

Il ruolo delle molecole HLA-B27 nella patogenesi della spondilite anchilosante*

The role of HLA-B27 molecules in the pathogenesis of ankylosing spondylitis

A. Cauli, G. Dessole, P.P. Nurchis, A. Vacca, A. Mamei, P. Garau, R. Pala, G. Passiu, A. Mathieu

Cattedra di Reumatologia II, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Cagliari

SUMMARY

Ankylosing Spondylitis (AS) is characterised by the strongest association with an HLA antigen ever described for any disease. It represents therefore the ideal model for the understanding of the link between immune-mediated diseases and the HLA system. The role of HLA-B27 in the pathogenesis of AS will be discussed focusing on the recently described higher expression of these molecules in patients with AS compared with healthy controls.

Reumatismo, 2002; 54(3):266-271

INTRODUZIONE

La spondilite anchilosante è una malattia infiammatoria cronica che interessa elettivamente le articolazioni sacro-iliache, lo scheletro assiale ma che può coinvolgere anche le articolazioni periferiche. Le entesi sono inoltre caratteristicamente interessate dal processo flogistico (1).

Caratteristica peculiare di questa malattia è la straordinaria associazione con un antigene del sistema HLA. Il 96% dei pazienti affetti da spondilite anchilosante risulta, infatti, positivo per l'allele HLA-B27, presente di contro nel 7-12% della popolazione caucasica di controllo (2). La prevalenza della malattia nei soggetti HLA B27 positivi rappresentativi della popolazione generale è del 2% mentre sale al 20% tra i parenti dei pazienti affetti da spondilite.

Al momento attuale si conoscono 23 sottotipi del B27 derivanti da un sottotipo ancestrale comune B2705 presente in tutte le popolazioni. I sottotipi 2701, 2702, 2710 sono ben rappresentati nei caucasici e nei nord africani, il 2709 nella popolazione sarda (ove costituisce il 25% degli individui

B27+), il 2703 nell'Africa occidentale, i 2704, 2706, 2707 nella popolazione asiatica e polinesiana. I sottotipi 2706 e 2709 non associano con lo sviluppo di malattia e sono pertanto neutri riguardo al rischio di ammalare di SA, senza promuoverlo (2). Questi due sottotipi differiscono nella loro sequenza aminoacidica dal B2705 per una sostituzione aminoacidica in posizione 116 nella zona ad elevata variabilità della catena pesante della molecola. Questa sostituzione aminoacidica comporta una diversa capacità legante nei confronti dell'ipotetico peptide artritogenico che dovrebbe essere contraddistinto da una tirosina in posizione P9 che, insieme alla posizione P2, rappresenta un sito critico per il legame tra l'antigene e la molecola HLA (aminoacidi di contatto nella tasca della molecola) (3).

Eziopatogenesi della SA e ruolo del B27

L'esatta eziopatogenesi della spondilite anchilosante non è nota. I dati epidemiologici suggeriscono un ruolo fondamentale per l'allele B27 ma non sufficiente per l'insorgenza della malattia. Appare probabile che altri geni, appartenenti al sistema HLA (4) ma anche esterni a questo, in associazione a fattori ambientali e/o endogeni, concorrano in maniera importante ai meccanismi che portano allo scatenamento e alla cronicizzazione del processo patologico (5).

In questo articolo ci limiteremo a riassumere le principali ipotesi tese a spiegare il ruolo delle mo-

*Lavoro premiato al XXXVIII Congresso SIR di Padova, 2001

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Alberto Cauli, Reumatologia II,
Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Cagliari,
Via San Giorgio 12, 09125 Cagliari,
E-mail: cauli@medicina.unica.it

lecole B27 nella patogenesi della SA, e ad esporre recenti risultati sperimentali del nostro gruppo.

a) L'associazione della spondilite anchilosante con diversi sottotipi del B27 e la condivisione tra i sottotipi associati alla malattia di una sequenza comune di 6 aminoacidi, posta nella nicchia legante l'antigene, sostengono l'ipotesi che la malattia sia determinata da un peptide artritogenico presentato ai linfociti CD8+ nel contesto della molecola di classe I (B27) espressa da cellule presentanti gli antigeni (APC). Una risposta immune geneticamente ristretta nei confronti di un fattore ambientale rappresenta quindi l'ipotesi di lavoro più accreditata. Tra le possibili origini del "peptide artritogenico", quella microbica/infettiva è senza dubbio la più probabile. Diverse analogie con le artriti reattive, nelle quali le infezioni giocano un ruolo preminente, hanno suggerito che le infezioni batteriche possano essere importanti anche nella spondilite anchilosante. La frequente associazione con enteriti croniche e l'incremento della risposta anticorpale specifica per antigeni della *Klebsiella* e l'incremento delle IgA totali (6), hanno inserito questi microrganismi tra i candidati per un ruolo scatenante il processo patologico. Degna di nota è stata inoltre la dimostrazione di una alterata interazione tra batteri endocellulari e cellule dell'ospite negli individui B27 positivi, con una più prolungata sopravvivenza del microrganismo secondaria ad una difettosa eliminazione dello stesso (7, 8).

b) Una teoria alternativa è costituita dal mimetismo molecolare con induzione di autoreattività nei confronti di un antigene self. Secondo una teoria condivisa da diversi autori, linfociti citotossici specifici per un antigene batterico andrebbero incontro a una reazione crociata con una sequenza aminoacidica autologa. Questa ipotesi è sostenuta dal riscontro che alcuni peptidi derivati da batteri associati alle spondiloartriti, come la *Klebsiella pneumoniae* e la *Shigella flexneri*, condividono sequenze aminoacidiche del B27 (9, 10). Infine peptidi derivati da molecole B27 potrebbero essere presentati come autoantigeni da molecole autologhe di classe I o II.

In questo contesto si inserisce l'osservazione di Fiorillo et al. che hanno dimostrato che la sequenza 400-408 della struttura peptidica del recettore 1 del VIP umano (simile ad un epitopo del EBV) si lega sia al B2705 che al B2709 ma scatena risposte significative unicamente a seguito del legame con il primo (11).

c) Recentemente il gruppo di R Colbert ha dimostrato che le catene pesanti del B27 presentano con notevole frequenza problemi di assemblaggio (misfolding). Il "misfolding" e l'accumulo di catene pesanti del B27 potrebbero costituire uno "stress" per il reticolo endoplasmico con una risposta che porta all'attivazione di NF- κ B e, di conseguenza, alla sintesi di citochine pro-infiammatorie come il TNF- α da parte delle cellule monocito/macrofagiche. La teoria del "misfolding" offre una spiegazione dell'associazione del B27 con la SA che prescinde dalla funzione di presentazione di antigeni (12).

d) Tra le possibili spiegazioni di questa associazione bisogna inoltre considerare, almeno a livello teorico, meccanismi indiretti come un possibile ruolo nella selezione timica. Il B27 potrebbe, infatti, partecipare a livello timico alla selezione di cloni linfocitari CD8+ con recettori T cellulari capaci di rispondere in senso patologico ad antigeni microbici (13).

e) Una recente ipotesi, formulata dal gruppo del Prof. Kella David della Mayo Clinic di Rochester, ha teorizzato che le catene pesanti del B27 non complessate con la β 2-microglobulina ed espresse sulla superficie cellulare potrebbero comportarsi funzionalmente come molecole di classe II ed interagire quindi con cloni di linfociti CD4 positivi (14). In seguito P. Bownes ha ripreso questo concetto evidenziando inoltre la tendenza delle catene pesanti non legate alla β 2-microglobulina di complessarsi in omodimeri (15).

L'importanza del B27 nella patogenesi delle spondiloartriti è confermata dal modello animale di Taurig et al. Ratti transgenici per il gene HLA B27 umano sviluppano entro dieci/venti settimane artrite, diarrea, flogosi genitale e alterazioni cutanee psoriasiformi. L'analisi dell'espressione del B27 nelle cellule linfoidi ha rivelato che la severità e il grado di suscettibilità alla malattia correlano con il livello di espressione del transgene sia a livello di mRNA che di proteina.

Variabilità dell'espressione delle molecole B27

Nonostante il 95% dei pazienti affetti da Spondilite Anchilosante possieda nel proprio patrimonio genetico l'allele HLA B27, e che questa associazione tra malattia e HLA sia la più forte presente in natura, soltanto una piccolissima parte dei soggetti HLA B27 positivi svilupperà nel corso della vita la malattia. Quale è il motivo di questa diver-

sa suscettibilità a contrarre la malattia? Come mai tra gli individui B27 positivi che vivono nello stesso ambiente, che sono esposti agli stessi stress e vengono a contatto con gli stessi agenti microbici, alcuni si ammalano e altri no? Naturalmente le risposte a questo quesito possono essere numerose e diverse.

Una prima risposta a questo quesito poteva essere data dallo studio dei diversi sottotipi del B27. Infatti l'allele B27 presenta 21 sottotipi a seconda della variazione di pochi o addirittura di un singolo aminoacido nella sequenza peptidica che forma la catena pesante del complesso, modificando quindi la tasca che accoglierebbe il presunto peptide artritogenico da presentare alle cellule T. L'osservazione effettuata dal gruppo R Sorrentino /A Mathieu che il B2709 non associa con la presenza della malattia (3), e la segnalazione che lo stesso fenomeno si osserva in Thailandia per il B2706 (16), possono essere interpretate ipotizzando che una piccola variazione strutturale della tasca suddetta possa impedire il legame tra la molecola di classe I con l'antigene, impedendo quindi lo scatenarsi della reazione immunitaria. Questa interpretazione spiega il non sviluppo di malattia nei pazienti B27 positivi che presentano questi due sottotipi (B2706 e B2709), ma non risolve il problema di come mai la stragrande maggioranza dei soggetti B27 positivi per i sottotipi che classicamente associano come il B2705 (il più rappresentato in natura) non ammalano. Una possibile risposta a questo quesito potrebbe essere fornita dallo studio del grado di traduzione in molecole funzionalmente attive sulla superficie delle cellule coinvolte nelle reazioni immunitarie. Abbiamo quindi ipotizzato che la diversa suscettibilità a contrarre la Spondilite Anchilosante da parte di individui B27 positivi potesse essere legata non soltanto al sottotipo dell'allele, ma anche al grado di espressione sulla superficie cellulare di queste molecole deputate alla presentazione dell'antigene alla controparte T cellulare. Questa ipotesi è sostenibile da un punto di vista immunologico in quanto è dimostrato che la densità di molecole di classe I presenti sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC) influenza fortemente la risposta dei linfociti T antigenici specifici (17). Inoltre, nel ratto transgenico per il B2705 umano, la suscettibilità a sviluppare alterazioni patologiche correlabili allo spettro delle spondiloartriti è risultata dipendente dal grado di espressione del transgene (18).

Al fine di testare la nostra ipotesi abbiamo studiato un gruppo di 20 pazienti affetti da SA e positivi

per l'antigene HLA-B27, 16 controlli normali B27 positivi e 20 controlli normali sani non selezionati in base al locus B. L'espressione delle molecole oggetto di studio è stata quantificata sulle cellule mononucleate del sangue periferico con analisi citofluorimetrica. Il canale medio di fluorescenza di ogni campione è stato espresso come numero di canale relativo su scala lineare, confrontato con standard di fluorescenza definita e convertito in unità MESF (Molecules of Equivalent Soluble Fluorochromes) (19, 20).

Lo studio delle cellule mononucleate del sangue periferico ha presentato due grossi vantaggi. Il primo è stato quello della facile accessibilità di queste cellule senza bisogno di procedure particolarmente invasive, con un semplice prelievo di sangue venoso. Il secondo motivo è stato quello di garantirsi una popolazione cellulare omogenea nella sua policlonicità, costituita da cellule lontane dal sito di infiammazione e pertanto non alterate dall'influsso dei mediatori flogistici locali.

L'espressione del B27 è risultata notevolmente superiore nel gruppo dei pazienti affetti da SA rispetto ai controlli sani (55536.3 ± 18961.0 MESF nel gruppo della SA e 25936.0 ± 12117.5 MESF nei controlli, $p=0.00009$) con una limitata sovrapposizione nella distribuzione dei valori individuali (21, 22). Al fine di verificare se la maggiore espressione di molecole B27 fosse dovuta o meno a una più generale iperespressione delle molecole HLA di classe I, abbiamo inoltre valutato l'espressione delle molecole HLA-A, B e C per mezzo del monoclonale B9.12.1. L'espressione totale delle molecole di classe I è risultata invece sovrapponibile nei due gruppi (448840.2 ± 136293.8 unità MESF nei SA e 533494.4 ± 232931.1 unità MESF nei controlli, $p=0.51$) (21, 22). L'analisi mediante regressione multipla non ha inoltre evidenziato una correlazione tra l'espressione del B27 e l'espressione totale di molecole di classe I. La possibilità che la diversa espressione del B27 potesse essere dovuta a differenze di attivazione cellulare tra i due gruppi è stata esclusa dallo studio dei marker di attivazione (CD69 e CD25) e dalla concentrazione sierica di interferone-gamma, (che non hanno messo in evidenza differenze significative tra pazienti e controlli sani). Questo risultato era prevedibile in quanto sarebbe stato difficilmente ipotizzabile una attivazione selettiva sul locus B e non sulla rimanente classe I.

Una recente ipotesi, formulata dal gruppo del Prof. Kella David della Mayo Clinic di Rochester, ha teorizzato che le catene pesanti del B27 non com-

plesate con la $\beta 2$ -microglobulina ed espresse sulla superficie cellulare potrebbero comportarsi funzionalmente come molecole di classe II ed interagire quindi con cloni di linfociti CD4 positivi. Questa ipotesi è stata formulata in base a risultati sperimentali ottenuti su un modello animale transgenico, dove la suscettibilità a sviluppare le alterazioni patologiche e la severità delle stesse era correlata alla quantità di catene pesanti libere presenti sulla superficie delle cellule linfoidi. Al fine di valutare se un simile meccanismo potesse avere un corrispettivo anche nella malattia umana, abbiamo quindi deciso di studiare l'espressione dei prodotti genici del locus B non complessati alla $\beta 2$ -microglobulina dei nostri pazienti B27 positivi. Tramite l'anticorpo monoclonale prodotto dall'ibridoma Hc10 (gentile dono del Professor Kella) abbiamo quantificato l'espressione di queste catene

pesanti libere derivanti dalla mancata complessazione con la $\beta 2$ -microglobulina o dalla dissociazione delle stesse sulla superficie cellulare. Sia nel gruppo patologico sia in quello di controllo abbiamo osservato una chiara espressione di queste molecole, senza però riscontrare un fenomeno analogo al modello animale dove la diversa espressione di questa forma condizionava la suscettibilità alla malattia. L'esatto ruolo funzionale di queste forme libere, se reale, rimane però ancor oggi da dimostrare.

I pazienti da noi studiati presentavano dei quadri clinici diversi, alcuni molto severi con esito invalidante, altri con scarsa evolutività anchilosante. Abbiamo osservato che i pazienti con malattia più severa non hanno presentato livelli di espressione del B27 più elevati rispetto ai pazienti con malattia meno invalidante e, in ogni caso, non si è ri-

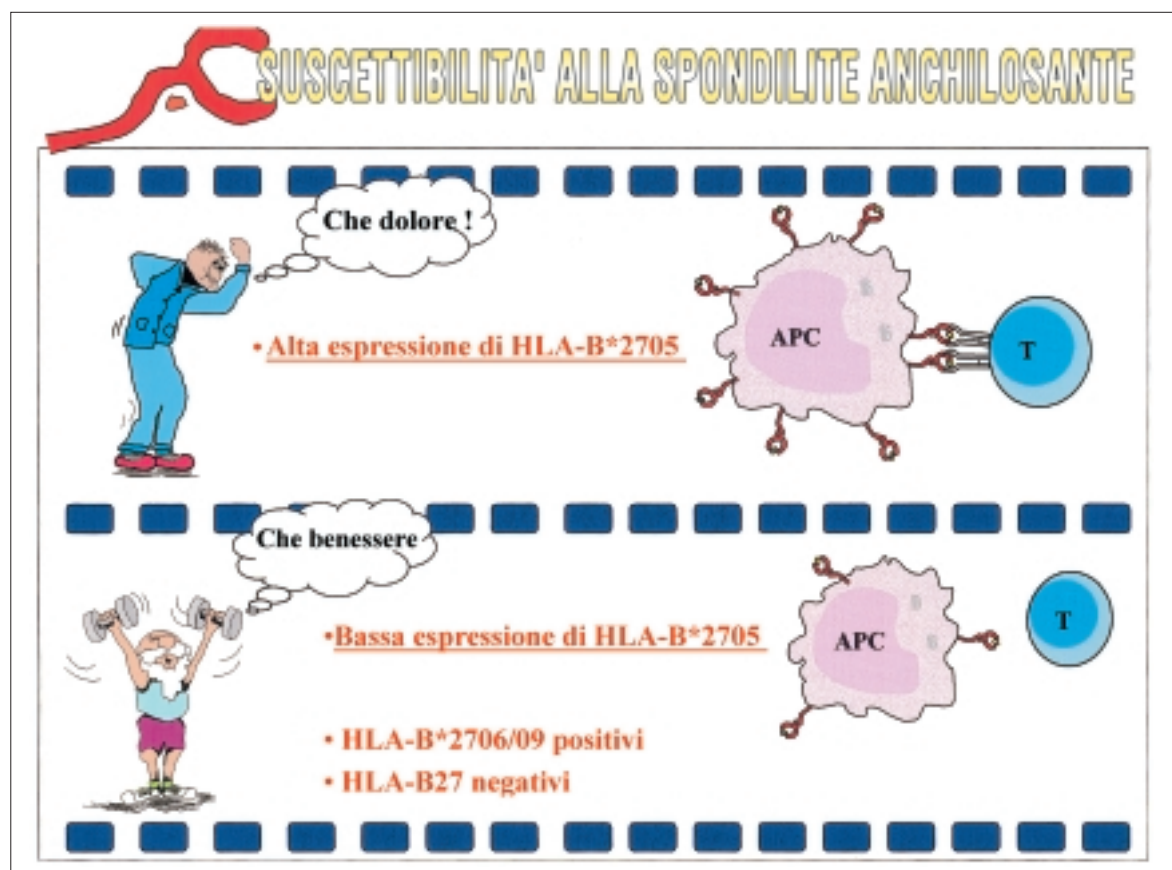


Figura 1 - Suscettibilità a sviluppare la Spondilite Anchilosante: rappresentazione grafica del modello proposto (vignetta presentata nel corso della comunicazione premiata al XXXVIII Congresso Nazionale della SIR, Padova 2001). I soggetti B27 positivi per un sottotipo predisponente (es. B*2705) e con una alta espressione del gene in molecole funzionalmente attive sulla superficie delle cellule immunocompetenti presenterebbero un rischio maggiore di sviluppare nel corso della vita la Spondilite Anchilosante rispetto ai soggetti B27 negativi, ai soggetti con un sottotipo del B27 non predisponente (B*2706/09), ai soggetti con bassa espressione di un sottotipo predisponente.

scontrata una correlazione tra gli indici di attività/severità di malattia con l'espressione del B27. Premesso che la casistica è attualmente troppo esigua per assicurare una sicura valutazione di questo tipo, questo dato può essere interpretato ipotizzando che, una volta innescata la reazione che porta all'esordio del processo patologico, i processi di mantenimento e cronicizzazione non siano più strettamente dipendenti dai meccanismi di esordio e che la gravità dell'evoluzione della malattia sia dovuta all'intervento di fattori ancora da definire. I risultati riassunti dimostrano una maggiore espressione delle molecole HLA B27 sulla superficie delle PBMC nei pazienti con Spondilite An-

chilosante rispetto ai controlli sani indipendente dallo stato di attivazione cellulare e non secondaria ad una generale sovraespressione delle molecole di classe I. Alla luce di questi dati proponiamo che, in determinate condizioni ambientali e con esposizione ai medesimi agenti microbiologici, gli individui con elevata espressione di molecole HLA B27 possiedano un ulteriore elemento di suscettibilità per lo scatenamento dei meccanismi patogenetici alla base della Spondilite Anchilosante (Fig. 1). Questo può essere spiegato con una più efficace risposta antigene specifica da parte delle T cellule stimulate dalle cellule presentanti il presunto peptide artritogenico.

RIASSUNTO

La Spondilite Anchilosante (SA) è caratterizzata dalla più forte associazione con un antigene HLA mai descritta in patologia, costituendo pertanto il modello ideale per lo studio del legame tra malattie immunomediate e sistema HLA. In questo articolo è discusso il ruolo del B27 nella patogenesi della SA, con particolare attenzione alla recente dimostrazione di una maggiore espressione di queste molecole nei pazienti affetti da SA rispetto ai controlli sani.

Parole chiave - Spondilite anchilosante, HLA-B27, patogenesi.

Key words - *Ankylosing spondylitis, HLA-B27, pathogenesis.*

BIBLIOGRAFIA

1. Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 361-8.
2. Khan MA. HLA-B27 polymorphism and association with disease. *J Rheumatol* 2000; 27: 1110-4.
3. D'Amato M, Fiorillo MT, Carcassi C, Mathieu A, Zucarelli A, Bitti PP, et al. Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3199-201.
4. La Nasa G, Mathieu A, Mulargia M, Carcassi C, Vacca A, Ledda A, et al. Association of the HLA-A2, CW2, B27, S31, DR2 haplotype with ankylosing spondylitis. A possible role of non-B27 factors in the disease. *Disease Markers* 1993; 11: 191-203.
5. van der Linden S, von der Heijde D. Ankylosing Spondylitis. In Harris ED jr, Ruddy S, Sledge CB, editors. *Kelley's Textbook of Rheumatology*, 4th ed. Philadelphia: Saunders, 2001: 1039-53.
6. Granfors K, Maki-Ikola O, Lerisala-Repo M. Association of gut inflammation with the increased serum *Klebsiella pneumoniae*-specific antibody levels in patients with axial type of ankylosing spondylitis. *Arthritis and Rheum.* 1995; 38: S348.
7. Kapasi K, Inman RD. HLA-B27 expression modulates gram-negative bacterial invasion into transfected L cells. *J Immunol* 1992; 148: 3554-9.
8. Heesemann J, Gaede K, Autenrieth IB. Experimental *Yersinia Enterocolitica* infections in rodents: a model for human yersiniosis. *APMIS.* 1993; 1: 417-29.
9. Tsuchiya N, Husby G, Williams RCJ. Studies of humoral and cell-mediated immunity to peptides shared by HLA-27.1 and *Klebsiella pneumoniae* nitrogenase in ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 354-60.
10. Tsuchiya N, Husby G, Williams RCJ, Stieglitz H, Lipsky PE, Inman RD. Autoantibodies to HLA-B27 sequence cross-react with the hypothetical peptide from the arthritis-associated *Shigella* plasmid. *J Clin Invest* 1990; 85: 1193-203.
11. Fiorillo MT, Maragno M, Butler R, Dupuis ML and Sorrentino R. CD8+ T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J Clin Invest* 2000; 106: 47-53.
12. Mear JP, Schreiber KL, Munz C, Zhu X, Stevanovic S, Rammensee H-G, et al. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol.* 1999; 163: 6665-70.
13. Lipsky PE. Spondyloarthropathies. In: Klippel JH, Dieppe PA, editors. *Rheumatology* 2nd ed. London: Mosby, 1999: 6.12.1-12.
14. Khare SD, Hansen J, Luthra HS, David CS. HLA-B27 heavy chains contribute to spontaneous inflammatory disease in B27/ human beta2-microglobulin double transgenic mice with disrupted mouse beta2-microglo-

- bulin. The American Society for Clinical Investigation 1996; 98: 2746-55.
15. Allen RL, O'Callaghan CA, Mc Michael AJ and Bowness P. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel b2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol* 1999; 162: 5045-8.
 16. Lopez-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK, Chiewslip P, Isarangkura D, Kanga U, et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens* 1995; 45: 169-76.
 17. Sprent J, Schaefer M. Antigen-presenting cells for CD8+ T cells. *Immunol Rev* 1990; 117: 213.
 18. Taurog JD, Maika SD, Simmons WA, Breban M, Hammer RE. Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J Immunol* 1993; 150: 4168-78.
 19. A Cauli, Dessole G, Passiu G, Mathieu A. La citofluorimetria quantitativa e le possibili applicazioni in reumatologia. *Reumatismo* 2001; 53: 14-7.
 20. Shapiro HM. Putting the metry into the immunofluorescence flow cytometry. *Cytometry* 1991; 12 (suppl 5): 70.
 21. Cauli A, Dessole G, Atzeni F, Alba F, Nurchi PP, Pala R et al. High HLA-B27 molecules expression is a further susceptibility factor for the development of Ankylosing Spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2000 ; suppl. 1: 207.
 22. Cauli A, Dessole G, Fiorillo MT, Vacca A, Mameli A, Bitti PP et al. Increased level of HLA-B27 expression in Ankylosing Spondylitis patients compared with healthy HLA-B27 positive subjects : a possible further susceptibility factor for the development of disease. *Rheumatology*, in corso di stampa.