

Asociación del polimorfismo de una única base (SNP, Single nucleotide polymorphism) rs10865331 (2p15) con la Espondilitis Anquilosante en población española.

La Espondilitis Anquilosante (EA) es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la presencia de sacroileitis, anquilosis del esqueleto axial y entesitis. Aunque la causa exacta de la EA no se conoce, se han implicado diversos factores genéticos en su etiopatogenia, comenzando por la asociación de la molécula de histocompatibilidad de clase I HLA-B27 a principios de los años 70. Pero, aunque alrededor del 90% de los pacientes con EA de raza caucásica son B27 positivos, sólo menos del 5% de los aproximadamente 8% de los individuos B27 positivos que existen en la población general desarrollan la enfermedad. Durante los últimos años el desarrollo de las técnicas de genotipado de polimorfismos de base única (SNPs) basadas en microarrays de alto rendimiento y los estudios de asociación amplia del genoma (GWAS o genome wide association studies) han ayudado a encontrar factores de riesgo genéticos independientemente del HLA-B27 asociados con la EA, como el Receptor de la IL-23 (IL-23R) y la aminopeptidasa del retículo endoplásmico ERAP-1, entre otros genes. Un estudio GWAS reciente ha mostrado la asociación con la enfermedad de dos SNPs intergénicos que no habían sido previamente publicados, el SNP rs2242944 perteneciente a la región cromosómica 21q22 y el SNP rs10865331, en la región cromosómica 2p15. El propósito de este trabajo fue evaluar la asociación de estos dos SNPs intergénicos con la EA en población española.

La población participante en este estudio consistió en 300 pacientes con EA diagnosticados según los criterios de Nueva York modificados seleccionados a partir del Registro Español de pacientes con Espondiloartropatías de la Sociedad Española de Reumatología (REGISPONSER) y 300 controles sanos procedentes del Banco Nacional de ADN de Salamanca. Ambos grupos eran de origen caucásico. El grupo de pacientes comprendió 231 hombres y 69 mujeres y tenía una edad media de 51 ± 10 años. La población control fue seleccionada con un ratio similar en cuanto al sexo y edad, comprendiendo 225 hombres y 75 mujeres, con una media de edad de $55 \pm 4,5$ años, con el fin de asegurar que no fueran diagnosticados de espondiloartritis de forma más tardía. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito para colaborar en el estudio, que fue aprobado de forma centralizada por

el Comité de Ética del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda en el caso del grupo de pacientes y por el Comité Ético del Banco Nacional de DNA en el caso del grupo de controles.

Los dos SNPs, rs10865331 y el rs2242944, fueron genotipados mediante la tecnología KASPar (KBioscience, Hertfordshire, UK) que consiste en una PCR (reacción de la polimerasa en cadena) aleloespecífica competitiva con detección por FRET (transmisión de energía por resonancia de fluorescencia). La presencia de HLA-B27 fue testada por PCR convencional usando como control interno la amplificación del exón 8 del gen p53.

El análisis estadístico se realizó con el software Helix Tree v.6.4.2 (Golden Hélice Inc., Bozeman, Montana, EE.UU). La prueba de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) se realizó para cada SNP. Los tests de asociación de las frecuencias alélicas y genotípicas para cada SNP se realizaron mediante la prueba de χ^2 . La magnitud de la asociación se expresó como odds ratio (OR) con un intervalo de confianza (IC) del 95% (> 1 indica un alelo de susceptibilidad, y < 1 indica un alelo protector). La significación estadística se fijó en $p < 0,05$. Se definió una asociación "borderline" a los valores de p comprendidos en el intervalo entre $p = 0,05$ y $p = 0,1$.

Los resultados obtenidos tras realizar la PCR para la detección de HLA-B27 al conjunto de participantes mostraron que 253 (84%) pacientes y 20 (7%) controles fueron positivos.

Respecto al genotipado de SNPs, encontramos que ambos (rs10865331 y rs2242944) estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg en el grupo control ($p = 0,38$ y $p = 0,88$ respectivamente). La tasa de genotipado fue de 0,97, con 286 y 295 genotipos obtenidos para el SNP rs10865331 y 294 y 290 para el rs2242944, en casos y controles respectivamente.

Los resultados para las comparaciones de frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos grupos mostraron una asociación significativa para el SNP rs10865331 para ambas frecuencias alélicas ($p = 0,029$) y genotípicas ($p = 0,002$). Específicamente el alelo A confirió susceptibilidad a EA con un OR de 1,29 (95% CI de 1,02-1,63). En el caso del SNP rs2242944 aunque no se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar ambos grupos sí se observó una tendencia o asociación borderline en los pacientes al comparar las frecuencias alélicas ($p = 0,068$). Estos resultados, por

tanto replican por primera vez en una cohorte independiente de la utilizada en el estudio GWAS la asociación del SNP rs10865331 con la Espondilitis Anquilosante. El hecho de que el SNP rs2242944 no haya alcanzado un valor estadísticamente significativo podría ser debido al tamaño muestral, que es una limitación de nuestro estudio.

Ambos SNPs se localizan en regiones intergénicas en las cuales no se han descrito genes que codifiquen para ninguna proteína conocida. Aunque diversos estudios genéticos recientes han implicado a SNPs pertenecientes a regiones genómicas intergénicas en enfermedades autoinmunes y otros trastornos y procesos fisiológicos es difícil establecer el impacto biológico de las variantes intergénicas en una patología específica. El SNP intergénico rs10865331 que encontramos significativamente asociado a EA en nuestro estudio se encuentra localizado en la región 15 del brazo corto (p) del cromosoma 2. De acuerdo con los datos de genotipado disponibles del proyecto HAPMAP de la población CEU, el snp rs10865331 no se encuentra en desequilibrio de ligamiento (LD) con ningún bloque de genes vecinos, por tanto, parece improbable que este SNP se encuentre asociado con EA debido al posible LD que hubiese con alguna variante asociada con la enfermedad en algún gen vecino.

El gen más cercano al SNP rs10865331 es el de la acetilglucosamintransferasa B3GNT2 que codifica para una proteína transmembrana tipo II implicada en la biosíntesis de cadenas de poli-N-acetilactosamina. Otro de los genes situados en esta región es el COMMD1, que codifica para una proteína relacionada con el metabolismo del cobre que actúa como inhibidor de la activación del factor nuclear NF- κ B. NF- κ B es uno de los principales factores de transcripción reguladores de la respuesta inmune y su función se ha encontrado alterada en diversas enfermedades autoinmunes. Mediante la utilización de la plataforma MAPPER para la búsqueda de posibles sitios de unión de factores de transcripción (TFBS, transcription factor binding sites) encontramos 2 posibles TFBSs para el factor de transcripción Myc-Mac y 1 TFBS para el factor Tal1beta-E47S. En este último caso, sólo si el alelo G estuviera presente se podría predecir el potencial sitio de unión para el factor de transcripción apuntado. Por tanto, si alternativamente se encontrara la presencia del alelo de susceptibilidad A, la posible unión del factor Tal1beta-E47S se perdería. Nuestra hipótesis apuntaría a que este posible TFBS podría estar implicado en la regulación de los genes vecinos, como COMMD1 o B3GNT2.

Como resumen, podemos decir que nuestro estudio evidencia claramente la asociación del SNP intergénico rs10865331 con la EA en población española, replicando los resultados obtenidos recientemente en el estudio de asociación amplia del genoma (GWAS) específico de EA. No obstante hacen falta más estudios que investiguen la importancia funcional y los procesos biológicos alterados por este SNP intergénico asociado a Espondilitis Anquilosante.