IL-10, MS4A4A i SOCS-3) i ovom metodom pokazala su sličan izražaj. Analiza svih gena koji su pokazali razliku u izražaju, uz pomoć Ingenuity Pathway Analysis programa, otkrila je da ti geni sudjeluju u 46 puteva koji su primarno povezani s imunološkim i upalnim odgovorom. Analiza grupa gena pokazala je smanjen izražaj gena za hemoglobin α (HBA1/A2 i HBA2) i β (HBB) u bolesnika s ErA-om. To je otkriće bilo neočekivano, s obzirom na to da su bolesnici s AS-om i drugim oblicima SpA-a rijetko anemični (42). Međutim, jedan od

uzroka smanjenog izražaja ovih gena mogao bi biti odgovor na TGF- β , za koji se zna da je više izražen u AS-u i da može djelovati preko protein 1 aktivatora koji se veže na mjesto blizu gena za hemoglobin (43). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da postoje jasne razlike u izražaju gena povezanih s imunološkim i upalnim odgovorom u PBMC-u bolesnika s JIA-om. Prilikom odabira bolesnika s ErA-om korišteni su ILAR-ovi kriteriji, no i u ovom istraživanju glavni naglasak bio je na analizi gena povezanih s drugim oblicima JIA-a, a ErA skupina bolesnika bila je heterogena.

Naposlijetku, krajem 2012. objavljeno je istraživanje u kojem su sudjelovali samo bolesnici s postavljenom dijagnozom ErA-a prema ILAR-ovim kriterijima (44). RNA je izolirana iz PBMC-a 20 bolesnika s ErA-om i 8 odgovarajućih zdravih kontrola te iz SFMC-a 10 bolesnika s ErA-om. Analiza genskog izražaja učinjena je na Illumina Human WG-6_v3_BeadChip pločicama u 17 bolesnika s ErA-om i 8 zdravih kontrola kojima je RNA izolirana iz PBMC-a te u 7 bolesnika s ErA-om kod kojih je RNA izolirana iz SFMC-a. RT-PCR učinjen je svim bolesnicima. Uz odabrana svojstva (omjer izražaja ≥ 2 , $p < 0,05$) nije opažena razlika u izražaju gena između PBMC-a bolesnika s ErA-om i zdravih kontrola, dok je u usporedbi s SFMC-om bolesnika s ErA-om 216 gena imalo povećan izražaj, a 131 gen imao je smanjen izražaj. Daljnja analiza s pomoću GeneSpring GX programa pokazala je da 182 od tih gena sudjeluju u 13 različitim puteva, no ni jedan od puteva nije pokazao statistički važnu razliku u regulaciji ($p < 0,05$). Iz liste navedenih gena odabrani su geni za potvrdu RT-PCR-om. Ustanovljeno je da geni Granzyme H, KLRF1, NKG7, KIR3DL3, CD244, CCR7, CD248 i FAIM3 imaju smanjen izražaj u PBMC-u u usporedbi s SFMC-om, dok su geni CD1c i CD1d

imali povećan izražaj. Za topivi CD163 (sCD163) učinjena je ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) u plazmi 27 uzoraka prikupljenih od bolesnika s ErA-om i svih zdravih kontrola te nije uočena razlika u koncentraciji. No u sinovijalnoj tekućini bolesnika s ErA-om koncentracija sCD163 bila je znatno veća nego u plazmi istih bolesnika. Ovo je prvo istraživanje koje je pokazalo da u SFMC-u bolesnika s postavljenom dijagnozom ErA-a postoji različit izražaj gena u odnosu na PBMC istih bolesnika. Većina gena koja je pokazala razliku u izražaju povezana je s imunološkim sustavom, tako da su u SFMC-u povećan izražaj imali geni povezani s predočavanjem antigena, čišćenjem (engl. scavenger function), kemotaksijom i proteazama, a geni uključeni u funkciju NK stanica, adheziju stanica i inhibiciju apoptoze pokazali su smanjen izražaj. Nadalje, povećan izražaj CD163 gena u SFMC-u i povećana koncentracija sCD163 u sinovijalnoj tekućini upućuje na to da bi ovaj gen i njegov produkt, za koji se prije pokazalo da ima protuupalni učinak, mogli imati važnu ulogu u razvoju bolesti. Zanimljivo je da u ovom istraživanju nije otkrivena znatna razlika u izražaju gena u PBMC-u bolesnika i zdravih kontrola. To bi djelomično moglo biti prouzročeno metodama korištenim u istraživanju (izolacija RNA, pločice), a djelomično i odabranim graničnim vrijednostima (omjer izražaja ≥ 2). Osim navedenoga, u nedostatke istraživanja može se ubrojiti i heterogenost bolesnika te činjenica da su neki bolesnici bili liječeni DMARD-ovima. Nadalje, izražaj gena u bolesnika s ErA-om nije se usporedio s izražajem u bolesnika sa sličnim upalnim bolestima, poput drugih oblika JIA-e. Ipak, ovo istraživanje pokazuje da se u bolesnika s ErA-om u sinovijalnom odjeljku odvijaju imunološki procesi važni za patogenezu bolesti.

Zaključak

Metode visoke propusnosti omogućile su povezivanje genotipa i fenotipa mnogih kroničnih bolesti, pa tako i bolesti iz skupine spondiloartritisa. Uz otprije poznatu povezanost HLA-B27 i B7 genotipa s bolestima iz ove skupine, novija istraživanja pokazala su da u razvoju bolesti važnu ulogu imaju i različiti geni izvan HLA-sustava. S obzirom na to da je poredak nukleotida u genomu samo jedan od čimbenika razvoja bolesti, istraživanja su danas sve više usmjerena i na ostale unutrašnje čimbenike koji utječu na stvaranje fenotipskih obilježja. Tako je do danas provedeno nekoliko istraživanja u kojima je ispitivan transkriptom bolesnika sa SpA-om. Zanimljivo je da ni u jednom od provedenih istraživanja nisu dobiveni isti re-

zultati, što bi moglo biti prouzročeno heterogenošću bolesnika koji su sudjelovali u istraživanjima, ali i činjenicom da su rezultati analize genskoga izražaja ovisni o stanicama iz kojih se analizira RNA, o čipovima na kojima se provodi analiza te o bioinformatičkim programima kojima se provodi analiza rezultata dobivenih na čipu. Na kraju možemo zaključiti da na razvoj bolesti iz ove skupine utječe mnoštvo različitih gena, među kojima se osobito ističu geni koji kodiraju HLA-B27 i B7 antigene, ali i geni koji sudjeluju u procesuiranju antigena te geni koji kodiraju različite citokine, zbog čega bolesti iz ove skupine predstavljaju poligenске bolesti u kojima sudjeluju i autoinflamatorni i autoimunosni mehanizmi.

Izjava o sukobu interesa

Autori izjavljuju da nisu u sukobu interesa.

Literatura

1. Brown MA. Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47:132-7.
2. Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J*. 2007;48:11-23.
3. Reveille JD, Maganti RM. Subtypes of HLA-B27: history and implications in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Adv Exp Med Biol*. 2009;649:159-76.
4. Thomas GP, Brown MA. Genetics and genomics of ankylosing spondylitis. *Immunol Rev*. 2010;233:162-80.
5. Ehrenfeld M. Geoepidemiology: the environment and spondyloarthropathies. *Autoimmun Rev*. 2010;9:A325-9.
6. Tse SM, Laxer RM. New advances in juvenile spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:269-79.
7. Thomson W, Barrett JH, Donn R, i sur. Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41:1183-9.
8. Stanevicha V, Eglite J, Zavadska D, i sur. HLA B27 allele types in homogeneous groups of juvenile idiopathic arthritis patients in Latvia. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2010;8:26.
9. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*. 1990;63:1099-112.
10. Hermann E, Yu DT, Meyer zum Büschenfelde KH, Fleischer B. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet*. 1993;342:646-50.
11. May E, Dorris ML, Satumtira N, i sur. CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol*. 2003;170:1099-105.
12. Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, i sur. Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1977-84.
13. Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol*. 1999;162:5045-8.
14. Kollnberger S, Bowness P. The role of B27 heavy chain dimer immune receptor interactions in spondyloarthritis. *Adv Exp Med Biol*. 2009;649:277-85.
15. Brown MA. Genetics of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol*. 2010;22:126-32.
16. Colbert RA, DeLay ML, Layh-Schmitt G, Sowders DP. HLA-B27 misfolding and spondyloarthropathies. *Prion*. 2009;3:15-26.
17. Goodall JC, Wu C, Zhang Y, i sur. Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:17698-703.
18. DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA. HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2633-43.
19. Zeng L, Lindstrom MJ, Smith JA. Ankylosing spondylitis macrophage production of higher levels of interleukin-23 in response to lipopolysaccharide without induction of a significant unfolded protein response. *Arthritis Rheum*. 2011;63:3807-17.
20. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *Lancet*. 2011;377:2127-37.
21. Reynolds TL, Khan MA. B7 crossreactive antigens in spondyloarthropathies. *J Rheumatol*. 1988;15:1454.
22. Cedoz JP, Wendling D, Viel JF. The B7 cross reactive group and spondyloarthropathies: an epidemiological approach. *J Rheumatol*. 1995;22:1884-90.
23. el-Zaatari FA, Taurog JD. In vitro mutagenesis of HLA-B27: single and multiple amino acid substitutions at consensus B27 sites identify distinct monoclonal antibody-defined epitopes. *Hum Immunol*. 1992;33:243-8.
24. Grubić Z, Žunec R, Čečuk-Jeličić E, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan A. Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and -DQB1 haplotypes in a Croatian population. *Eur J Immunogenet*. 2000;27:47-51.
25. Grubić Z, Kerhin-Brkljačić V, Perić P, Čečuk-Jeličić E, Žunec R, Kaštelan A. HLA-B27 subtypes in Croatian patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol*. 2001;30:51-2.
26. Harjaček M, Margetić T, Kerhin-Brkljačić V, Martinez N, Grubić Z. HLA-B*27/HLA-B*07 in combination with D6S273-134 allele is associated with increased susceptibility to juvenile spondyloarthropathies. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26:498-504.
27. Flato B, Hoffmann-Vold AM, Reiff A, Førre Ø, Lien G, Vinje O. Long-term outcome and prognostic factors in enthesitis-related arthritis: a case-control study. *Arthritis Rheum*. 2006;54:3573-82.
28. Prahald S, Glass DN. A comprehensive review of the genetics of juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2008;6:11.
29. Frei R, Steinle J, Birchler T, i sur. MHC class II molecules enhance Toll-like receptor mediated innate immune responses. *PLoS One*. 2010;5:e8808.
30. Reveille JD. The genetic basis of spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70 Suppl 1:i44-50.
31. van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in

- HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum.* 1984;27:241-9.
32. Reveille JD. Genetics of spondyloarthritis--beyond the MHC. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8:296-304.
33. Gu J, Märker-Hermann E, Baeten D, i sur. A 588-gene microarray analysis of the peripheral blood mononuclear cells of spondyloarthropathy patients. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41:759-66.
34. Gu J, Rihl M, Märker-Hermann E, i sur. Clues to pathogenesis of spondyloarthropathy derived from synovial fluid mononuclear cell gene expression profiles. *J Rheumatol.* 2002;29:2159-64.
35. Sharma SM, Choi D, Planck SR, i sur. Insights in to the pathogenesis of axial spondyloarthropathy based on gene expression profiles. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R168.
36. Gu J, Wei YL, Wei JC, i sur. Identification of RGS1 as a candidate biomarker for undifferentiated spondylarthritis by genome-wide expression profiling and real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* 2009;60:3269-79.
37. Duan R, Leo P, Bradbury L, Brown MA, Thomas G. Gene expression profiling reveals a downregulation in immune-associated genes in patients with AS. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1724-9.
38. Assassi S, Reveille JD, Arnett FC, i sur. Whole-blood gene expression profiling in ankylosing spondylitis shows upregulation of toll-like receptor 4 and 5. *J Rheumatol.* 2011;38:87-98.
39. Pimentel-Santos FM, Ligeiro D, Matos M, i sur. Whole blood transcriptional profiling in ankylosing spondylitis identifies novel candidate genes that might contribute to the inflammatory and tissue-destructive disease aspects. *Arthritis Res Ther.* 2011;13:R57.
40. Barnes MG, Aronow BJ, Luyrink LK, i sur. Gene expression in juvenile arthritis and spondyloarthropathy: pro-angiogenic ELR+ chemokine genes relate to course of arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43:973-9.
41. Barnes MG, Grom AA, Thompson SD, i sur. Subtype-specific peripheral blood gene expression profiles in recent-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2102-12.
42. Golding DN. Hematology and biochemistry of ankylosing spondylitis. *Br Med J.* 1973;2:663.
43. Braun J, Bollow M, Neure L, i sur. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 1995;38:499-505.
44. Myles A, Tuteja A, Aggarwal A. Synovial fluid mononuclear cell gene expression profiling suggests dysregulation of innate immune genes in enthesitis-related arthritis patients. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51:1785-9.