

Spondilite anchilosante ed un nuovo allele HLA-B27 non associato alla malattia. Implicazioni patogenetiche

M. D'AMATO*, M.T. FIORILLO*, I. POTOLICCHIO*, L. RICCI VITIANI*, R. SORRENTINO*#

Parole chiave: spondilite anchilosante, HLA-B27, peptide artritogenico

Ankylosing spondylitis and HLA-B27: new insights from the characterization of a novel non AS-associated allele

Key words: ankylosing spondylitis, HLA-B27, arthritogenic peptide

Summary

The strong association between ankylosing spondylitis and HLA-B27 is known since about 25 years. Several attempts have been made to understand the basis of this association but the issue has remained to date an open challenge. The most favoured hypothesis is that HLA-B27 molecules can present to T lymphocytes an "arthritogenic" peptide capable of inducing an aberrant immune response. Accordingly, a common goal is to define the nature of such peptide, through the elucidation of the specific peptide-binding properties of HLA-B27 molecules. There are several HLA-B27 subtypes which differ for few amino acids clustered around the peptide-binding groove and whose association to the disease is variable. The recent discovery by our group of a new non-AS associated allele (HLA-B*2709), which shows distinctive peptide-binding properties, is likely to allow a better definition of the features of the "arthritogenic" peptide. Indeed, HLA-B*2709 does not bind peptides with a Tyrosin at C-terminus that, instead, well fits into the peptide binding groove of the common, AS-associated, HLA-B*2705 subtype. This information will help in narrowing the number of candidate peptides and provides a unique tool for experimental approaches, towards the understanding of the disease pathogenesis.

corso del tempo questa associazione è stata ripetutamente confermata anche in popolazioni etnicamente diverse, tanto che, generalmente, più del 95% dei pazienti affetti da SA risulta positivo per HLA-B27 (3-5). Eppure, ancora oggi, le basi biologiche di questa associazione non sono note.

Le molecole HLA sono proteine di membrana codificate da geni altamente polimorfici che svolgono un ruolo chiave nell'attivazione della risposta immunitaria: sono infatti deputate alla presentazione dei peptidi antigenici ai linfociti T (6-8). La loro analisi cristallografica ha dimostrato come nella porzione più esterna alla membrana sia presente un solco in cui vanno a legarsi i peptidi che sono poi riconosciuti dai linfociti attraverso l'interazione con il TCR (T Cell Receptor) (9, 10). Le molecole HLA-B27 sono codificate da un sottogruppo di 11 alleli del gene HLA-B, che differiscono tra di loro per pochi amminoacidi situati nel solco dove va a legarsi il peptide. È quindi possibile che queste differenze influenzino la specificità di legame dei diversi sottotipi HLA-B27.

L'ipotesi oggi maggiormente accreditata per giustificare la forte associazione tra la spondilite anchilosante e l'HLA-B27 prevede la capacità esclusiva di queste molecole di presentare ai linfociti T un peptide definito "arthritogenico", che sarebbe in grado di scatenare la risposta autoimmunitaria alla base della patologia (3, 4). Recentemente, due tipi di studi hanno fornito informazioni importanti che avvalorano quest'ipotesi: 1) la produzione di un modello animale di ratto transgenico per HLA-B27 ha dimostrato come l'espressione di queste molecole possa dare origine ad una patologia molto simile alla spondilite anchilosante umana, quando questi ratti vengono cresciuti in un ambiente non sterile (11, 12); 2) studi di popolazione hanno evidenziato come tra

Spondilite anchilosante e HLA-B27: l'ipotesi del "peptide artritogenico"

L'associazione tra la molecola di istocompatibilità HLA-B27 e la Spondilite Anchilosante (SA) è emersa fin dai primi studi condotti negli anni '70 (1, 2). Nel

*Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Roma "La Sapienza"; °Istituto di Biologia Cellulare-CNR, Roma e #Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università de L'Aquila, L'Aquila, Italy.

i diversi alleli HLA-B27 ce ne siano alcuni che non associano alla malattia (5, 13, 14). Il modello animale ha definitivamente dimostrato il coinvolgimento delle molecole HLA-B27 nella patogenesi delle spondiloartropatie mentre, come vedremo, dai dati di genetica si ottiene una ulteriore indicazione di come il ruolo chiave di queste molecole risieda nella loro funzione canonica di presentazione antigenica.

Il nostro gruppo di ricerca ha identificato in passato un nuovo sottotipo HLA-B27, HLA-B*2709, e dai successivi studi di popolazione è emersa la sua mancanza di associazione con la spondilite anchilosante. HLA-B*2709 differisce dall'allele più comune e fortemente associato alla SA, HLA-B*2705, per un solo amminoacido posizionato all'interno della tasca che lega il peptide. Come vedremo, questi dati non solo rafforzano l'ipotesi del coinvolgimento di un peptide artritogenico nella patologia ma, per la prima volta, ci forniscono alcune informazioni di estrema utilità per tentare di identificare la natura di tale peptide.

La mancanza di associazione di HLA-B*2709 con la malattia

Nel nostro laboratorio, da un donatore sano HLA-B27 positivo era stato generato un clone T citotossico con una caratteristica peculiare: la sua attività citotossica risultava ristretta per la molecola HLA-B27 presente soltanto sulle cellule autologhe del donatore, non riconoscendo come target nessuna di tutta una serie di linee linfoblastoidi, esprimenti diversi sottotipi HLA-B27. Tale peculiarità è stata successivamente spiegata grazie alla determinazione della sequenza codificante per la molecola HLA-B27 del donatore, che si è rivelata corrispondere ad un nuovo sottotipo, HLA-B*2709 (15). Questo nuovo allele differisce per un solo amminoacido dall'HLA-B*2705, il sottotipo più comunemente riscontrato in diverse popolazioni e che più fortemente associa alla spondilite anchilosante. Dal momento che la differenza tra le due molecole poteva essere in grado di influenzare le proprietà di legame dei peptidi, abbiamo affrontato la caratterizzazione di questo nuovo sottotipo sia da un punto di vista genetico, per evidenziare una eventuale mancanza di associazione con la spondilite anchilosante, che funzionale, per definire le variazioni nelle proprietà di legame che la singola differenza amminoacidica conferiva alla molecola.

La ricerca di HLA-B*2709 nella popolazione italiana ha riscontrato una frequenza molto bassa di questo nuovo allele (solo 4 su 121 individui B27 positivi analizzati), anche se una prima indicazione della sua mancanza di associazione con la malattia veniva dal fatto che era completamente assente nel gruppo dei 37 soggetti affetti da SA (16) (Tabella I). La sua frequenza era

tuttavia troppo bassa per poter derivare alcuna conclusione statisticamente significativa, anche volendo analizzare un campione di popolazione molto grande. Ci siamo indirizzati perciò verso la popolazione sarda che, grazie al suo isolamento geografico, presenta delle frequenze di aplotipi HLA molto diverse e, in alcuni casi, quasi esclusive. In questo secondo studio siamo stati più fortunati, dal momento che in Sardegna questo nuovo allele rappresenta il 25% di tutti gli alleli HLA-B27 nel complesso: ciò ci ha permesso di ottenere un dato statisticamente significativo dell'associazione con la malattia. Come riportato in Tabella I, l'HLA-B*2709 era assente in tutti i pazienti analizzati, malgrado fosse ben rappresentato tra gli individui sani ($p < 0,0004$) (17). HLA-B*2709 perciò, unico tra tutti i sottotipi HLA-B27, risultava *chiaramente* non associato alla spondilite anchilosante.

Le proprietà di legame con i peptidi della molecola HLA-B*2709

La differenza tra gli alleli B*2709 e B*2705 risiede in un unico amminoacido nella posizione 116, dove nel primo una istidina (His) prende il posto di un acido aspartico (Asp), comportando così una differenza di carica in un punto della molecola importante per il legame antigenico. L'amminoacido 116, infatti, partecipa alla formazione della tasca F in cui va a situarsi una delle due principali ancore del peptide (quella C-terminale) che prendono contatto più intimamente con la molecola stabilizzando il legame. Questa sostituzione suggeriva una possibile differenza funzionale tra i due sottotipi. A tale scopo, abbiamo studiato le caratteristiche di legame della molecola HLA-B*2709, confrontandole con quelle del B*2705, sia attraverso saggi di stabilizzazione del legame in vitro, che attraverso l'eluizione ed il sequenziamento diretto dei peptidi associati alle due molecole. Dai dati ottenuti, che sono risultati sovrapponibili con i due sistemi adottati, è apparso evidente che la molecola HLA-B*2709 possiede una specificità di legame più ristretta rispetto all'HLA-B*2705. Con particolare riguardo alla posizione C-terminale del peptide legato infatti, nel solco di legame con l'antigene della

Tabella I - Distribuzione del sottotipo HLA-B*2709 in pazienti affetti da spondilite anchilosante e controlli sani.

	Pazienti B27+	Controlli B27+	Test χ^2
Italia	(n. 37)	(n. 121)	
HLA-B*2709+	0 (0%)	4 (3,3%)	NS
Sardegna	(n. 45)	(n. 40)	
HLA-B*2709+	0 (0%)	10 (25%)	$p < 0,0004$

molecola HLA-B*2709 non viene mai accettato un residuo di tirosina, amminoacido che invece rappresenta uno dei residui preferenziali per il legame con la molecola HLA-B*2705 (18, 19).

Implicazioni patogenetiche e prospettive future verso l'identificazione del "peptide artritogenico"

I dati presentati dimostrano come, unico tra i vari sottotipi HLA-B27, l'allele HLA-B*2709 non associata alla spondilite anchilosante. Questo fenomeno è probabilmente il riflesso di una diversa specificità di queste molecole nei confronti dei peptidi antigenici da legare e presentare ai linfociti T. In effetti, la sostituzione dell'acido aspartico con un residuo molto diverso quale l'istidina, in una posizione cruciale per la funzione della molecola come la 116, fornisce una plausibile spiegazione a questa osservazione e depone ancora una volta a favore dell'ipotesi che prevede il coinvolgimento di un peptide artritogenico nell'insorgenza della malattia. Se questa ipotesi è corretta, infatti, tale peptide dovrà essere in grado di legarsi ed essere presentato soltanto dalle molecole HLA-B27 associate con la spondilite anchilosante, ma non da quei sottotipi che risultano non associati. In questo senso quindi, tutte le differenze nella specificità di legame esistenti tra i diversi alleli risultano di estrema importanza per l'identificazione del peptide artritogenico. Recentemente è stato descritto un altro allele HLA-B27, il B*2706, che è presente nella popolazione orientale e che non sembra associare alla spondilite anchilosante (20). È notevole il fatto che anche questa molecola, che differisce dal B*2705 in alcune posizioni all'interno del solco di legame tra cui la 116 (dove una tirosina sostituisce l'acido aspartico), non sia in grado di legare peptidi con una tirosina in posizione C-terminale (21), rafforzando i dati da noi ottenuti.

I nostri ed altri recenti dati sperimentali hanno fornito quindi una nuova base per una ricerca che, pur durando da più di vent'anni, non sembrava aver prodotto informazioni particolarmente utili alla comprensione della patogenesi delle spondiloartropatie. Il fatto di aver trovato una differenza funzionale tra gli alleli HLA-B27 associati e non associati alla malattia punta l'attenzione ancora una volta sulla funzione di queste molecole ed apre la strada ad una ricerca più mirata dell'eventuale peptide artritogenico. Secondo i dati raccolti, si può ragionevolmente dedurre che un tale peptide, affinché possa legarsi agli alleli associati (HLA-B*2705, HLA-B*2702 ecc.) e non legarsi a quelli non associati (HLA-B*2709 e HLA-B*2706) sarà probabilmente un nonamero, come la maggior parte dei peptidi eluiti dalle molecole B27, dovrà avere una arginina in seconda posizione, in quanto ancora obbligata di tutte le molecole HLA-B27, e quindi una tirosina in nona posizione, come

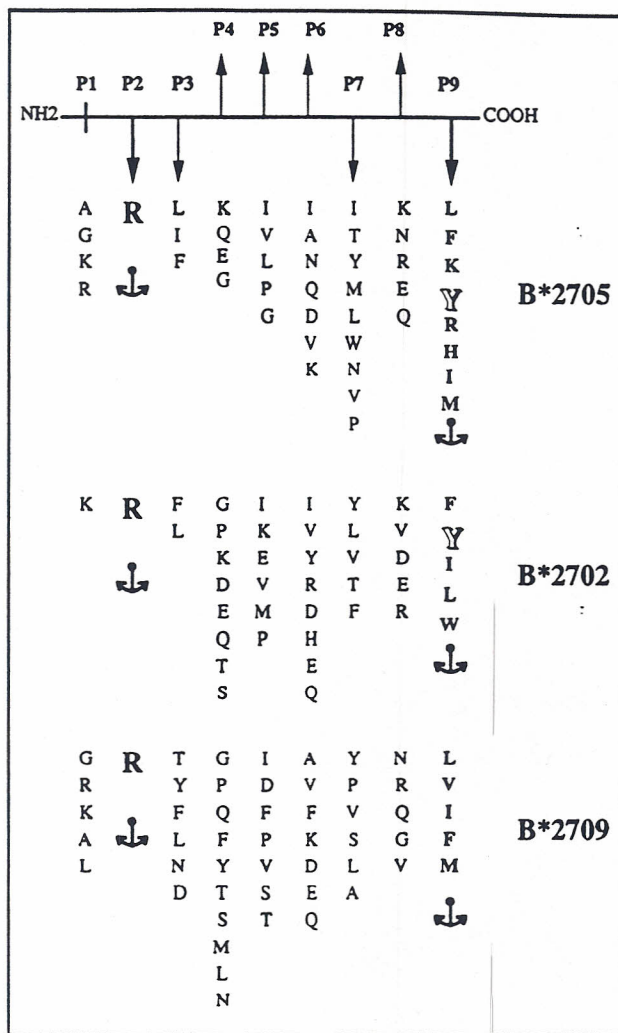


Fig. 1 - Confronto tra i motivi di legame con i peptidi delle molecole HLA-B*2705, HLA-B*2702 e HLA-B*2709. La tirosina in posizione P9 è stata messa in evidenza poiché rappresenta l'amminoacido candidato ad occupare quella posizione nel "peptide artritogenico". È in grado infatti di legarsi ad entrambi gli alleli comunemente associati alla spondilite anchilosante (HLA-B*2705 e HLA-B*2702), mentre non viene accettata dalla molecola HLA-B*2709. (Nello schema relativo al peptide, le frecce che puntano in alto corrispondono ai residui che puntano verso il TCR, mentre quelle in basso corrispondono ai residui che prendono contatto con la molecola HLA-B27).

suggerito dai nostri studi (Fig. 1). Con queste informazioni, ed altre che derivano dagli studi di legame tra molecole HLA-B27 e peptidi (22-24), si può ora pensare di tentare approcci più diretti per identificare, attraverso una ricerca nelle banche dati proteiche, le sequenze che possono essere prese in considerazione come candidate al ruolo di "peptidi artritogenici". A questo scopo, il confronto funzionale ora possibile tra una molecola già nota, associata alla spondilite anchilosante (HLA-B*2705), ed il B*2709 recentemente scoperto che non associa alla malattia, costituirà un eccellente strumento sperimentale attraverso il quale ridurre ulterior-

mente il numero di tali candidati, sulla base delle loro proprietà di legame differenziale alle due molecole. Successivamente sarà quindi possibile evidenziare delle risposte specifiche verso tali peptidi, attraverso l'isolamento di cloni T da pazienti affetti da SA. Nel nostro laboratorio stiamo attualmente portando avanti un progetto basato su questo approccio sperimentale. Un auspicabile successo di questi studi avrebbe importanti ripercussioni pratiche, poiché potrebbe permettere in futuro l'applicazione della ricerca alla costruzione di analoghi del peptide che possano essere eventualmente utilizzati in una terapia specifica della malattia.

Riassunto

La spondilite anchilosante è una malattia autoimmune fortemente associata alla molecola HLA-B27 che, unica fra tutti gli antigeni di istocompatibilità, sarebbe in grado di presentare ai linfociti T un peptide "artritogenico", ancora non identificato. Esistono diversi sottotipi della molecola HLA-B27 che differiscono in diverse posizioni importanti per le proprietà di legame con i peptidi. L'HLA-B*2709, che abbiamo recentemente descritto, non associa con la malattia e differisce dagli altri alleli HLA-B27 per la sua incapacità di legare peptidi con un particolare residuo nella posizione C-terminale: la tirosina. Questi dati saranno di estrema utilità per la definizione delle caratteristiche del peptide artritogenico e quindi per una migliore comprensione della patogenesi della spondilite anchilosante.

Bibliografia

- Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD, James DCO, Nichols A, Sturrock RD. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet* 1973; 1: 904-7.
- Schlosstein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973; 288: 704-6.
- Feltkamp TEW, Khan MA, Lopez de Castro JA. The pathogenetic role of HLA-B27. *Immunol Today* 1996; 17: 5-7.
- Lopez-Larrea C, Gonzalez-Roces S., Alvarez V. HLA-B27 structure, function and disease association. *Curr Opin Rheumatol* 1996; 8: 296-308.
- MacLean IL. HLA-B27 subtypes: implications for the spondylo-arthropaties. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 929-31.
- Lopez de Castro JA. Structural polymorphism and function of HLA-B27. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7: 270-4.
- Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self-peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991; 353: 326-29.
- Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 85-96.
- Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 1991; 353: 321-5.
- Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 1992; 70: 1035-48.
- Taurog JD, Richardson JA, Croft JAT et al. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* 1994; 180: 2359-64.
- Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 associated human disorders. *Cell* 1990; 63: 1099-112.
- Gonzalez-Roces S, Alvarez MV, Gonzalez S et al. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1997; 49: 116-23.
- Breur-Vriesendorp BS, Dekker-Saeyns AJ, Ivanyi, P. Distribution of HLA-B27 subtypes in patients with ankylosing spondylitis: the disease is associated with a common determinant of the various B27 molecules. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 353-6.
- Del Porto P, D'Amato M, Fiorillo MT, Tuosto L, Piccolella E, Sorrentino R. Identification of a novel HLA-B27 subtype by restriction analysis of a cytotoxic gamma delta T cell clone. *J Immunol* 1994; 153: 3093-100.
- D'Amato M, Fiorillo MT, Galeazzi M, Martinetti M, Amoroso A, Sorrentino R. Frequency of the new HLA-B*2709 allele in ankylosing spondylitis patients and healthy individuals. *Disease Markers* 1995; 12: 215-7.
- D'Amato M, Fiorillo MT, Carcassi C, Mathieu A, Zuccarelli A, Biti PP, Tosi R, Sorrentino R. Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3199-201.
- Fiorillo MT, Greco G, Sorrentino R. The Asp-His 116 substitution in a novel HLA-B27 subtype influences the acceptance of the peptide C-terminal anchor. *Immunogenetics* 1995; 41: 38-9.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Prof. A. Mathieu ed il Prof. C. Carcassi dell'Università di Cagliari, il Dr. A. Zuccarelli dell'ospedale di Olbia ed il Dr. P.P. Biti dell'Ospedale di Nuoro che hanno collaborato allo studio della popolazione sarda; il Prof. M. Galeazzi dell'Università di Siena, il Prof. A. Amoroso dell'Università di Torino e la Dr. M. Martinetti del Policlinico "San Matteo" di Pavia per la collaborazione nello studio sulla popolazione italiana. Gli autori ringraziano inoltre il Prof. E. Appella ed il Prof. D. Hunt dell'NIH di Bethesda, in collaborazione con i quali sono stati effettuati gli studi di eluizione e caratterizzazione dei peptidi legati alle molecole HLA-B*2705 ed HLA-B*2709, ed il Prof. R. Tosi del CNR di Roma per la revisione critica del lavoro. Questo progetto è stato finanziato dal contratto Telethon E.410 a R.S.

19. Fiorillo MT, Meadows L, D'Amato M, Shabanowitz J, Hunt DF, Appella E, Sorrentino R. Susceptibility to ankylosing spondylitis correlates with the C-terminal residue of peptides presented by various HLA-B27 subtypes. *Eur J Immunol* 1997; 27: 368-73.
20. Lopez-Larrea C, Sujirachato K, Mehra et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis: evidence for new associations. *Tissue Antigens* 1995; 45: 169-76.
21. Garcia F, Marina A, Lopez de Castro JA. Lack of carboxyl-terminal tyrosine distinguishes the B*2706-bound peptide repertoire from those of B*2704 and other HLA-B27 subtypes associated to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1997; 49: 215-21.
22. Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Gnau V, Jung G, Rammensee HG. Dominant aromatic/aliphatic C-terminal anchor in HLA-B*2702 and B*2705 peptide motifs. *Immunogenetics* 1994; 39: 74-7.
23. Fruci D, Greco G, Vigneti E, Tanigaki N, Butler RH, Tosi R. The peptide-binding specificity of HLA-B27 subtype (B*2705) analyzed by the use of polyalanine model peptides. *Human Immunol* 1994; 41: 34-8.
24. Fruci D, Butler RH, Greco G, Rovero P, Pazmany L, Vigneti E, Tosi R, Tanigaki N. Differences in peptide-binding specificity of two ankylosing spondylitis-associated HLA-B27 subtypes. *Immunogenetics* 1995; 42: 123-8.