



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Medicina

Factores genéticos implicados en la susceptibilidad a la artritis reumatoide. Polimorfismos en genes candidatos y estudios de confirmación

TESIS DOCTORAL

Rebeca Diéguez González

2009



Universidad de Santiago de Compostela

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina

Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela

Laboratorio de Investigación 2

**Factores genéticos implicados en la
susceptibilidad a la artritis reumatoide.
Polimorfismos en genes candidatos y estudios
de confirmación**

Tesis Doctoral

Rebeca Diéguez González

2009

El Dr. Antonio González Martínez-Pedrayo, investigador principal del Laboratorio de Investigación 2 del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, y el Dr. Juan Jesús Gómez-Reino Carnota, Jefe del Servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN QUE:

El presente trabajo que lleva por título: *Factores genéticos implicados en la susceptibilidad a la artritis reumatoide. Polimorfismos en genes candidatos y estudios de confirmación*, realizado por Rebeca Diéguez González en el Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela bajo nuestra dirección, ha sido revisado y está en disposición de ser presentado para optar al grado de Doctora en Biología.

Fdo: Dr. Antonio González Martínez-Pedrayo Fdo: Dr. Juan J. Gómez-Reino Carnota

A mis padres

Agradecimientos

Cuando consigues algo por lo que has luchado con todas tus fuerzas y todo tu corazón, la satisfacción es tan grande que es difícil de contener. Cuando ese momento llega, miras hacia atrás y lo que recuerdas es a quien te ha acompañado en ese camino. Entonces, un millón de sentimientos se agolpan, un millón de recuerdos renacen, y sonríes feliz y agradecido a todas aquellas personas que han compartido tu esfuerzo. Porque la felicidad no es feliz si no tienes con quien compartirla.

Me siento tremendamente afortunada de haber llegado hasta aquí, y se que ha sido posible gracias al apoyo incondicional de quien ha confiado en mí, y me ha ayudado a comprender que merece la pena luchar por lo que uno cree. Por eso quiero agradecer a todas esas personas, que hayan compartido este sendero conmigo.

En primer lugar quiero darle las gracias al Dr. Antonio González, quien ha “sufrido” la dirección de esta tesis doctoral. Gracias por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo un sueño. Gracias por tu entusiasmo y por seguir pensando que las cosas van a mejorar en este mundo de locos. Gracias también al Dr. Juan J. Gómez-Reino, mi codirector de tesis, por permitirme realizar mi trabajo en colaboración con el Servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.

Gracias a todos aquellos pacientes y controles que se han prestado de manera completamente desinteresada a colaborar en este proyecto de investigación. Nada de esto sería posible sin la participación de estas personas. Gracias también a todos los clínicos e investigadores que han participado de alguna manera en este trabajo.

A mis padres, a quienes dedico este momento. Y os lo dedico con humildad porque el esfuerzo que yo haya empleado estos años, no alcanza ni de lejos, ni uno de los días de trabajo que vosotros habéis dedicado para que yo haya podido llegar hasta aquí. Me habéis dado en vida, la mejor herencia que se le puede dejar a un hijo, toneladas de amor incondicional, que habéis demostrado con cada uno de los sacrificios que tuvisteis que hacer para que yo tuviera lo que vosotros no tuvisteis. Me habéis hecho entender, con vuestro ejemplo, que en esta vida hay que tener afán de lucha y espíritu de superación, que hay que ser generosos, y que las cosas se consiguen a base de esfuerzo, pero se consiguen si uno pone ilusión y empeño. Es una auténtica fortuna teneros por padres. Os agradezco todo, porque os debo todo y más.

A mis hermanos, porque sin duda, parte de lo que soy se lo debo a todos los momentos que pasamos juntos. Tengo cientos de recuerdos felices a vuestro lado. A ti Belén quiero agradecerte tu complicidad, el que hayas sabido escucharme, entenderme y ayudarme. Para mi, y a pesar de lo diferentes que podamos parecer, eres una especie de alma gemela conectada a lo que siento. A ti Julián, quiero darte las gracias por los millones de veces que me has hecho reír y por tu buen corazón que siempre se deja ver a pesar de los problemas. Aprovecho también para agradecerte, alguna que otra culpa con la que cargaste tú...por alguna trastada que hice yo cuando éramos pequeños...tienes que entender, que tenía una reputación que mantener...

A mi abuela Asunción y a mi tío Ismael porque sois una segunda madre y un hermano mayor para mí. Gracias, porque gran parte de mis recuerdos más felices son a vuestro lado. Porque sé que me habéis dado lo que a veces no teníais. Porque me hacéis sentir “especial” con lo que hago. Por haber confiado siempre en mí. Os admiro muchísimo y os quiero más todavía.

A mi familia por ser los amigos que nunca fallan. Todos y cada uno de vosotros habéis sido buenos educando, y mejores mimando. Espero que se me haya “pegado” algo de cada uno. Gracias: A mi tía Mary y a mi tío Toñi, porque me transmitís muchísima alegría (no hay risas que más me hayan prestado que las que nos hemos echado juntos), y porque hacéis que me sienta muy querida. A mi tía Loly y a mi tío Pepe porque me demostráis mucho cariño siempre, y por vuestros ánimos durante todo este tiempo. A mi Tata por mil cariños, por tu exquisita amabilidad y bondad, y por ese toque de elegancia que tú tienes; a mi tío Antonio tu entrañable toque de niño. A mi tío Luís y mi tía Eva, porque decís mucho hablando poco...y por vuestra generosidad (tremenda generosidad...). A mi tía Susi, porque eres un ejemplo de lucha y superación. A mi tío Carlos y mi tita Mónica, por vuestra cercanía. A primos, María, Yago, David, Isis, Noemi y Andrea, porque sencillamente sois geniales, de cada uno de vosotros guardo con cariño, charlas, juegos, risas...sólo buenos momentos. También a ti Sheila, porque aunque acabas de llegar a este mundo, ya me has hecho sonreír muchas veces.

De forma especial quiero darles las gracias a mi abuelo Darío y a mi abuela Lourdes, porque siempre me habéis animado a luchar por esto, aunque eso implique tener que salir de mi mundo. Gracias por vuestros sacrificios y por una vida trabajando de sol a sol, sois un ejemplo para mí. Gracias también a ti Abuelo Antonio, porque aunque sólo estuvimos nueve añitos juntos, tengo recuerdos muy felices contigo. Estoy segura de que estás viéndome y alegrándote por mí ahora.

A mis compañeros, porque me habéis ayudado mucho estos años de tesis. No solamente con conocimientos, sino con muy buenos momentos. Especialmente quiero agradecerlos a los “tunantes” del laboratorio 2: A Chicha, porque sin duda eres lo más auténtico que conozco, gracias por tu amistad, tu sinceridad y tu fuerza. A Servet, por el inolvidable tiempo que pasamos juntas. A Isa, por arrimar siempre el hombro y porque tu carácter entiende al mío. A Isabel, por tu apoyo desde el primer día. A Julio, por contagiarme tu entusiasmo y tu interés por el mundo de la ciencia, porque me has regalado frases que recordaré siempre (“en el laboratorio se trabaja pensando en lo que se tiene”, “no hay como conocerse a uno mismo”...), y por *Napoleón Dinamita* (fue un antes y un después...). A Pombo, porque aunque cambiaste la faceta de “pasar de mí” a la de “meterte conmigo”, me haces reír un montón, y siempre has estado ahí cada vez que te he necesitado. Sin duda, Manuel, eres incorregiblemente adorable. A Marián, por tu ternura, por la paz que me transmites, por todo lo que tenemos en común, y por los “hachazos” que pegas de vez en cuando... A Elisa, porque eres un auténtico “huracán”, porque me encantaste desde el principio y por tu admirable y sorprendente “espíritu innovador”. A Cristina, por escucharme, porque siento que me entiendes perfectamente, por tu madurez, y porque adoro tu sutil locura. A Manolo, por docenas de miles de millones de cosas. Gracias por tu paciencia, por saber escuchar, por saber enseñar, por saber aguantarme (lo más difícil de todo...), y porque tus “inapreciables” facetas de matemático-estadístico-informático-biólogo-meteorólogo, me han ayudado muchísimo.

Gracias también a toda la gente que se ha dejado caer por este “recunchiño” que tenemos por laboratorio: Marta, Yolanda, Inés, Aida y ahora Carmen. Al resto de mis compi-amigos también os doy las gracias, especialmente a Rudy, porque me parto y me mondo contigo, y porque sin duda ocupas gran parte de mis recuerdos más alegres en los laboratorios. A Samu, porque aunque te metes mucho conmigo...lo haces con mucho cariño. A Diego, porque tienes mucha pero que mucha chispa, y porque si tú eres friky...que viva el frikismo! A Bruno, por tu ternura y por escuchar siempre. A Ezequiel y a Sonia por vuestra cercanía y porque sois la mar de enrollados. Y por supuesto a todos los demás: Ana, Miguel, Roberto, Toño, Sandra, Rocío, Manuel (labo1), Patricia (labo 3 y 5), María, Marina (sin duda, una compañera más), Javi, al nuevo equipo técnico (Paula, Vero, Ana, Bea) a Anna, y a las nuevas incorporaciones: Vanesa, Miriam, Giuseppe y Pamela (espero no haberme olvidado de nadie...). Gracias a ti también Dina, por tu cercanía y porque cuando las jornadas laborales llegaban hasta horas intempestivas, siempre tenías una palabra de ánimo.

No me olvido de Carmen, Fran y por supuesto de su “Excelentísima Eminencia el señor Doctor D. Oreste”...Gracias por vuestra cercanía y por los agradables momentos que hemos pasado.

Gracias a la Dra. Ana Viñas, porque en gran parte, si opté por este camino fue porque tu conseguiste despertar en mí el interés por la genética. Empecé en investigación contigo, y tú me motivaste para que continuara por este camino. Me has enseñado mucho como profesora, como directora y como persona.

También quiero recordar y agradecer a mis profesores de las etapas de escuela, instituto y universidad, lo que me han enseñado, y lo que han ido sumando cada uno de ellos para que yo me haya interesado por la ciencia

A mis amigos “los vascos”: Gorka, Eneko, Tanit, Ilse, Arkaitz, Iñaki, Ignacio (más conocido como Bolsón), Juankar y a mi mañica (María). Porque aunque a muchos kilómetros de distancia, os he sentido y os siento cerca. A la tribu de física, especialmente a Iván y a Manuela por mil días y un centenar de noches. A Jose, porque no conozco a un biólogo más biólogo que tú. A Juan, por todo lo que me has escuchado, aguantado, animado, apoyado..., gracias por lo bueno que siempre has sido conmigo. A Lore, por cruzarte en mi camino, por tu dulzura, por tu madurez y por tu apoyo incondicional.

A mi Paula, porque la palabra amistad cobra sentido contigo. Por todo lo que has sabido escucharme y ayudarme. Por tu fidelidad, porque siempre estás, estés como estés. Por todos y cada uno de estos años. Te aseguro que no los recordaría con tantísimo cariño si tú no hubieras formado parte de ellos.

A ti David, gracias por recorrer este camino a mi lado. Gracias por darme fuerza. Por salvarme de mí misma. Por justificar mis malos momentos y por alegrarte de los buenos. Por entenderme mejor que nadie. Por levantarme de las caídas. Por creer en mí...y por hacerme sentir todo esto. Te aseguro que no lo hubiera conseguido sin ti. Sencillamente, gracias por cada segundo.

Abreviaturas	1
Introducción	3
- Introducción	5
-Artritis Reumatoide	5
-Mediadores de la degradación tisular y de la inflamación en AR	8
TNF- α	9
IL-1	11
IL-6	13
-Rutas de señalización y regulación de la expresión génica en la AR	13
NFK- κ B	14
MAP quinasas	16
AP-1	17
-Genética de la AR	17
-Estudios de ligamiento de genoma completo	18
-Identificación de genes candidatos en loci de ligamiento	19
-Estudios de asociación de genes candidatos	23
-Estudios de Asociación de genoma completo	28
- Factores genéticos asociados con AR	36
HLA	36
Organización y nomenclatura	36
El epítipo compartido	37
Hipótesis alternativas	40
PTPN22	41
STAT4	43
Región intergénica 6q23	44
TRAF1-C5	46
IRF5	49
Hipótesis	55
- Hipótesis	57

Objetivos	59
- Objetivos	61
Procedimiento experimental, resultados y discusión	63
-Procedimiento experimental, resultados y discusión	65
- Esquema general	65
- NFκB en AR	69
-TNFAIP3 y región intergénica 6q23	95
- IRF5 en AR	123
- IL-1 en AR	137
-Otros genes candidatos en AR	157
Discusión general	179
-Discusión	181
-Estudio de la variabilidad de la ruta NFκB en relación con susceptibilidad a la AR	184
-TNFAIP3 y la región intergénica 6q23 en AR	189
-Haplotipos de IRF5 en AR	194
-Análisis de polimorfismos del gen IL-1β en relación a la susceptibilidad a la AR	199
-Exploración de otros genes candidatos: CFH, CD209, Eotaxin-3 y MHC2TA	201
-Sumario	207
Conclusiones	211
- Conclusiones	213
Bibliografía	215
- Bibliografía	217

ABREVIATURAS

ACPA	Autoanticuerpos frente a péptidos/proteínas citrulinadas
ACR	Colegio Americano de Reumatología
AR	Artritis Reumatoide
C5	Componente 5 del complemento
CD209	Receptor de la lectina tipo C
CFH	Factor del complemento H
CTLA4	Antígeno linfocitario citotóxico 4
FR	Factor Reumatoide
GWAs	Estudios de asociación de genoma completo (del inglés, <i>genome wide association studies</i>)
HLA	Antígeno leucocitario humano
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IRF5	Factor regulador del interferón 5
LD	Desequilibrio de ligamiento
LES	Lupus eritematoso sistémico
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MHC2TA	Trasactivador 2 del complejo mayor de histocompatibilidad
NFκB	Factor nuclear-κB
nsSNP	Polimorfismos no sinónimos de un solo nucleótido

OR	<i>Odds ratio</i>
PADIs	Peptidilarginina deaminasa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PTPN22	Fosfatasa de tirosina tipo 22 no-receptor
RR	Riesgo relativo
SCLC22A4	Transportador soluble de cationes orgánicos 4
SE	Epítipo compartido (del inglés, <i>shared epitope</i>)
SNP	Polimorfismo de un sólo nucleótido (del inglés, <i>Single nucleotid polymorphism</i>)
STAT4	Traductor de señal y activador de la transcripción 4
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFAIP3	Proteína 3 inducida por TNF alpha
TRAF1	Factor 1 asociado al receptor de TNF

Introducción

Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por sinovitis y por una severa destrucción articular, que afecta fundamentalmente a las articulaciones periféricas con distribución simétrica. Algunas de sus manifestaciones clínicas son dolor, rigidez, hinchazón y pérdida de movilidad. Puede llegar a producir la destrucción de la arquitectura de la articulación causando graves deformidades (Feldmann M *et al.*, 1996) (Bresnihan B *et al.*, 1998). Su evolución es progresiva con remisiones y exacerbaciones y, en ocasiones, se acompaña de otros problemas en diferentes órganos como vasculitis, pleuritis, pericarditis...Esta enfermedad afecta al 1% de la población caucásica, con una prevalencia en mujeres con respecto a hombres del 2,5:1 (Lawrence RC *et al.*, 1998).

La patogenia de la AR es un proceso complejo, que implica proliferación celular y fibrosis a nivel sinovial, la formación de pannus, y la erosión del cartílago y el hueso. La respuesta inmune que se desencadena en la AR, da lugar a la inflamación de la membrana sinovial. Las células del sistema inmune, linfocitos T, linfocitos B, monocitos/macrófagos y granulocitos, invaden la membrana sinovial, al mismo tiempo que las células residentes, sinoviocitos tipo macrófago y tipo fibroblasto, se hiperplasian y proliferan (**Figura 1**).

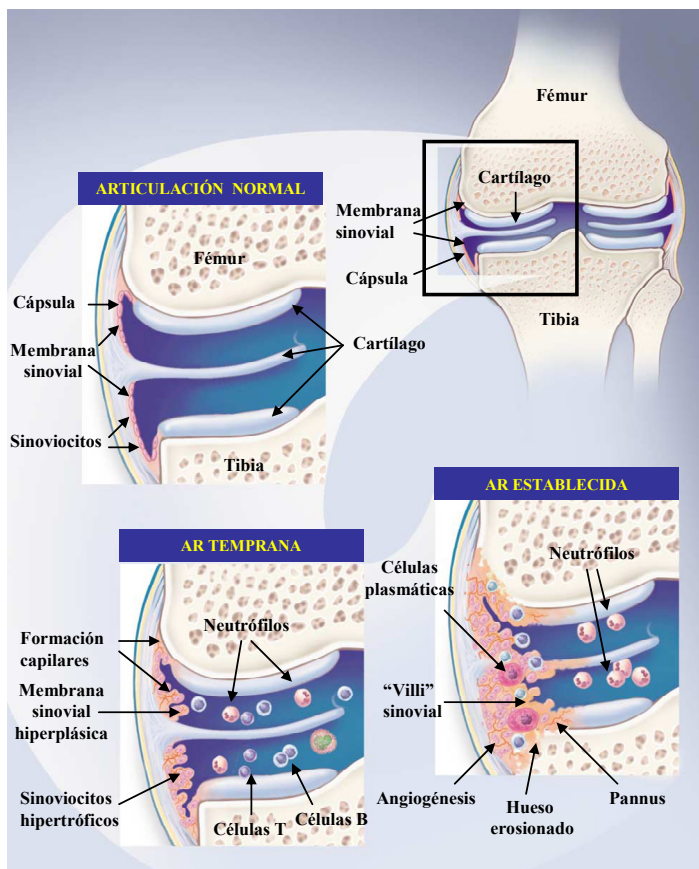


Figura 1: Esquema de los cambios que se van observando en una articulación con artritis reumatoide (Choy EH, Panayi GS, 2001)

Todo este conjunto de células producen factores que acentúan y mantienen la inflamación, como citocinas, quimiocinas, prostanoïdes, y enzimas degradativos tales como metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), proteasas de serina y agrecanasas (Tak P, Bresnihan B, 2000) (Dinarello C, Moldawer L, 2002). Entre las citocinas cabe destacar la interleucina 1 (IL, 1 *Interleukin-1*) y el factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*) que son mediadores fundamentales de la inflamación en la AR (Buchan G *et al.*, 1998) (Arend WP *et al.*, 1990) (Koch AE *et al.*, 1995). Los enzimas

degradativos son capaces de digerir la matriz extracelular, lo que facilita la infiltración celular inflamatoria, y provoca la destrucción de las estructuras articulares (Firestein GS, 2003).

La alteración de la respuesta inmune favorece la aparición del denominado factor reumatoide (FR), un autoanticuerpo reactivo frente a la porción constante de la IgG. Este autoanticuerpo se emplea como uno de los criterios de clasificación de la AR establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR, *American College of Rheumatology*) en 1987 (Arnett FC *et al.*, 1988) (**Tabla 1**).

Tabla 1: Criterios de clasificación de la AR establecidos por la ACR en 1987.

1. Rigidez matinal
2. Artritis de tres o más articulaciones
3. Artritis de manos
4. Artritis simétrica
5. Nódulos reumatoides
6. Factor reumatoide sérico
7. Cambios radiográficos

La asociación de la enfermedad con el FR, es la principal razón por la que la AR se clasifica dentro de las enfermedades autoinmunes. La sensibilidad y especificidad del FR en la AR son, sin embargo, bajas: 60-70 y 80-90%, respectivamente. Recientemente se han descubierto autoanticuerpos frente a péptidos/proteínas citrulinadas (ACPA, *anti-citrullinated peptides antibodies*), con una sensibilidad similar a la del FR pero con mucha más especificidad (~99%) (Vossenaar ER *et al.*, 2004). Tanto el FR como los ACPA se

desarrollan años antes del comienzo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Nielen MM *et al.*, 2004) (Rantapaa-Dahlqvist S *et al.*, 2003), y ambos están asociados con una mayor severidad de las mismas (van Gaalen FA *et al.*, 2003) (Kroot EJ *et al.*, 2000).

Mediadores de la degradación tisular y de la inflamación en AR

Como se comentaba anteriormente, la patogenia de la artritis reumatoide se caracteriza por la acción concertada de diferentes tipos de células que desencadenan la inflamación de la membrana sinovial y en ocasiones, la erosión del cartílago. De forma resumida, el resultado global de todos estos procesos es una acumulación de células inmunes en la membrana sinovial, y un marcado incremento de la sinovia debido a la hipertrofia e hiperproliferación de los sinoviocitos tipo macrófago y los de tipo fibroblasto. Esta membrana sinovial engrosada se puede transformar en un tejido inflamatorio llamado pannus que destruye el cartílago y el hueso subcondral.

Dentro de todo el conjunto de moléculas que participan en la patogenia de la AR, las citocinas inflamatorias son los principales mediadores de la inflamación y de la degradación tisular. Numerosos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* indican que la IL-1 y el TNF α son las citocinas catabólicas más importantes implicadas en la destrucción del cartílago articular en la AR (van der Berg WB, van Riel PL, 2005) (Dayer JM, 2003) (van der Berg WB, 2005). La IL-1 y el TNF- α inducen la producción de otras proteínas inflamatorias que incluyen la IL-6, el factor inhibidor de leucemia (LIF), IL-17 y la IL-18, así como quimiocinas (Goldring SR, Goldring MB, 2004) (Aida Y *et al.*, 2006) **(Figura 2)**

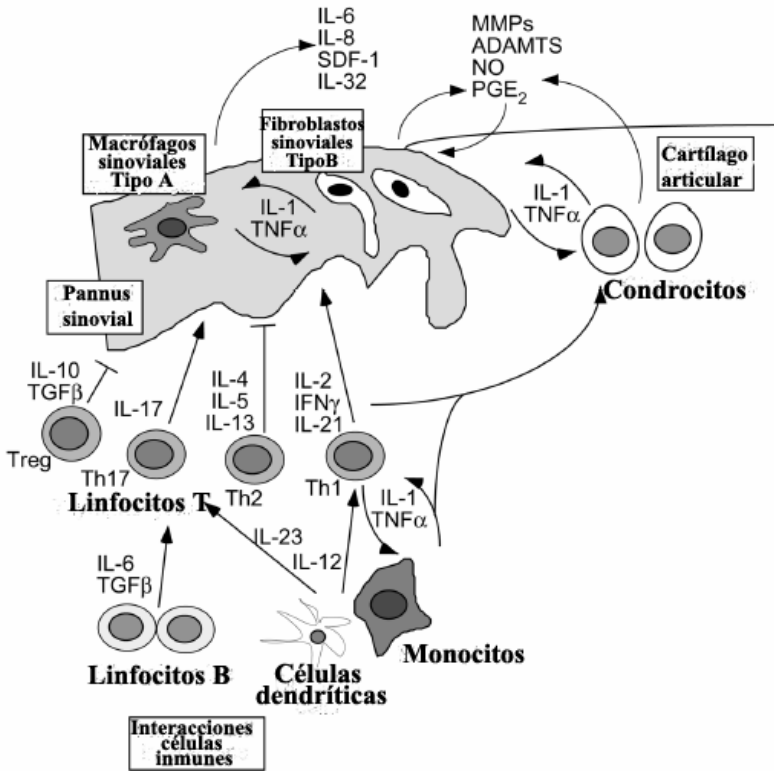


Figura 2: Redes de citocinas e interacciones celulares en la destrucción del cartílago en AR. (Otero M, Goldring MB, 2007).

TNF- α

El factor de necrosis tumoral- α ($TNF-\alpha$) es una potente citocina pro-inflamatoria. El gen *TNF- α* se localiza en una región cercana a los genes *HLA* en la región 6p23-6p12, y codifica para una proteína secretada principalmente por monocitos y macrófagos, pero también por células B, células T y fibroblastos. Su producción es inducida por IFN , IL-2 e IL-18. $TNF-\alpha$ es un estimulador autocrino y un potente inductor paracrino de otras citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8, así como de otras proteínas que incluyen las GM-CSF y las

MMPs. También induce la producción de prostaglandinas, incrementa la expresión de moléculas de adhesión y facilita la osteoclastogénesis (Beutler BA, 1999) (Zhang Z, Bridges SL Jr, 2001) (Brennan FM *et al.*, 1998) (Feldmann M, Maini RN, 1999) (Arend WP, Dayer JM, 1990) (Dayer JM, 1985) (Lader CS, Flanagan AM, 1998). TNF- α se ha encontrado en concentraciones elevadas en el líquido sinovial y en el pannus de pacientes con AR (Chu CQ *et al.*, 1991), y su expresión ha sido correlacionada con la sinovitis y las erosiones (Neidel J *et al.*, 1995).

La eficacia de los inhibidores de TNF- α en el tratamiento de la AR demuestra su implicación en la enfermedad. Así, en células sinoviales en cultivo procedentes de pacientes con AR, el bloqueo de TNF- α a través de anticuerpos, reduce significativamente la producción de IL-1, IL-6, IL-8 y GM-CSF (Butler DM *et al.*, 1995). Ratones transgénicos para TNF- α , los cuales producen la proteína humana de forma constitutiva, desarrollan una poliartritis inflamatoria y destructiva, muy similar a la AR (Keffer J *et al.*, 1991). El bloqueo de TNF- α a través de anticuerpos monoclonales en estos animales, previene el desarrollo de la artritis. En modelos animales de AR inducida por inmunización con colágeno de tipo II, el bloqueo de TNF- α , también disminuye la actividad de la enfermedad y reduce la severidad y el daño en la articulación (Wooley PH *et al.*, 1993) (Williams RO *et al.*, 1992).

Actualmente, existen tres antagonistas de TNF que se utilizan como tratamiento de la AR: Una proteína de fusión con el receptor soluble (etanercept) y dos anticuerpos monoclonales anti-TNF (infliximab y adalimumab). Los tres han demostrado una alta eficacia al mejorar los parámetros clínicos de actividad, y retrasar la progresión de las lesiones radiográficas en un elevado porcentaje de pacientes con AR (Weinblatt ME *et al.*, 1999) (Lipsky PE *et al.* 2000)

(Weinblatt ME *et al.*, 2003). No hay datos que avalen la superioridad de un antagonista sobre otro. En relación a esto se ha visto que sus diferencias a nivel estructural, antigénicas y de mecanismos de acción, hacen que la falta de respuesta a uno de ellos no implique la ineficacia de otro. Por lo tanto, el uso de anticuerpos anti-TNF parece ser el tratamiento más eficaz en la AR. El hecho de que TNF sea una buena diana terapéutica aumenta el interés en el estudio de genes y rutas de señalización en las que esta citocina está implicada.

IL-1

El sistema de la *IL-1* tiene un importante papel regulador en la inflamación y la respuesta inmune (Dinarello CA, 1998) (Arend WP, Gutheide CJ, 2000) (Rosenwasser LJ, 1998) que se induce en muchos tipos celulares en respuesta a productos microbianos. Las proteínas de IL-1 más estudiadas son la IL-1 α , IL-1 β y el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra), que son productos de tres genes, *IL1A*, *IL1B* e *IL1RN* respectivamente. IL-1 α y β son agonistas del receptor de membrana celular de tipo I (IL-1R1), mientras que IL-1Ra es un antagonista competitivo. Los genes *IL-1 α* e *IL-1 β* están situados en el brazo corto del cromosoma 2, localizado en una región de aproximadamente 500Kb. En su proximidad se encuentran otros genes relacionados como la *IL-R1*, *IL-R2* e *IL-1Ra*

De forma resumida, puede decirse que la *IL-1* es un mediador clave de la AR que actúa, de forma sinérgica con TNF, en la inducción de genes inflamatorios tanto a nivel local como sistémico. Además, tiene una gran capacidad de incrementar la degradación de la matriz, por medio de la inducción de la producción de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) (MMP-3, MMP8 y MMP-13); produce la activación de osteoclastos y por

consiguiente, incrementa la reabsorción del hueso y la destrucción del cartílago; y reduce la producción de procesos de reparación mediante la supresión de síntesis de matriz (Dayer JM, 2002).

Dentro de la familia de IL-1, la IL-1 β tiene como función principal ser un potente activador de la respuesta inmune humoral (Nakae S, 2001). Está producida por diferentes tipos celulares incluyendo neutrófilos, células *natural killer*, linfocitos B y T, y células del sistema nervioso central (Oppenheim J, 1986), aunque las células principales en su producción son los monocitos y los macrófagos (Arend W et al., 1989). Esta citoquina pro-inflamatoria tiene la capacidad de incrementar la expresión de otras citocinas como TNF α y la IL-6, y de quimiocinas y moléculas de adhesión. Del mismo modo, la IL-1 β también incrementa la expresión de varias proteasas de tejidos y metaloproteasas de matriz, e inhibe la síntesis de proteoglicanos. (Charles A, Dinarello MD, 2005). Además, experimentos llevados a cabo en modelos animales apoyan la hipótesis de que el bloqueo de esta citocina inflamatoria sería una medida terapéutica importante. El bloqueo de la IL-1 se produce, de forma natural, cuando IL-1Ra se une a IL-1R1, bloqueando la unión de IL-1 α e IL-1 β (Seckinger P, 1987) (Bresnihan B, 2002). Por tanto, el balance entre la producción de IL-1 e IL-1Ra es muy importante, ya que el desequilibrio de la producción de ambos, lleva a la propagación de la inflamación.

Todo estos datos indican que esta interleucina es un mediador clave en la AR, la confirmación de que la variabilidad genética en IL-1 β afecta a la susceptibilidad de esta enfermedad, resultaría muy interesante fundamentalmente por la aplicabilidad en el estudio de esta citocina como diana terapéutica en la AR.

IL-6

La IL-6 es una citoquina inflamatoria producida por monocitos, macrófagos activados, células T y sinoviocitos tipo fibroblasto (Van Snick J, 1990). El gen de la *IL-6* humana se localiza en el cromosoma 7p21-p14. Desempeña diferentes funciones entre las que se encuentran la maduración final de células B en células plasmáticas, la activación de células T citotóxicas, inducción de una respuesta de fase aguda, estimulación del crecimiento y diferenciación de células precursoras hematopoyéticas, la formación de osteoclastos y la proliferación de sinoviocitos tipo fibroblasto (Van Snick J, 1990). La expresión de IL-6 es inducida por lipopolisacáridos bacterianos, TNF- α y algunos interferones. La concentración de IL-6 y la de su receptor soluble (IL-6R), se encuentra aumentada en líquido sinovial de pacientes con AR (Hossiau FA *et al.*, 1988). Además, la concentración de IL-6 en el suero de estos pacientes se correlaciona con la actividad de la enfermedad (Dasgupta B *et al.*, 1992), el grado de daño radiológico en las articulaciones (Kotake S *et al.*, 1996) y la respuesta a tratamiento (Dasgupta B *et al.*, 1992).

Rutas de señalización y regulación de la expresión génica en la AR

Los mecanismos moleculares de traducción de la señal, así como los factores de transcripción activados por mediadores de la inflamación en células sinoviales, son objeto de numerosos estudios debido a su potencial papel como dianas terapéuticas (**Figura 3**).

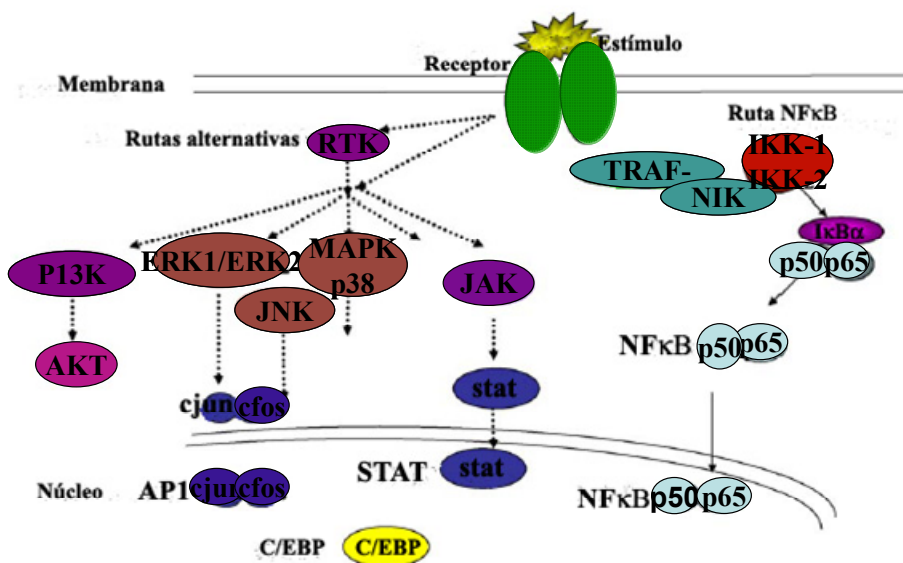


Figura 3: Rutas de señalización inducidas por citocinas pro-inflamatorias (Morel J, Berenbaum F, 2004)

NFK- κ B

El factor nuclear kappa B (NFK- κ B, *nuclear factor kappa B*) juega un papel fundamental dentro de los mecanismos relacionados con la AR. Este factor de transcripción se encuentra activado en la sinovia de pacientes con AR (Han Z *et al.*, 1998). Está implicado en la regulación de genes que contribuyen al proceso inflamatorio y degradación del tejido articular, como citocinas inflamatorias, MMPs, la molécula de adhesión intracelular ICAM-1 que favorece el reclutamiento de linfocitos, y la ciclooxygenasa COX-2 responsable de la formación de prostanoïdes.

Existen dos rutas de señalización que activan NFκB (Bonizzi G, Karin M, 2004) (Bouwmeester T *et al.*, 2004) (Hayden MS, Ghosh S, 2004). La ruta

canónica se desencadena a través de citocinas pro-inflamatorias y mecanismos moleculares asociados a patógenos. Estas señales causan la activación del complejo I κ B quinasa (o IKK, *inhibitor kappa B kinase*), que incluye las subunidades catalíticas IKK α e IKK β y la subunidad reguladora IKK γ . Este complejo activado fosforila los inhibidores de NF κ B o I κ Bs (*inhibitor kappa B*). Estas proteínas, I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ e I κ B γ , se unen en su forma no fosforilada a los dímeros que constituyen NF κ B, reteniéndolos en el citoplasma. Tras la fosforilación, los I κ Bs, son poliubiquitinizados y degradados, de tal manera que dejan libres los dímeros de NF κ B, que se translocan al núcleo donde se unen a promotores de los genes que regulan. Los dímeros de NF κ B se forman por la combinación de alguna de las cinco proteínas NF κ B: p50/105, p52/100, Rel A, Rel B y c-Rel. La fosforilación y la degradación de los I κ Bs es el paso crítico en la regulación de esta ruta. Dos proteínas, KBRAS1 y KBRAS2, se unen a I κ B α e I κ B β impidiendo su degradación y contribuyendo a inhibir la inducción de NF κ B. La ruta alternativa se activa a través del ensamblado por un conjunto de receptores específicos de la superfamilia de receptores del TNF. Esta ruta es dependiente de la quinasa NIK (o MAP3K14) y de IKK α , e independiente de IKK β y de IKK γ . Las dos quinasas se ensamblan en un complejo activo a través de la unión de los dominios de I κ BKAP. La diana de fosforilación de IKK α en esta ruta es p100. Es posible que otras rutas minoritarias también lleven a la activación de NF κ B. Así por ejemplo, señales mediadas por TCR activan NF κ B a través de IKK ϵ .

La ruta de señalización del NF κ B tiene un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad ya que está implicada en la expresión de muchos de los genes de las respuestas inmune e inflamatoria. Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio sistemático para conocer el papel que las variantes genéticas en esta ruta

pueden tener en la AR. Por este motivo, el análisis de polimorfismos de los genes implicados en la ruta resulta muy interesante ya que las rutas de señalización son potenciales dianas terapéuticas.

MAP quinasas

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*) son también moléculas reguladoras claves en la producción de citocinas y metaloproteasas, y por tanto potencialmente importantes en la AR. Las MAPK participan en múltiples rutas de señalización que integran señales externas con la apropiada respuesta celular. Las tres familias principales de MAP quinasas, quinasas reguladas por señal extracelular (ERK, *extracellular signal-regulated kinase*), quinasas N-terminal c-Jun (JNK, *c-Jun N-terminal kinase*) y del grupo p38, se expresan en el tejido sinovial de pacientes con AR (Schett G *et al.*, 2000). Todas ellas son expresadas de forma constitutiva por los sinoviocitos en cultivo, y se fosforilan tras la exposición a citocinas inflamatorias. Las MAPK han sido objeto de estudio como posibles dianas terapéuticas en AR. Así, estudios experimentales muestran que los inhibidores de p38 son efectivos en diferentes modelos animales de artritis (Badger AM *et al.*, 1996). Además, un inhibidor de JNK (SP600125) proporcionó protección frente a la destrucción del hueso y cartílago en un ensayo llevado a cabo en modelos animales (Han Z *et al.*, 2001). Por otra parte, una de las isoformas de JNK, JNK2, es particularmente importante en artritis, ya que se expresa predominantemente en sinoviocitos, y se ha visto que ratones *knockout* para JNK-2 sufren menos daño en el cartílago en comparación con ratones normales (Han Z *et al.*, 2001).

AP-1

La proteína activadora 1, es un factor de transcripción que regula diferentes genes que participan en AR, incluyendo TNF- α y diferentes metaloproteasas. Los componentes de este factor de transcripción, c-Jun y c-Fos, están sobreexpresados en la sinovia de AR (Kinne RW, 1995). Diferentes citocinas inflamatorias activan AP-1 en los sinoviocitos, lo que provoca una expresión masiva de metaloproteasas. El bloqueo de AP-1 a través de oligonucleótidos, suprime la artritis inducida por colágeno (CIA, *collagen-inducen arthritis*) e inhibe la citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α , así como las metaloproteasas MMP-3 y MMP-9.

A pesar de que estas rutas de trasducción de la señal (NF κ B y MAPK), así como el factor de transcripción AP-1 son potenciales dianas terapéutica, no hay demasiados datos publicados acerca de estudios donde se analice el papel de la variabilidad genética de las mismos. Por este motivo, sería interesante examinar la posible asociación genética entre la AR, y polimorfismos conocidos en genes claves en estas rutas de señalización celular.

Genética de la AR

La AR es una enfermedad compleja en la que los factores genéticos juegan un papel relevante. Se han obtenido evidencias de la influencia genética en AR a través de estudios de agregación en familias y estudios de concordancia en gemelos. En el primer caso, se ha observado que la prevalencia de la AR en los hermanos de los pacientes oscila entre el 2% y el 12%, mientras que la prevalencia en la población es solamente del 0,2-1% (Deighton CM *et al.*, 1989). El riesgo relativo entre hermanos (λ s) (que expresa el riesgo que tiene el

hermano de un enfermo de sufrir la enfermedad, comparado con el riesgo que tiene la población en general) es entre 2 y 17 veces mayor que en la población control (Silman AJ *et al.*, 1999). Por su parte, los estudios con gemelos han mostrado que los índices de concordancia varían entre el 12% y el 30% en gemelos monocigóticos, y entre el 5% y el 10% en gemelos dicigóticos del mismo sexo (Aho K *et al.*, 1986) (Silman AJ *et al.*, 1993). A partir de estos datos, se ha estimado que el componente genético explica alrededor del 50% de la etiología de la AR (Harney S, Wordsworth BP, 2002).

Los factores genéticos más importantes residen en el complejo mayor de histocompatibilidad o *HLA (human leukocyte antigen)*, un complejo que se tratará más detenidamente en un apartado posterior, y al que se le atribuye un 30% del componente genético de la AR (Seldin MF *et al.*, 1999). Para tratar de descubrir otros genes de susceptibilidad, se han llevado a cabo tanto estudios de ligamiento como estudios de asociación. Estos últimos pueden realizarse en familias, o como estudios caso-control. Actualmente, la posibilidad de realizar estudios de asociación caso-control del genoma completo (GWAs, *genome wide associatios studies*), ha supuesto una revolución en la identificación de factores genéticos de la AR.

Estudio de ligamiento de genoma completo

Los estudios de ligamiento de genoma completo se basan en el análisis de la cosegregación de loci y enfermedad, en familias con varios miembros afectados por una determinada enfermedad. Se estudian marcadores repartidos por todo el genoma. Si un marcador está en ligamiento con un locus de susceptibilidad, los miembros afectados de la familia tendrán el mismo alelo del

marcador. De esta manera se observan las regiones cromosómicas que segregan con la enfermedad, y se buscan posibles genes candidatos en las mismas.

En AR se han realizado siete estudios de ligamiento llevados a cabo en poblaciones de Francia, Reino Unido, EEUU y Japón. Los resultados obtenidos confirman el papel del locus *HLA*, y aportan datos que apuntan a la existencia de muchos otros loci de susceptibilidad (MacKay K *et al.*, 2002) (Jawaheer D *et al.*, 2001) (Eyre S *et al.*, 2004) (Cornelis F *et al.*, 1998) (Shiozawa S *et al.*, 1998) (Jawaheer D *et al.*, 2003) (Osorio Y Fortéa J *et al.*, 2004). Hasta cincuenta loci han mostrado evidencias de ligamiento en, al menos, un estudio. Sólo una minoría de estos loci han mostrado ligamiento en más de un estudio, y éstos son los más prometedores a la hora de localizar genes candidatos asociados con la enfermedad.

Identificación de genes candidatos en loci de ligamiento.

Un paso importante en la investigación genética de la AR, fue el de estudiar en detalle las amplias zonas que se habían propuesto en los estudios de ligamiento de genoma completo, en busca de genes de susceptibilidad a la AR. Lo que se denomina escaneado fino de la región. Para ello se realizaron estudios de asociación caso-control. En estos estudios de asociación se compara la frecuencia relativa de los polimorfismos entre una serie de individuos afectados y un grupo control adecuado. Con estos estudios se identifican “genes candidatos” (aquellos cuya función puede estar relacionada con la enfermedad de interés). Los marcadores más utilizados son los SNPs.

Algunos de los estudios de ligamiento identificaron el locus 1p36 como una región de interés en la AR (Cornelis F *et al.*, 1998) (Shiozawa S *et al.*,

1998). Este locus contiene el gen *TNFR2* (*tumor necrosis factor receptor 2*) que codifica para el receptor 2 de $\text{TNF}\alpha$. La relevancia del papel de $\text{TNF}\alpha$ en la patofisiología de la AR, así como el hecho de que *TNFR2* se localice dentro de uno de los loci de interés identificados, indica que este gen podría participar en la susceptibilidad a la AR. Se identificó un SNP que produce la sustitución de un residuo de arginina por un residuo de metionina en la posición 196 del gen (exón 6), y que altera la transmisión de señales intracelulares generadas cuando $\text{TNF}\alpha$ se une a *TNFR2* (Morita C *et al.*, 2001). Diferentes estudios llevados a cabo en población japonesa y holandesa no evidenciaron asociación entre dicho polimorfismo y la AR (Shibue T *et al.*, 2000) (Bayley JP *et al.*, 2003). Sin embargo, un estudio de asociación en población de Reino Unido con AR familiar mostró una asociación significativa con el alelo 196R, y un mayor riesgo para el genotipo 196R/R. Esta asociación restringida a AR familiar, fue confirmada por el mismo grupo de investigación en una cohorte independiente (Barton A *et al.*, 2001). Además, la asociación entre el genotipo 196R/R se confirmó en un estudio llevado a cabo en Francia en una cohorte de pacientes, también con AR familiar. Sin embargo, los resultados obtenidos no son concluyentes, por lo que se necesitan estudios adicionales en colecciones de muestras independientes para confirmar el papel de *TNFR2* en la susceptibilidad a la AR.

Otro posible factor genético detectado a partir de los estudios de ligamiento es *PADI4* (*peptidyl arginine deiminase type IV*) localizado en el mismo locus de interés que *TNFR2*, 1p36. Este locus contiene un cluster que incluye los genes para diferentes peptidilarginina deiminases (*PADIs*). Estas enzimas catalizan la citrulinización de los residuos de arginina, que son blanco de una serie de autoanticuerpos específicos de AR como los anti-Sa, anti-filaggrin y ACPA. La elevada especificidad de estos autoanticuerpos que casi

sólo se observan en pacientes con AR, sugiere que la citrulinización, y por tanto, las PADIs, pueden jugar un papel clave en la patofisiología de la enfermedad.

Ocho SNPs del gen *PADI4* se encontraron asociados con AR en un estudio japonés. La asociación más fuerte fue con el SNP denominado *padi4_94*T/C*. Además, un haplotipo definido por cinco SNPs exónicos (*padi4_89*A/G*, *padi4_90*T/C*, *padi4_92*G/C*, *padi4_94*T/C*, *padi4_104*T/C*), también se encontró asociado con la enfermedad (Suzuki A *et al.*, 2003). Análisis posteriores revelaron que el haplotipo de susceptibilidad afectaba a la estabilidad del ARN mensajero de *PADI4*. La asociación genética entre *PADI4* y la AR se confirmó en población japonesa (Ikari K *et al.*, 2005) y población coreana (Kang CP *et al.*, 2006). En otros estudios en población caucásica los resultados obtenidos no fueron concluyentes (Barton A *et al.*, 2005) (Harney SM *et al.*, 2005) (Martinez A *et al.*, 2005) (Plenge RM *et al.*, 2005) (Hoppe B *et al.*, 2006). Recientemente, diferentes metaanálisis de los SNPs de *PADI4* confirman la asociación entre *PADI4* y la AR en población asiática, y apuntan a que esta asociación también se observa en población europea (Iwamoto T *et al.*, 2006) (Lee YH *et al.*, 2007) (Takata Y *et al.*, 2008)

El grupo japonés que identificó este haplotipo de susceptibilidad en *PADI4*, estudió también, la posible asociación entre el gen *SLC22A4* (*Solute carrier family 22 organic cation transporter, member 4*), y AR (Tokuhiro S *et al.*, 2003). Este gen está localizado en el locus 5q31 que muestra ligamiento a múltiples enfermedades con un componente inflamatorio, y que contiene potenciales genes candidatos debido a su efecto en las respuestas inmunes. El gen *SLC22A4* se había visto asociado con enfermedad de Crohn y enfermedad inflamatoria crónica del tracto intestinal en poblaciones caucásicas (Costantin A *et al.*, 2004) (Peltekova VD *et al.*, 2004) (Fisher SA *et al.*, 2006) (Silverberg

MS *et al.*, 2007), enfermedades que tienen algunas similitudes con la AR. El grupo de Tokuhira (2003) mostró la asociación de un SNP localizado en una secuencia intrónica con la AR. Este SNP está situado en una secuencia que contiene un lugar de unión para el factor de transcripción RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*). La presencia del alelo de susceptibilidad resulta en una mayor afinidad por este sitio de unión, lo que provoca una menor transcripción de *SLC22A4*. Por lo tanto, este descenso en la producción de *SLC22A4* puede estar jugando un papel en la patofisiología de la enfermedad. Con la finalidad de confirmar la asociación entre *SLC22A4* y la AR, se han llevado a cabo diferentes estudios en población caucásica y japonesa (Newman B *et al.*, 2005) (Barton A *et al.*, 2005) (Kuwahara M *et al.*, 2005) (Plenge RM *et al.*, 2005) (Martínez A *et al.*, 2006) (Orozco G *et al.*, 2006) (Takata Y *et al.*, 2008). En ninguno de los estudios se confirmó la asociación entre la variabilidad genética en *SLC22A4* y susceptibilidad a la AR. Recientemente, un estudio en japoneses llevó a cabo un metaanálisis con los datos de todos los trabajos en los que se analizaba el polimorfismo de este gen. Además, realizó un estudio de confirmación en una colección de muestras japonesas independiente (Okada Y *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos confirman la asociación entre el polimorfismo de *SLC22A4* y la AR en japoneses pero no en caucásicos. Probablemente la falta de asociación en caucásicos se deba a que la menor frecuencia del alelo de riesgo en esta población, disminuye el poder estadístico de estos estudios, en relación con los realizados en japoneses. Por lo tanto, estudios independientes serían necesarios para aclarar el papel que juega la variabilidad genética de *SLC22A4* en la etiología de AR.

Estos resultados establecen el valor de los estudios de ligamiento y proporcionan una visión clara de la complejidad de la susceptibilidad genética de la AR. Sin embargo, los resultados obtenidos no son del todo sólidos por la

falta de confirmación de los mismos. Esto puede deberse, por una parte, a los tamaños muestrales reducidos tanto de los estudios de ligamiento que sugieren estos genes candidatos, como de alguno de los estudios de asociación caso-control de esos genes propuestos. Por otro lado, estos factores genéticos pueden tener un efecto modesto o pequeño en la predisposición a la enfermedad, y esto explicaría que la magnitud de los efectos observados para la mayoría de los loci sean débiles (Lander Es, Schork NJ, 1994) (Wandstrat A, Wakeland E, 2001).

Estudios de asociación de genes candidatos

Otros genes candidatos han sido estudiados con independencia de los estudios de ligamiento. Este es el caso del gen que codifica para la proteína 4 asociada con linfocitos T citotóxicos (*CTLA-4*, *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene*) y el gen que codifica para la fosfatasa de tirosina linfocitaria Lyp (*PTPN22*, *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)*). Estos genes habían mostrado una asociación contrastada con otras enfermedades de carácter autoinmune (enfermedad de Graves, en el caso de *CTLA-4* y diabetes de tipo 1 en *PTPN22*), y es posible que el mismo gen participe en la patofisiología de diferentes enfermedades de este tipo (Pearce HS, Merriman T, 2006). Alguno de los genes comentados anteriormente como *IL-1*, *IL-1RA*, *TNF*, así como otros muchos, han suscitado interés debido a su implicación en la patogenia de la AR, y por ello, se ha estudiado si la variabilidad genética de los mismos podría afectar a la susceptibilidad a AR. Algunos se comentarán a continuación y dos de ellos, *PTPN22* y *STAT4*, se tratarán en un apartado posterior donde se analizarán los factores genéticos confirmados.

El gen *CTLA-4* está situado en la región 2q33, y codifica para un receptor de carácter inhibidor que pertenece a la familia CD28/B7. Este receptor es necesario para controlar la estimulación de los linfocitos T (Chambers CA *et al.*, 2001). Distintos alelos localizados dentro de la región 3'UTR de *CTLA-4* se vieron asociados con la enfermedad de Graves (Yanagawa T *et al.*, 1995). El SNP que presentó una mayor asociación con esta enfermedad fue el denominado CT60*G (Ueda H *et al.*, 2003). Además, un SNP codificante localizado en el codón 17 del gen, también se vio asociado con diabetes tipo I (Nistico L *et al.*, 1996). La asociación de estas enfermedades con *CTLA-4* se confirmó en otros estudios (Donner H *et al.*, 1997) (Kotsa K *et al.*, 1997) (Vaidya B *et al.*, 1999) (Kristiansen OP *et al.*, 2000) (Ueda H *et al.*, 2003) (Han S *et al.*, 2005).

En el caso de la AR, se estudió la asociación del polimorfismo +49A/G de *CTLA-4*. Los resultados obtenidos no fueron concluyentes. Cuatro estudios (Seidl C *et al.*, 1998) (Yanagawa T *et al.*, 2000) (Lee CS *et al.*, 2003) (Lei C *et al.*, 2005) encontraron una asociación entre este polimorfismo y AR. Otros siete estudios (Barton A *et al.*, 2000) (Matsushita M *et al.*, 2000) (Hadj Kacem H *et al.*, 2001) (Milicic A *et al.*, 2001) (Vaidya B *et al.*, 2002) (Lee YH *et al.*, 2002) (Milterski B *et al.*, 2004) no observaron dicha asociación. Las discrepancias podían estar justificadas debido tanto al insuficiente tamaño muestral de cada estudio, como a que el efecto de este polimorfismo en la AR fuera pequeño. Por lo tanto, el grupo de Han S (Han S *et al.*, 2005) llevó a cabo un metaanálisis con los estudios caso-control publicados. Los resultados de dicho metaanálisis sugirieron que el alelo +49G no parece ser un factor de riesgo para AR en europeos, sin embargo, puede jugar un papel en la susceptibilidad a AR en asiáticos. El SNP CT60*G también se estudió en relación con susceptibilidad a la AR. Dos estudios diferentes no encontraron asociación con la enfermedad

(Orozco G *et al.*, 2004) (Barton A *et al.*, 2004). Por otra parte, un estudio de genes candidatos llevado a cabo por el grupo de Plenge (Plenge RM *et al.*, 2005) observó asociación entre este polimorfismo de *CTLA-4* y la AR. La falta de resultados concluyentes no permite destacar *CTLA-4* como un factor genético de riesgo en susceptibilidad a la AR

Otros genes que se estudiaron como candidatos en la susceptibilidad a la AR fueron la *IL-1* y el *IL-1RA*. En el caso de la *IL-1*, múltiples estudios demuestran que esta citocina es un importante mediador de las enfermedades inflamatorias (Choy EH, Panayi GS, 2001) (Mrak RE, Griffin WS, 2001) (Libby P, 2002). Estudios de asociación también han sugerido una influencia genética de la región de *IL-1* en una gran variedad de enfermedades con componente inflamatorio (Duff GW, 2000) (Griffin WS *et al.*, 2000) (Francis SE, 1999) (Kormman KS *et al.*, 1997) (El-Omar EM *et al.*, 2000) (Jacoviello L *et al.*, 2005). La AR es sin duda una enfermedad con un fuerte componente inflamatorio, y de forma particular, la *IL-1* interviene en la patogénesis de la enfermedad (Koch AE *et al.*, 1995). Diferentes estudios, han sugerido la asociación entre polimorfismos en el cluster de la *IL-1* y severidad de AR (Cantagrel A., 1999) (Buchs N., 2001) (Trifunovic Cvetkovic J., 2002) (Genevay S, 2002). Así, Cantagrel y sus colaboradores, que estudiaron diferentes polimorfismos situados en los genes de *IL-1 β* e *IL-1Ra*, encontraron dos SNPs en *IL-1 β* que afectaban a la producción de la proteína. Uno de ellos estaba situado en el promotor (-511), y el otro estaba localizado en el exón 5 (+3954) (Di Giovanni FS, 1992) (Pociot F, 1992). Ninguno de los dos SNPs estaba asociado con susceptibilidad a la AR, pero sí se observó un incremento significativo en la frecuencia del alelo raro del polimorfismo +3954 en el subgrupo de pacientes con AR erosiva, y que además portaban el SE (Cantagrel A., 1999). En el estudio publicado por Busch se analizaron de nuevo estos dos

SNPs y se encontró que el alelo raro del SNP +3954 estaba asociado con la severidad de la AR (Buchs N., 2001). Trifunovic Cvetkovic J y colaboradores obtuvieron este mismo resultado, en un estudio de asociación de polimorfismos situados en *IL-1 β* e *IL-1Ra* (Trifunovic Cvetkovic J., 2002). De igual modo, Genevay encontró una asociación entre el SNP -511 y la severidad de AR en pacientes con una larga evolución de la enfermedad. Todos estos estudios revelan que los polimorfismos asociados a *IL-1 β* pueden influir en la severidad de la AR.

TNF α es otro de los genes candidatos en la AR. Estudios *in vitro* que analizaban la función de diferentes SNPs del promotor de *TNF* suscitaron la realización de estudios de asociación caso-control en relación con enfermedades autoinmunes e inflamatorias, entre las que se encuentra la AR. Hasta el momento se han caracterizado seis polimorfismos tipo microsatélite y 14 SNPs (-103 T/C, -863 C/A, -857 C/T, -851 C/T, -419 G/C, -376 G/A, -308 G/A, -163 G/A, -49 G/A, +489 G/A, +851 A/G, +1304 A/G), la mayor parte de ellos están localizados en la región 5' reguladora del gen (Hajeer AH, Hutchinson IV, 2001). En la AR se llevaron a cabo múltiples estudios donde se analizaba la posible asociación de diferentes polimorfismos de *TNF α* con susceptibilidad a la enfermedad. El polimorfismo más estudiado es la transición guanina a adenosina en la posición -380 (Wilson AG *et al.*, 1995) (Cvetkovic JT *et al.*, 2002) (Brinkman BM *et al.*, 1997) (van Krugten MV *et al.*, 1999) (Rodríguez-Caerron AA *et al.*, 2005) (Barton A *et al.*, 2004) (Lacki JK *et al.*, 2000) (Pawlik A *et al.*, 2005) (Nemec P *et al.*, 2007). De nuevo, los resultados obtenidos en los diferentes estudios no son concluyentes debido a la falta de consenso entre los mismos.

En el caso del gen *MIF*, éste codifica para una proteína con actividades pro-inflamatorias, hormonales y enzimáticas. Además de estimular la liberación de citocinas pro-inflamatorias, antagoniza el efecto de los glucocorticoides y por tanto, tiene un papel central en determinar la magnitud de la respuesta inflamatoria (Calandra T, Roger T, 2003). Elevados niveles de MIF han sido detectados en el suero y en el líquido sinovial de pacientes con JIA y AR. Además, se ha visto que anticuerpos anti-MIF retrasan el comienzo de la enfermedad y disminuyen su severidad, en modelos animales (Mikulowsha A *et al* 1997). Este gen se localiza en el cromosoma 22q11.23 y comprende tres regiones exónicas. Se han visto polimorfismos en el promotor y en las regiones intrónicas y exónicas (Donn R *et al.*, 2002), que incluyen una transición de una guanina por citosina en la posición -173 y un microsatélite del tipo CATT en la posición -794. De nuevo bajo la hipótesis de que los polimorfismos presentes en el promotor de este gen podrían estar asociados con la AR, se han llevado a cabo diferentes estudios de asociación. Así, el polimorfismo MIF-173*C y la siete repeticiones del microsatélite CATT, se correlacionan con susceptibilidad a la AR en pacientes adultos de población española (Martinez A *et al.*, 2007^a) (Nuñez C *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados no son tan claros en europeos del Norte (Radstake *et al.*, 2007). Por lo tanto no se puede concluir que *MIF* sea un factor de riesgo importante en AR.

A parte de los genes comentados, muchos otros loci se han estudiado como factores genéticos de riesgo en AR, como por ejemplo el gen *MHC2TA* (*Major Histocompatibility Complex 2 Transactivator*) (Swanbert M *et al.*, 2005) (Bronson PG *et al.*, 2008), *Eotaxin 3* (Chae S-C *et al.*, 2005) y algunas MMPs como *MMP1*, *MMP3* y *MMP9* (Rodriguez-Lopez J *et al.*, 2006) entre otros.

En resumen, podemos decir que de las dos metodologías hasta el momento planteadas para la búsqueda de factores genéticos de riesgo en la AR, los estudios de ligamiento han sido menos resolutivos en encontrar genes asociados con esta enfermedad. Esto puede deberse, quizás, a un poder más limitado de la técnica para detectar factores que confieren un riesgo moderado. Los estudios de asociación, por otra parte, parecen ser más potentes a la hora de detectar estos factores asociados con susceptibilidad a la AR. Hasta el momento, los estudios más resolutivos son los estudios de asociación de genoma completo (*Genome-wide association studies, GWA*), de los que se hablará a continuación. Esta técnica permite un escaneado extenso y de alta densidad del genoma completo en busca de loci de riesgo.

Estudios de asociación de genoma completo

Recientemente, la aplicación de nuevas metodologías ha dado un gran impulso a los estudios genéticos de enfermedades humanas. Este es el caso de los estudios de asociación de genoma completo (*Genome-wide association studies, GWA*). Los GWA se han diseñado para analizar la influencia de la variación genética, a lo largo de todo el genoma humano, en la susceptibilidad a enfermedades complejas. Para llevar a cabo estos estudios se utilizan *chips* de entre trescientos y quinientos mil SNPs, los cuales proporcionan información sobre una proporción importante de la variación genética.

El desarrollo de esta nueva metodología ha sido posible gracias a dos factores clave. Por una parte, los avances en tecnología han permitido el genotipado de miles de SNPs en grandes colecciones de muestras de forma económica, de tal manera que se consigue una buena cobertura genética a lo largo del genoma humano. Por otro lado, actualmente existen grandes cohortes

de muestras bien caracterizadas que representan una rica fuente de información para la investigación genética de enfermedades humanas.

El objetivo fundamental de los GWA es evaluar el mayor número de variantes genéticas comunes en el genoma humano, independientemente de cual sea su localización (Wang WY *et al.*, 2005) (Hirschhorn JN, Daly MJ, 2005). En este aspecto, existen diferentes estrategias a la hora de seleccionar el panel de SNPs que proporcionen una buena cobertura genética, y que sean representativos de las frecuencias alélicas y de la diversidad poblacional. Uno de los métodos empleados para la selección de SNPs en un GWA es el uso de *tagSNPs*, esto es, un conjunto de SNPs basados en la estructura de LD (*linkage disequilibrium*) cuidadosamente elegidos para maximizar la variación capturada por cada uno de dichos SNPs (Carlson CS *et al.*, 2004) (Ke X *et al.*, 2005). Esta metodología es la empleada por *Illumina HumanHap* que dispone de un panel de 317000 SNPs y otro de 500000 SNPs. Otra estrategia es la selección de SNPs distribuidos aleatoriamente a lo largo del genoma, ignorando los patrones de LD (Wang WY *et al.*, 2005) (Clayton DG *et al.*, 2005). Este es el caso de *Affymetrix* de 111000 y 500000 SNPs. A pesar de las diferencias existentes entre estas dos estrategias de selección y entre las plataformas tecnológicas, tanto los *tagSNPs* como los SNPs distribuidos aleatoriamente capturan una fracción similar de las variantes comunes en el genoma humano.

Existen otras estrategias complementarias como la que combina un panel de *Affymetrix* con un conjunto de *TagSNPs* que completan la información; un panel de SNPs en el que se seleccionan todos los polimorfismos no sinónimos (nsSNPs) conocidos (*MegAllele system* de *Affymetrix* con un total de 12000 nsSNPs); o paneles focalizados en genes (*Illumina Human-1 Bead Chip*). Estas últimas estrategias están diseñadas para el estudio de variantes funcionales, a

diferencia de las otras metodologías donde se busca testar el mayor número de variantes comunes sin una hipótesis previamente establecida (Barrett JC, Cardon LR, 2006).

El primer GWA de AR fue llevado a cabo por el *Wellcome Trust Case Control Consortium* (WTCCC) en la población del Reino Unido (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Se estudiaron 2000 casos y los 3000 controles comunes a las siete enfermedades analizadas en este estudio colaborativo. Las dos señales de asociación más fuertes observadas se localizaron en *HLA-DRB1* y *PTPN22*. Además otros 9 SNPs con valores de p de entre 10^{-5} y 5×10^{-7} , aparecieron asociados con AR (**Figura 4**).

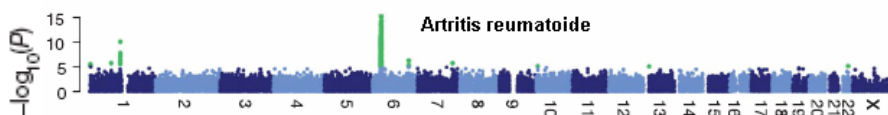


Figura 4: Resultados del GWA para AR del WTCCC. Los cromosomas se señalan con la alternancia de colores para más claridad, y las señales de asociación con valores de significación que oscilan entre 10^{-5} y 5×10^{-7} marcadas en verde. (*Wellcome Trust Case Control Consortium*, 2007)

Ninguno de estos polimorfismos se localizaban en loci de ligamiento previamente asociados con la enfermedad. Particularmente interesantes parecían las asociaciones de SNPs situados en las proximidades de los genes que codifican para la cadena α y β del receptor de la IL-2 (*IL2R*, *IL-2 receptor*). El receptor de la IL-2 media la estimulación de los linfocitos T, y por lo tanto podría tener un papel interesante en la autoinmunidad. Una delección rara de cuatro pares de bases en este gen ya se había visto asociada con el desarrollo de enfermedades autoinmunes severas (Sharfe N *et al.*, 1997). Además, existen evidencias de que SNPs dentro de la región génica de *IL2R* están asociados con

diabetes de tipo 1 (T1D) (Vella A *et al.*, 2005) (The Wellcome Trust Association Consortium, 2007).

Posterior al GWA realizado por el WTCCC, se han publicado más estudios de este tipo. El primero incluía pacientes de AR ACPA positivos y controles de Norteamérica y de Suecia. En este estudio se genotiparon un total de 317503 SNPs en 1522 casos y 1850 controles (Plenge RM *et al.*, 2007^a). Al igual que en el estudio del WTCCC las señales de asociación más fuertes se identificaron dentro de los genes *HLA-DRB1* y *PTPN22*. Además, se detectó otra señal (rs3761847), con niveles de significación elevados, en la región cromosómica 9p33-34 que incluye los genes *TRAF1* (*TNF receptor-associated factor 1*) y *C5* (*encoding complement component 5*) (**Figura 5**). La asociación con este locus fue confirmada en un estudio caso-control independiente (Kurreeman FA, 2007).

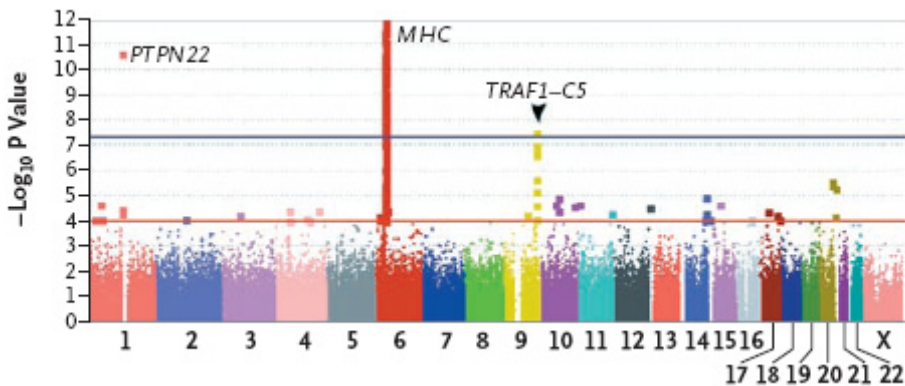


Figura 5: Resultados del GWA de AR realizado por Plenge *et al.* Los SNPs se distribuyen conforme a la localización en el cromosoma. El locus *TRAF1-C5* localizado en el cromosoma 9 evidencia señales de asociación de 10^{-8} (Plenge *et al.*, 2007^a)

El grupo de Plenge llevó a cabo otro GWA con la finalidad de identificar nuevos alelos asociados con susceptibilidad a la AR. En este caso se genotiparon 116204 SNPs en 397 pacientes con AR ACPA positivos que compararon con 1211 individuos control (Plenge RM *et al.*, 2007^b). Identificaron un SNP en la *región 6q23* (rs10499194) localizado a unas 150 kb de los genes *TNFAIP3* y *OLIGO3*. Esta asociación se confirmó en una colección de muestras independientes constituida por un total de 2283 pacientes con AR, también ACPA positivos, y 3258 controles. Simultáneamente, el WTCCC publicó su GWA en el que se informaba de la asociación entre un SNP localizados a 3.8 kb del rs10499194 (rs6920220) y AR (Wellcome Trust Association Consortium, 2007). El grupo de Plenge demostró que ambas señales de asociación eran estadísticamente independientes.

El último de los GWA publicados en AR hasta el momento se llevó a cabo en población española (Julià A *et al.*, 2008). Este estudio analizó 317503 SNPs en 400 pacientes con AR y 400 controles. Identificaron el locus *KLF12* (*activador protein 2α [AP-2α] represor*) como un nuevo gen de susceptibilidad a la AR. Este gen es un inhibidor del factor de transcripción AP-2α (Schuierer M *et al.*, 2001) El patrón de expresión de los genes regulados por este factor de transcripción, que incluyen el gen *TNFα*, ha sido implicado en respuestas a estrés y transformación celular (Kannan P *et al.*, 1994) (Wajapeyee N, Somasundaram K, 2003). La asociación genética de *KLF12* con la AR, y su implicación directa en la regulación de *TNFα*, podría suponer una nueva perspectiva en las interacciones ambiente-genética asociadas con susceptibilidad a la AR

Tras la realización de los estudios de GWA, los grupos de investigación responsables de su desarrollo intentaron confirmar las señales, que sin llegar al

valor de p mínimo establecido para este tipo de estudios, alcanzaban niveles cercanos que las hacían susceptibles de confirmación. Por lo tanto, las nueve señales con valores de p entre 10^{-5} y 5×10^{-7} en el primero de los GWA, fueron de nuevo genotipadas, en una cohorte de muestras independiente (Thomson W *et al.*, 2007). Solamente se confirmó la asociación para uno de los polimorfismos (rs6920220) localizado en la región intergénica 6q23. Esta señal (de la que se hablará detalladamente en un apartado posterior) apareció asociada en estudios posteriores, que además mostraron otros polimorfismos asociados en esta región (Plenge RM *et al.*, 2007^b).

De forma similar, otras señales con valores de p menos claros entre 10^{-4} y 5×10^{-5} han sido también estudiadas en nuevas colecciones de muestras. Tres de ellas (rs4750316, rs1678542 y rs3218253) localizadas en los loci 10p15, 12q13 y 22q23 respectivamente, han sido confirmadas (Barton A *et al.*, 2008). El gen más próximo a la señal localizada en el locus 10q15 es *PKCQ*. Este gen tiene un papel importante en la activación de las células T, ya que ratones deficientes en esta proteína manifiestan una marcada disminución en la producción de IL-2 (Hayashi K, Altman A, 2007). Por su parte, el SNP rs1678542, localizado en la región 12q13, se sitúa en el intrón 15 de gen *KIF5A*. Este gen codifica para la cadena pesada de una quinesina, algunas de cuyas mutaciones se han visto asociadas con un tipo de paraplejia (Fichera M *et al.*, 2004). Más prometedor parece uno de los genes próximos *PIP4K2C* (*phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, gamma*), ya que se expresa en células B y parece tener un papel importante en la activación del receptor de estas células, así como durante el desarrollo de los linfocitos B (Niir H, Clark EA, 2003). Por último, el SNP rs3218253 se localiza en el intrón 1 del gen *IL2R*, que es otro buen candidato funcional en la susceptibilidad a AR.

Recientemente, se llevó a cabo un metaanálisis de los dos primeros GWA publicados (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007) (Plenge RM *et al.*, 2007^a). En este estudio se analizaron 340000 SNPs en un total de 3393 casos y 12462 controles (Raychaudhuri S *et al.*, 2008). Se obtuvieron 31 SNPs que presentaban nuevas señales de asociación y éstos se analizaron en una cohorte independiente constituida por un total de 3929 pacientes con AR, positivos para el FR o ACPA, y 5807 controles. De esta forma se confirmaron variantes asociadas en *CD40* (*TNF receptor superfamily member 5*) y *CCL21* (*Chemokine (C-C motif) ligand 21*). También se observaron evidencias de asociación en cuatro loci adicionales: *MMEL1-TNFRSF14* (*membrane metallo-endopeptidase-like1- tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14*), *CDK6* (*Cyclin-dependent_kinase_6*), *PRKCQ* (*protein linase C, theta*) y *KIF5A-PIP4K2C* (*kinesin family member 5^a- phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, gamma*).

Sin duda, la señal más importante de estas últimas fue la de *CD40* (rs4810485), no solamente por ser la asociación más clara, sino también por sus implicaciones biológicas. *CD40* es un receptor que se expresa en la superficie de múltiples células del sistema inmune, incluyendo las células B, monocitos y células dendríticas. Este receptor está indirectamente implicado en la ruta NFκB, ya que TRAF1 se une a *CD40* y coopera con TRAF2 para activar NFκB. Además, TRAF1 también su une a TNFAIP3, regulador negativo de NFκB. Por otra parte, el estudio de la ruta de señalización a través de *CD40* en modelos animales y en el desarrollo de ciertas drogas, ha demostrado que el bloqueo de esta ruta podría prevenir el desarrollo de la AR y la diabetes (Balasa B *et al.*, 1997) (Durie FH *et al.*, 1993). El polimorfismo asociado está fuertemente correlacionado ($r^2=0.95$) con otro polimorfismo (rs1883832) que se había visto asociado con enfermedad tiroidea autoinmune (Jacobson EM *et al.*, 2007). Este

último SNP produce una traducción incorrecta del receptor CD40 lo que podría causar la asociación con la AR.

Por lo tanto, y haciendo una reflexión general de los visto hasta el momento, los GWA han permitido pasar de dos locus claramente asociados con susceptibilidad a la AR (*HLA-DRB1* y *PTPN22*), a cuatro factores genéticos más, cuya asociación con la enfermedad ya ha sido confirmada (*6q23*, *TRAF1-C5*, *STAT4*, *TNFAIP3*), así como un conjunto de nuevas señales que se están corroborando en colecciones de muestras independientes como por ejemplo, *CD40*. La amplia cobertura genética, así como los tamaños muestrales de los que disponen estos estudios, facilitan la búsqueda de factores de riesgo asociados a una enfermedad. Sin embargo, y aunque los GWA superen la resolución de los estudios de ligamiento y los estudios de asociación caso-control, siguen teniendo ciertas limitaciones como son la detección de falsos positivos y falsos negativos. Un ejemplo de falsos negativos sería el hecho de que *TRAF1-C5* y *STAT 4* no se detectó como señal de asociación en el primero de los GWA (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007), pero sí en el estudio llevado a cabo por Plenge y sus colaboradores (Plenge RM *et al.*, 2007^a). En cuanto a señales que resultan ser falsos positivos, ese primer estudio de genoma completo, detectó hasta nueve loci con valores de *p* situados entre 10^{-5} y 5×10^{-7} , de los cuales solamente se confirmó la asociación para uno de los polimorfismos (rs6920220) localizado en la *región intergénica 6q23*. Por lo tanto, esto apoya la necesidad de la confirmación de las señales de asociación obtenidas, así como la continuación en la búsqueda de nuevas señales de asociación con la AR.

Factores genéticos asociados con AR

Mediante el uso de las diferentes metodologías de estudio expuestas hasta ahora, los factores genéticos más claramente asociados con la susceptibilidad a la AR son *HLA-DRB1*, y *PTPN22*. Además, como también se comentaba anteriormente, otros loci de asociación han sido confirmados en estudios independientes, como *TRAF1-C5*, la *región intergénica 6q23*, el gen *STAT4* e *IRF5*. De todos ellos se hablará detalladamente a continuación:

HLA.

Organización y nomenclatura

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) se localiza en el brazo corto del cromosoma 6p21.3 y se extiende sobre 3,6 Mb. Se divide en tres subregiones que se denominan Clase I, situada en posición telomérica, Clase III, y Clase II que es la más centromérica. En total contiene unos 220 genes, muchos de los cuales tienen funciones relacionadas con las respuestas inmunes.

Los loci *HLA-A*, *B* y *C* codifican moléculas (antígenos) que se expresan en todas las células nucleadas y cuya función es la de presentar péptidos intracelulares a los linfocitos T. Estos antígenos se denominan de Clase I. Por otra parte, los loci *HLA-DR*, *DQ* y *DP* codifican las moléculas que presentan péptidos procedentes de la degradación de bacterias o proteínas fagocitadas. Estos péptidos son procesados por células del sistema inmune. Los antígenos *HLA-DR*, *DQ* y *DP* se agrupan bajo la denominación de antígenos de Clase II. Solamente se expresan en células implicadas activamente en la respuesta

inmunitaria como los linfocitos B, los monocitos y los linfocitos T activados. Los genes de Clase III no pertenecen al sistema *HLA*, y por tanto, no están implicados en la presentación de péptidos. Entre ellos se encuentran algunos genes que también están relacionados con la respuesta inmune como son algunos componentes del sistema del complemento y TNF.

Tanto las moléculas de Clase I como las de Clase II, son glicoproteínas heterodiméricas. En el caso de las moléculas de Clase II, el heterodímero está formado por una cadena α y una cadena β . Una característica distintiva del HLA es su gran polimorfismo. Así, por ejemplo, hay más de 400 alelos del gen *HLA-DRB1*, o más aún, aproximadamente 600 alelos del gen *HLA-B*. Otra característica de esta región es el fuerte desequilibrio de ligamiento (LD) existente, que se traduce en una baja densidad de haplotipos. Este fuerte LD en el *MHC* supone un problema a la hora de diferenciar qué genes están realmente predisponiendo a una enfermedad (Undlien DE *et al.*, 2001).

El epítipo compartido

Tanto los estudios de segregación en familias, como los de concordancia en gemelos y los estudios de asociación en la población, demuestran que el *MHC*, y en concreto el locus *HLA-DR*, es el factor genético más importante en la predisposición a la AR. Se estima que contribuye, al menos, en un tercio del componente genético total (Seldin MF *et al.*, 1999).

La primera evidencia de asociación entre genes pertenecientes al *HLA* y la predisposición a AR, fue aportada por Stastny en 1976 (Stastny P, 1976). Análisis posteriores concretaron que la asociación provenía del locus *HLA-DR*, en concreto de los alelos DR4 y DR1 del gen *DRB1* (Stastny P, 1978)

(Woodrow JC *et al.*, 1981). El desarrollo de técnicas de genotipado más resolutorias, llevaron a la demostración de que los diferentes alelos DR4 y DR1 no estaban igualmente asociados con AR. Además, estudios en diferentes poblaciones demostraron que otros alelos de *DRB1* también estaban asociados con la enfermedad. Estos hallazgos apuntaban a que la complejidad de la asociación entre *HLA-DRB1* y la AR era mayor de lo que en un principio se suponía. Gregersen y sus colaboradores (Gregersen PK *et al.*, 1987), fueron los primeros en unificar los diferentes alelos de *HLA-DRB1* asociados con la AR, bajo la hipótesis del *epítipo compartido* (SE, *shared epitope*). Demostraron que la AR está asociada con alelos de *DRB1* que codifican para una secuencia aminoacídica conservada, situada en la tercera región hipervariable de la cadena DR β 1. Esta secuencia se extiende desde la posición 70 a la 74 de la cadena aminoacídica: ⁷⁰QKRAA⁷⁴, ⁷⁰QRRRAA⁷⁴, ⁷⁰RRRAA⁷⁴. Estos residuos forman parte de uno de los dominios hélice α que conforma, el lugar de unión al péptido. Los alelos que codifican esta secuencia nucleotídica son DBR1*0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1001 y *1402. La hipótesis del SE asume que estas moléculas de Clase II están directamente implicadas en la patogenia de la AR, pero el mecanismo exacto no se conoce.

Estudios recientes han postulado la hipótesis de que los alelos SE suponen un riesgo para el desarrollo de ACPA de forma directa, y que su efecto sobre la susceptibilidad a la AR sería consecuencia de esta asociación. Además parece existir una interacción entre los alelos SE y uno de los factores ambientales implicados en AR, el tabaquismo, de tal manera que esta interacción predispone también a la aparición de ACPA. La hipótesis postula que la exposición al tabaco genera la citrulinización de péptidos/proteínas que desencadenan reacciones autoinmunes específicas. Estas reacciones se mantienen a lo largo del tiempo, y eventos secundarios como traumas o infecciones, generan

sinovitis inespecíficas y la consecuente citrulinización en el tejido. En individuos que presentan ACPA esta sinovitis puede desencadenar una enfermedad crónica articular (van der Helm-Van Mil AH *et al.*, 2007) (**Figura 6**).

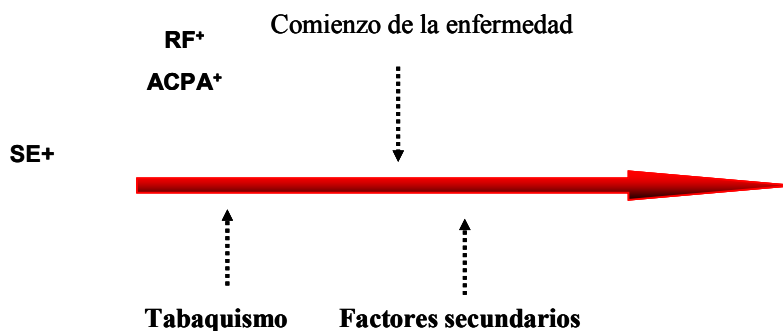


Figura 6: Perfil temporal de la interacción de SE, tabaquismo, ACPA y AR (figura modificada de Klareskog L *et al.*, 2006)

Existen diferencias regionales en cuanto a la asociación del HLA con AR. Por ejemplo, se ha descrito una mayor asociación de HLA-DRB1*0401 y *0404 con la enfermedad en americanos y poblaciones del Norte de Europa. En contraste, el alelo HLA-DRB1*1001, es más frecuente en población española que en otras poblaciones (Ollier W, Thomson W, 1992). Además, existen estudios que evidencian que los alelos SE clásicos no parecen contribuir al riesgo de AR en poblaciones afroamericanas ni hispanoamericanas (McDaniel DO *et al.*, 1995) (Teller K *et al.*, 1996). También se ha visto asociado a la AR el alelo *0901 en poblaciones asiáticas. Este alelo no contiene la misma secuencia aminoacídica conservada de los alelos SE clásicos, ⁷⁰RRRAE⁷⁴. Por otra parte, en población caucásica se ha observado una jerarquía en los alelos SE en función del riesgo relativo (RR). El alelo *0401 tiene un RR de 3 y los alelos *0101, *0404, *1001 y *0901 tienen un RR más moderado, de

aproximadamente 1.5 (Fernando MM *et al.*, 2008). Así mismo, se ha descrito una jerarquía en el efecto de los distintos genotipos que contienen alelos SE. De este modo, para el genotipo DRB1*0401/DRX, donde X es un alelo que no codifica para SE, el riesgo relativo (RR) de desarrollar la enfermedad es de 4,7; en el caso del genotipo DRB1*0404/DRX el RR es 5. Cuando el paciente es homocigoto para DRB1*0401/*0401 el RR es de 18.8, y si es heterocigoto del tipo DRB1*0401/*0404 tienen un RR de 31 (Hall FC *et al.*, 1996). El efecto de asociación del homocigoto *0404/*0404 todavía no se ha comparado con los heterocigotos *0401/*0404.

También se ha descrito una jerarquía en la asociación de los diferentes alelos SE y severidad de la AR. Así, las manifestaciones más severas de la enfermedad se observan en pacientes homocigotos para *0404 o *0401 y heterocigotos para los alelos DRB1*0401, *0404 y *0408 (Weyand CM *et al.*, 1992).

Hipótesis alternativas

La hipótesis de la asociación del SE con AR, es la más aceptada, sin embargo, existen hipótesis alternativas que sugieren que la asociación se debe, en realidad, a los alelos de *HLA-DQ*, en concreto DQ3 y DQ5. De todas formas, debido al fuerte desequilibrio de ligamiento de estos alelos con alguno de los alelos SE, es difícil discernir una contribución independiente.

Además de los efectos de predisposición mencionados, existen determinados haplotipos de *HLA-DRB1*, que parecen aportar protección ante la AR. Esos haplotipos contienen, en lugar del SE, la secuencia aminoacídica conservada ⁷⁰DERAA⁷⁴. Los alelos del *HLA-DRB1* que la contiene son

DRB1*0103, *0402, *1102, *1103, *1301, *1302 y *1304 (van der Horst-Bruinsma IE *et al.*, 1999) (Seidl C *et al.*, 2001). Los primeros estudios que aportaron estas evidencias carecían de potencia estadística (van der Horst-Bruinsma IE *et al.*, 1999) (Vos K *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios recientes han confirmado que los alelos *HLA-DRB1* que contienen la secuencia DERA A están asociados con protección frente a la AR tanto en individuos portadores de alelos SE, como en individuos portadores de alelos “neutros”. Por lo tanto, este efecto protector es independiente del efecto de los alelos SE (van der Helm-van Mil AH *et al.*, 2005).

Por último, diferentes investigadores han propuesto la necesidad de una reclasificación de los alelos del HLA, ya que la hipótesis del SE como tal, no puede explicar todo el riesgo genético atribuible al locus *HLA-DRB1* (Gao X *et al.*, 1991) (Zanelli E *et al.*, 1998) (de Vries N *et al.*, 2002) (Michou L *et al.*, 2006). Sin embargo, no se ha establecido ninguna clasificación consensuada

PTPN22

El gen *PTPN22* se localiza en el cromosoma 1p13 y codifica para una fosfatasa de tirosina linfoide (Lyp), que modula la activación de quinasas implicadas en la ruta de señalización intracelular desencadenada por la unión del TCR en los linfocitos T (Hill RJ *et al.*, 2002). Un SNP no sinónimo en *PTPN22* (rs2476601, R620W), que produce un cambio de una arginina por triptófano en el codón 620 de la proteína, se ha encontrado asociado con múltiples enfermedades autoinmunes. El primer estudio que evidenció la asociación de este polimorfismo con una enfermedad de este tipo, fue un estudio de genes candidatos en diabetes tipo 1 (Bottini N *et al.*, 2004). Esta asociación se confirmó en otros estudios (Smyth D *et al.*, 2004) (Ladner MB *et*

al., 2005) (Qu H *et al.*, 2005) (Zheng W *et al.*, 2005). Simultáneamente al descubrimiento de esta asociación con diabetes tipo 1, un grupo de EEUU observó que esa misma variante también estaba asociada con AR (Begovich AB *et al.*, 2004). La asociación con AR fue confirmada en población de Reino Unido (Hinks A *et al.*, 2005), Finlandia (Seldin MF *et al.*, 2005), Suecia (Plenge RM *et al.*, 2005), Alemania (Piere M *et al.*, 2006), Holanda (Zhemakova *et al.*, 2005), España (Orozco G *et al.*, 2005) y Canadá (van Oene M *et al.*, 2005). En un estudio en población japonesa, no se replicó dicha asociación debido a la baja frecuencia del alelo menor de esta variante en dicha población (Ikari K *et al.*, 2006).

Estudios sucesivos analizaron este mismo polimorfismo en otras enfermedades, concluyendo la asociación de dicho SNP con susceptibilidad a lupus eritematoso sistémico (LES) (Kyogoku C *et al.*, 2004), artritis idiopática juvenil (AIJ) (Hinks A *et al.*, 2005), enfermedad de Graves (GD) (Velaga MR *et al.*, 2004) y vitiligo generalizado (Canton I *et al.*, 2005). Sin embargo, no se encontró asociación con esclerosis múltiple (MS) (Begovich AB *et al.*, 2005), enfermedad de Crohn (CD) (van Oene *et al.*, 2005), soriasis (Ps) (Nistor I *et al.*, 2005) o artritis soriásica (PsA) (Hinks A *et al.*, 2005). Esto sugiere que existen diferencias en la etiología de este conjunto de enfermedades autoinmunes humanas.

Esta variante de *PTPN22* es el segundo factor genético de susceptibilidad más importante en la AR. La sustitución aminoacídica de arginina (Arg620) por triptófano (Trp620) producida por este polimorfismo, se da en la región no catalítica C terminal de la proteína Lyp, en una secuencia rica en prolina. Esta secuencia permite la unión física de Lyp con una quinasa (Csk). El complejo resultante inhibe la señalización a través de TCR mediante la regulación

negativa de una quinasa de tirosina linfoide (Lck) implicada en los primeros estadios de la activación de las células T (Cloutier JF *et al.*, 1999). Estudios recientes indican que el cambio Trp620 produce un aumento en la actividad catalítica de la enzima. Este hecho produce un incremento en la inhibición de células T, que desencadena un aumento en el nivel de la estimulación necesario para la activación de estas células. Se piensa que como consecuencia de esa hiposensibilidad linfocitaria, se producen fallos en la eliminación de células T autoreactivas durante el proceso de selección en el timo (Vang T *et al.*, 2005) (Rieck M *et al.*, 2007), y que ésta sería la causa última del aumento de susceptibilidad a múltiples enfermedades en las que los linfocitos T autoreactivos tiene un papel central.

STAT4

El gen *STAT4* se localiza en el cromosoma 2q y codifica para un factor de transcripción que transmite señales inducidas por diferentes citocinas entre las que se incluyen IL-12, IL- 23 e IFN de tipo 1 (Watford WT *et al.*, 2004). *STAT4* se encuentra en forma latente en el citosol pero tras su activación por citocinas, se fosforila y se acumula en el núcleo. La activación de *STAT4* estimula la transcripción de genes específicos incluyendo INF γ , un factor clave en la diferenciación de las células T a células “*helper*” de tipo 1 (Th1). Así, se ha visto que las señales dependientes de *STAT4* que se inician en los receptores de IL-12, juegan un papel crítico en la diferenciación de células Th1 y en algunas respuestas de los linfocitos T (Morinobu A *et al.*, 2002) (Nishikomori R *et al.*, 2002). *STAT4* también está implicado en la diferenciación de las células Th17. Este linaje celular juega un papel importante en las enfermedades inflamatorias crónicas a través de la señalización por IL-23 e IL-12 (Mathur AN *et al.*, 2007). A nivel experimental se observó que ratones deficientes en *STAT4*

son resistentes a modelos de enfermedades autoinmunes entre las que se incluye la AR (Finnegan A *et al.*, 2002). Además, la inhibición de STAT4 a través de oligodeoxinucleótidos o oligonucleotidos antisentido es beneficiosa en modelos animales de artritis (Klinman DM., *et al* 2005) (Hildner KM *et al.*, 2007).

Un estudio reciente en el que se analizaba la variación genética de 13 genes candidatos localizados en la región de ligamiento 2q, identificó un SNP (rs7574865) asociado a AR próximo al locus *STAT1-STAT4*, en una cohorte de pacientes americanos (Remmers EF *et al.*, 2007). Análisis posteriores revelaron la asociación de cuatro SNPs en el tercer intrón del gen *STAT4*, siendo la mayor asociación encontrada la del SNP rs7574865. Esta señal fue confirmada por el mismo grupo de investigación, en una cohorte independiente de muestras norteamericanas y en una colección de muestras de Suecia, aunque en el último caso la asociación fue más clara. La asociación con esos cuatro SNPs también fue confirmada en población japonesa (Lee HS *et al.*, 2007), por lo que *STAT4* es el primer ejemplo de un gen no relacionado con HLA que está asociado con AR en asiáticos y caucásicos.

La asociación con el SNP rs7574865 también se encontró en un metaanálisis de tres cohortes de LES, sugiriendo que este polimorfismo puede ser un factor de susceptibilidad para diferentes enfermedades autoinmunes, de forma similar a lo que sucede con *PTPN22*.

Región intergénica 6q23

Como se comentó anteriormente el GWA de AR del WTCCC para AR encontró nueve polimorfismos con valor de p entre 10^{-5} y 5×10^{-7} que fueron genotipados de nuevo, por el mismo grupo de investigación (Thomsom W *et al.*,

2007), en una cohorte de muestras independiente, también del Reino Unido, constituida por un total de 5063 casos de AR y 3849 controles. Solamente se confirmó la asociación para uno de ellos (rs6920220) localizado en la *región intergénica 6q23*. Dicha asociación era independiente de *HLA-DRB1* y de *PTPN22*. El SNP asociado se encuentra flanqueado a gran distancia (>150kb) por dos genes, el factor de transcripción oligodendrocítico 3 (*OLIG3*, *oligodendrocyte transcription factor 3*) y el gen de la proteína 3 inducida por TNF α (*TNFAIP3*, *tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3*).

De forma simultánea, un estudio GWA llevado a cabo en población estadounidense, analizó la asociación de un total de 116204 SNPs en pacientes de AR caracterizados por ser ACPA positivo (Plenge RM *et al.*, 2007^a). Se observó una señal de asociación con el SNP rs10499194. Dicha señal se confirmó en dos cohortes de muestras independientes. Este polimorfismo localizado también en la *región 6q23* se correlacionaba perfectamente ($r^2=1$) con otro SNP que mostraba asociación en el GWA del WTCCC (rs13207033). De esta forma la asociación de este polimorfismo quedaba indirectamente confirmada en pacientes de AR, independientemente de la presencia o ausencia de ACPA. Además, estudios de regresión logística y estudios de haplotipos evidenciaron que estas señales, y la asociación con rs6920220 encontrada en el estudio del WTCCC y en este estudio, eran estadísticamente independientes. Todos estos datos proporcionan una evidencia inequívoca de la existencia de variantes de susceptibilidad a la AR en esta región. Es posible que estas variantes regulen la función del gen adyacente *TNFAIP3*. Este gen es un buen candidato en la susceptibilidad a AR debido a que estudios previos demuestran su función como regulador negativo del factor de transcripción NF- κ B en respuesta a TNF y TLR, pero no en la activación inducida por IL1- β (Boone DL *et al.*, 2004) (Wertz IE *et al.*, 2004). Por otra parte, en un estudio previo se

observó que ratones deficientes para la proteína TNFAIP3, desarrollaban una inflamación multiorgánica que incluía inflamación de las articulaciones (Lee EG *et al.*, 2000). A parte, la asociación estadísticamente independiente de dos SNPs en esta *región 6q23* puede estar indicando la presencia de múltiples efectos. El hecho de que estas señales de asociación estén próximas al gen *TNFAIP3*, un inhibidor de NFκB, añade interés al estudio de la variabilidad genética en este locus.

TRAF1-C5

Como ya se ha mencionado, en un segundo GWA llevado a cabo (Plenge RM *et al.*, 2007^b) en población de EEUU (*NARAC*, North American Rheumatoid Arthritis Consortium) y Suecia (*EIRA*, Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis) se encontró una señal de asociación (rs3761847) con niveles de significación elevados en la región cromosómica 9p33-34, que incluye los genes *TRAF1* y *C5*. Esta asociación resultó muy interesante por la implicación biológica de estos dos genes.

Con la finalidad de confirmar la asociación del locus *TRAF1-C5*, el polimorfismo asociado se analizó en dos cohortes de muestras independientes, de nuevo, de EEUU y Suecia (Plenge RM *et al.*, 2007^b). Ambas colecciones de muestras se caracterizan porque todos los pacientes tenían presencia de ACPA. La asociación se confirmó en la primera de las dos poblaciones, y en el análisis combinado de las dos cohortes de muestras. Además, la asociación de esta región con AR se confirmó en otro estudio caso-control independiente (en el que no se incluía el polimorfismo rs3761847) (Kurreeman FA *et al.*, 2007), para el que se analizaron muestras de Holanda, Suecia y Norteamérica. Los resultados obtenidos mostraron una asociación significativa con el

polimorfismo rs10818488 localizado en el extremo 5' del gen *TRAF1*. Este mismo SNP se analizó por el mismo grupo de investigación (Kurreeman FA *et al.*, 2008) en un estudio en familias del Oeste de Europa que comprendía un total de 452 individuos. En este estudio también se evidenció la asociación entre el SNP rs10818488 y la AR. De igual modo, el efecto de estas señales quedó claramente confirmado en otro estudio en una nueva cohorte de 3418 casos y 3337 controles de Reino Unido (Barton A *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de que los dos SNPs más asociados con *TRAF1-C5* no fueron genotipados en el estudio del WTCCC, sí que se testaron SNPs altamente correlacionados con ellos que no mostraron evidencia de asociación. Recientemente, otro estudio genético de AR en el que se analizaron 25966 SNPs funcionales en 475 pacientes de AR norteamericanos y 475 controles, identificaron la asociación del SNP rs1953126 en la región 9q33.2 (Chang M *et al.*, 2008). Este mismo grupo llevó a la confirmación las señales asociadas en dos colecciones independientes de muestras formadas por 661 pacientes de AR y 1322 controles una de ellas, y la otra por 596 casos y 705 controles. Con este análisis se confirma de nuevo la asociación de la región de *TRAF1-C5* con AR.

TRAF1 codifica para una proteína intracelular que media la señalización a través de los receptores 1 y 2 de TNF y a través del receptor CD40. Como se comentó anteriormente, TNF es una citocina crítica en la patogénesis de AR (Firestein GS, 2003), y los antagonistas de TNF son efectivos en el tratamiento de la AR (Weinblatt ME, 1999). Por otra parte, el estudio de la ruta de señalización a través de CD40 en modelos animales, y en el desarrollo de ciertas drogas, ha demostrado que el bloqueo de esta ruta podría prevenir el desarrollo de la AR (Balasa B *et al.*, 1997). Además, se ha visto que el ratón *knockout* para *TRAF1* muestran un aumento en la proliferación de células T, así como de la activación en respuesta a TNF o cuando se estimulan a través del complejo

receptor de células T, sugiriendo que *TRAF1* actúa como un regulador negativo de estas rutas de señalización (Tsitsikov EN *et al.*, 2001). *TRAF1* se une a diferentes proteínas intracelulares incluyendo el inhibidor de NFκB, TNFAIP3, y el receptor CD40, cooperando con TRAF2 para activar NFκB (Bradley JR, Pober JS, 2001)

C5 también se presenta como un buen candidato en susceptibilidad a la AR. La ruta del complemento es esencial en la inducción de artritis inflamatoria a través de autoanticuerpos, al menos en dos modelos de ratones (Ji H *et al.*, 2002) (Hietala MA *et al.*, 2002) (Wang Y *et al.*, 1995). El papel del complemento en la AR humana ha sido difícil de establecer, pero diferentes hallazgos sugieren una contribución de esta ruta a la enfermedad. Así, en el líquido sinovial de AR, pero no en otros tipos de artritis inflamatorias, se ha visto que los componentes del complemento están disminuidos (Pekin TJ *et al.*, 1964). Además, existe una clara evidencia de la presencia de productos de degradación del complemento en el líquido sinovial (Monlles TE *et al.*, 1986) (Olmez U *et al.*, 1991). En la misma línea, se ha demostrado que C3 se deposita en la superficie del cartílago y en la sinovia de pacientes con AR (Cooke TD *et al.*, 1975) (Vetto AA *et al.*, 1990), tal y como se había visto en varios modelos de ratones (Matsumoto I *et al.*, 2002) (Stuart JM *et al.*, 1983) (van den Berg EB *et al.*, 1984). Del mismo modo, se sabe que ratones deficientes para C5 son resistentes a artritis inflamatoria en modelos con un componente humoral dominante (Wang Y *et al.*, 2000) (Ji H *et al.*, 2001). Estos datos apoyan el potencial papel tanto de *TRAF1* como C5 en la susceptibilidad a la AR.

IRF5

La familia de factores reguladores del interferón (IRF, *interferon regulatory factors*) comprende 9 miembros desde el IRF1 al IRF9. Estos factores comparten un dominio de unión constituido por un motivo de aproximadamente 120 aminoácidos, que reconoce una secuencia consenso de ADN conocida como ISRE (*INF-Stimulated Response Element*) (Kyogoku C Tsuchiya N, 2007). Esta secuencia consenso se encuentra en los promotores de múltiples genes que son activados por el INF de tipo I, como son: *INF α* , *INF β* , *IL-12*, *CXCL10* (*C-X-C motif chemokine 10 presursor*) e *IFIT1* (*Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*) (Taniguchi T, Takaska A, 2001).

El gen que codifica para el factor regulador del interferón 5 (*IRF5*) se encuentra situado en el cromosoma 7q32. Este gen presenta una transcripción compleja ya que contiene 3 promotores conocidos y al menos 11 variantes de su RNA mensajero (V1-V11) debido a *splicing* alternativo (Mancl ME *et al.*, 2005) (Graham. RR *et al.*, 2006). Este factor de transcripción se expresa en linfocitos B y células dendríticas, y su expresión aumenta al activarse la vía del IFN de tipo I (Mancl ME *et al.*, 2005) (Izaguirre A *et al.*, 2003). Se activa en respuesta a señales de la ruta TLR-MyD88 y como consecuencia, induce la expresión de múltiples genes incluyendo citocinas pro-inflamatorias. En infecciones víricas, su función reguladora de estas citocinas se produce en cooperación con NF κ B. En este caso, recibe las señales de los TLR desde los endosomas. (Barnes BJ *et al.*, 2002) (Fitzgerald-Bocarsly P *et al.*, 2008) (Honda K *et al.*, 2005) (Akahoshi M *et al.*, 2006). Sin embargo, sus efectos no se limitan a las citocinas pro-inflamatorias, así, cuando se analizó el patrón de genes expresados en linfocitos B humanos en relación con *IRF5*, se encontró que 657 genes (568 aumentados y 89 disminuidos) estaban regulados (Barnes BJ *et al.*, 2004). Estos resultados

demuestran la importancia de este factor en la regulación de la expresión de un amplio espectro de genes.

IRF5 es uno de los principales factores genéticos de susceptibilidad al LES. En un primer estudio, se demostró la asociación de diferentes polimorfismos del locus *IRF5* con esta enfermedad autoinmune en población de Suecia, Finlandia e Islandia (Sigurdsson S *et al.*, 2005). Los datos obtenidos en este estudio muestran la clara asociación de 3 SNPs (rs729302, rs2004640, rs752637) de la región 5' del gen. Esta asociación de *IRF5* con LES fue confirmada en diferentes estudios en los que se analizaba población caucásica y asiática (Demirci FY *et al.*, 2006) (Graham. RR *et al.*, 2006), (Cunnighame Gram. DS *et al.*, 2007) (Graham. RR *et al.*, 2007) (Kozyrev SV *et al.*, 2007) (Reddy MV *et al.*, 2007) (Shin HD *et al.*, 2007) (Ferreiro-Neira I *et al.*, 2007). Los resultados incluyen tanto la asociación con susceptibilidad a la enfermedad, como con protección a la misma, y se conocen, al menos, tres polimorfismos potencialmente funcionales implicados. Uno es el SNP rs10954213, que afecta a la estabilidad del mensajero de *IRF5*, debido a que produce un cambio en la longitud de la cola de poli A del RNA (Cunnighame Gram. DS *et al.*, 2007) (Graham. RR *et al.*, 2007). Un segundo SNP, rs2004640, crea un *donor splice site*, necesario para la expresión del exón 1B de *IRF5* (uno de los tres posibles primeros exones) (Graham. RR *et al.*, 2006) (Kozyrev SV *et al.*, 2007). Un tercer polimorfismo, es una inserción/delección que modifica, en 10 aminoácidos, la longitud de una secuencia rica en prolina en el exón 6 (Graham. RR *et al.*, 2007) (Kozyrev SV *et al.*, 2007).

Existen evidencias que muestran una relación entre los IFNs tipo 1 y la AR. Así, se ha visto que artritis inflamatorias pueden desencadenarse por el tratamiento con IFN tipo 1, aunque esto sucede de forma poco habitual (Borg

FA, Isenberg DA, 2007). También se ha visto un aumento en la expresión de IFN β (van Holten J *et al.*, 2005) y un incremento en el número de células dendríticas plasmocitarias, que son la fuente principal de IFNs de tipo 1, en la sinovia y el tejido sinovial de pacientes con AR (Lande R *et al.*, 2004). Por otra parte, análisis de *microarrays* de la expresión génica en AR, muestran una expresión aumentada de genes regulados por el INF de tipo 1, en un subgrupo de pacientes de AR (van der Pouw Kraan TC *et al.*, 2007). Estos hallazgos junto con la implicación en la AR de muchas citocinas y quimiocinas reguladas por IFN tipo 1 e IRF5, podrían interpretarse como que estos factores son pro-inflamatorios en la AR. Sin embargo, experimentos en modelos animales de artritis evidenciaron un posible papel protector de IFN β (Tak PP, 2004). Además, un ensayo clínico basado en el tratamiento con IFN β no mostró que se produjera una mejora de la AR, ni tampoco se observaron cambios en biopsias secuenciales de la sinovia (van Holten J *et al.*, 2005). Por lo tanto, aunque existen evidencias que sugieren que el IFN de tipo 1 puede ser importante en la AR, no está claro si el papel que juega es de tipo pro-inflamatorio o anti-inflamatorio.

Los estudios en los que se ha analizado la posible asociación de polimorfismos en *IRF5* con AR, han mostrado resultados poco concluyentes. Por una parte, dos estudios no evidencian asociación entre la variabilidad genética en este gen y la enfermedad (Rueda B *et al.*, 2006) (Garnier S *et al.*, 2007) Sin embargo, en otro estudio se observa una asociación, pero únicamente en el subgrupo minoritario de pacientes que no tienen ACPA (Sigurdsson S *et al.*, 2007). Con la finalidad de esclarecer estos resultados, es necesario estudiar el papel que juega *IRF5* en AR en cohortes de muestras independientes.

Por lo tanto, mediante el uso de una gran variedad de metodologías como estudios de ligamiento, estudios de genes candidato y estudios de asociación genética a gran escala, una serie de trabajos recientes han ido identificando algunos de los factores genéticos implicados en la AR. El más robusto después del *HLA-DRB1* es *PTPN22*, el cual se ha visto repetidamente asociado con AR en individuos de ancestro europeo (Begovich AB et al., 2004) (Plenge RM et al., 2005) (Gregersen PK, Behrens TW, 2006). Además estudios de ligamiento evidenciaron variantes de susceptibilidad en el locus 1p36 en el que se encuentra situado el cluster de *PADIs* que incluye a *PADI4* (Suzuki A et al., 2003) (Lee YH et al., 2007). Del mismo modo, estudios de asociación con un considerable poder estadístico identificaron una serie de SNPs en *STAT4* asociados con AR (Remmers EF et al., 2007), la región 6q23 (Plenge RM et al., 2007^a) (Thomsom E et al., 2007) y *TRAF1-C5* (Plenge RM et al., 2007^b) (Kurreaman FA et al., 2007). Otros loci que se han visto asociados con la AR, aunque con resultados menos concluyentes son por ejemplo, el SNP localizado en el lugar de unión de *SLC22A4* a *RUNX1* (Tokuhiro S et al., 2003) (Okada Y et al., 2008). *IRF5* es otro de los genes en los que se ha visto asociación entre diferentes polimorfismos y la AR, aunque en este caso, la asociación parece ser más clara en determinados subgrupos de pacientes (Sigurdsson S et al., 2007).

Algunos de estos polimorfismos asociados con AR presentan diferencias en cuanto al tamaño del efecto según el grupo étnico; así por ejemplo, las variantes asociadas con la enfermedad en *PADI4* parecen tener un efecto más fuerte en asiáticos del este y un menor efecto en descendientes de Europeos (Plenge RM et al., 2005). De forma similar, el alelo de riesgo W620 de *PTPN22* es muy raro en asiáticos y por lo tanto, no juega un papel en la susceptibilidad a AR en esta población (Gregersen PK et al., 2006).

Debido a la etiología de la AR, los estudios genéticos suponen una herramienta básica en el estudio de esta enfermedad. Además, como han demostrado algunos de estos estudios genéticos, fundamentalmente estudios de tipo metaanálisis y estudios de ligamiento, algunas de las variantes implicadas en susceptibilidad a la AR muestran efectos pleiotrópicos en otras enfermedades de carácter autoinmune (Gregersen PK *et al.*, 2006) (Remmers EF *et al.*, 2007) (Bottini N *et al.*, 2004) (Wellcome Trust Case Control Consortium). Por lo tanto, la identificación de nuevos factores genéticos de riesgo a la AR, permitiría elucidar los mecanismos que subyacen a la autoinmunidad en varias enfermedades de carácter autoinmune, así como mejorar los tratamientos existentes mediante el estudio de nuevas dianas terapéuticas. De ahí la necesidad de seguir descubriendo nuevos factores genéticos implicados en la AR, así como identificar las variantes funcionales de las señales asociadas conocidas.

Hipótesis

Hipótesis

1. Los factores genéticos explican alrededor de un 50% de la etiología de la AR.
2. Los estudios de asociación caso-control de genes candidatos suponen una herramienta muy útil a la hora de investigar y establecer los factores genéticos implicados en la patofisiología de la AR
3. La confirmación de los resultados obtenidos en un primer estudio genético, en estudios independientes, es imprescindible para asentar conclusiones sólidas que permitan el progreso en este área de la investigación biomédica

Objetivos

Objetivos

1. Análisis de los polimorfismos conocidos en genes candidatos implicados en la ruta de señalización NFκB que está directamente relacionada con la patofisiología de la AR
2. Exploración de otros genes candidatos con potencial implicación en la susceptibilidad a la AR
3. Confirmación de hallazgos significativos de estudios independientes que han demostrado asociación con susceptibilidad a la AR.

Procedimiento experimental, resultados y discusión

Procedimiento experimental, resultados y discusión

Esquema general

1 NFκB en AR

Publicación 1:

- Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Perez-Pampin E, Costas J, Torres M, Vicario JL, Velloso ML, Navarro F, Narváez J, Joven BE, Herrero-Beaumont G, Gonzalez-Alvaro I, Fernandez-Gutierrez B, de la Serna AR, Carreño L, Lopez-Longo J, Caliz R, Collado-Escobar MD, Blanco FJ, Fernandez-Lopez C, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. *Genetic variation in the NFKB pathway in relation to susceptibility to rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. Abril 2008 [Epub ahead of print]

2 TNFAIP3 y región 6q23

Publicación 2:

- Dieguez-Gonzalez R, Calaza M, Perez-Pampin E, Balsa A, Blanco FJ, Cañete JD, Caliz R, , Carreño L, de la Serna AR, Fernandez-Gutierrez B, Ortiz AM, Herrero-Beaumont G, de Pablos JL, Narváez J, Navarro F, Marengo JL, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. *TNFAIP3, a Feedback inhibitor of NFKB, and the neighbour intergenic 6q23 region contain independent genetic factors for rheumatoid arthritis*.

3 IRF5 en AR

Publicación 3:

- Dieguez-Gonzalez R, Calaza M, Perez-Pampin E, de la Serna AR, Fernandez-Gutierrez B, Castañeda S, Largo R, Joven B, Narvaez J, Navarro F, Marengo JL, Vicario JL, Blanco FJ, Fernandez-Lopez JC, Caliz R, Collado-Escobar MD, Carreño L, Lopez-Longo J, Cañete JD, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. *Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 2008. 58 (5):1264-74

4 IL-1 en AR

Publicación 4:

- Johnsen AK, Plenge RM, Butty V, Campbell C, Dieguez-Gonzalez R, Gomez-Reino JJ, Shadick N, Weinblatt M, Gonzalez A, Gregersen PK, Benoist C, Mathis D. *A broad analysis of IL1 polymorphism and rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 2008. 58 (7):1947-57

5 Otros genes candidatos en AR

Publicación 5:

- Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Gonzalez-Alvaro I, Fernandez-Gutierrez B, Lamas JR, de la Serna AR, Caliz R, Blanco FJ, Balsa A, Velloso ML, Perez-Pampin E, de Pablos JL, Navarro F, Narváez J, Lopez-Longo J, Herrero-Beaumont G, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. *Lack of association to rheumatoid arthritis of four candidates genes: CFH, DC-SIGN, Eotaxin-3 and MHC2TA*

NFκB en AR

Genetic Variation in the NFκB Pathway in Relation to Susceptibility to Rheumatoid Arthritis

Rebeca Dieguez-Gonzalez¹, Servet Akar¹, Manuel Calaza¹, Eva Perez-Pampin¹, Javier Costas², Maria Torres², Jose Luis Vicario³, Maria Luisa Velloso⁴, Federico Navarro⁵, Javier Narvaez⁶, Beatriz Joven⁷, Gabriel Herrero-Beaumont⁸, Isidoro Gonzalez-Alvaro⁹, Benjamin Fernandez-Gutierrez¹⁰, Arturo R. de la Serna¹¹, Luis Carreño¹², Javier Lopez-Longo¹², Rafael Caliz¹³, María Dolores Collado-Escobar¹³, Francisco J Blanco¹⁴, Carlos Fernandez-Lopez¹⁴, Alejandro Balsa¹⁵, Dora Pascual-Salcedo¹⁶, Juan J Gomez-Reino¹, Antonio Gonzalez¹

¹ Laboratorio de Investigacion 2 and Rheumatology Unit, Hospital Clinico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain

² National Genotyping Center. Hospital Clinico Universitario de Santiago. Santiago de Compostela, Spain

³ Regional Transfusion Center. Madrid, Spain

⁴ Rheumatology Unit, Hospital Universitario de Valme. Sevilla, Spain

⁵ Rheumatology Unit, Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla, Spain

⁶ Rheumatology Unit, Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona, Spain

⁷ Rheumatology Unit, Hospital 12 de Octubre. Madrid, Spain

⁸ Rheumatology Unit, Fundacion Jimenez Diaz. Madrid, Spain

⁹ Rheumatology Unit, Hospital Universitario de la Princesa. Madrid, Spain

¹⁰ Rheumatology Unit, Hospital Clinico San Carlos. Madrid, Spain

¹¹ Rheumatology Unit, Hospital Santa Creu e San Pau. Barcelona, Spain

¹² Rheumatology Unit, Hospital Universitario Gregorio Marañon. Madrid, Spain

¹³ Rheumatology Unit, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada, Spain

¹⁴ Laboratorio de Investigación Osteoarticular y del Envejecimiento. Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Juan Canalejo. A Coruña, Spain

¹⁵ Rheumatology Unit, Hospital La Paz. Madrid, Spain

¹⁶ Immunology, Hospital La Paz. Madrid, Spain

Corresponding author:

Antonio Gonzalez

Laboratorio de Investigacion 2

Hospital Clinico Universitario de Santiago

Travesia de Choupana sn.

15706-Santiago de Compostela

Spain

Antonio.Gonzalez.Martinez.Pedrayo@sergas.es

anlugon@hotmail.com

Running title: NFκB polymorphisms in Rheumatoid Arthritis

Word count: 2933; **Abstract:** 218

The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd to permit this article (if accepted) to be published in ARD and any other BMJ PGL products and sublicences such use and exploit all subsidiary rights, as set out in our licence (<http://ARD.bmjournals.com/fora/licence.pdf>)."

ABSTRACT

Objective: To examine genetic association between RA and known polymorphisms in core genes of the NFκB pathway, the major intracellular pathway in RA pathogenesis.

Methods: Discovery and replication sample sets of Spanish RA patients and controls were studied. A total of 181 single nucleotide polymorphisms (SNPs) uniformly spaced along the genomic sequences of 17 core genes of the NFκB pathway (REL, RELA, RELB, NFκB1, NFκB2, NFκB1A, NFκB1B, NFκB1E, IKBKA, IKBKB, IKBKE, IKBKAP, KBRAS1, KBRAS2, MAP3K1, MAP3K14, TAX1BP1) were studied by mass spectrometry analysis complemented with 5'-nuclease fluorescence assays in the discovery set, 458 RA patients and 657 controls. SNPs showing nominal significant differences were further investigated in the replication set of 1189 RA patients and 1092 controls.

Results: No clear reproducible association was found, although 12 SNPs in IKBKB, IKBKE and REL genes showed significant association in the discovery set. Interestingly, two of the SNPs in the IKBKE gene, weakly associated in the discovery phase, showed a trend to significant association in the replication phase. Pooling both sample sets together, the association with these two SNPs was significant.

Conclusion: We did not find any major effect among the explored members of the NFκB pathway in RA susceptibility. However, it is possible that variation in the IKBKE gene could have a small effect that requires replication in additional studies.

Keywords: Genetic susceptibility, NFκB, Rheumatoid Arthritis, Candidate genes, Signaling pathway

INTRODUCTION

The complex etiology of rheumatoid arthritis includes a genetic component that accounts for about 50 % of disease liability.[1] The main genetic factor is known to reside in specific HLA-DRB1 alleles, collectively called the shared epitope (SE). A second major genetic factor is a non-synonymous polymorphism in the lymphocyte tyrosine phosphatase coded by PTPN22.[2] Other genetic factors, in STAT4, [3] the TRAF1/C5 [4] and the OLIG3/TNFAIP3 [5, 6] loci have been discovered in recent months.

NFκB plays a key role in a wide range of RA related mechanisms and is downregulated by several drugs used in RA treatments.[7-9] NFκB activates pro-inflammatory cytokines, the matrix metalloproteinases, the adhesion molecule ICAM1 that favors recruitment of lymphocytes, and cyclooxygenase 2 that is responsible for the formation of prostanoids. Surprisingly, no systematic investigation of the role of genetic variation in the NFκB pathway has been done. Only a couple of polymorphisms in NFKB1 and NFKBIA have been ever explored.[10-12] Herein, we have attempted to fill this hole by studying the NFκB core players.

There are two major signaling pathways that activate NFκB.[13-15] The canonical pathway is triggered by pro-inflammatory cytokines and pathogen-associated molecular patterns. These signals cause activation of the IκB kinase (IKK, note that different symbols are used for proteins and the genes encoding them) complex, which includes the IKKα and IKKβ catalytic subunits and the IKKγ regulatory subunit (encoded by the IKBKA, IKBKB and IKBKG genes, respectively). The activated complex phosphorylates the inhibitors of NFκB or IκBs. These proteins, IκBα, IκBβ, IκBε and IκBγ (corresponding to the NFKBIA, NFKBIB, NFKBIE and a fragment of the NFKB1 genes, respectively), in their unphosphorylated form bind to NFκB dimers and retain them in the cytoplasm. After phosphorylation, the IκBs are polyubiquitinated and degraded. In this way, NFκB dimers become free to move to the nucleus where they bind the DNA promoters of their regulated genes. The NFκB dimers are formed by any of the five NFκB proteins: p50/105, p52/100, RelA, RelB and c-Rel (encoded by NFKB1, NFKB2, RELA, RELB and REL genes, respectively). Phosphorylation and degradation of the IκBs is the critical step in the regulation of this pathway. Two proteins, KBRAS1 and KBRAS2, bind to IκBα and IκBβ delaying their degradation and contributing to inhibit NFκB induction. The alternative pathway is activated by engagement of a specific subset of receptors from the TNF receptor superfamily. This pathway is absolutely dependent on the kinases NIK (or MAP3K14) and IKKα and independent of IKKβ and IKKγ. The two kinases are assembled into an active complex through binding to separate domains of IKBKAP. The target of phosphorylation by IKKα in this pathway is p100. It is possible that other minor pathways lead to NFκB activation. For example, T cell receptor signals activate NFκB by a pathway dependent on IKKε (encoded by IKBKE). Also there is crosstalk with other signaling pathways induced by signals in Toll-like receptors involving the kinase MAP3K1 that phosphorylates members of the IKK complex.

MATERIALS AND METHODS

Samples: DNA samples were obtained from RA patients and healthy controls of Spanish ancestry in 13 hospitals from Spain (Supplementary table 1). The study was divided into a first discovery phase, 458 patients and 657 controls, and a second phase of replication with 1189 patients and 1092 controls. RA patients had an established disease and were classified according the 1987 American College of Rheumatology criteria.[16] Clinical data are provided in Table 1. Patients of the discovery phase were from a single center and were actively recruited trying to obtain samples for each patient available. Patients in the replication phase were recruited consecutively as they attended the participating Rheumatology Units. It is likely that this difference in recruiting has caused the differences in clinical characteristics. Patients with longer follow-up or with seronegative RA were more prevalent in the discovery phase (Table 1). Controls were obtained in three ways in different centers: from the general population (all the controls in the discovery phase and in some centers from the replication phase), blood donors and spouses of patients. The Ethical Committee for Clinical Research of Galicia approved this study and all participants gave their written informed consent.

Table 1: Clinical data of RA patients in the discovery and replication studies.

Clinical characteristics	discovery	replication	p
Female (%)	76.6	73.9	NS
Age of disease onset (median, IQR)	49 (37-57)	48 (38-58)	
Time of follow-up (median, IQR)	16.8 (10.8-25.8)	12.8 (7.8-19.9)	2.4 x10 ⁻¹³
Morning stiffness (%)	99.4	94.8	0.00007
Arthritis of 3 or more joint areas (%)	100.0	99.5	NS
Arthritis of hand joints (%)	100.0	99.2	NS
Symmetric arthritis (%)	100.0	98.5	NS
Rheumatoid nodules (%)	12.7	22.8	0.0005
Rheumatoid factor (%)	62.4	76.2	1.95 x10 ⁻⁷
Erosions (%)	70.3	72.6	NS
S. Sicca (%)	9.3	9.0	NS
Interstitial pneumonitis (%)	1.8	3.2	NS

SNP genotyping: 181 SNPs were selected to cover genetic variation in 17 genes of the NFkB pathway (Table 2 and Supplementary table 2). The SNPs were selected to be evenly spaced and to have a minor allele frequency higher than 10 % in the coding sequences and their neighboring 10 Kb both upstream and downstream. Genotype determination was performed with the MassARRAY SNP genotyping system (Sequenom Inc., San Diego, CA, USA) as described.[17]

Table 2: List of the 17 genes that have been screened with their genomic position, size, number of SNPs selected in each of them and the density obtained expressed as mean distance between SNPs in Kb (20 Kb of flanking sequence were included for each gene)

Gene symbol	Chromosome	Size (Kb)	SNP number	Mean distance
REL	2p16.1	41.4	6	10.2
RELA	11q13.1	8.6	5	5.7
RELB	19q13.32	36.7	6	9.5
NFKB1	4q24	116.0	23	5.9
NFKB2	10q24.32	8.0	4	7.0
NFKBIA	14q13.2	3.2	8	2.9
NFKBIB	19q13.2	8.9	6	4.8
NFKBIE	6p21.1	7.6	7	3.9
CHUK (IKBKA)	10q24.2	41.2	7	8.7
IKBKB	8p11.21	61.1	7	11.6
IKBKE	1q32.1	26.4	24	1.9
IKBKAP	9q31.3	66.6	17	5.1
KBRAS1	3p24.2	25.0	6	7.5
KBRAS2	17q21.2	5.6	5	5.1
MAP3K1	5q11.2	66.2	19	4.5
MAP3K14	17q21.31	27.8	21	3.5
TAX1BP1	7p15.2	89.0	10	10.9

In the replication phase, we genotyped 11 SNPs in three genes with the same technology but different assays (new multiplexes), with three SNPs failing. These three SNPs were genotyped with TaqMan SNP genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical analysis: Analysis of results relied on the Haploview and Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK), programs. HWE was tested in control samples with a p-value threshold of 0.01. Chi square association tests were performed to compare allele frequencies in 2 x 2 contingency tables. Multivariate logistic regression analysis was used to evaluate the effect of each associated SNP in a gene conditional on the remaining. Likelihood ratio tests for the additive, dominant and recessive genetic models were obtained relative to the codominant model. Likelihoods for the fit of each model were calculated with univariate logistic regression. Allele frequencies in the two phases were considered together with the Mantel-Haenszel test to account for differences between the two sample collections, discovery and replication. Homogeneity of effect size across sample sets was assessed with the Breslow-Day test. Cocophase software [18] was used to infer haplotypes by the expectation-maximization algorithm and to compare haplotype frequency distribution by the homogeneity likelihood ratio test.

RESULTS

Discovery phase: We selected evenly spaced SNPs across the 17 core NFκB genes (Table 2 and Supplementary table 2) and their flanking sequences (10 Kb in each direction). The 181 selected SNPs were examined in the discovery phase. They provided a mean coverage of one SNP every 5.5 Kb that is comparable to the coverage of the current whole genome association (WGA) commercial panels. A total of 32 SNPs were discarded because of diverse problems. The remaining 149 SNPs were successfully genotyped in 90.9 % of the samples. The discovery set of samples was formed by 458 RA patients and 657 controls (for clinical data, see Table 1). Women accounted for 76.6% of the RA patients and 52.1 % of the controls.

Among the 149 validated SNPs there was nominal evidence of significant association ($p < 0.05$) for twelve SNPs in three genes (Table 3). Table 3: SNPs showing a nominal significant difference in allele frequencies between RA patients and controls from the discovery set

Gene	SNP	MAF % (n/N)*		O.R. (95% C.I.)	p
		RA patients	Controls		
IKBKB	rs9694958	7.0 (63/894)	9.9 (128/1296)	0.69 (0.51-0.95)	0.02
	rs2272733	7.9 (70/884)	12.5 (161/1292)	0.60 (0.45-0.81)	0.0007
	rs12676482	2.7 (24/892)	5.7 (74/1292)	0.46 (0.28-0.73)	0.0008
	rs17875732	5.0 (40/806)	9.1 (116/1268)	0.52 (0.36-0.75)	0.0004
	rs3136717	8.0 (72/896)	11.6 (147/1272)	0.67 (0.50-0.90)	0.007
IKBKE	rs17433909	1.6 (14/874)	3.9 (48/1244)	0.41 (0.22-0.74)	0.002
	rs2151222	31.7 (278/876)	27.7 (355/1280)	1.21 (1.00-1.46)	0.045
	rs17434047	0.9 (8/870)	2.5 (30/1208)	0.36 (0.17-0.80)	0.009
	rs3748022	25.2 (220/874)	21.0 (264/1258)	1.26 (1.03-1.55)	0.02
REL	rs6545835	22.1 (165/746)	27.0 (311/1152)	0.77 (0.62-0.95)	0.017
	rs842647	25.2 (222/880)	21.6 (277/1284)	1.23 (1.00-1.50)	0.047
	rs3732179	25.5 (225/882)	21.8 (280/1284)	1.23 (1.00-1.50)	0.045

* MAF = Minor Allele Frequency; n/N = number of minor alleles/total number of alleles

The strength of association was more marked in the IKBKB gene where five of the seven studied SNPs showed p values < 0.05 . Two SNPs, rs12676482 and rs17875732, showed minor allele frequencies in RA patients that were half the frequencies of the controls (O.R. of 0.46 and 0.52, respectively; $p < 0.001$). Association in this gene could be due to rs17875732 as suggested by conditional logistic regression analysis (Supplementary Table 3). Four of the 22 validated IKBKE SNPs showed significant allelic differences in the discovery phase. They were towards the 3' side of the gene in a region of 17.7 Kb. LD, frequency data and conditional logistic regression analysis suggested two independent genetic factors in this gene (Supplementary table 4).

Association in the REL gene was weak and included three of the five validated SNPs (Table 3). It could be accounted only by the rs6545835 SNP (Supplementary table 5).

In addition to the 12 SNPs with nominal significant differences, there were 8 other SNPs showing allelic differences with p values < 0.1 (Supplementary table 2). Genotype analysis showed that the additive model fitted data as well as, or better than, other genetic models. Results with the additive model were almost identical to the observed with allele frequencies (not shown). Haplotype analysis of each of the 17 genes did not show any new significant association.

Replication phase: Eleven of the 12 SNPs found at the p < 0.05 level in the discovery phase (rs842647 in REL was not tested because it was well represented by rs3732179, $r^2 = 0.97$) were genotyped in a replication phase with a 97.4 % call rate. All of them showed genotype frequencies that were in accordance with HWE. The replication set of samples included 1189 RA patients and 1092 controls. In both groups, females were predominating in similar proportion, 73.94% and 70.67 %, respectively. Allelic frequencies were compared and none of the differences that have been found in the discovery phase were confirmed (Table 4). Genotype frequencies gave similar results with the additive genetic model, which fitted data better or equally well than other genetic models (not shown).

Table 4: Allele frequencies of the 11 SNPs analyzed in the replication phase of the study.

Gene	SNP	MAF % (n/N)*		O.R. (95% C.I.)	p
		RA patients	Controls		
IKBKB	rs9694958	9.6 (225/2354)	10.4 (224/2154)	0.91 (0.7-1.1)	0.3
	rs2272733	11.9 (268/2258)	12.9 (270/2096)	0.91 (0.8-1.1)	0.3
	rs12676482	4.4 (103/2346)	4.1 (89/2150)	1.06 (0.8-1.4)	0.7
	rs17875732	8.0 (182/2274)	8.3 (175/2100)	0.96 (0.8-1.2)	0.7
	rs3136717	11.9 (279/2348)	13.2 (283/2150)	0.89 (0.7-1.1)	0.2
IKBKE	rs17433909	3.8 (90/2354)	3.8 (82/2156)	1.01 (0.7-1.4)	1.0
	rs2151222	30.3 (710/2342)	27.8 (588/2112)	1.13 (1.0-1.3)	0.07
	rs17434047	2.1 (49/2356)	2.1 (46/2154)	0.97 (0.7-1.5)	0.9
	rs3748022	23.4 (541/2310)	21.2 (451/2130)	1.14 (1.0-1.3)	0.07
REL	rs6545835	22.7 (513/2262)	24.2 (499/2062)	0.92 (0.8-1.1)	0.2
	rs3732179	26.0 (610/2348)	24.6 (525/2136)	1.08 (0.9-1.2)	0.3

* MAF = Minor Allele Frequency; n/N = number of minor alleles/total number of alleles

The largest differences were observed in the two weakly correlated IKBKE SNPs that have larger MAF, rs2151222 and rs3748022 (p = 0.07 for each of them). All the others were very similar in RA patients and controls of this set of samples. Sample size of the replication set was enough to allow for confirmation of the discovery phase results. It provided more than 95 % power for an effect similar to the four IKBKB SNPs, the two

IKBKE SNPs with low MAF, rs17433909 and rs17434047, and the REL SNP able to account for association, rs6545835.

Trying to find an explanation for the lack of replication, we compared, separately, the allelic frequencies in controls and in RA patients between the discovery and the replication phases (Supplementary table 6). There was only a SNP that was slightly different between the two sets of controls in spite of differences in their recruitment in the two phases (population vs a mixture of 3 different approaches). In contrast, 7 of the 11 SNPs showed different allele frequencies in patients with RA from the two phases. The five IKBKB SNPs and the two IKBKE SNPs with low MAF were significantly less frequent in RA patients from the discovery phase than in patients from the replication phase. Although there were differences in some clinical characteristics between RA patients in the two phases of the study (Table 1) that were indicative of a more severe disease in the replication phase, there were not any significant correlation between the available clinical data and these SNPs. Specifically, there were no differences in the allele frequencies between patients with RF, anti-CCPs (only available in the discovery phase) or rheumatoid nodules and those lacking these RA features; nor differences in the strength of association (evaluated as O.R.) that could explain the results observed when the patients were stratified by these clinical features; nor significant changes in the differences between genotype frequencies in RA patients from the two phases of the study when data were adjusted for time of follow-up as covariant.

We also considered the two phases jointly with a Mantel-Haenszel analysis (Table 5).

Table 5: Pooled analysis of the allelic frequencies in the discovery and replication phases.

Gene	SNP	Mantel-Haenszel		
		O.R. (95%C.I.)	P _{M-H} *	P _{B-D} *
IKBKB	rs9694958	0.84 (0.7-0.99)	0.03	0.12
	rs2272733	0.81 (0.7-0.9)	0.006	0.02
	rs12676482	0.82 (0.6-1.0)	0.10	0.002
	rs17875732	0.78 (0.7-0.9)	0.009	0.002
	rs3136717	0.81 (0.7-0.9)	0.007	0.07
IKBKE	rs17433909	0.79 (0.6-1.0)	0.09	0.01
	rs2151222	1.15 (1.0-1.3)	0.008	0.5
	rs17434047	0.76 (0.5-1.1)	0.12	0.03
	rs3748022	1.17 (1.0-1.3)	0.007	0.4

REL	rs6545835	0.89 (0.8-1.0)	0.05	0.4
	rs3732179	1.12 (1.0-1.2)	0.05	0.2

* P_{M-H} = p value of the Mantel-Haenszel pooled O.R.; P_{B-D} = p value of the Breslow-Day homogeneity test

This analysis showed that 9 of the 11 SNPs were still associated with RA with P_{M-H} values < 0.05, but only three of them showed p values that were lower than the obtained in the discovery phase: two in IKBKE (rs2151222 and rs3748022) and one in REL (rs3732179). There was significant heterogeneity of effects between the two phases in 6 of the SNPs by the Breslow-Day homogeneity test (P_{B-D} in Table 5), further showing that most results were not comparable between the two sets of samples. Results were very similar if the pooling of data was done considering towns of origin of the samples (Not shown). No significant influence of gender was present in any of the analyses.

DISCUSSION

We have taken in this study a variant of the candidate gene approach by exploring genetic variation in a functional unit in RA pathogenesis. The selected NF κ B signaling pathway has an important regulatory role in RA.[7-9] It has two clearly defined branches and many alternative players at different levels.[13, 15] Therefore, it seemed interesting to investigate if genetic association with RA susceptibility will identify any of them as critical. The 17 selected genes included the core elements and other members of the pathway related to either minor routes of activation, as IKBKE and MAP3K1, or critical regulatory steps, as KBRAS1 and KBRAS2. Density of SNP coverage was slightly larger than the available in the WGA panels but was not complete at $r^2 > 0.8$.

The study was conducted in two phases because replication of the findings is critical to differentiate between true associations and random frequency changes. However, it should be noted that alleles with modest effects could have been missed in the discovery phase. More specifically, for an OR = 1.3 and minor allele frequency of 0.2, the power of the discovery phase was 72 % and power of the replication set was > 95 %.

Results of the first phase were promising with SNPs in three genes showing nominal evidence of association and some of them, in IKBKB and IKBKE, a relatively strong effect. However, the evidence for association would be lower if an adjustment was performed for multiple testing. None of these associations was replicated in the second phase of the study. Allele frequency differences between the two phases were present only among the patients with RA, but we did not find correlation with available clinical data even with the clinical characteristics that were different between the two phases of the study. Therefore, the lack of replication of the original findings remains unexplained. Only two SNPs in IKBKE showed a trend to association in the replication sample set. These two SNPs, rs2151222 and rs3748022, also showed an increased statistical significance when the two sample sets were considered together. Interestingly, they are correlated and thus the possible association would be to a single genetic factor. Another possibility is that they are related with an interleukin cluster, 270 Kb telomeric to IKBKE. This cluster includes IL10, a gene with several regulatory polymorphisms that influence RA susceptibility and severity according to some studies, [19-21] but not according to others. [22, 23] If a direct IKBKE association is confirmed it will add new perspectives into RA pathology because IKK ϵ is not a component of the IKK complex and is not involved in the best-known NF κ B activation pathways.[24] IKK ϵ activates the IRF-3 and IRF-7 transcription factors of the innate immune response, and the NF κ B pathway in T cells by directly phosphorylating RelA.[25] Also of relevance for RA pathology could be that IKK ϵ is expressed in fibroblast-like synoviocytes and in the synovial intimal lining where it participates in the induction of matrix metalloproteinases through phosphorylation of c-Jun.[26]

It is also possible that the differences in IKBKB SNPs in the discovery set were related with the nearby PLAT gene, coding for the tissue type plasminogen activator, that is only 63 Kb telomeric to IKBKB and that we have previously found associated to RA susceptibility.[27] Nevertheless, we have not detected significant LD between the regulatory SNP in PLAT and the SNPs of IKBKB (not shown).

Results from the first large WGA in RA susceptibility have been published very recently.[28] This study can provide important independent confirmation for our results because it is very powerful and exhaustive, including 3000 controls and 2000 RA patients of British descent genotyped at 500 000 SNPs. None of the SNPs that are highlighted in the WGA publication as different in RA patients and controls is near any of the NF κ B genes explored by us. However, a deeper analysis is possible as there are many other differences in the WGA study that are not significant at the genome level

but they can be used for confirmation of independent studies. For example, the WGA includes the same number of SNPs in the IKBKB locus as our study. Only one shows some difference between cases and controls (rs5029748, $p = 0.01$). This SNP was also included in our discovery phase but we did not find any difference. On the contrary, two SNPs with significant differences in our discovery phase (rs12676482 and rs17875732) are represented in the WGA by highly correlated SNPs ($r^2 = 1$) that are not different between RA patients and controls. In the same way, there are two SNPs in the WGA study informative about the REL SNPs we have analyzed. None of them are associated to RA. Unfortunately, it is impossible to obtain this kind of information for IKBKE because the WGA panel does not include any SNPs in the 40 Kb surrounding the IKBKE gene. In addition, flanking SNPs do not show significant correlation with IKBKE SNPs. These comparisons show a way in which WGA studies will contribute to progress in the genetic investigation of RA.

In conclusion, our study has not found important genetic factors for RA susceptibility in core members of the NF κ B signaling pathway. It should be noted, however, that SNP coverage was not complete and that power of the discovery phase did not allow excluding modest effects. Also, it is possible that a more complex or restricted involvement, because of interaction between genetic factors or association limited to a subgroup of patients, has eluded our detection. Our initial findings of RA association with IKBKB and REL SNPs were most likely due to random fluctuations in allelic frequencies that can be expected in any study where multiple SNPs are analyzed. Lack of replication in the second set of samples and of confirmatory evidence in the published WGA study support this conclusion. Nevertheless, variation in IKBKE or nearby sequences could have a role in RA susceptibility although we were unable to obtain clear confirmatory evidence. This effect may be small, in an OR range of 1.1-1.2, and this will make difficult future attempts of replication.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cristina Fernandez-Lopez for her excellent technical assistance. This project was supported by grant PI04/1513 from the Instituto de Salud Carlos III (Spain) with participation of funds from FEDER (European Union). SA was the recipient of a Research Fellowship of the Fundation Articulium.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare they do not have any conflict of interest.

REFERENCES:

1. Oliver JE, Worthington J, Silman AJ. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;**18**:141-6
2. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2004;**75**:330-7
3. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007;**357**:977-86
4. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B *et al.* TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007;**357**:1199-209
5. Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J *et al.* Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2007;**39**:1477-82
6. Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J *et al.* Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet.* 2007;**39**:1431-3
7. Firestein GS. NF-kappaB: Holy Grail for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum.* 2004;**50**:2381-6
8. Andreaskos E, Sacre S, Foxwell BM, Feldmann M. The toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway in rheumatoid arthritis. *Front Biosci.* 2005;**10**:2478-88
9. Roman-Blas JA, Jimenez SA. NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;**14**:839-48
10. Hegazy DM, O'Reilly DA, Yang BM, Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG *et al.* NFkappaB polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes. *Genes Immun.* 2001;**2**:304-8
11. Mozzato-Chamay N, Corbett EL, Bailey RL, Mabey DC, Raynes J, Conway DJ *et al.* Polymorphisms in the IkappaB-alpha promoter region and risk of diseases involving inflammation and fibrosis. *Genes Immun.* 2001;**2**:153-5
12. Orozco G, Sanchez E, Collado MD, Lopez-Nevot MA, Paco L, Garcia A *et al.* Analysis of the functional NFKB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 2005;**65**:183-6
13. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;**25**:280-8
14. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K *et al.* A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 2004;**6**:97-105
15. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004;**18**:2195-224
16. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;**31**:315-24
17. Buetow KH, Edmonson M, MacDonald R, Clifford R, Yip P, Kelley J *et al.* High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;**98**:581-4
18. Dudbridge F. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol.* 2003;**25**:115-21

19. Huizinga TW, Keijsers V, Yanni G, Hall M, Ramage W, Lanchbury J *et al.* Are differences in interleukin 10 production associated with joint damage? *Rheumatology (Oxford)*. 2000;**39**:1180-8
20. Lard LR, van Gaalen FA, Schonkeren JJ, Pieterman EJ, Stoeken G, Vos K *et al.* Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;**48**:1841-8
21. Padyukov L, Hytonen AM, Smolnikova M, Hahn-Zoric M, Nilsson N, Hanson LA *et al.* Polymorphism in promoter region of IL10 gene is associated with rheumatoid arthritis in women. *J Rheumatol.* 2004;**31**:422-5
22. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M *et al.* Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;**42**:1093-100
23. MacKay K, Milicic A, Lee D, Tikly M, Laval S, Shatford J *et al.* Rheumatoid arthritis susceptibility and interleukin 10: a study of two ethnically diverse populations. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;**42**:149-53
24. Peters RT, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol Cell.* 2000;**5**:513-22
25. Mattioli I, Geng H, Sebald A, Hodel M, Bucher C, Kracht M *et al.* Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *J Biol Chem.* 2006;**281**:6175-83
26. Sweeney SE, Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS. Regulation of c-Jun phosphorylation by the I kappa B kinase-epsilon complex in fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 2005;**174**:6424-30
27. Rodriguez-Lopez J, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Regulatory polymorphisms in extracellular matrix protease genes and susceptibility to rheumatoid arthritis: a case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2005;**8**
28. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007;**447**:661-78

Supplementary Table 1:

Sample collections by hospital recruitment.

Center name	Study phase	Town	RA	Controls
H Clínico Universitario de Santiago	Discovery	Santiago	458	657
H Clínico Universitario de Santiago ^a	Replication	Santiago	95	0
H de la Santa Creu I Sant Pau		Barcelona	45	48
H Príncipes de España		Barcelona	94	94
H Virgen de las Nieves		Granada	92	96
H Universitario de Valme		Sevilla	81	95
H Virgen de La Macarena		Sevilla	166	143
H Universitario de La Princesa		Madrid	109	100
Fundación Jiménez Díaz		Madrid	34	45
H Universitario Doce de Octubre		Madrid	85	77
H Clínico San Carlos		Madrid	93	102
H Universitario La Paz		Madrid	156	111
Complejo H Univ Juan Canalejo ^a		A Coruña	89	94
H Universitario Gregorio Marañón		Madrid	50	87

^aThese two collections were considered as the same town because they are only to 60 km appart and share the same population on many criteria.

Supplementary Table 2:

List of 181 SNPs selected in 17 NFkB core genes. SNPs that were excluded of further analysis are signaling

Gene name	SNP ID	Position	Call rate	HWEpval controls	MAF	Case,Control Ratios	P value	
CHUK	rs10786583	101936004	95,40					Discarded
CHUK	rs7909855	101957202	52,10					Discarded
CHUK	rs17880376	101943695	91,60	0,069	0,43	491:349, 663:509	0,400	
CHUK	rs17885645	101977457	98,20	0,078	0,42	508:362, 735:551	0,569	
CHUK	rs11591741	11966491	97,80	0,112	0,42	506:360, 734:548	0,589	
CHUK	rs7923726	101953289	96,60	0,185	0,48	459:429, 651:583	0,628	
CHUK	rs3818411	101950956	97,00	0,974	0,47	468:416, 660:586	0,990	
IKBKAP	rs838818	108772687	98,20	0,022	0,37	552:328, 807:453	0,532	
IKBKAP	rs4978372	108715838	74,50					Discarded
IKBKAP	rs4978753	108717026	45,40					Discarded
IKBKAP	rs754333	108766451	97,40	0,050	0,17	724:152, 1042:206	0,609	
IKBKAP	rs3204145	108731175	71,50					Discarded
IKBKAP	rs2275635	108768322	97,10	0,055	0,17	726:152, 1032:206	0,684	
IKBKAP	rs4978747	108702780	98,30	0,312	0,46	455:417, 714:558	0,071	
IKBKAP	rs3818875	108720079	98,30	0,330	0,17	724:148, 1049:223	0,737	
IKBKAP	rs4978374	108726538	96,00	0,402	0,24	657:217, 929:289	0,562	
IKBKAP	rs2275495	108723951	96,80	0,499	0,12	773:99, 1091:147	0,714	
IKBKAP	rs2275626	108738576	81,70	0,504	0,17	622:126, 858:176	0,922	
IKBKAP	rs838824	108750262	94,30	0,522	0,33	579:269, 798:410	0,292	
IKBKAP	rs2289480	108785056	98,20	0,581	0,34	588:298, 821:433	0,667	
IKBKAP	rs4978746	108702610	98,10	0,616	0,45	459:421, 710:548	0,050	
IKBKAP	rs3763643	108775162	97,10	0,626	0,27	649:223, 900:344	0,288	
IKBKAP	rs1538660	108721380	92,70	0,741	0,18	717:145, 948:210	0,443	
IKBKAP	rs3818932	108743733	98,60	0,981	0,27	654:230, 917:349	0,426	
IKBKB	rs3747811	42248662	79,30	0,004	0,49	376:342, 518:516	0,310	Discarded
IKBKB	rs2272733	42277059	98,60	0,170	0,11	814:70, 1131:161	0,001	
IKBKB	rs3136717	42315598	98,20	0,193	0,10	824:72, 1125:147	0,007	
IKBKB	rs12676482	42293234	98,90	0,368	0,05	868:24, 1218:74	0,001	
IKBKB	rs9694958	42275203	99,20	0,473	0,09	831:63, 1168:128	0,021	
IKBKB	rs5029748	42259706	99,30	0,656	0,27	641:255, 957:339	0,233	
IKBKB	rs17875732	42306311	93,90	0,744	0,08	766:40, 1152:116	0,000	
IKBKE	rs3748022	203057860	96,90	0,162	0,23	654:220, 992:264	0,025	
IKBKE	rs2297543	203039745	94,90					Discarded
IKBKE	rs1953090	203036542	94,90	0,216	0,17	716:156, 1010:204	0,517	
IKBKE	rs11584629	203029255	98,10	0,321	0,47	480:396, 666:614	0,207	
IKBKE	rs7552033	203052791	95,90	0,347	0,15	745:119, 1045:199	0,161	
IKBKE	rs10863389	203044687	90,70	0,365	0,37	523:337, 736:398	0,061	
IKBKE	rs2297546	203036432	98,40	0,375	0,42	501:371, 760:530	0,499	
IKBKE	rs1930437	203034822	95,90	0,400	0,47	432:420, 677:579	0,149	
IKBKE	rs12724769	203043133	95,90	0,412	0,50	441:411, 644:612	0,172	
IKBKE	rs2184030	203055836	94,60	0,470	0,47	443:367, 669:601	0,369	
IKBKE	rs2151222	203042663	98,10	0,522	0,29	598:278, 925:355	0,045	
IKBKE	rs1059704	203036773	96,10	0,553	0,33	564:296, 849:403	0,285	
IKBKE	rs10836	203058564	92,00	0,569	0,46	485:389, 609:539	0,275	
IKBKE	rs1930438	203031501	96,20	0,575	0,22	651:207, 989:267	0,121	
IKBKE	rs9242	203025794	96,80	0,630	0,45	452:394, 720:562	0,215	
IKBKE	rs3849271	203064778	87,10	0,643	0,49	345:329, 638:602	0,912	

IKBKE	rs1539243	203036182	98,10	0,658	0,13	766:110, 1107:173	0,517	
IKBKE	rs2274902	203034706	92,40	0,766	0,49	446:426, 604:556	0,151	
IKBKE	rs17433930	203041134	96,40	0,808	0,06	803:51, 1187:77	0,910	
IKBKE	rs17433804	203029447	89,30	0,835	0,33	552:248, 770:392	0,204	
IKBKE	rs11117858	203034669	96,50	0,903	0,25	639:235, 953:293	0,077	
IKBKE	rs12728136	203048917	98,60	0,918	0,13	768:108, 1121:171	0,536	
IKBKE	rs17433909	203040120	96,40	1,000	0,03	860:14, 1196:48	0,002	
IKBKE	rs17434047	203054115	94,50	1,000	0,02	862:8, 1178:30	0,009	
KBRAS1	rs2885034	23908178	98,00					Discarded
KBRAS1	rs11918791	23923193						Discarded
KBRAS1	rs7619870	23969981	93,90	0,272	0,34	582:286, 772:408	0,442	
KBRAS1	rs1133926	23936766	96,30	0,518	0,22	681:191, 955:275	0,805	
KBRAS1	rs11129128	23936625	93,90	0,722	0,08	796:70, 1094:88	0,593	
KBRAS1	rs1136155	23909494	94,60	0,862	0,21	686:170, 946:262	0,314	
KBRAS2	rs4796758	37423045	74,80					Discarded
KBRAS2	rs7225117	37451242	98,30	0,476	0,19	713:173, 1023:233	0,571	
KBRAS2	rs4796756	37409324	96,00	0,576	0,19	688:164, 1004:234	0,843	
KBRAS2	rs4796763	37458592	90,90	0,689	0,18	700:168, 925:187	0,144	
KBRAS2	rs2240011	37447235	99,20	0,731	0,19	706:176, 1039:239	0,467	
MAP3K1	rs96844	56232361	92,40	0,051	0,25	625:211, 892:300	0,971	
MAP3K1	rs1423622	56149199	95,50	0,066	0,07	799:57, 1157:83	0,975	
MAP3K1	rs17661089	56141753	82,40	0,076	0,07	704:48, 978:78	0,409	
MAP3K1	rs3733951	56165560	95,90	0,113	7,00	784:58, 1173:89	0,885	
MAP3K1	rs252908	56156443	90,60	0,194	0,38	517:309, 708:454	0,453	
MAP3K1	rs832574	56195639	97,60	0,252	0,37	549:329, 802:462	0,664	
MAP3K1	rs832575	56197544	98,40	0,259	0,14	751:121, 1100:186	0,702	
MAP3K1	rs3817119	56219500	94,50	0,352	0,09	795:81, 1088:110	0,960	
MAP3K1	rs2067214	56169828						Discarded
MAP3K1	rs33323	56211323	20,90					Discarded
MAP3K1	rs33322	56210983	92,60	0,734	0,20	668:162, 950:252	0,426	
MAP3K1	rs702689	56213200	95,30	0,757	0,30	570:242, 886:392	0,673	
MAP3K1	rs863839	56186856	83,70	0,782	0,36	542:320, 631:343	0,580	
MAP3K1	rs702688	56226743	91,40	0,851	0,37	514:300, 747:445	0,828	
MAP3K1	rs7733041	56143134	97,90	0,906	0,22	682:188, 1003:275	0,960	
MAP3K1	rs702691	56150283	98,10	0,924	0,38	549:323, 784:496	0,423	
MAP3K1	rs252899	56224326	96,70	0,928	0,21	692:180, 987:263	0,824	
MAP3K1	rs832582	56213500	98,10	0,956	0,21	686:186, 1006:274	0,966	
MAP3K1	rs43184	56177534	97,50	0,969	0,12	695:183, 992:270	0,759	
MAP3K14	rs2072090	40706910	93,80	0,013	0,49	428:420, 630:594	0,385	
MAP3K14	rs4248280	40690761	98,00	0,034	0,49	461:415, 648:640	0,180	
MAP3K14	rs708563	40696719	96,60	0,086	0,49	454:420, 633:625	0,460	
MAP3K14	rs7222094	40723436	99,10	0,097	0,46	481:421, 694:592	0,768	
MAP3K14	rs11079502	40706449	98,60	0,107	0,50	445:439, 646:646	0,876	
MAP3K14	rs2074293	40699856	96,50	0,212	0,44	503:373, 683:571	0,177	
MAP3K14	rs2074291	40717672	93,90	0,218	0,86	410:402, 657:605	0,486	
MAP3K14	rs9909488	40695542	99,60	0,286	0,04	863:41, 1249:47	0,285	
MAP3K14	rs721579	40726264	98,10	0,368	0,27	641:233, 939:353	0,733	
MAP3K14	rs9908330	40738883	97,70	0,431	0,44	486:384, 718:570	0,957	
MAP3K14	rs3785803	40716996	97,20	0,505	0,14	749:131, 1106:160	0,135	
MAP3K14	rs12449740	40741132	98,60	0,509	0,44	497:391, 729:559	0,771	
MAP3K14	rs2285674	40698089	48,90					Discarded
MAP3K14	rs3785805	40716723	80,10		0,00	657:1, 1106:4		Discarded
MAP3K14	rs11574822	40718258						Discarded
MAP3K14	rs2291448	40688148	99,60	0,689	0,06	846:58, 1214:82	0,933	

MAP3K14	rs17686001	40744196	99,20	0,700	0,16	759:135, 1089:207	0,581	
MAP3K14	rs16939943	40709546	98,60	0,769	0,15	739:145, 1108:184	0,167	
MAP3K14	rs1047841	40696414	93,70	0,780	0,05	761:47, 1203:57	0,189	
MAP3K14	rs1047833	40697924	99,00	0,784	0,30	648:246, 886:406	0,050	
MAP3K14	rs3744410	40697696	99,20	0,902	0,04	855:41, 1240:54	0,649	
NFKB1	rs230539	103852725	93,60	0,019	0,31	573:245, 838:400	0,259	
NFKB1	rs1599961	103800754	94,30	0,020	0,35	551:279, 789:451	0,198	
NFKB1	rs3774937	103791438	96,00	0,082	0,31	597:249, 865:397	0,323	
NFKB1	rs1020760	103871638	95,50	0,100	0,37	537:305, 782:474	0,481	
NFKB1	rs230526	103816010	95,60	0,115	0,37	539:295, 788:478	0,268	
NFKB1	rs230509	103835455	97,00	0,119	0,31	603:263, 860:404	0,436	
NFKB1	rs230521	103820512	96,80	0,125	0,37	558:306, 791:471	0,370	
NFKB1	rs3774956	103865719	91,60	0,137	0,37	500:290, 768:454	0,841	
NFKB1	rs3774938	103795624	97,70	0,153	0,36	565:305, 809:467	0,465	
NFKB1	rs3755867	103883867	92,40	0,319	0,29	635:239, 817:339	0,328	
NFKB1	rs1609798	103894643	92,30	0,465	0,26	617:205, 888:316	0,509	
NFKB1	rs3774963	103876558	96,50	0,482	0,28	624:234, 900:362	0,478	
NFKB1	rs3774968	103888305	93,40	0,500	0,46	437:393, 665:555	0,408	
NFKB1	rs747559	103771362	83,80	0,000	0,36	441:233, 746:420	0,531	Discarded
NFKB1	rs93059	103825702	91,80	0,001	0,46	463:403, 625:525	0,694	Discarded
NFKB1	rs230511	103831958	60,60					Discarded
NFKB1	rs997476	103899208	96,90	0,635	0,05	815:49, 1206:58	0,262	
NFKB1	rs230491	103841806	96,50	0,001	0,32	583:273, 858:406	0,912	Discarded
NFKB1	rs230542	103855648	94,20	0,009	0,32	586:252, 830:400	0,239	Discarded
NFKB1	rs4648072	103875893	59,70					Discarded
NFKB1	rs4698863	103903051	96,50	0,666	0,28	618:240, 915:347	0,810	
NFKB1	rs4648099	103886010	73,70	0,00				Discarded
NFKB1	rs3774932							Discarded
NFKB2	rs7897947	104147701	91,90	0,743	0,16	729:151, 986:166	0,091	
NFKB2	rs7076748	104140132	97,60	0,877	0,25	669:223, 959:309	0,738	
NFKB2	rs12772374	104146901	94,70	0,886	0,16	720:126, 1045:203	0,397	
NFKB2	rs12769316	104142741	94,90	0,910	0,15	731:127, 1045:197	0,509	
NFKBIA	rs696	34940844	96,80	0,069	0,40	518:352, 759:489	0,555	
NFKBIA	rs3138053	34944605	96,10	0,369	0,27	628:220, 905:349	0,339	
NFKBIA	rs3138045	34947472	94,80	0,562	0,21	680:170, 962:262	0,438	
NFKBIA	rs1957106	34943521	96,80	0,580	0,26	612:230, 966:310	0,119	
NFKBIA	rs2233409	34944021	96,00	0,654	0,23	642:182, 975:301	0,425	
NFKBIA	rs1012919	34954390	88,50					Discarded
NFKBIA	rs3138056							Discarded
NFKBIA	rs2233406	34944550	96,80	0,893	0,27	648:226, 896:348	0,281	
NFKBIB	rs9403	44098007	97,40	0,056	0,37	562:332, 792:462	0,889	
NFKBIB	rs3136640	44088140	95,70	0,149	0,40	521:341, 755:495	0,985	
NFKBIB	rs3136641	44088489	93,70	0,256	0,23	635:197, 956:280	0,588	
NFKBIB	rs3136642	44090256	96,40	0,352	0,41	513:363, 735:515	0,913	
NFKBIB	rs3136646	44091117	97,50	0,528	0,23	658:204, 1000:288	0,480	
NFKBIB	rs2053071	44082771	73,90					Discarded
NFKBIE	rs529948	44344347	99,60	0,011	0,10	790:88, 1151:137	0,646	
NFKBIE	rs730775	44340052	94,50	0,085	0,47	443:405, 649:557	0,482	
NFKBIE	rs476632	44322303	94,30	0,177	0,39	531:331, 711:477	0,423	
NFKBIE	rs504697	44328054	97,70	0,520	0,28	630:236, 904:354	0,653	
NFKBIE	rs1044690	44353219	98,80	0,617	0,22	686:174, 990:298	0,111	
NFKBIE	rs2282151	44334173	12,40					Discarded
NFKBIE	rs2233434	44340898	49,80					Discarded
REL	rs842647	61031122	98,40	0,041	0,23	658:222, 1007:277	0,047	

REL	rs3732179	61065976	98,50	0,055	0,23	657:225, 1004:280	0,045	
REL	rs13031237	61047780	94,70	0,084	0,41	484:334, 742:524	0,800	
REL	rs9309331	61053266	97,20	0,271	0,25	655:197, 941:345	0,054	
REL	rs6545835	61024203	86,30	0,670	0,25	581:165, 841:311	0,017	
REL	rs1429265	61064733	96,50	1,000	0,04	838:32, 1210:42	0,690	
RELA	rs1049728	65177693	97,40	0,061	0,06	812:44, 1213:73	0,593	
RELA	rs10896027	65177336	95,20	0,202	0,37	546:322, 768:458	0,903	
RELA	rs11227247	65179429	97,50	0,743	0,13	750:126, 1108:160	0,237	
RELA	rs11568300	65181743	97,50	0,791	0,36	575:307, 810:454	0,597	
RELA	rs1466462	65175940	97,30	0,819	0,37	541:313, 801:485	0,619	
RELB	rs10424046	50227876	97,60	0,022	0,45	496:394, 686:580	0,478	
RELB	rs1560725	50235627	94,30	0,036	0,43	511:363, 675:535	0,223	
RELB	rs10856	50233254	96,30	0,371	0,07	822:54, 1151:101	0,097	
RELB	rs909134	50184901	95,80	0,573	0,34	572:300, 819:427	0,949	
RELB	rs9193	50188143	97,80	0,855	0,10	798:92, 1155:117	0,378	
RELB	rs2288918	50220639	94,20	0,000	0,34	576:278, 794:434	0,187	Discarded
TAX1BP	rs2051829	27639471	97,70	0,590	0,43	489:391, 732:530	0,263	
TAX1BP	rs1859328	27651317	96,80	0,681	0,23	662:204, 982:274	0,345	
TAX1BP	rs2237337	27552125	93,30	0,707	0,38	504:306, 763:473	0,823	
TAX1BP	rs3779472	27596483	92,90	0,787	0,07	786:56, 1103:91	0,405	
TAX1BP	rs2057998	27569761	96,10	0,845	0,22	665:199, 975:267	0,404	
TAX1BP	rs739900	27646925	97,40	0,856	0,07	805:61, 1174:96	0,654	
TAX1BP	rs2074769	27561733	17,30					Discarded
TAX1BP	rs7809260	27570900	98,50		0,00			Discarded
TAX1BP	rs1029604	27565196	98,40	0,998	0,15	747:135, 1079:195	1,000	
TAX1BP	rs11761430	27610598	66,10					Discarded

Supplementary Table 3:

Conditional logistic regression analysis of RA associated IKBKB SNPs in de discovery set.

SNP	OR and 95% CI conditional on rs17875732	OR and 95% CI of rs17875732 conditional on the indicated SNP
rs9694958	1.05 (0.7-1.6)	0.47 (0.3-0.8)
rs2272733	0.98 (0.6-1.6)	0.47 (0.25-0.9)
rs12676482	0.78 (0.4-1.7)	0.57 (0.3-1.0)
rs3136717	1.21 (0.7-1.8)	0.44 (0.2-0.8)

Supplementary Table 4:

Condicional logistic regression analysis of RA associated IKBKE SNPs in de discovery set.

SNP	OR and 95% CI conditional on SNP			
	rs17433909	rs2151222	rs17434047	rs3748022
rs17433909		0.35 (0.2-0.6)	0.47 (0.2-1.1)	0.35 (0.2-0.6)
rs2151222	1.3 (1.1-1.6)		1.30 (1.1-1.6)	1.14 (0.9-1.4)
rs17434047	0.74 (0.3-2.1)	0.34 (0.2-0.7)		0.32 (0.1-0.7)
rs3748022	1.37 (1.1-1.7)	1.13 (0.9-1.4)	1.34 (1.1-1.7)	

Supplementary Table 5:

Condiciona! logistic regression analysis of RA associated REL SNPs in de discovery set.

SNPs	OR and 95% CI conditional on rs6545835	OR and 95% CI of rs6545835 conditional on the indicated SNP
rs842647	1.15 (0.9-1.4)	0.79 (0.6-1.0)
rs3732179	0.85 (0.7-1.1)	0.80 (0.6-1.0)

Supplementary Table 6-1:

Comparison of allelic frequencies between the discovery and replication phase among the patients with RA and among the controls

Gene	SNP	RA patients			Controls		
		MAF % (n/N)*		p	MAF % (n/N)*		p
		discovery	replication		discovery	replication	
IKBKB	rs9694958	7.0	9.6	0.025	9.9	10.4	0.6
		(63/894)	(225/2354)		(128/1296)	(224/2154)	
	rs2272733	7.9	11.9	0.0013	12.5	12.9	0.7
		(70/884)	(268/2258)		(161/1292)	(270/2096)	
	rs12676482	2.7	4.4	0.026	5.7	4.1	0.034
		(24/892)	(103/2346)		(74/1292)	(89/2150)	
rs17875732	rs17875732	5.0	8.0	0.0041	9.1	8.3	0.4
		(40/806)	(182/2274)		(116/1268)	(175/2100)	
	rs3136717	8.0	11.9	0.0016	11.6	13.2	0.17
		(72/896)	(279/2348)		(147/1272)	(283/2150)	
IKBKE	rs17433909	1.6	3.8	0.0015	3.9	3.8	0.9
		(14/874)	(90/2354)		(48/1244)	(82/2156)	
	rs2151222	31.7	30.3	0.4	27.7	27.8	0.9
		(278/876)	(710/2342)		(355/1280)	(588/2112)	
	rs17434047	0.9	2.1	0.026	2.5	2.1	0.5
		(8/870)	(49/2356)		(30/1208)	(46/2154)	
rs3748022	rs3748022	25.2	23.4	0.3	21.0	21.2	0.9
		(220/874)	(541/2310)		(264/1258)	(451/2130)	
REL	rs6545835	22.1	22.7	0.8	27.0	24.2	0.08
		(165/746)	(513/2262)		(311/1152)	(499/2062)	
	rs3732179	25.5	26.0	0.8	21.8	24.6	0.06
		(225/882)	(610/2348)		(280/1284)	(525/2136)	

Supplementary Table 6-2:

Comparison of genotype frequencies between the discovery and replication phase among the patients with RA.

	Genotype Frequencies RA patients						P
	Discovery			Replication			
	A1A1	A1A2	A2A2	A1A1	A1A2	A2A2	
IKBKB							
rs9694958	86.8 (388/447)	12.3 (55/447)	0.9 (4/447)	81.7 (962/1177)	17.4 (205/1177)	0.8 (10/1177)	0.026
rs2272733	85.3 (377/442)	13.6 (60/442)	1.1 (5/442)	77.9 (879/1129)	20.5 (232/1129)	1.6 (18/1129)	0.002
rs12676482	94.6 (422/446)	5.4 (24/446)	0.0 (0/446)	91.4 (1072/1173)	8.4 (99/1173)	0.2 (2/1173)	0.027
rs17875732	90.6 (365/403)	8.9 (36/403)	0.5 (2/403)	84.9 (965/1137)	14.2 (162/1137)	0.9 (10/1137)	0.005
rs3136717	85.0 (381/448)	13.8 (62/448)	1.1 (5/448)	77.8 (913/1174)	20.7 (243/1174)	1.5 (18/1174)	0.002
IKBKE							
rs17433909	96.8 (423/437)	3.2 (14/437)	0.0 (0/437)	92.4 (1088/1177)	7.5 (88/1177)	0.1 (1/1177)	0.002
rs2151222	46.6 (204/438)	43.4 (190/438)	10.0 (44/438)	49.2 (576/1171)	41.0 (480/1171)	9.8 (115/1171)	0.4
rs17434047	98.2 (427/435)	1.8 (8/435)	0.0 (0/435)	95.8 (1129/1178)	4.2 (49/1178)	0.0 (0/1178)	0.029
rs3748022	57.2 (250/437)	35.2 (154/437)	7.6 (33/437)	59.4 (686/1155)	34.4 (397/1155)	6.2 (72/1155)	0.3
REL							
rs6545835	61.1 (228/373)	33.5 (125/373)	5.4 (20/373)	60.5 (684/1131)	33.7 (381/1131)	5.8 (66/1131)	0.7
rs3732179	56.5 (249/441)	36.1 (159/401)	7.5 (33/441)	56.3 (661/1174)	35.4 (416/1174)	8.3 (97/1174)	0.8

Supplementary Table 6-3:

Comparison of genotype frequencies between the discovery and replication phase among the controls.

	Genotype Frequencies Controls						P
	Discovery			Replication			
	A1A1	A1A2	A2A2	A1A1	A1A2	A2A2	
IKBKB							
rs9694958	81.5 (528/648)	17.3 (112/648)	1.2 (8/648)	80.5 (867/1077)	18.2 (196/1077)	1.3 (14/1077)	0.6
rs2272733	77.2 (499/646)	20.6 (133/646)	2.2 (14/646)	76.0 (796/1048)	22.3 (234/1048)	1.7 (18/1048)	0.7
rs12676482	88.7 (573/646)	11.1 (72/646)	0.2 (1/646)	91.8 (987/1075)	8.1 (87/1075)	0.1 (1/1075)	0.032
rs17875732	82.6 (524/634)	16.4 (104/634)	0.9 (6/634)	84.1 (883/1050)	15.1 (159/1050)	0.8 (8/1075)	0.4
rs3136717	78.8 (501/636)	19.3 (123/636)	1.9 (12/636)	75.5 (812/1075)	22.6 (243/1075)	1.9 (20/1075)	0.18
IKBKE							
rs17433909	92.3 (574/622)	7.7 (48/622)	0.0 (0/622)	92.8 (1000/1078)	6.9 (74/1078)	0.4 (4/1078)	0.9
rs2151222	51.7 (331/640)	41.1 (263/640)	7.2 (46/640)	51.1 (540/1056)	42.0 (444/1056)	6.8 (72/1056)	0.9
rs17434047	95.0 (574/604)	5.0 (30/604)	0.0 (0/604)	95.8 (1032/1077)	4.1 (44/1077)	0.1 (1/1077)	0.5
rs3748022	61.5 (387/629)	35.0 (220/629)	3.5 (22/629)	62.2 (662/1065)	33.3 (355/1065)	4.5 (48/1065)	0.9
REL							
rs6545835	53.6 (309/576)	38.7 (223/576)	7.6 (44/576)	58.0 (598/1031)	35.6 (367/1031)	6.4 (66/1031)	0.084
rs3732179	62.5 (401/642)	31.5 (202/642)	6.1 (39/642)	57.6 (615/1068)	35.7 (381/1068)	6.7 (72/1068)	0.071

TNFAIP3 y región intergénica 6q23

TNFAIP3, a Feedback Inhibitor of NFkappaB, and the Neighbour Intergenic 6q23 Region Contain Independent Genetic Factors for Rheumatoid Arthritis

Rebeca Dieguez-Gonzalez¹, Manuel Calaza¹, Eva Perez-Pampin¹, Alejandro Balsa², Francisco J. Blanco³, Juan D. Cañete⁴, Rafael Caliz⁵, Luis Carreño⁶, Arturo R. de la Serna⁷, Benjamin Fernandez-Gutierrez⁸, Ana Maria Ortiz⁹, Gabriel Herrero-Beaumont¹⁰, Jose Luis Pablos¹¹, Javier Narvaez¹², Federico Navarro¹³, Jose Luis Marengo¹⁴, Juan J Gomez-Reino^{1,15}, Antonio Gonzalez¹

¹ Laboratorio de Investigacion 2 and Rheumatology Unit. Hospital Clinico Universitario de Santiago. Santiago de Compostela. Spain

² Rheumatology Unit. Hospital La Paz. Madrid

³ Laboratorio de Investigación Osteoarticular y del Envejecimiento. Servicio de Reumatología. Hospital Universitario Juan Canalejo. A Coruña. Spain

⁴ Arthritis Unit, Rheumatology Department. Hospital Clinic. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer. Barcelona

⁵ Rheumatology Unit. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. Spain

⁶ Rheumatology Unit. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid

⁷ Rheumatology Unit. Hospital Santa Creu e San Pau. Barcelona

⁸ Rheumatology Unit. Hospital Clinico San Carlos. Madrid

⁹ Rheumatology Unit. Hospital Universitario La Princesa. Madrid

¹⁰ Rheumatology Unit. Fundación Jimenez Diaz. Madrid

¹¹ Rheumatology Unit. Hospital 12 de Octubre. Madrid

¹² Rheumatology Unit. Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona

¹³ Rheumatology Unit. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. Spain

¹⁴ Rheumatology Unit. Hospital Universitario de Valme. Sevilla. Spain

¹⁵ Department of Medicine. University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Corresponding author:

Antonio Gonzalez

Laboratorio de Investigacion 2

Hospital Clinico Universitario de Santiago

Travesia de Choupana sn.

15706-Santiago de Compostela

Spain

Tfn: 34 981 950 903

Fax: 34 981 951 068

Antonio.Gonzalez.Martinez.Pedrayo@sergas.es

anlugon@hotmail.com

Running title: TNFAIP3 and intergenic 6q23 in Rheumatoid Arthritis

Keywords: Genetic susceptibility, TNFAIP3, A20, Rheumatoid Arthritis, Candidate gene,
Whole Genome Association

ABSTRACT

Objectives: We aimed to examine if genetic variation in the TNFAIP3 gene, which encodes an important feedback inhibitor of TNF signaling through NF κ B, contributes to rheumatoid arthritis (RA) susceptibility. This possibility was suggested by the report in whole genome association studies (WGAS) of reproducible association of RA to SNPs in a 6q23 intergenic region that is flanked by TNFAIP3.

Methods: Samples from 1651 patients with RA and 1619 healthy controls of Spanish ancestry were analyzed. Genotypes were obtained for 12 tagSNPs in the 6q23 intergenic locus and 6 tagSNPs in the TNFAIP3 locus.

Results: Evidence of association was found both in the 6q23 intergenic region and in the TNFAIP3 locus. The rs582757 SNP and a common haplotype in the TNFAIP3 locus showed association to RA. Analysis of unreported data from a previous RA WGAS confirmed association at the TNFAIP3 locus. In the intergenic region, two SNPs were associated, rs609438 and rs13207033. The latter was only associated in ACPA+ patients. The previously reported rs6920220 SNP was not replicated though a trend to association with the same allele was observed ($P = 0.07$). Overall, statistical association was best explained by the independent contribution of SNPs from the two loci, TNFAIP3 and the 6q23 intergenic region.

Conclusion: Our data indicate that, like for SLE, there are several independent RA genetic factors in the 6q chromosome including polymorphisms in the TNFAIP3 gene, which is a clear functional candidate that has been neglected in RA research.

INTRODUCTION

RA etiology includes a genetic component that has become amenable to investigation in recent years. A major development has been the availability of large scale whole genome association studies (WGAS). They typically analyze 300 000 or more single nucleotide polymorphisms (SNPs) distributed all along the genome in each DNA sample. These studies are conducted in large collections of cases and controls. The first WGAS in RA have easily confirmed the two clearest RA genetic factors, in the HLA region and in the PTPN22 gene.[1-3] In addition, they have shown other areas of association. Some of them have already been confirmed in additional studies like the TRAF1-C5 locus and the intergenic region in the 6q23 chromosome.[2-5] Independently, association to STAT4 polymorphisms has been found and confirmed.[5-7]

One of the clearly confirmed RA genetic factors is in a region of chromosome 6q23 that is flanked at about 185 Kb to either side by the oligodendrocyte transcription factor 3 gene (OLIG3) and the tumor necrosis factor- α -induced protein 3 gene (TNFAIP3, also known as A20), but that does not contain any known protein coding sequence and lacks any evident functional consequence.[2, 4] Two SNPs in 6q23, rs6920220 and rs13207033 (or its perfect surrogate rs10499194), have shown peak association in an independent way.[2] This has been interpreted as indicative of multiple effects.[2] Given this complex pattern of association and the absence of a better candidate, we surmised the hypothesis that genetic variation in TNFAIP3 could explain association in the intergenic region of chromosome 6q23 (See Figure 1 for the positions of these two loci).

TNFAIP3 is an excellent candidate for such an effect because it is a feedback negative regulator of TNF signaling through Nf κ B.[8-10] To test our hypothesis and to relate the TNFAIP3 locus with the intergenic 6q23 region, we have genotyped tagSNPs in both loci. Analysis in 1651 RA patients and 1619 controls showed significant associations at each locus

that were statistically independent. These results support multiple RA genetic factors in chromosome 6q that include polymorphisms in the TNFAI3 gene. Similarly, multiple SLE genetic factors have just been reported in the same loci highlighting the importance of this region for immune-mediated diseases.[11, 12]

MATERIAL AND METHODS

DNA Samples: Recruitment of samples included in this study has already been described.[13] Samples were obtained from Caucasian Spanish RA patients, 1651, and healthy controls, 1619. All patients were according to the 1987 American College of Rheumatology criteria,[14] and their clinical characteristics are shown in Table 1. Participants granted their informed consent and the respective ethical committees approved the study.

SNP selection: Two regions were selected for analysis, one of 56 Kb centered on the TNFAIP3 gene, and a second of 65 Kb in the 6q23 intergenic region (Figure 1). Boundaries of the intergenic region were established on the recombination hot-spots at about 138.002 Mb and 138.067 Mb.[15] TagSNPs (Supplementary Table 1) were selected with the Haploview software[16] to cover with a pairwise $r^2 \geq 0.8$ all the SNPs with minor allele frequency over 0.05 (TNFAIP3 locus) or 0.1 (intergenic locus). TagSNPs of the intergenic region included the peak SNPs in previous studies rs6920220,[1] and rs13207033, that is a perfect proxy of rs10499194.[2]

SNP genotyping: PCRs were done with the Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, CA) on 30 ng of genomic DNA. PCR products were purified by Exo-SAP digestion with Exonuclease I (Epicentre, Madison, WI) and Shrimp Alkaline Phosphatase (GE Healthcare, Barcelona). Single-base extension reactions with the SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) were done. Oligonucleotide sequences are shown in Supplementary Table 1.

Statistical analysis: Hardy-Weinberg equilibrium concordance was tested in control samples. LD was analyzed with Haploview.[16] Chi squared tests for the 2 x 2 contingency tables were used to compare allele frequencies. Likelihood ratio tests for the additive, dominant and recessive genetic models were obtained relative to the codominant model. Multivariate logistic regression analysis was used to evaluate the conditional effect of the SNPs. Step-wise logistic regression was conducted to detect best multi-SNP models. Haplotypes were

estimated with the Phase 2.1 software.[17] Odds ratios (O.R.) for each haplotype were calculated taking as reference all chromosomes not bearing the haplotype. Combined analyses of our results with previously reported results,[1, 2, 4] and the freely available summary data from the RA WGA performed by the WTCCC (http://www.wtccc.org.uk/info/summary_stats.shtml) were done. For these analyses, we used the Mantel-Haenszel approach on allele frequencies and the Breslow-Day test for heterogeneity. If allele frequencies were unavailable, we used a fixed effect metaanalysis and the Cochran Q statistic for heterogeneity. A customized version of Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa OK) was used for analyses except metaanalysis that was done with R software (<http://www.R-project.org> <<http://www.r-project.org/>>) and statistical power that was estimated with the “Power and sample size calculations” software.[18]

RESULTS

TNFAIP3 locus

Six tagSNPs were enough to cover the TNFAIP3 gene and 20 Kb of flanking sequences to either side. Genotypes of these tagSNPs were obtained with a 99.1 % call rate and they were in HWE except for the rs629953 SNP, which was excluded from further analysis. Analysis of allele frequencies showed that the minor allele of the rs582757 SNP was significantly less frequent in RA patients than in controls (O.R. = 0.89; Table 2). Genotype frequency comparisons were similar (not shown). Estimation of the haplotype frequency distribution showed that only six haplotypes accounted for more than 98 % of all chromosomes in RA cases and controls (Table 3). The rs582757 minor allele was distributed in two haplotypes and none of them showed significant changes. However, the most common haplotype, which was defined by the major alleles of the five tagSNPs, was significantly more common in RA patients than in controls (haplotype #5 in Table 3). Multivariate analysis combining haplotype #5 and rs582757 SNP genotypes showed that any of them could account for the association with RA and that these two association signals were not independent (not shown). No significant change was detected by stratifying by gender (not shown) or by the presence of RF or ACPA (Supplementary Table 2).

Three of the tagSNPs we have studied were also analyzed in the WTCCC WGAS,[1] and we have combined the results (Table 2). For the rs582757 SNP, WTCCC results were almost identical to ours. Combined analysis showed a more significant difference with $p = 0.002$ (Table 4). Data from other SNPs included in the WTCCC WGAS suggest also that genetic variation in TNFAIP3 is associated to RA (Supplementary Table 3). One of these, rs11970411, showed the strongest association, but we did not find any difference between cases and controls in our study (Table 2). This discrepancy could be due to the significant difference in allele frequencies between the UK and Spanish controls at this SNP (7.7 vs 10.1

%, respectively).

6q23 intergenic locus

We have included 10 tagSNPs in addition to the two SNPs that have shown peak association in previous studies in the 6q23 intergenic locus.[1, 2, 4] Genotypes of these 12 SNPs were in HWE and showed a high call rate (99.0 %) in our samples. Comparison of allele frequencies showed no clear association to RA of any of these SNPs (Table 4). Association in the peak rs13207033 SNP was completely absent. The rs6920220 SNP showed a trend ($P = 0.07$) in the same direction that has been reported.[1, 2, 4] Only the rs609438 SNP showed a P value that was just below 0.05 (Table 4). The difference was more marked when only women were considered (44.5 vs. 48.9 % in RA patients and controls, respectively; $OR = 0.84$; 95 % $CI = 0.7-1.0$; $P = 0.006$). Genotypes of this SNP were best fitted by a dominant model and analysis according to this model showed a clearer difference between RA patients and controls (frequencies of CA + AA genotypes = 68.4 % in patients vs. 72.7 % in controls; $OR = 0.81$; 95 % $CI = 0.70-0.95$; $P = 0.008$); difference that was further accentuated in women (frequencies of CA + AA genotypes = 66.8 % in patients vs. 74.0 % in controls; $OR = 0.71$; 95 % $CI = 0.58-0.86$; $P = 0.0006$). Genotype analyses of all other SNPs were very similar to allele frequency comparisons, and no differences were found by gender stratification (not shown).

Association of the rs6920220 SNP to RA has previously been reported to be stronger in ACPA+ or RF+ patients than in the ACPA- or RF- subgroup.[4] However, we did not detect any significant difference between these patient subgroups (Table 5 and Supplementary Table 2). In contrast, we found that the rs13207033 SNP was associated to RA only in the ACPA+ patients. Other three SNPs showed significant association exclusively in ACPA+ patients (Table 5). Conditional logistic regression of these 4 SNPs, taken two by two, was unable to distinguish between them (not shown).

Haplotype analysis of the 12 tagSNPs in this locus did not show any significant association (Supplementary Table 4A). Also, no significant difference was detected in haplotype frequencies between ACPA+ patients with RA and controls. However, this analysis suggested a more specific role of the rs13207033 SNP than of the other 3 SNPs showing association in this subpopulation of RA patients (Supplementary Table 4B).

Combination of our results with the obtained in previous studies almost did not change the global effect size (OR) and level of significance of the rs6920220 SNP (Table 4). The rs13207033 SNP showed significant heterogeneity between previous results ($P_{\text{hetero.}} = 0.005$) that was made worse after incorporating our results ($P_{\text{hetero.}} = 0.0002$) (Table 4). Heterogeneity was reduced when only data from ACPA+ patients were combined ($P_{\text{hetero.}} = 0.07$; no WTCCC data available for this analysis) and the association was stronger (O.R. = 0.76, 95 % CI = 0.7-0.8; $p < 0.0001$). Therefore, it seems likely that this SNP has an effect restricted to the ACPA+ subgroup of patients as suggested by our results.

Statistical independence between the 6q23 intergenic and the TNFAIP3 loci

Our results showed evidence of association to RA both in the TNFAIP3 and the 6q23 intergenic loci. We examined the statistical relationship between these two association signals in two ways that provided concordant evidence of their independence. First, SNPs from the two loci were not in LD (all values of $r^2 < 0.07$ in our samples). However, lack of pairwise correlation does not exclude complex interdependence between the loci. To explore more complex relationships, we used step-wise logistic regression with the 17 SNPs. This unsupervised multivariate process was run both in a forward and in a backward mode. That is, it was run starting with the most associated SNP and adding a SNP in each step until the model is not longer improved, or starting with a model incorporating all SNPs and eliminating the less associated in each step until the model deteriorates. The forward process yielded a best model combining the rs6920220 SNP from the intergenic region and the rs582757 SNP

from the TNFAIP3 locus ($P = 0.009$). The two SNPs were significantly associated conditional on the other ($P = 0.027$ and $P = 0.013$, respectively). The backward step-wise procedure yielded a best model with three SNPs ($P = 0.009$), two of the intergenic region, rs13207033 and rs609438, and the rs582757 SNP from the TNFAIP3 gene. Each showed a significant contribution to RA conditional in the other two ($P = 0.046$, $P = 0.019$ and $P = 0.007$, respectively). Therefore, the two procedures showed that the best models differentiating cases and controls include SNPs from the two loci and suggested interactions between them.

DISCUSSION

Association of RA susceptibility to SNPs in the intergenic region of chromosome 6q23 has placed a strong interest in a locus that by its lack of coding sequences is especially difficult to investigate.[1, 2, 4] This was our motivation to study the clearest candidate among the genes flanking this locus, TNFAIP3.

TagSNPs in the TNFAIP3 locus showed weak association to RA that could be explained either by the rs582757 tagSNP or by the commonest haplotype. Confidence in this association was greatly increased by the realization that in the freely available summary statistics from the WTCCC WGAS,[1] which studied 1.860 rheumatoid arthritis cases and 2.938 healthy controls, there was clear association to RA at this locus (Supplementary Table 3). This provided independent confirmation of our results. It is noteworthy that a TNFAIP3 SNP with strong correlation ($r^2 > 0.9$) with the rs582757 SNP has been found associated to coronary artery disease in type 2 diabetes and to reduced expression of TNFAIP3,[19] which suggests that this SNP is tagging a functional regulatory variant in this gene.

In relation with the 6q23 intergenic region, we found evidence of association to a not previously reported SNP, rs609438, and replication of association with the rs13207033 SNP. This latter was observed only in ACPA+ patients. This suggests that the effect of the genetic factor tagged by this SNP is restricted to ACPA+ subjects. Conclusion that is supported by previous reports because the rs13207033 (or rs10499194) association was much clearer in the Plenge study ($P = 4 \times 10^{-7}$),[2] where all RA patients were ACPA+, than in the WTCCC WGAS ($P = 0.01$),[1] where the patients were unselected. The rs609438 association was preferential in women and followed a dominant genetic model, but these results should be taken with caution given the complexity of RA association signals in the region and the lack of consistency between reports. A specific example of this is the lack of association of

rs6920220 to RA in our samples, although our results were in the same direction as the previously reported. This lack of association was not due to lack of power (that was 0.8 for a P value of 0.01 and O.R. = 1.23) but to a weaker effect of the rs6920220 SNP (OR = 1.12) than in previous studies.[1, 2, 4] Such a difference in effect size is not surprising and examples have been found in confirmed RA genetic factors as STAT4 and TRAF1-C5.[5]

Our initial hypothesis was that polymorphisms in TNFAIP3 could cause the association found in the intergenic 6q23 locus. However, multivariate logistic analyses showed that contribution to RA by polymorphisms in the two loci were independent. This is exactly the type of results reported by two SLE recent studies.[11, 12] In these large and comprehensive SLE studies, strong evidence of multiple independent genetic factors in the region including the TNFAIP3 gene is presented. At least three independent association signals are detected in each of the studies. Therefore, it seems that this region contains multiple genetic factors shared by RA and SLE and, possibly, by other immune-mediated diseases.

Our data do not allow us to define further the specific effects of the multiple factors. This task is going to be complicated by discrepancies between studies. Apart from the already mentioned in relation to RA, there was also heterogeneity for rs13207033 association among the cohorts from the Plenge study because Swedish patients did not show association, whereas it was clear in two sets of European-American samples.[2] In addition, the specific SNPs involved in each of the two SLE studies were contradictory.[11, 12] We think that differences in the phenotype of patients could be an important factor behind these discordances. As mentioned, some association signals seem dependent on the ACPA status or the sex of RA patients. Also, population heterogeneity and interaction between genetic factors in the region could play a role.

No known functional element maps in the intergenic 6q23 region. Conversely, TNFAIP3 is a

clear candidate for a role in RA by its anti-inflammatory role. TNFAIP3 is involved in many regulatory feedback loops through the cooperative activity of its two ubiquitin-editing domains and interaction with other proteins like ABIN-1, TAX1BP1 and Itch.[9, 20, 21] Its protein levels are drastically increased upon NFkappaB stimulation by a variety of stimuli including TNF, and IL1. [9, 10] Inhibition of NFkappaB activity takes place at multiple levels. A generic inhibitory effect of the canonical NFkappaB signalling pathway is by ubiquitinating IKKgamma for proteosomal degradation.[20] In addition, TNFAIP3 negatively regulates several specific pathways leading to NFkappaB activation by particular stimuli. Of special relevance for RA is its action on the TNF receptor-interacting protein (RIP), which is also marked for proteosomal degradation, inhibiting TNF signaling.[22] Although TNFAIP3 has not been specifically studied in RA, it could be particularly involved in the response to TNF antagonists or in cardiovascular risk. This has been already suggested in recent reports indicating that early changes in TNFAIP3 levels after anti-TNF treatment predict the long term response of the patient,[23] and that polymorphisms in this gene are associated to cardiovascular risk in type 2 diabetes.[19] Therefore, it seems likely that polymorphisms reducing TNFAIP3 expression or function will favour exaggerated and uncontrolled inflammatory responses contributing to RA development and expression.

In conclusion, there were clear indications of RA association with two neighbour loci, the intergenic 6q23 region and the TNFAIP3 gene, especially after previous unreported data were considered. Also, similar results have been reported in relation with SLE susceptibility. Some of the specific association signals are discordant between studies, probably by differences between disease subphenotypes, but also possibly by interaction between the different factors or heterogeneity between populations. This is clearer in RA for the genetic factor tagged by the rs13207033 SNP that predominated in ACPA+ patients. Genetic variation in TNFAIP3 will affect RA liability by altering its function in preventing excessive inflammatory

responses after TNF signaling via NFkappaB. Investigation of the region should pursue with increased interest given its likely involvement in multiple diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cristina Fernandez-Lopez for her excellent technical assistance. This project was supported by grant PI04/1513 from the Instituto de Salud Carlos III (Spain) with participation of funds from FEDER (European Union).

REFERENCES

1. . Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;**447**:661-78
2. Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J *et al*. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2007;**39**:1477-82
3. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B *et al*. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med*. 2007;**357**:1199-209
4. Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J *et al*. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet*. 2007;**39**:1431-3
5. Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J *et al*. Re-evaluation of putative rheumatoid arthritis susceptibility genes in the post-genome wide association study era and hypothesis of a key pathway underlying susceptibility. *Hum Mol Genet*. 2008;**17**:2274-9

6. Lee HS, Remmers EF, Le JM, Kastner DL, Bae SC, Gregersen PK *et al.* Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population. *Mol Med.* 2007;**13**:455-60
7. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007;**357**:977-86
8. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP *et al.* Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science.* 2000;**289**:2350-4
9. Heyninck K, Beyaert R. A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci.* 2005;**30**:1-4
10. Beyaert R, Heyninck K, Van Huffel S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2000;**60**:1143-51
11. Graham RR, Cotsapas C, Davies L, Hackett R, Lessard CJ, Leon JM *et al.* Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2008;**40**:1059-61
12. Musone SL, Taylor KE, Lu TT, Nititham J, Ferreira RC, Ortmann W *et al.* Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2008;**40**:1062-4
13. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Perez-Pampin E, Costas J, Torres M *et al.* Genetic variation in the NFkappaB pathway in relation to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 (in press)
14. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;**31**:315-24

15. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL , Gibbs RA *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007;**449**:851-61
16. Barrett JC, Fry B, Maller J , Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005;**21**:263-5
17. Stephens M, Smith NJ , Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001;**68**:978-89
18. Dupont WD , Plummer WD Jr. Power and sample size calculations. A review and computer program. *Control Clin Trials.* 1990;**11**:116-28
19. Boonyasrisawat W, Eberle D, Bacci S, Zhang YY, Nolan D , Gervino EV *et al.* Tag polymorphisms at the A20 (TNFAIP3) locus are associated with lower gene expression and increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2007;**56**:499-505
20. Mauro C, Pacifico F, Lavorgna A, Mellone S, Iannetti A , Acquaviva R *et al.* ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB. *J Biol Chem.* 2006;**281**:18482-8
21. Shembade N, Harhaj NS, Parvatiyar K, Copeland NG, Jenkins NA , Matesic LE *et al.* The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol.* 2008;**9**:254-62
22. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L , Seshagiri S *et al.* De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature.* 2004;**430**:694-9
23. Koczan D, Drynda S, Hecker M, Drynda A, Guthke R , Kekow J *et al.* Molecular discrimination of responders and non-responders to anti-TNF-alpha therapy in rheumatoid arthritis by etanercept. *Arthritis Res Ther.* 2008;**10**:R50

Table 1: Clinical characteristics of the 1651 patients with RA that were included in the study

Clinical characteristics	
Female (%)	75
Age of disease onset (median, IQR)	48 (37-57)
Morning stiffness (%)	96.0
Arthritis ≥ 3 joint areas (%)	99.7
Arthritis of hand joints (%)	99.3
Symmetric arthritis (%)	99.0
Rheumatoid nodules (%)	20.3
Rheumatoid factor (%)	72.6
Erosions (%)	70.5
S. Sicca (%)	8.8
Interstitial pneumonitis (%)	2.8
ACPA+ (%) [*]	67.2

^{*} Data were only available for 574 RA patients.

Table 2: Comparison of the allele frequencies in the tagSNPs covering variability in the TNFAIP3 gene between patients with RA and controls. Data are presented for all valid tagSNPs in our study and for the SNPs available in the WTCCC WGAS.[1] as well as a combined analysis of our results with all previous data.

SNP	Current study			WTCCC WGAS ^b			Combined		
	MAF % (n/N) ^a	OR (95% CI)	P	MAF % (n/N)	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	P _{Hetero}
rs600144									
RA	25.9 (850/3278)	0.96 (0.91-1)	ns						
CRL	26.8 (857/3202)								
rs11970361									
RA	5.7 (187/3300)	0.94 (0.8-1.2)	ns						
CRL	6.0 (194/3238)								
rs11970411									
RA	10.2 (338/3300)	1.01 (0.9-1.2)	ns	10.7 (396/3702)	1.43 (1.24-1.65)	7.4x10 ⁻⁷	1.23 (1.10-1.36)	0.0002	0.002
CRL	10.1 (328/3238)			7.7 (449/5806)					
rs582757									
RA	24.8 (816/3286)	0.89 (0.8-0.99)	0.041	25.0 (929/3718)	0.90 (0.82-0.98)	0.02	0.89 (0.83-0.96)	0.002	ns
CRL	27.0 (871/3220)			27.1 (1593/5876)					
rs17780429									
RA	12.7 (418/3300)	0.91 (0.8-1.0)	ns	13.8 (512/3716)	0.92 (0.82-1.03)	0.15	0.91 (0.83-1.00)	0.05	ns
CRL	13.8 (446/3236)			14.8 (871/5870)					

^a MAF = minor allele frequency, n = number of minor alleles, N = total number of alleles.

^b Data from the WTCCC WGAS (1,860 RA cases and 2,938 controls).[1] It was combined to our data with the Mantel-Hanszel approach. Heterogeneity assessed with the Breslow-Day test.

Table 3: Distribution of estimated haplotype frequencies in the TNFAIP3 locus for controls and patients with RA. The minor allele of each tagSNP is in bold. Haplotypes with frequency over 2% are shown, ordered by the OR comparing RA patients with controls

haplo #	rs600144	rs11970361	rs11970411	rs582757	rs17780429	CONTROLS		RA patients		OR (95% C.I.)
						n	%	n	%	
1	T	C	G	C	A	427	13.2	399	12.1	0.92 (0.79-1.06)
2	T	T	C	T	G	185	5.7	175	5.3	0.93 (0.76-1.16)
3	T	C	G	C	G	443	13.7	420	12.7	0.93 (0.81-1.07)
4	C	C	G	T	G	849	26.2	843	25.5	0.98 (0.88-1.09)
5	T	C	G	C	G	1159	35.8	1271	38.5	1.14 (1.03-1.26)
6	T	C	C	C	G	141	4.4	162	4.9	1.15 (0.91-1.44)

Table 4: Comparison of the allele frequencies in the 12 tagSNPs covering variability in the intergenic 6q23 region between patients with RA and controls. Data are presented for all tagSNPs in our study and for the SNPs available in previous studies, as well as a combined analysis of our results with all previous data.

SNP	Current study			Previous reports			Combined		
	MAF % (n/N) ^a	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	P _{hetero.}	OR (95% CI)	P	P _{hetero.}
rs566097									
RA	11.4 (364/3198)	0.99	ns	1.12 ^b	ns	NA	1.06	ns	ns
CRL	11.5 (367/3182)	(0.8-1.1)		(1.0-1.3)			(1.0-1.2)		
rs13207033									
RA	29.3 (897/3062)	0.98	ns	0.78 ^c	0.0003	0.005	0.81	0.002	0.0002
CRL	29.7 (914/3082)	(0.9-1.1)		(0.7-0.9)			(0.7-0.9)		
rs489738									
RA	17.7 (559/3164)	0.94	ns						
CRL	18.6 (586/3158)	(0.8-1.1)							
rs12194935									
RA	23.0 (726/3160)	1.00	ns						
CRL	23.0 (726/3154)	(0.9-1.1)							
rs536331									
RA	42.1 (1345/3194)	0.99	ns						
CRL	42.5 (1351/3182)	(0.9-1.1)							
rs675520									
RA	48.6 (1507/3104)	0.96	ns						
CRL	49.5 (1520/3070)	(0.9-1.1)							
rs6920220									
RA	22.0 (703/3200)	1.12	0.07	1.23 ^d	9.4x10 ⁻¹³	ns	1.21	5.7x10 ⁻¹³	ns
CRL	20.1 (639/3178)	(1.0-1.3)		(1.2-1.3)			(1.1-1.3)		
rs694069									
RA	39.0 (1244/3188)	0.96	ns						
CRL	40.0 (1273/3180)	(0.9-1.1)							
rs6917441									
RA	24.9 (790/3178)	0.95	ns						
CRL	25.8 (816/3164)	(0.9-1.1)							
rs647108									
RA	39.7 (1265/3188)	0.95	ns						
CRL	40.9 (1301/3178)	(0.9-1.0)							
rs9321627									
RA	22.7 (728/3202)	0.96	ns						
CRL	23.5 (749/3186)	(0.9-1.1)							
rs609438									
RA	45.1 (1436/3182)	0.91	0.047						
CRL	47.6 (1513/3178)	(0.8-1.0)							

^a MAF = minor allele frequency, n = number of minor alleles, N = total number of alleles.

^b Data from the WTCCC WGAS (1.860 RA cases and 2.938 controls).[1] It was combined to our data with the Mantel-Hanszel approach. Heterogeneity assessed with the Breslow-Day test.

^c Data from the WTCCC WGAS and the 4 sample collections in Plenge et al. combined with fixed effect metaanalysis (4540 RA patients and 7407 controls).[2] Heterogeneity assessed with the Cochran Q test.

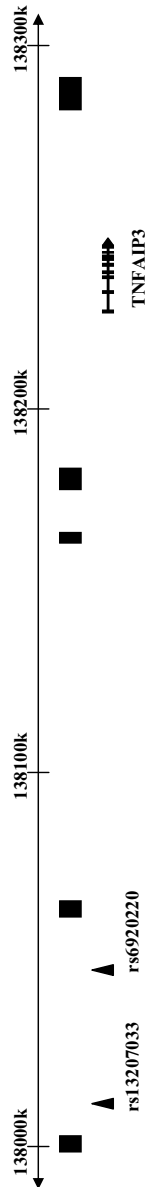
^d Data from the WTCCC WGAS,[1] and from Thomson et al. [4] combined with the Mantel-Hanszel approach (6923 RA cases and 6787 controls). Heterogeneity assessed with the Breslow-Day test.

Table 5: Allele frequency differences in tagSNP of the intergenic 6q23 region between RA ACPA+ patients and controls

SNP	MAF % (n/N) ^a	OR (95%CI)	P
rs566097			
RA ACPA+	10.9 (84/772)	0.94 (0.7-1.2)	ns
CRL	11.5 (367/3190)		
rs13207033			
RA ACPA+	25.1 (185/736)	0.80 (0.66-0.96)	0.015
CRL	29.7 (914/3082)		
rs489738			
RA ACPA+	18.2 (138/760)	0.97 (0.8-1.2)	ns
CRL	18.6 (586/3158)		
rs12194935			
RA ACPA+	26.1 (198/758)	1.18 (1.0-1.4)	ns
CRL	23.0 (726/3154)		
rs536331			
RA ACPA+	37.9 (292/770)	0.83 (0.71-0.97)	0.023
CRL	42.4 (1351/3184)		
rs675520			
RA ACPA+	44.5 (334/750)	0.82 (0.70-0.96)	0.014
CRL	49.5 (1520/3070)		
rs6920220			
RA ACPA+	22.3 (172/770)	1.15 (0.95-1.39)	ns
CRL	20.1 (639/3184)		
rs694069			
RA ACPA+	35.5 (273/770)	0.82 (0.70-0.97)	0.019
CRL	40.1 (1276/3186)		
rs6917441			
RA ACPA+	27.9 (212/760)	1.11 (0.9-1.3)	ns
CRL	25.8 (816/3166)		
rs647108			
RA ACPA+	41.9 (321/766)	1.04 (0.9-1.2)	ns
CRL	41.0 (1306/3184)		

^a MAF = minor allele frequency, n = number of minor alleles, N = total number of alleles.

Figure 1: Map of the studied region in chromosome 6q. Recombination hot-spots from the HapMap CEU data are represented as black squares below the rule with physical distances along the chromosome in Kb. The positions of the two RA associated peak SNPs from previous studies (rs13207033 and rs6920220) are marked by arrow-heads. Position of the TNFAIP3 gene and its structure are shown.



IRF5 en AR

Association of Interferon Regulatory Factor 5 Haplotypes, Similar to That Found in Systemic Lupus Erythematosus, in a Large Subgroup of Patients With Rheumatoid Arthritis

Rebeca Dieguez-Gonzalez,¹ Manuel Calaza,¹ Eva Perez-Pampin,¹ Arturo Rodriguez de la Serna,² Benjamin Fernandez-Gutierrez,² Santos Castañeda,⁴ Raquel Largo,⁵ Beatriz Joven,⁶ Javier Narvaez,⁷ Federico Navarro,⁸ Jose Luis Marengo,⁹ Jose Luis Vicario,¹⁰ Francisco J. Blanco,¹¹ Jesus Carlos Fernandez-Lopez,¹¹ Rafael Caliz,¹² María Dolores Collado-Escobar,¹² Luis Carreño,¹³ Javier Lopez-Longo,¹³ Juan D. Cañete,¹⁴ Juan J. Gomez-Reino,¹⁵ and Antonio Gonzalez¹

Objective. Previous studies have shown either a lack of effect of IRF5 polymorphisms or an association of the IRF5 gene in only a minor subset of rheumatoid arthritis (RA) patients in whom anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs) are absent. The present study

was undertaken to investigate the role of genetic variation in IRF5 in susceptibility to RA.

Methods. Nine IRF5 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were studied in 1,338 patients with RA and 1,342 control subjects in analyses of exploratory and replication sample collections, with stratification according to sex and by the presence or absence of ACPAs, rheumatoid factor, the shared epitope, the 620W PTPN22 allele, and erosions. A meta-analysis that included results from previous studies was also carried out.

Results. Our findings together with those from previous studies, in a total of 4,620 RA patients and 3,741 controls, showed a significant association of the rs2004640 IRF5 SNP in RA patients as a whole (odds ratio [OR] 0.88, 95% confidence interval [95% CI] 0.83–0.94; $P = 6.5 \times 10^{-5}$ versus controls). This association was stronger in ACPA– patients, but was also present in ACPA+ patients (from 3 sample collections). Further analysis of our exploratory sample collection showed that only patients in the ACPA+ and SE– group lacked an association with IRF5 SNPs. All of the remaining RA patients (ACPA– or SE+) showed a strong association with IRF5 SNPs, which followed a complex pattern of opposing effects mediated by independent haplotypes. The susceptibility haplotype showed an OR of 1.8 (95% CI 1.4–2.3; $P = 1.2 \times 10^{-6}$ versus controls), whereas the protective haplotype showed an OR of 0.76 (95% CI 0.6–0.98; $P = 0.046$ versus controls).

Conclusion. IRF5 polymorphisms seem to influence RA susceptibility in a large subgroup of patients, following a pattern of association very similar to that described in patients with systemic lupus erythematosus.

Supported by grants PI04/1513 and PI06/0620 from the Instituto de Salud Carlos III (Spain), with participating funds from FEDER (European Union), by a grant from the Consellería de Educación, Xunta de Galicia (Spain), and by an unrestricted grant from Roche, Spain.

¹Rebeca Dieguez-Gonzalez, MSc, Manuel Calaza, MSc, Eva Perez-Pampin, MD, Antonio Gonzalez, MD, PhD: Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela; ²Arturo Rodriguez de la Serna, MD: Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; ³Benjamin Fernandez-Gutierrez, MD, PhD: Hospital Clínico San Carlos, Madrid; ⁴Santos Castañeda, MD, PhD: Hospital Universitario de la Princesa, Madrid; ⁵Raquel Largo, PhD: Fundación Jiménez Díaz, Madrid; ⁶Beatriz Joven, MD: Hospital 12 de Octubre, Madrid; ⁷Javier Narvaez, MD: Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona; ⁸Federico Navarro, MD, PhD: Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville; ⁹Jose Luis Marengo, MD: Hospital Universitario de Valme, Seville; ¹⁰Jose Luis Vicario, MD: Regional Transfusion Center, Madrid; ¹¹Francisco J. Blanco, MD, Jesus Carlos Fernandez-Lopez, MD: Hospital Universitario Juan Canalejo, Coruña; ¹²Rafael Caliz, MD, María Dolores Collado-Escobar, PhD: Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada; ¹³Luis Carreño, MD, PhD, Javier Lopez-Longo, MD, PhD: Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid; ¹⁴Juan D. Cañete, MD, PhD: Hospital Clinic de Barcelona, and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer, Barcelona; ¹⁵Juan J. Gomez-Reino, MD, PhD: Hospital Clínico Universitario de Santiago, and University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Address correspondence and reprint requests to Antonio Gonzalez, MD, PhD, Laboratorio de Investigación 2, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Travesía de Choupana sn, 15706 Santiago de Compostela, Spain. E-mail: Antonio.Gonzalez.Martinez.Pedrayo@sergas.es.

Submitted for publication October 18, 2007; accepted in revised form January 28, 2008.

The genetic component in the etiology of rheumatoid arthritis (RA) accounts for ~50% of variability in disease susceptibility (1). Approximately 40% of the variability is attributable to genetic factors residing in the HLA region and in the PTPN22 gene. The variations linked to the HLA region are largely dependent on a group of HLA-DRB1 alleles that share a common motif in the third hypervariable sequence, important in peptide binding, known as the shared epitope (SE). The SE determines a higher susceptibility to RA and greater disease severity, with an increased incidence of bone erosions (2) and earlier disease onset (3).

The effect of the SE is restricted to a subset of RA patients with anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs) (4). These are autoantibodies directed to citrulline-containing peptide antigens (neoantigens that appear by posttranscriptional deimination of arginine) that seem to be involved in the RA etiologic process (5). The pathogenic relationship between HLA-DRB1 alleles and ACPAs is still incompletely understood, although tobacco smoking is thought to be involved (6).

Another genetic factor considered to be of importance in susceptibility to RA is a change of amino acid in the lymphocyte phosphatase Lyp, encoded by the PTPN22 gene (7). Several other genetic factors have been proposed, particularly in recent large-scale studies such as the whole-genome association studies (WGAS) (8,9); however, the results of these studies will require replication and further investigation of the functional consequences.

The recent discovery of genetic variation in IRF5 as a major factor in susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE) (10) has prompted the investigation of its possible role in RA. The IRF5 gene codes for a transcription factor that induces expression of many type 1 interferon (IFN)-regulated genes and of type 1 IFNs themselves (11). Activation of this transcription factor is triggered by signals from Toll-like receptors (TLRs), mainly by the endosomal TLR-7/8 and TLR-9 (12,13). There is only scant evidence to indicate a relationship between IRF5 or type 1 IFNs and RA. For example, studies have shown the development of inflammatory arthritis in association with type 1 IFN treatment, although this occurs only rarely (14). There is also increased expression of IFN β (15) and increased numbers of plasmacytoid dendritic cells, the main source of type 1 IFNs, in the synovia and synovial fluid of RA patients (16).

Microarray analysis of gene expression in RA peripheral blood has shown an interferon signature (overexpression of genes regulated by type 1 IFNs) in a

subset of RA patients (17). These findings, together with the involvement in RA of many cytokines and chemokines that are under type 1 IFN and IRF5 regulation, could be interpreted as meaning that these factors are proinflammatory in RA. However, experiments in animal models of arthritis have shown that IFN β can be protective (18). Nevertheless, a clinical trial involving treatment with IFN β showed no improvement of RA and the absence of changes in sequential synovial biopsy samples (19). Therefore, although there is evidence suggesting that type 1 IFNs can be important in RA, it is still unclear whether they play a proinflammatory or antiinflammatory role. In addition, results from exploration of IRF5 polymorphisms in RA susceptibility have been unclear, since 2 studies have shown a lack of association (20,21), whereas another study indicated a positive association, but only preferentially in a minor subset of RA patients in whom ACPAs were absent (22).

In contrast, in patients with SLE, type 1 IFNs clearly contribute to disease activity and damage (23). Moreover, IRF5 genetic variation has been found to be strongly associated with SLE susceptibility in studies performed in Caucasian and Asian populations (10,24–31). The underlying genetic structure of this association is complex. The associations include both an association with disease susceptibility and an association with protective components, and at least 3 polymorphisms are known to be involved. One of these single-nucleotide polymorphisms (SNPs), rs10954213, affects IRF5 messenger RNA (mRNA) stability by changing the length of the RNA polyadenylation tail (26,27). A second SNP, rs2004640, creates a donor splice site that is necessary for expression of IRF5 exon 1B (1 of the 3 possible first exons) (25,28). A third polymorphism is an insertion/deletion that modifies, in 10 amino acids, the length of a proline-rich sequence corresponding to 30 nucleotides in exon 6 (27,28) and has unknown consequences.

According to one point of view, these 3 polymorphisms jointly modulate the susceptibility to SLE (27) on 3 different levels: susceptible, neutral, and protective. We have obtained slightly different data in our patients with SLE, which led us to propose that the 3 known functional polymorphisms determine susceptibility to SLE by epistatic interaction, but that protection is conferred independent of these polymorphisms, implying that there are other, as yet unidentified polymorphisms involved (31). These 2 models are largely concordant, and therefore are difficult to distinguish without additional functional or genetic evidence.

In the present study, we explored 9 IRF5 polymorphisms, specifically including the 3 known functional

polymorphisms, in 2 collections of RA samples from Spain, and we combined the results with those reported in previous studies. We found an association of IRF5 with RA as a whole, and observed that this association was stronger in the minor subgroup of ACPA- patients, but also present in ACPA+ patients. Furthermore, our results showed that classification of RA patients according to 2 criteria, ACPA status and SE status, allowed separation of a minor subgroup of RA patients characterized by a lack of association with IRF5 (IRF5-independent) from the larger fraction of RA patients in whom an IRF5 association is evident (IRF5-associated). The genetic structure of this association in RA is very similar to that observed in patients with SLE.

PATIENTS AND METHODS

Samples. An exploratory collection of DNA samples and a replication set of DNA samples were obtained from Spanish Caucasian patients with RA and Spanish healthy control subjects. All patients met the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) 1987 criteria for RA (32), and all patients and controls granted their informed consent to participate in the study. The Ethics Committee for Clinical Research of Galicia approved the study. The exploratory sample collection was from the Hospital Clínico Universitario de Santiago and included 516 patients and 503 controls. Samples in the replication collection were obtained from 11 tertiary-level hospitals from 5 provinces of Spain and included 822 patients and 839 controls. The clinical characteristics of the patients are listed in Table 1. In some analyses we also included data from 313

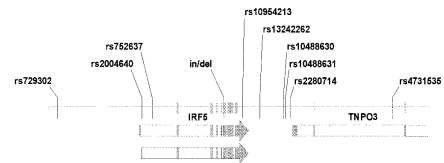


Figure 1. Genotyped single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IRF5 locus. The full genomic area (42 kb) was covered to select tagSNPs. The IRF5 and TNPO3 exons are shown as boxed areas on the sequence. Transcripts are shown below these areas. The 2 transcripts of IRF5 included in the RefSeq database are shown. The insertion/deletion (in/del) in exon 6 was not genotyped, because it was tagged by SNP rs4731535.

healthy Spanish control subjects from our previous study of patients with SLE (31).

SNP genotyping. Nine IRF5 SNPs (Figure 1) were selected and studied as described previously (31). Eight of the SNPs were tagSNPs, which were selected to cover variability in the IRF5 gene and its neighboring sequences. These tagSNPs included the rs2004640 functional SNP. In addition, the functional SNP rs10954213 was included. The insertion/deletion polymorphism in exon 6 was not genotyped because it has been closely correlated with the rs4731535 SNP in the Spanish population, at an r^2 of 0.93.

The 9 SNPs were amplified in a single polymerase chain reaction (PCR) (Qiagen Multiplex PCR kit; Qiagen, Chatsworth, CA) and the products were included in a single-base extension reaction with the SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Products of this reaction were analyzed in the ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). (Detailed information on the sequences of the primers and oligonucleotides used are available on the author's Web site, at <http://bioinformatics.cesga.es/supmat/>.)

Clinical subgroup definition. The presence of ACPAs was ascertained in RA patients from the exploratory group by serum enzyme-linked immunosorbent assay (EDIA ACPA Kit; Euro-Diagnostica, Arnhem, The Netherlands). The cutoff level for ACPA positivity was set at 5 units/ml, in accordance with the manufacturer's instructions. Rheumatoid factor (RF) was determined in the patients' sera by rate nephelometry (IMMAGE Immunochemistry System; Beckman Coulter, Fullerton, CA).

HLA-DRB1 analysis was performed using a sequencing-based typing (SBT) method with the AlleleSEQR HLA-DRB1 Typing Kit (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL), which includes a single PCR amplification for all alleles of the second exon of DRB1 and bidirectional sequencing. Alleles were assigned using the Assign-SBT software version 3.2.7 (Abbott Diagnostics). Samples with ambiguous typing were additionally sequenced with group-specific primers (AlleleSEQR HLA-DRB1 GSSP; Abbott Diagnostics). The SE was defined as any of the following alleles: *0401, *0404, *0405, *0408, *0101, *0102, *1001, and *1402. The rs2476601 SNP of PTPN22 was genotyped with TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems). Primers and fluorescence-labeled probes were designed and synthesized by Applied Biosystems.

Table 1. Clinical characteristics of the RA patients in the 2 phases of the study*

Clinical characteristic	Exploratory	Replication	P
Female	77.3	74.6	—
Age at disease onset, median (IQR)	49 (37–57)	47 (37–57)	NS
Rheumatoid nodules	12.0	17.3	0.04
Rheumatoid factor positive	60.1	76.1	3.6×10^{-9}
Erosions	68.1	63.8	NS
Sicca syndrome	9.6	8.1	NS
Interstitial pneumonitis	2.8	2.6	NS
Shared epitope carrier	53.7	—	—
ACPA positive	67.7	—	—
PTPN22 620W carrier	14.1	—	—

* Except where indicated otherwise, values are the percent of rheumatoid arthritis (RA) patients (n = 516 exploratory, n = 822 replication). IQR = interquartile range; NS = not significant; ACPAs = anti-citrullinated protein antibodies.

Table 2. Frequencies of alleles of the IRF5 SNPs in RA patients and controls from the 2 phases of the study*

SNP, group	Exploratory			Replication			Combined analysis		
	MAF, %†	OR (95% CI)	P versus controls	MAF, %‡	OR (95% CI)	P versus controls	MAF, %§	OR (95% CI)	P versus controls
rs729302									
RA	32.3	0.83 (0.7–1.0)	0.047	30.1	0.97 (0.8–1.1)	NS	31.0	0.93 (0.8–1.0)	NS
Control	36.5			30.8			32.6		
rs2004640									
RA	41.3	0.75 (0.6–0.9)	0.001	41.8	0.99 (0.9–1.1)	NS	41.6	0.91 (0.8–1.0)	0.07
Control	48.3			42.1			44.0		
rs752637									
RA	32.0	0.83 (0.7–1.0)	0.040	33.9	0.94 (0.8–1.1)	NS	33.1	0.92 (0.8–1.0)	NS
Control	36.3			35.2			35.1		
rs10954213									
RA	30.1	0.77 (0.6–0.9)	0.006	34.9	0.94 (0.8–1.1)	NS	33.0	0.87 (0.8–1.0)	0.016¶
Control	35.9			36.4			36.2		
rs13242262									
RA	31.1	0.80 (0.7–1.0)	0.016	35.2	0.96 (0.8–1.1)	NS	33.6	0.92 (0.8–1.0)	NS
Control	36.2			36.2			35.5		
rs10488630									
RA	40.2	1.18 (1.0–1.4)	0.069	40.1	1.01 (0.9–1.2)	NS	40.2	1.03 (0.9–1.1)	NS
Control	36.3			39.8			39.4		
rs10488631									
RA	15.0	1.36 (1.1–1.8)	0.020	11.0	1.08 (0.9–1.4)	NS	12.6	1.23 (1.0–1.4)	0.013
Control	11.5			10.3			10.5		
rs2280714									
RA	29.6	0.88 (0.7–1.1)	NS	32.1	1.00 (0.9–1.2)	NS	31.1	0.99 (0.9–1.1)	NS
Control	32.4			32.1			31.2		
rs4731535									
RA	46.6	0.93 (0.8–1.1)	NS	47.4	1.01 (0.9–1.2)	NS	47.1	1.02 (0.9–1.1)	NS
Control	48.5			47.1			46.7		

* SNPs = single-nucleotide polymorphisms; MAF = minor allele frequency; OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval; NS = not significant.

† Total of 1,032 chromosomes of rheumatoid arthritis (RA) patients and 1,006 chromosomes of control subjects.

‡ Total of 1,612 chromosomes of RA patients and 1,608 chromosomes of control subjects.

§ Total of 2,644 chromosomes of RA patients and 3,236 chromosomes of control subjects.

¶ No data from Spanish controls in the previous study (31) were included for this SNP.

A Chromo4 real-time PCR system (MJ Research, Waltham, MA) was used to run these assays.

Statistical analysis. Analysis of the results was carried out in Haploview (33), Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK), and the Phase 2.0 program (34). Hardy-Weinberg equilibrium was tested in control samples, using a threshold of 0.05 without correction for multiple testing. Chi-square tests on 2×2 contingency tables were used to compare allele frequencies. Conditional logistic regression was used to ascertain the effect of the different SNPs on RA susceptibility, following a simplified additive model without interaction parameters, implemented using the Statistica program. Effects on clinical subgroups of patients were explored by sample stratification. Meta-analysis by pooling available data was performed with the Mantel-Haenszel method on 2×2 frequency tables, stratified by sample collection. Homogeneity of effect size across sample collections was assessed with the Breslow-Day test.

RESULTS

IRF5 genetic variation in RA susceptibility. Nine SNPs covering genetic variation in the IRF5 locus

(Figure 1) were genotyped with a 99.7% success rate, both in the exploratory phase and in the replication phase. Genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium. Analysis of the linkage disequilibrium pattern showed high D' values between the 9 SNPs, indicating that they were in a single linkage disequilibrium block. At the same time, they were not providing redundant information, since most r^2 values were below 0.8, as expected for tagSNPs. Therefore, it is likely that a large fraction of genetic variation in the IRF5 locus has been adequately covered and has been determined with a minimum of redundancy.

The first exploratory analysis was conducted using the collection of samples from the Hospital Clínico Universitario de Santiago, which included 516 RA patients and 503 controls. There was evidence of a significant association ($P < 0.05$) for 6 of the 9 IRF5 SNPs (Table 2). The strength of association was more marked for the rs2004640, rs10954213, and rs10488631 SNPs.

Table 3. Allele frequencies of the IRF5 SNPs in the subgroups of RA patients defined either by the presence or absence of ACPAs or for being a carrier or noncarrier of the SE*

SNP, group†	MAF, %	P versus ACPA– or SE–	OR (95% CI)	P versus controls
rs729302				
RA ACPA+	31.9	NS	0.97 (0.8–1.2)	NS
RA ACPA–	30.5		0.91 (0.7–1.2)	NS
RA SE+	32.5	NS	0.99 (0.8–1.2)	NS
RA SE–	33.0		1.02 (0.8–1.3)	NS
Control	32.6		Referent	
rs2004640				
RA ACPA+	41.8	NS	0.91 (0.8–1.1)	NS
RA ACPA–	37.0		0.75 (0.6–1.0)	0.018
RA SE+	40.9	NS	0.88 (0.7–1.1)	NS
RA SE–	42.5		0.94 (0.8–1.2)	NS
Control	44.0		Referent	
rs752637				
RA ACPA+	34.1	0.007	0.95 (0.8–1.1)	NS
RA ACPA–	25.3		0.63 (0.5–0.8)	5.4×10^{-4}
RA SE+	31.7	NS	0.86 (0.7–1.1)	NS
RA SE–	34.0		0.95 (0.8–1.2)	NS
Control	35.1		Referent	
rs10954213				
RA ACPA+	31.3	0.059	0.80 (0.7–1.0)	0.019
RA ACPA–	25.3		0.60 (0.5–0.8)	1.6×10^{-4}
RA SE+	30.7	NS	0.78 (0.6–1.1)	0.019
RA SE–	30.7		0.78 (0.6–1.0)	0.027
Control	36.2		Referent	
rs13242262				
RA ACPA+	32.2	0.050	0.86 (0.7–1.0)	NS
RA ACPA–	26.0		0.64 (0.5–0.8)	7.7×10^{-4}
RA SE+	31.7	NS	0.84 (0.7–1.0)	NS
RA SE–	31.8		0.85 (0.7–1.1)	NS
Control	35.5		Referent	
rs10488630				
RA ACPA+	39.2	NS	0.99 (0.8–1.2)	NS
RA ACPA–	44.1		1.22 (1.0–1.5)	NS
RA SE+	36.0	0.039	0.86 (0.7–1.1)	NS
RA SE–	42.7		1.14 (0.9–1.4)	NS
Control	39.4		Referent	
rs10488631				
RA ACPA+	14.9	NS	1.49 (1.2–1.9)	0.0014
RA ACPA–	16.9		1.73 (1.3–2.4)	6.6×10^{-4}
RA SE+	18.1	0.015	1.88 (1.5–2.4)	9.4×10^{-7}
RA SE–	12.3		1.19 (0.9–1.6)	NS
Control	10.5		Referent	
rs2280714				
RA ACPA+	31.0	0.035	0.99 (0.8–1.2)	NS
RA ACPA–	24.4		0.71 (0.5–0.9)	0.012
RA SE+	29.5	NS	0.92 (0.7–1.1)	NS
RA SE–	30.7		0.97 (0.8–1.2)	NS
Control	31.2		Referent	
rs4731535				
RA ACPA+	47.7	NS	1.04 (0.9–1.2)	NS
RA ACPA–	43.2		0.87 (0.7–1.1)	NS
RA SE+	50.4	0.067	1.16 (1.0–1.4)	NS
RA SE–	44.3		0.91 (0.7–1.1)	NS
Control	46.7		Referent	

* SE = shared epitope (see Table 2 for other definitions).

† Groups included the following number of chromosomes: RA ACPA+ 646, RA ACPA– 308, RA SE+ 492, RA SE– 424, and controls 3,236.

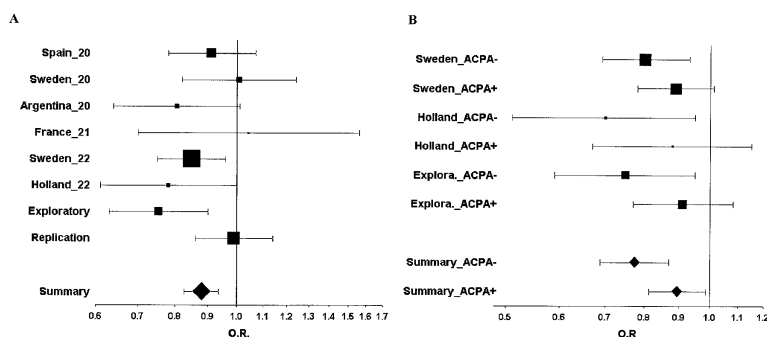


Figure 2. Meta-analysis of all available studies of the association of the rs2004640 IRF5 single-nucleotide polymorphism with susceptibility to rheumatoid arthritis (RA). Data were obtained on RA patients as a whole (A) and stratified according to anti-citrullinated protein antibody (ACPA) status (B). Each collection of samples is identified by country and corresponding study reference number. Samples in the present study were from either the exploratory collection or the replication collection. The collections in B include the Swedish and Dutch samples described in ref. 22 and the samples in our exploratory (Explora.) collection. Results are the odds ratio (OR) with 95% confidence interval. The size of each square represents the size of the collection, but the size of the diamonds (for summary ORs) is arbitrary.

Frequencies of the rare alleles of rs2004640 and rs10954213 were decreased in RA samples compared with control samples (OR 0.75, 95% CI 0.6–0.9 and OR 0.77, 95% CI 0.6–0.9, respectively). In addition, the rare alleles of 3 other SNPs were also less common in RA patients than in controls (Table 2). Conversely, the rs10488631 SNP rare allele was more frequent in RA patients than in controls (OR 1.36, 95% CI 1.05–1.8).

Replication of the study in a second collection of samples from multiple centers, which included 822 RA patients and 839 controls, showed a similar trend but did not confirm the association (Table 2). For completeness, we performed a combined analysis that also included samples from 313 Spanish controls from our previous study (31). In this analysis, involving 1,655 controls and 1,338 RA patients, the frequencies of the rs10954213 and rs10488631 SNPs remained significantly different between RA patients and controls, similar to the findings in the exploratory phase (Table 2).

Preferential IRF5 association in RA patients without ACPAs. Data on ACPA status were only available for samples from the exploratory collection. Six SNPs showed significant differences in allele frequencies between the ACPA– patients and the controls, of which 4 were significantly different at $P < 0.001$ (Table 3). In contrast, all of the allele frequencies in the ACPA+ patients were at an intermediate level, between those

observed in the ACPA– patients and those observed in the controls. Moreover, only 2 IRF5 SNPs were significantly more frequent in the ACPA+ patients than in the controls, in spite of the larger size of the ACPA+ subgroup (Table 3). The rs2004640 SNP showed a significant association with RA in the ACPA– patients only (Table 3), which is consistent with the preferential association reported by Sigurdsson et al (22).

Meta-analysis of available studies. All studies of IRF5 genetic variation in RA have included the investigation of one of the functional SNPs, rs2004640. Therefore, results for this SNP were pooled and analyzed. Eight collections of samples, comprising a total of 4,620 RA patients and 3,741 controls, were included. All subjects were of European Caucasian descent (1 collection was from Argentina). Results from the different collections did not show significant heterogeneity ($P = 0.19$), thus allowing inclusion in a pooled data set.

Most single collections showed a trend toward lower frequency of the rs2004640 minor allele in RA patients compared with controls (Figure 2A). In 2 collections, 1 from Sweden and 1 from the present study, the difference in frequency of this minor allele was significant. In another 2 collections, the Argentinean and the Dutch, the decreased frequency of rs2004640 was not significantly different from controls, which is likely attributable to insufficient sample size. The other

4 collections, 2 from Spain, 1 from Sweden, and 1 from France, showed an rs2004640 minor allele frequency that approached a neutral level of association (OR 1.0). Mantel-Haenszel analysis showed that the frequency of this minor allele was significantly reduced in the RA patients as a whole (Figure 2A), with a pooled OR of 0.88 (95% CI 0.83–0.94; $P = 6.5 \times 10^{-5}$ versus controls). Therefore, our findings indicate that an association of the rs2004640 SNP was present in this RA patient population as a whole.

In addition, the data on the rs2004640 SNP from 3 collections were stratified by ACPA status. These analyses included 895 ACPA– RA patients, 1,478 ACPA+ RA patients, and 1,545 controls. Results on the frequency of rs2004640 by ACPA status were not heterogeneous among the 3 different collections (for ACPA– patients, $P = 0.70$, and for ACPA+ patients, $P = 0.96$). Mantel-Haenszel analysis showed that the pooled effect of the rs2004640 minor allele was larger in the ACPA– patients than in the ACPA+ patients (Figure 2B), although it was significantly different from controls in both subgroups of RA patients (for ACPA– patients, OR 0.77, 95% CI 0.69–0.87, and for ACPA+ patients, OR 0.90, 95% CI 0.81–0.99; $P = 1.8 \times 10^{-5}$ and $P = 0.026$ versus controls, respectively). This was unexpected, because ACPA+ patients did not show a significant association of this allele with RA in any of the 3 sample collections separately (Figure 2B). Therefore, ACPA status by itself does not fully explain the effect of IRF5 genetic variation on RA susceptibility.

IRF5 association in other RA subgroups. We also tested allele frequencies in 5 clinically relevant subclassifications of RA patients, according to sex and according to the presence or absence of erosions, RF, the SE, and the 620W PTPN22 allele. These analyses yielded unremarkable results except in the patients grouped by SE carrier status (Table 3) and except for a minor effect of erosive arthritis. (Detailed results for all of these subgroups are available online on the author's Web site.)

Two IRF5 SNPs were significantly different between the SE+ and SE– RA patients (Table 3). The frequency of one of these SNPs, rs10488631, was highly significantly different from that in controls in the SE+ subgroup only (18.1% in SE+ patients versus 10.5% in controls), with an OR of 1.88 (95% CI 1.5–2.4; $P = 9.4 \times 10^{-7}$ versus controls). The association of the SE was dose dependent, since the frequency of this minor allele was higher in patients homozygous for the SE (24.0%) than in patients who were SE heterozygotes (16.6%). Thus, a significant correlation was observed between the SE dose and minor allele frequency of this SNP ($P =$

0.037). This was a remarkable finding, because the rs10488631 minor allele has also been shown to tag the haplotype associated with SLE susceptibility (31), and because its frequency was increased in ACPA– patients (Table 3) and in RA patients with erosive disease (data available online on the author's Web site).

Similar to the results stratified by SE status, a significant difference in frequency of alleles of the rs10488631 SNP was also found in the group of RA patients with erosive disease compared with those without erosions (data available online on the author's Web site). This finding was obtained when all of the RA

Table 4. Allele frequencies of the IRF5 SNPs in the subgroups of RA patients defined jointly by the presence or absence of ACPAs and for being a carrier or noncarrier of the SE*

SNP, group†	MAF, %	OR (95% CI)	P versus controls
rs729302			
ACPA+ and SE–	31.6	0.95 (0.7–1.3)	NS
ACPA– or SE+	32.0	0.97 (0.8–1.2)	NS
Control	32.6	Referent	
rs2004640			
ACPA+ and SE–	42.5	0.94 (0.7–1.2)	NS
ACPA– or SE+	39.6	0.84 (0.7–1.0)	0.045
Control	44.0	Referent	
rs752637			
ACPA+ and SE–	36.8	1.08 (0.8–1.4)	NS
ACPA– or SE+	29.9	0.79 (0.7–1.0)	0.013
Control	35.1	Referent	
rs10954213			
ACPA+ and SE–	32.0	0.83 (0.6–1.1)	NS
ACPA– or SE+	29.0	0.72 (0.6–0.9)	0.0007
Control	36.2	Referent	
rs13242262			
ACPA+ and SE–	33.3	0.91 (0.7–1.2)	NS
ACPA– or SE+	29.8	0.77 (0.6–0.9)	0.0059
Control	35.5	Referent	
rs10488630			
ACPA+ and SE–	41.2	1.08 (0.8–1.4)	NS
ACPA– or SE+	39.1	0.99 (0.8–1.2)	NS
Control	39.4	Referent	
rs10488631			
ACPA+ and SE–	11.8	1.14 (0.8–1.7)	NS
ACPA– or SE+	17.5	1.80 (1.4–2.3)	7.54×10^{-7}
Control	10.5	Referent	
rs2280714			
ACPA+ and SE–	32.0	1.04 (0.8–1.4)	NS
ACPA– or SE+	28.0	0.86 (0.7–1.0)	NS
Control	31.2	Referent	
rs4731535			
ACPA+ and SE–	45.2	0.94 (0.7–1.2)	NS
ACPA– or SE+	47.9	1.05 (0.9–1.2)	NS
Control	46.7	Referent	

* ACPAs = anti-citrullinated protein antibodies; SE = shared epitope (see Table 2 for other definitions).

† Groups included the following number of chromosomes: ACPA+ and SE– RA patients n = 228, ACPA– or SE+ RA patients n = 618, and control subjects n = 3,236.

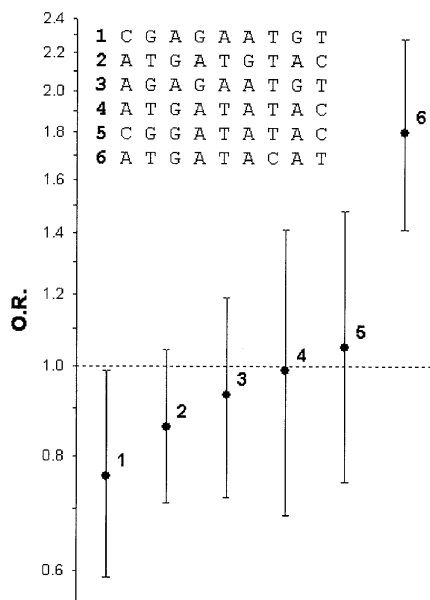


Figure 3. Haplotype analysis of the 9 IRF5 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the rheumatoid arthritis patients who were either anti-citrullinated protein antibody negative or shared epitope positive. Results are the odds ratio (OR) with 95% confidence interval (95% CI) for those haplotypes with a frequency higher than 5%. Alleles in each haplotype are shown in the order of the SNPs in the IRF5 sequence (rs729302, rs2004640, rs752637, rs10954213, rs13242262, rs10488630, rs10488631, rs2280714, and rs4731535). Haplotype 6 or 1.8 (95% CI 1.4–2.3; $P = 1.2 \times 10^{-6}$ versus controls) and haplotype 1 OR 0.76 (95% CI 0.6–0.98; $P = 0.046$ versus controls).

patients from the exploratory set and the replication set were studied together.

Association of IRF5 genetic variation according to both ACPA status and SE status. The preceding analyses led us to test whether simultaneous classification according to ACPA status and SE status could be useful in separating IRF5-associated patients from IRF5-independent patients. RA patients were classified into 1 of 2 groups: one that lacked the 2 associated characteristics, designated the ACPA+ and SE– group, and one that included either of them, designated the ACPA– or SE+ group; extensive classification would

actually produce 4 subgroups, but the 3 included in the ACPA– or SE+ definition were associated with IRF5 SNPs.

The ACPA+ and SE– group (27.0% of RA patients) showed no association with IRF5 genetic variation (Table 4). The second group, ACPA– or SE+, which included all of the remaining RA patients, showed significant changes in allele frequencies for 5 of the IRF5 SNPs. The most notable was the difference in frequency of the rs10488631 SNP (OR 1.80, 95% CI 1.4–2.3; $P = 7.54 \times 10^{-7}$ versus controls). Therefore, classification of RA patients by both ACPA status and SE status allowed a clear separation of patients who showed an association with IRF5 variants from those who lacked any association.

These results allowed us to further investigate the nature of the associated polymorphisms in the ACPA– or SE+ subgroup. Conditional logistic regression analysis of rs10488631 along with each of the other IRF5-associated SNPs was conducted to determine whether the association with IRF5 variants was attributable to linkage disequilibrium or to an independent effect. Only the rs10954213 SNP remained associated with RA after conditioning (adjusted OR 0.79, 95% CI 0.64–0.97; $P = 0.02$ versus controls), indicating that 2 IRF5-independent effects could be present in the subgroup of ACPA– or SE+ RA patients. (Detailed results of the conditional logistic regression analysis are available online on the author's Web site.)

We also performed an analysis of haplotypes in this subgroup of patients. Only 6 haplotypes had frequencies higher than 5%. Two of these haplotypes had frequencies that were significantly different from those in controls (Figure 3 and results online on the author's Web site). One was a susceptibility haplotype, which was identified by the increased frequency of the minor allele of the rs10488631 SNP (allele 6 in Figure 3). This haplotype was almost twice as common in the RA patients as in the controls, and had a unique combination of the 3 known IRF5 functional polymorphisms. The other was a protective haplotype (allele 1 in Figure 3), which was less common in this subgroup of RA patients than in the controls. In contrast, the ACPA+ and SE– group did not show any significant difference from controls in the frequency of any of these haplotypes (results available online on the author's Web site).

DISCUSSION

In the present study, we have expanded the knowledge of the role of IRF5 genetic variation in RA

susceptibility. Our meta-analysis of all of the available studies that have analyzed the rs2004640 IRF5 SNP showed, convincingly, that this SNP is associated with RA susceptibility. This association in nonstratified RA patients was unexpected, since most previous reports have described a lack of association of this SNP with RA (20–22). Only our exploratory sample collection and the samples in a previous study from Sweden (22) were found to show an association of this IRF5 SNP with RA in nonstratified patients. The associated SNP, rs2004640, is 1 of the 3 functional SNPs that have been identified in IRF5, and its association suggests that other functional variants will also have a role in RA susceptibility. This contention was supported by our results, which showed a wide association of IRF5 SNPs in our exploratory sample collection.

Additional independent evidence comes from the WGAS performed by the Wellcome Trust Case–Control Consortium (WTCCC) (8). In the WTCCC study, up to one-half million SNPs have been genotyped in 2,000 RA patients and 3,000 control subjects from the UK as part of a larger project that includes 6 other diseases. In that study, 2 SNPs in the IRF5 locus were found to be associated with RA. One of these, rs12531711, showed a perfect correlation with rs10488631 and had an increased minor allele frequency in RA patients (OR 1.16, 95% CI 1.02–1.3; $P = 0.027$ versus controls). The other, rs3807306, was correlated with rs13242262, at an r^2 of 0.75, and had a decreased minor allele frequency in RA patients (OR 0.84, 95% CI 0.8–0.9; $P = 4.2 \times 10^{-5}$ versus controls). These results are very similar to those observed for the rs10488631 and rs13242262 SNPs in our exploratory sample collection. Therefore, in independent sample collections, particularly in those from large-scale RA studies such as meta-analyses or the WTCCC study, the association of IRF5 genetic variation with RA as a whole has been demonstrated.

However, the IRF5 association is not homogeneous across RA patients. The particular association that we observed in ACPA– patients has been found previously in patients from Sweden and in those from The Netherlands (22). We confirmed this finding in our study, showing that the changes in frequency of alleles of the IRF5 SNPs were more marked in the ACPA– subgroup of patients than in the ACPA+ patients. Accordingly, our meta-analysis of 3 of the sample collections showed a more marked effect of the rs2004640 SNP in ACPA– patients than in ACPA+ patients. However, the meta-analysis also showed that, unexpectedly, rs2004640 was associated with RA in ACPA+ patients; this was not the case in any of the 3 sample

collections studied separately. This result indicates that IRF5 variation could affect the susceptibility to RA in patients who are not included in the minor ACPA– subgroup.

Stratification of RA patients according to other characteristics allowed identification of strong IRF5 associations in the SE carrier subgroup, whereas patients in the SE noncarrier subgroup showed weak IRF5 associations. Because the patients in the SE+ subgroup were not always the same patients as in the ACPA– subgroup, the SE carrier status could potentially explain the IRF5 association among the ACPA+ patients. This preferential association in SE+ patients should be considered with prudence until it is replicated in other studies. Nevertheless, it seems to be useful, since it allows a more precise separation of IRF5-associated RA patients from IRF5-independent RA patients, when the groupings are combined with ACPA status.

The IRF5-associated group included most RA patients (~73%). These patients were ACPA– or SE+ and showed a strong association with several of the IRF5 SNPs. The IRF5-independent group, a minority of the RA patients, comprised those RA patients who were ACPA+ and SE–. This latter classification is puzzling, because we do not know specifically what distinguishes the 2 groups of patients, and because the defining characteristics of the IRF5-independent subgroup, ACPA+ and SE–, are discordant. As already mentioned, the SE predisposes RA patients to develop ACPA+, and not ACPA–, disease (4). At present, it is unclear whether there are any particular defining characteristics in RA patients who develop ACPAs in the absence of the SE. Further investigation of this subgroup may help identify the clinical or laboratory features that would distinguish these patients and ultimately point out the dissimilar pathogenic mechanisms involved in RA. Possible clues could be obtained from the interferon signature found in some RA patients (17). In contrast, the IRF5-associated group included most RA patients, and because of their heterogeneity, the data from this group are likely to be not very informative in this regard.

Results of the haplotype analysis in the ACPA– or SE+ subgroup were reminiscent of the findings in patients with SLE (26,27,31). Most notably, RA patients and SLE patients appear to share the same susceptibility haplotype, with an OR that is almost double the likelihood in controls (31). This haplotype combines the rs2004640 allele, which introduces the donor splice site for exon 1B, and the rs10954213 allele, which determines elevated mRNA stability, as well as the longer, proline-rich region in exon 6. The specific consequences of this

particular combination of alleles are unknown, but it constitutes an intriguing example of epistasis.

The protective haplotype in the ACPA- or SE+ RA subgroup was 1 of the 2 protective haplotypes found in our SLE study; the other protective haplotype from the SLE study (31) (haplotype 5 in Figure 3) was not protective in RA patients. We do not have a clear picture as to what could be behind protective IRF5 haplotypes. In SLE, we have speculated that the protection could be linked to an unknown polymorphism tagged by the rs729302 SNP, but this SNP was irrelevant in RA. Others have proposed that protective haplotypes lack the exon 1B splicing site and include only 1 of the 2 other functional alleles (27), but this hypothesis also did not match our findings in RA.

The similarity in the associated haplotypes between the ACPA- or SE+ RA subgroup and patients with SLE suggests that the impact of these haplotypes on the etiologic processes of each disease will be similar. This is intriguing, because SLE and RA are clearly differentiated diseases and their presence in the same subject is less frequent than what would be expected at random (35). Also, RA patients in the IRF5-associated group did not show an increase in the presence of antinuclear antibodies (14.1%) as compared with that in RA patients in the IRF5-independent group (20.7%). It is likely that RA and SLE share some genetic factors related to the breaking of immune tolerance to autoantigens, but the role of IRF5 in this context is unclear, and results from the WGAS did not disclose an IRF5 association in patients with type 1 diabetes or in those with Crohn's disease. In fact, our knowledge of IRF5 or type 1 IFNs in RA is insufficient to allow for robust prediction of the role of IRF5 variants in the disease.

IRF5 has not yet been investigated at the molecular or cellular level in the context of autoimmune disease. Experiments have been restricted to antiviral responses and to the role of IRF5 in cancerous cells (11,36). The fact that a combination of polymorphisms is required to increase susceptibility and that both susceptibility and protective haplotypes are present, as well as the finding of a preferential association in a subset of RA patients, complicate further interpretation. It is possible that IRF5 genetic variation will impinge on synovial inflammation via its contribution to the induction of proinflammatory cytokines and chemokines (37). However, there are too many unsolved questions to propose any sound hypothesis.

In conclusion, the association of IRF5 genetic variants with RA susceptibility has been confirmed. This association was preferential in patients with ACPA-

RA or in patients with SE+ RA. Combining both criteria allowed us to separate a minor subgroup of IRF5-independent RA patients, characterized as ACPA+ and SE-, from the remaining majority of patients with RA, who show strong IRF5 associations. It is expected that investigation of this classification may help us to better understand the different mechanisms involved in RA expression. In addition, we found that the expression pattern of IRF5 polymorphisms associated with RA was similar to that described in patients with SLE (31), suggesting that the involved molecular mechanisms might be similar.

Note added in proof. A new functional polymorphism in the promoter region of IRF5 has been identified and has been shown to be associated with SLE susceptibility (Sigurdsson S, Göring HH, Kristjansdóttir G, Milani L, Nordmark G, Sandling JK, et al. Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 2008;17:872-81). This polymorphism is not directly related to any of the haplotypes showing an association with RA in our study (unpublished observations). Further studies will be required to examine whether this polymorphism is associated with RA susceptibility.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Cristina Fernandez-Lopez for excellent technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Gonzalez had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study design. Dieguez-Gonzalez, Gonzalez.

Acquisition of data. Dieguez-Gonzalez, Perez-Pampin, Rodriguez de la Serna, Fernandez-Gutierrez, Castañeda, Largo, Joven, Navarro, Marengo, Vicario, Blanco, Fernandez-Lopez, Caliz, Collado-Escobar, Carreño, Lopez-Longo, Cañete, Gomez-Reino.

Analysis and interpretation of data. Dieguez-Gonzalez, Perez-Pampin, Rodriguez de la Serna, Fernandez-Gutierrez, Castañeda, Largo, Joven, Narvaez, Navarro, Marengo, Vicario, Blanco, Fernandez-Lopez, Caliz, Collado-Escobar, Cañete, Gomez-Reino, Gonzalez.

Manuscript preparation. Dieguez-Gonzalez, Gonzalez.

Statistical analysis. Calaza, Gonzalez.

REFERENCES

1. Oliver JE, Worthington J, Silman AJ. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:141-6.
2. Gorman JD, Lum RF, Chen JJ, Suarez-Almazor ME, Thomson G, Criswell LA. Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease: a meta-analysis of 3,240 rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2004;50:400-12.
3. Fries JF, Wolfe F, Apple R, Erlich H, Bugawan T, Holmes T, et al.

- HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum* 2002;46:2320-9.
4. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 2005;52:3433-8.
5. De Rycke L, Nicholas AP, Cantaert T, Kruithof E, Echols JD, Vandekerckhove B, et al. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum* 2005;52:2323-30.
6. Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, Kloppenburg M, de Vries RR, le Cessie S, et al. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis* 2006;65:366-71.
7. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004;75:330-7.
8. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-78.
9. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis: a genome-wide study. *N Engl J Med* 2007;357:1199-209.
10. Sigurdsson S, Nordmark G, Goring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2005;76:528-37.
11. Barnes BJ, Moore PA, Pitha PM. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon α genes. *J Biol Chem* 2001;276:23382-90.
12. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005;434:243-9.
13. Ouyang X, Negishi H, Takeda R, Fujita Y, Taniguchi T, Honda K. Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:1045-51.
14. Borg FA, Isenberg DA. Syndromes and complications of interferon therapy. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:61-6.
15. Van Holten J, Smeets TJ, Blankert P, Tak PP. Expression of interferon β in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis: comparison with patients with osteoarthritis and reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1780-2.
16. Lande R, Giacomini E, Serafini B, Rosicarelli B, Sebastiani GD, Minisola G, et al. Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis. *J Immunol* 2004;173:2815-24.
17. Van der Pouw Kraan TC, Wijnbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1008-14.
18. Tak PP. IFN- β in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 2004;9:3242-7.
19. Van Holten J, Pavelka K, Vencovsky J, Stahl H, Rozman B, Genovese M, et al. A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:64-9.
20. Rueda B, Reddy MV, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Petersson IF, et al. Analysis of IRF5 gene functional polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:3815-9.
21. Garnier S, Dieude P, Michou L, Barbet S, Tan A, Lasbleiz S, et al. IRF5 rs2004640-T allele, the new genetic factor for systemic lupus erythematosus, is not associated with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:828-31.
22. Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman FA, Liljedahl U, Wiman AC, Alfredsson L, et al. Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2202-10.
23. Pascual V, Farkas L, Banchereau J. Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Curr Opin Immunol* 2006;18:676-82.
24. Demirci FY, Manzi S, Ramsey-Goldman R, Minster RL, Kenney M, Shaw PS, et al. Association of a common interferon regulatory factor 5 (IRF5) variant with increased risk of systemic lupus erythematosus (SLE). *Ann Hum Genet* 2006;71:308-11.
25. Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2006;38:550-5.
26. Cunningham Graham DS, Manku H, Wagner S, Reid J, Timms K, Gutin A, et al. Association of IRF5 in UK SLE families identifies a variant involved in polyadenylation. *Hum Mol Genet* 2007;16:579-91.
27. Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:6758-63.
28. Kozyrev SV, Lewen S, Reddy PM, Pons-Estel B and the Argentine Collaborative Group, Witte T and the German Collaborative Group, Junker P, et al. Structural insertion/deletion variation in IRF5 is associated with a risk haplotype and defines the precise IRF5 isoforms expressed in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2007;56:1234-41.
29. Reddy MV, Velazquez-Cruz R, Baca V, Lima G, Granados J, Orozco L, et al. Genetic association of IRF5 with SLE in Mexicans: higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans. *Hum Genet* 2007;121:721-7.
30. Shin HD, Sung YK, Choi CB, Lee SO, Lee HW, Bae SC. Replication of the genetic effects of IFN regulatory factor 5 (IRF5) on systemic lupus erythematosus in a Korean population. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R32.
31. Ferreira-Neira I, Calaza M, Alonso-Perez E, Marchini M, Scorza R, Sebastiani GD, et al. Opposed independent effects and epistasis in the complex association of IRF5 to SLE. *Genes Immun* 2007;8:429-39.
32. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
33. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263-5.
34. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68:978-89.
35. Panush RS, Edwards NL, Longley S, Webster E. 'Rhumus' syndrome. *Arch Intern Med* 1988;148:1633-6.
36. Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, Kondo S, Mak TW, Takaoka A, et al. Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3402-7.
37. Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE, Pitha PM. Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 2002;22:5721-40.

IL-1 en AR



NIH Public Access

Author Manuscript

Arthritis Rheum. Author manuscript; available in PMC 2008 September 10.

Published in final edited form as:

Arthritis Rheum. 2008 July ; 58(7): 1947–1957. doi:10.1002/art.23592.

A Broad Analysis of *IL1* Polymorphism and Rheumatoid Arthritis

Alyssa K. Johnsen, MD, PhD^{1,2}, Robert M. Plenge, MD, PhD^{2,3}, Vincent Butty, MD¹, Christopher Campbell, BS¹, Rebeca Dieguez-Gonzalez, MSc⁴, Juan J. Gomez-Reino, MD, PhD⁴, Nancy Shadick, MD, MPH², Michael Weinblatt, MD², Antonio Gonzalez, MD, PhD⁴, Peter K. Gregersen, MD⁵, Christophe Benoist, MD, PhD^{1,2,3}, and Diane Mathis, PhD^{1,2,3}

¹ Section on Immunology and Immunogenetics, Joslin Diabetes Center; Harvard Medical School, Boston, MA 02215

² Division of Rheumatology, Immunology and Allergy, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA 02115

³ The Broad Institute of Harvard University and Massachusetts Institute of Technology, Cambridge MA

⁴ Laboratorio de Investigacion 2 and Rheumatology Unit, Hospital Clinico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain

⁵ The Feinstein Institute for Medical Research, North Shore-LIJ Health System, 350 Community Drive, Manhasset, NY 11030

Abstract

Objective—It has been suggested that polymorphisms in *IL1* are correlated with severe and/or erosive rheumatoid arthritis (RA), but the implicated alleles have differed among studies. The aim of this study was to perform a broad and well-powered search for association between allelic polymorphism in *IL1A* and *IL1B* and the susceptibility to or severity of RA.

Methods—Key coding and regulatory regions in *IL1A* and *IL1B* were sequenced in 24 patients with RA, revealing 4 novel single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *IL1B*. These and a comprehensive set of 24 SNPs tagging most of the underlying genetic diversity were genotyped in 3 independent RA case-control sample sets and 1 longitudinal RA cohort, totaling 3,561 patients and 3,062 control subjects.

Results—No fully significant associations were observed. Analysis of the discovery case-control sample sets indicated a potential association of *IL1B* promoter region SNPs with susceptibility to RA (for RA3/A, odds ratio [OR] 1.27, $P = 0.0021$) or with the incidence of radiographic erosions (for RA4/C, OR 1.56, $P = 0.036$), but these findings were not replicated in independent case-control samples. No association with rheumatoid factor, anti-cyclic citrullinated peptide, or the Disease Activity Score in 28 joints was found. None of the associations previously observed in other studies were replicated here.

Correspondence: Christophe Benoist and Diane Mathis, Section on Immunology and Immunogenetics, Joslin Diabetes Center, One Joslin Place, Boston, MA 02215, e-mail: cbdm@joslin.harvard.edu, Phone: (617) 264-2745, Fax: (617) 264-2744.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Mathis had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study design. Johnsen, Shadick, Weinblatt, Benoist, Mathis.

Acquisition of data. Johnsen, Plenge, Campbell, Dieguez-Gonzalez, Gomez-Reino, Shadick, Weinblatt, Gonzalez, Gregersen.

Analysis and interpretation of data. Johnsen, Plenge, Butty, Dieguez-Gonzalez, Gomez-Reino, Weinblatt, Gonzalez, Benoist, Mathis.

Manuscript preparation. Johnsen, Plenge, Butty, Weinblatt, Benoist, Mathis.

Statistical analysis. Johnsen, Plenge, Butty.

Provision of samples. Shadick.

Conclusion—In spite of a broad and highly powered study, we observed no robust, reproducible association between *IL1A/B* variants and the susceptibility to or severity of RA in white individuals of European descent. Our results provide evidence that, in the majority of cases, polymorphism in *IL1A* and *IL1B* is not a major contributor to genetic susceptibility to RA.

Interleukin-1 (IL-1) is a key mediator of inflammation, with pleiotropic effects on several cells and signaling pathways. The activity defined as IL-1 reflects the function of 2 molecules, IL-1 α and IL-1 β . *IL1A* encodes IL-1 α , which is cell-bound, and *IL1B* encodes IL-1 β , a secreted cytokine. IL-1 is a critical mediator in several systemic autoinflammatory syndromes and in juvenile rheumatoid arthritis, as evidenced by a dramatic effect of anti-IL-1 therapy in those diseases (1–3). IL-1 also plays a pathogenic role in inflammation and tissue destruction in rheumatoid arthritis (RA) (4,5). IL-1 blockade ameliorates arthritis in multiple mouse models and has been shown in clinical trials to improve human RA (6).

Although the existence of genetic factors that modulate susceptibility to RA is well established, only a few such genes have thus far been identified and confirmed (7). Other than that for the “shared epitope” alleles at the HLA locus (8), the most compelling evidence of an association exists for *PTPN22* (9). Recently, a genome-wide association study not only confirmed the association between RA susceptibility and the *HLA* and *PTPN22* loci but also uncovered 9 other loci (at a significance level of $P = 10^{-5}$ to $P = 10^{-7}$) that are potentially associated with RA (10). In addition, single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the regions of *STAT4* (11, 12), *TRAF1/C5* (13,14), and *TNFAIP3* (15,16) have recently been shown to be associated with RA susceptibility, but the functional consequence of these polymorphisms has not yet been elucidated.

The central role that IL-1 plays in inflammation suggests that allelic polymorphism in *IL1* might have an impact on susceptibility to RA. Indeed, in mice, allelic polymorphism in *Il1b* influences the severity of arthritis in the K/BxN model (17). In humans, the situation is less clear. A genome-wide scan of a family cohort showed an excess of allele sharing for the *IL1* gene cluster (18). A subsequent linkage study of the *IL1* locus showed no linkage with susceptibility to RA, although subgroup analysis demonstrated linkage of *IL1* in families with erosive RA if siblings did not share the *HLA-DRB1* allele (19). Similarly, case-control association studies revealed no association of *IL1* variants and susceptibility to RA but showed an association with severity or radiographic erosions or progression (19–24). The number of patients with RA who were screened in these studies was relatively small (<300 patients in all studies); therefore, these analyses were underpowered to show weak associations. In addition, these studies addressed a rather limited number of polymorphisms, focusing on some subset of only 2 polymorphisms in *IL1B* (–511 and +3954) and 2 polymorphisms in *IL1A* (–889 and +4845. These polymorphisms in *IL1A* are in tight linkage disequilibrium [LD] and thus provide the same information). International SNP databases currently list 88 SNPs in the *IL1B* gene alone; clearly, much of the existing variation has not yet been analyzed. In addition, it is possible that disease-specific variants found only in patients with RA exist and have not been catalogued in general SNP databases.

Given the importance of IL-1 as a mediator of inflammation, suggestive results from prior genetics studies in humans, and the clear evidence of an arthritis association in mouse models, we thought that a deeper and broader analysis of genetic variation at the *IL1* loci was warranted. Therefore, we performed a comprehensive and well-powered study to determine the relevance of polymorphisms in *IL1A* and *IL1B* to susceptibility to RA or to its destructive consequences.

PATIENTS AND METHODS

Clinical samples

Clinical samples were obtained from 5 sources, as follows:

1. Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) samples from the International HapMap project (90 individuals from Utah with ancestry from northern and western Europe) (25).
2. The Brigham Rheumatoid Arthritis Sequential Study (BRASS). A prospective longitudinal study of patients with RA diagnosed by a rheumatologist (26). Clinical measures, including anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies, rheumatoid factor (RF), C-reactive protein, and the Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) (27), were obtained at the baseline visit. Hand radiographs were evaluated by a radiologist for the presence of erosions. Only the 774 patients who identified their race as "white" were selected for analysis, in order to avoid population admixture effects.
3. North American Rheumatoid Arthritis Consortium (NARAC). The cases included 1,314 individuals from 619 multiplex families (primarily affected sibling pairs); at least 1 sibling had documented erosions on hand radiographs, and at least 1 sibling experienced disease onset between the ages of 18 years and 60 years (28). All of the NARAC patients satisfied the 1987 American College of Rheumatology (ACR; formerly, the American Rheumatism Association) criteria for the classification of RA (29). The control subjects were 1,103 individuals from the New York Cancer Project (NYCP), a population-based prospective study of healthy individuals. Approximately 2 control subjects were matched to a single randomly chosen affected sibling on the basis of sex, age (birth decade), and ethnicity (grandparental country/region of origin). (The number of cases does not equal the number of control subjects, because some case families contributed more or fewer than 2 siblings, and because 2 control subjects were not available for every case.) Only patients and control subjects who identified their ancestry as "white" were selected for this study. Complete data for PTPN22 for this case-control sample set have been published previously (9).
4. The Spanish case-control sample set from the University Clinical Hospital of Santiago de Compostela. The study group comprised 525 patients satisfying the ACR criteria for the classification of RA (29) and 504 control subjects ages 55 years or older who were undergoing elective nonorthopedic surgery (30). The patients and control subjects were white individuals of Spanish origin, all of whose known ancestors were of the same origin.
5. The Wichita Rheumatic Disease Data Bank (WRDDB)/National Inception Cohort of Rheumatoid Arthritis Patients (NICRAP)/Study of New Onset Rheumatoid Arthritis (SONORA) case-control sample set. Patients included 948 anti-CCP antibody-positive individuals in whom RA was diagnosed by a rheumatologist. These patients were selected from 3 independent registries, as follows: the WRDDB (in which the mean disease duration was 10 years) (31), the NICRAP (in which patients were enrolled within 6 months of the clinical diagnosis) (32), and SONORA (in which patients were enrolled within 3–12 months of the clinical diagnosis) (33). Control subjects included 1,455 unique individuals from the NYCP. Only patients and control subjects who identified their race as "white" were selected for this study.

Sequencing

The VISTA genome browser (34) was used to identify regions of homology with the rat and mouse genomes. Exons and noncoding regions showing homology with the rodent genomes were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then treated with exonuclease I and alkaline phosphatase. Bidirectional sequencing was performed. Sequencher software (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI) was used to align and compare chromatographs. Secondary peaks that were $\geq 30\%$ of the maximum peak height were visually inspected for validity as heterozygotes.

Genotyping

Genotyping was performed primarily by primer extension of multiplex products, with detection by mass spectroscopy (35), using the Sequenom platform (36) and/or by allele-specific fluorogenic PCR (37). For quality control, *PTPN22* was genotyped by both methods in the BRASS registry (99.9% concordance). For fluorogenic PCR, the concordance of duplicates was 100%. All SNPs included in the analysis had a *P* value greater than 0.001 for Hardy-Weinberg distribution and a genotyping efficiency $>70\%$ (all but 4 of the SNPs genotyped in NARAC had a genotyping efficiency $>95\%$). Individuals were excluded if $>50\%$ of the genotypes were missing. In NARAC, 28 individuals were excluded, with 96% of the remaining individuals genotyped at 80% of the markers and 74% genotyped at 90% of the markers. In the BRASS registry, 31 individuals were excluded, with 98% of the remaining individuals genotyped at 90% of the markers. Genotyping efficiency was 99.97% in the Spanish samples and 99.96% in the WRDDB/NICRAP/SONORA samples.

Statistical analysis

Single-marker analysis—*P* values were calculated for binary variables using 2-by-2 contingency tables of allele counts and chi-square testing. For continuous variables, *P* values were determined using linear regression (Plink; online at <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/ibdibs.shtml>). Because >20 SNPs were tested in the NARAC and BRASS sample sets, we applied a conservative Bonferroni correction for multiple sampling, with a significance threshold of $P = 10^{-3}$.

LD analysis—LD was investigated using Haploview (38). Blocks of high LD were defined according to the method described by Gabriel et al (36).

Haplotype analysis

Phased haplotypes were reconstructed using 2 different statistical frameworks: expectation-maximization using Haploview (38) and Whap (39), and Bayesian using Phase (40,41). No significant differences were observed in the haplotypes derived using the different methods. For Whap, 500–1,000 repeats were performed for each analysis. Phase version 2.1.1 was run according to the authors' recommendations. For each set of SNPs tested as a haplotype, linear regression and a likelihood ratio test of overall association were performed to determine an omnibus *P* value. For omnibus *P* values ≤ 0.05 , a haplotype-specific chi-square test was performed for each haplotype.

RESULTS

Sequencing of IL1A and IL1B in patients with RA

To understand the full genetic diversity within *IL1* in the context of RA, we sequenced *IL1A* and *IL1B* in a set of RA patients enrolled in the BRASS registry. Sequencing DNA from 24 patients (i.e., 48 chromosomes) provided 95% power to detect alleles with $\geq 5\%$ frequency in the population (42). We performed bidirectional sequencing on all exons and promoter and

noncoding regions that demonstrated a high degree of sequence similarity to the rat and mouse homologs (from the VISTA browser (34)) (Figure 1). The sequence data revealed 24 previously discovered SNPs, including 9 in *IL1B* and 15 in *IL1A*, and 4 novel SNPs in the noncoding regions of *IL1B* (submitted to the National Center for Biotechnology Information dbSNP database; accession nos. ss76859910, ss76859911, ss76859912, ss76859913). Hereafter, these SNPs will be referred to as RA1, RA2, RA3, and RA4, respectively. RA3 was subsequently reported as an SNP named “5164” (43). RA1, RA2, RA3, and RA4 were identified in 1 of 48, 1 of 48, 10 of 48, and 2 of 48 sequenced chromosomes, respectively. All 4 novel SNPs were then verified by genotyping using allele-specific fluorogenic PCR in DNA obtained from the BRASS registry and other sample sets (see below). No novel SNPs were identified in *IL1A*.

Discovery case-control samples for analyzing association with RA susceptibility

Querying an association between IL1 and RA by genotyping every known SNP in *IL1A* and *IL1B* would clearly be impractical. Instead, we followed a modified “tagging SNPs” strategy (44), which used a set of SNPs that captured the underlying diversity of the region based on the LD between SNPs, while also testing the novel and database-derived SNP alleles that had been observed by resequencing in patients with RA.

In order to comprehensively determine the LD structure in *IL1A* and *IL1B*, we genotyped a collection of SNPs in CEPH samples from the International HapMap project (25). This SNP set contained 15 of the 28 SNPs identified by resequencing that were selected for multiplex genotyping reaction compatibility. Information for an additional 5 of the SNPs identified from *IL1A* and *IL1B* was already available in HapMap at that time. We also genotyped 23 additional database SNPs chosen from the 20-kb region around each gene to ensure complete coverage of the genetic diversity in these regions.

By collating the genotype data with information available from the HapMap project, we determined LD across the region (36,45). To select the final panel of SNPs to be genotyped in the case-control analysis, we then used Tagger software (46) to choose SNPs that adequately represented all common haplotypes. We preferentially included SNPs of interest by constraining Tagger to choose the 4 novel SNPs in *IL1B* and the 24 database-derived SNPs that had been identified by sequencing in patients with RA, including 4 SNPs that had previously been associated with aggressive and/or erosive arthritis (*IL1B* -511 [rs16944], *IL1B* +3954 [rs1143634], *IL1A* -889 [rs1800587], and *IL1A* +4845 [rs17561]) (19–21,23, 24). We then eliminated some SNPs that had perfect or near-perfect proxies in the set.

This process ultimately led to identification of a set of 28 SNPs, including a minimally redundant subset of those selected by constraining the tagging algorithm, as well as 11 additional SNPs chosen by Tagger to provide complete coverage of the major haplotypes. Based on the LD structure in the CEPH samples, this set captured 61 of 66 haplotypes in a 20-kb region surrounding each gene, with an r^2 value between the tagging SNPs and untested alleles of >0.8 and a mean r^2 value of 0.984.

The 28 SNPs were genotyped in 1,314 RA patients from NARAC, which was used as our “discovery” sample set, because its RA patients have severe disease, with ~95% having evidence of joint erosions on hand radiographs. A total of 1,103 control samples were selected from the NYCP, as described previously (9). In a dominant model with 10% allele frequency, we had 90% power to detect a relative risk of 1.5 (47). The data were analyzed (by chi-square test) for correlation between the individual SNPs and susceptibility to RA (Table 1). Five SNPs in *IL1A* and 2 SNPs in *IL1B* showed differences between patients and control subjects, although none reached a Bonferroni-corrected threshold for significance ($P = 0.001$). The 5 SNPs in *IL1A* are in significant LD, with r^2 values of 0.98–0.99 in the NARAC case-control data set. The most significant association was observed for RA3, with an odds ratio (OR) of 1.27 (95%

confidence interval [95% CI] 1.09–1.48 [$P = 0.0021$]). Of the other SNPs initially identified by sequencing of RA samples, RA1 was shown to be monomorphic in all patients and control subjects, and the rare RA2 variant was observed in only 1 control subject. Because the NARAC collection includes affected siblings, it is possible that the OR could be inflated by using a simple case-control model. To examine this possibility, we performed the same analysis using only 1 sibling from each family ($n = 619$). The ORs for RA3 and RA4 were 1.37 (95% CI 1.13–1.67 [$P = 0.0015$]) and 1.49 (95% CI 1.05–2.11 [$P = 0.0242$]), respectively, suggesting that inclusion of siblings did not exaggerate the OR.

Recent studies have demonstrated that the high-risk alleles at *HLA* and *PTPN22* are more significantly associated with susceptibility to RA in the subset of patients who are positive for antibodies against CCP (48). We therefore investigated the degree of association of *IL1* polymorphisms with RA in subgroups of patients defined by anti-CCP antibody status. No increased association was observed when we examined anti-CCP antibody-positive patients versus control subjects or RF-positive patients versus control subjects, or after stratification for *HLA* susceptibility alleles (HLA-DRB1*0101, *0401, *0404, *0405, *0408, or *1001) or sex (data not shown). However, when the patients and control subjects were stratified according to their *PTPN22* genotype, the association signal for RA3 increased in the subset (912 patients and 933 control subjects) that was homozygous for the low-risk *PTPN22* allele (OR 1.43, 95% CI 1.19–1.71 [$P = 0.0000897$], with allele frequencies for RA3/A of 0.85 in patients and 0.80 in control subjects). Conversely, the OR for RA4 and, to a lesser extent, rs1143642, was enhanced in the 382 patients and 158 control subjects with at least 1 copy of the high-risk allele at *PTPN22* (for RA4, OR 2.48, 95% CI 1.37–4.48 [$P = 0.002$], with allele frequencies for RA4/C of 0.959 in patients and 0.905 in control subjects; for rs1143642, OR 1.68, 95% CI 1.03–2.72 [$P = 0.0344$], with allele frequencies of 0.941 in patients and 0.905 in control subjects).

Case-control replication of association with RA susceptibility

We attempted to replicate the association in 2 additional independent case-control sample sets by testing RA3 (which has the strongest suggestive association with susceptibility to RA) and RA4 (a novel and possibly RA-specific SNP variant). The first replication set included 948 anti-CCP antibody-positive individuals combined from 3 independent registries (WRDDB/NICRAP/SONORA) (31–33) and 1,455 unique control subjects from the NYCP. The second replication set comprised 525 patients and 504 control subjects from the University Clinical Hospital of Santiago de Compostela, Spain (30).

There was no population-specific variation in allele frequencies for RA3 and RA4 when comparing the NARAC and the replication samples. However, in contrast to the findings in NARAC, the frequency of the RA3/A disease-associated allele in the replication samples was actually lower in the patients with RA compared with control subjects, particularly in the Spanish patients (Table 2). For RA4, the higher frequency of the C allele in patients with RA was reproduced in the 2 replication sample sets, but these differences did not reach statistical significance ($P = 0.09$ and $P = 0.3$), regardless of *PTPN22* stratification (data not shown).

IL1 polymorphism and disease characteristics

Our second question was whether certain alleles of *IL1* are associated with more severe or erosive disease, as suggested by prior studies involving smaller numbers of patients (19–24). We examined the association between the SNP alleles at *IL1A* and *IL1B* and the presence of erosions on hand radiographs in patients enrolled in the BRASS registry. For genotyping, we again chose a set of “tag” SNPs in *IL1A* and *IL1B*, based on LD structure in CEPH, with priority given to SNPs discovered by sequencing in RA samples. (The procedure used to identify SNPs was the same as that used for the NARAC set, but, for technical reasons, the panel of SNPs was slightly different.) We again included the 4 SNPs previously associated with aggressive

or erosive arthritis (19–21,23,24). When analyzed in the CEPH samples, the 23 genotyped SNPs together captured 61 of 66 haplotypes in a 20-kb region surrounding each gene, with an r^2 value between the tagging and untested alleles of >0.8 and a mean r^2 value of 0.987.

In the BRASS cohort, 403 patients were found to have erosions, whereas 309 patients did not have erosions (80% power to detect a relative risk of 1.6). There was no association between erosion status and the previously reported *IL1B* -511, *IL1B* +3954, *IL1A* +4845, and *IL1A* -889 variants. The strongest association, which did not meet a corrected significance threshold of $P = 0.001$, was observed for the C allele at RA4 (OR 1.56, 95% CI 1.03–2.58 [$P = 0.036$]) (Table 3). In order to confirm this finding, we compared cases of erosive disease ($n = 142$) and cases of nonerosive disease ($n = 272$) in the cohort of Spanish patients for whom data on erosion status were available. In that cohort, RA4/C showed a frequency of 0.927 in the patients with erosive disease and a frequency of 0.942 in patients with nonerosive disease, for an OR of 0.78; these findings are in the opposite direction from those in the BRASS cohort.

Haplotype analysis

Because the analysis described above showed no reproducible association between polymorphism at single markers and the susceptibility to or severity of RA, we reconstructed phased haplotypes in the study subjects and searched for association between these haplotypes and disease incidence or characteristics.

For NARAC patients and control subjects, we determined haplotypes defined by all of the SNPs, the SNPs around *IL1A*, and the SNPs around *IL1B*. For the extended *IL1A* haplotype, regression analysis provided an omnibus P value of 0.007, with 1 haplotype (GGATCGATTGGT) occurring in 17% of patients and 20% of control subjects (OR 0.82, 95% CI 0.70–0.94 [$P = 0.006$]) (Table 4). If only a single sibling from each family of cases was included, the magnitude of the OR for that haplotype was unchanged (OR 0.81, 95% CI 0.68–0.98 [$P = 0.026$]), suggesting that the potential association was not attributable to merely the inclusion of related individuals. In contrast to *IL1A*, the regression analysis for the extended *IL1B* haplotype and the extended *IL1A-IL1B* haplotype revealed P values of 0.295 and 0.233, respectively, suggesting no statistically significant skewing in the haplotype distribution. The haplotype-specific results (by chi-square test) for the extended *IL1A-IL1B* haplotype are shown in Table 5.

In addition, we analyzed SNP haplotypes defined as blocks determined by D' confidence intervals (35) (Figure 1B), none of which provided an omnibus P value <0.05 in regression analysis (data not shown).

We similarly tested phased haplotypes reconstructed in the BRASS cohort for an association with erosion and other clinical variables. The omnibus P value for the regression was >0.05 for association with erosion status, anti-CCP antibodies, RF, and the DAS28 (data not shown).

DISCUSSION

Previous studies suggested an association between polymorphisms at *IL1* and severe, erosive RA. We sought to perform a comprehensive, more definitive study adequately powered to determine whether *IL1A* or *IL1B* contributes to the risk or severity of RA. *IL1A* and *IL1B* were sequenced in patients with RA to fully assess the potential disease-relevant genetic diversity, and tagging SNPs that captured the majority of this diversity were chosen for further assessment. In the single-marker analysis, involving more than 3,500 patients and 3,000 control subjects in 4 independent sample sets, we observed no association between *IL1* and RA susceptibility/severity that proved reproducible and met rigorous criteria for significance after correction for multiple comparisons.

The SNP demonstrating the strongest association with susceptibility to RA in the primary NARAC case-control set was RA3. Unfortunately, this association of RA3/A with susceptibility to RA was not validated in the replication samples. In fact, the allele distribution between patients and control subjects was in the opposite direction in the other 2 populations, suggesting that the lack of replication was not attributable to insufficient power only. The most likely explanation for the discrepancy is that the initial finding was a false positive and not representative of a true association. One alternative explanation is that the patients in the replication sets differed significantly from the discovery patients, and the association with disease susceptibility is only relevant in a subset of patients that was enriched in the NARAC cohort. Indeed, the patients in NARAC do represent a subset of RA patients with severe and aggressive disease, and, therefore, it is possible that the association with RA3 may be relevant only for severe erosive RA. If this were true, we would have expected to observe in the BRASS cohort an association of RA3/A with erosion status, which was not the case. If anything, the alternate RA3/G allele was associated with erosion. Theoretically, one could invoke the possibility that ethnic diversity is contributing to the difference between NARAC and the replication sample sets, but the allele frequencies for RA3 were similar in all groups.

Our analysis of the NARAC case-control samples was designed to have 90% power to detect a relative risk of 1.5 in a dominant model of an allele with 10% frequency (47). Therefore, our study was somewhat underpowered to detect weak associations with RA4 and other rare alleles. In fact, RA4/C showed a 1–2% greater frequency in patients than in control subjects in all 3 sample sets, and this difference was enhanced to 2–5% when stratified for the high-risk *PTPN22* allele (Tables 1 and 2, and data not shown). Based on the *P* values (by chi-square test) and a conservative Bonferroni correction for the number of comparisons, this difference is not statistically significant.

Interestingly, the same allele was potentially associated with erosive RA versus nonerosive RA in the BRASS cohort, with RA4/C being 3% more frequent in patients with erosive disease (uncorrected $P = 0.03$). This potential association with erosion, however, was not replicated in the Spanish cohort. One possible issue concerning the use of erosion status as a marker of disease severity is that a radiograph is obtained at one point in time, and that erosive disease may ultimately develop in some of the patients who are erosion-negative or in those patients who would have had erosions in the absence of aggressive therapy. Therefore, the readout for each patient is influenced by the length of therapy, the severity of disease, and the aggressiveness of treatment.

Previous studies had shown association of rs16944, rs1143634, rs1800587, and rs17561 with erosive arthritis or radiographic progression, but the associated SNP and sometimes the associated allele differed among those studies (19–21,23,24). The disparities between these prior studies may suggest that the original findings were false-positive results reflective of the small number of patients studied. Indeed, our study in the BRASS cohort showed no statistically significant evidence of association with erosive disease status for any of these SNPs.

Although the single-marker analysis did not reveal a significant association between RA and *IL1A*, the haplotype analysis did uncover an *IL1A* haplotype, which was present in 17% of patients and 20% of control subjects, with a potential association with disease susceptibility. This finding could suggest that a certain set of SNP alleles may alter IL-1 function in an additive or synergistic manner or may indicate that a relevant allele is incompletely tagged with any of our single markers but is represented by one of the complex haplotypes. Because we did not genotype the entire set of *IL1A* and *IL1B* SNPs in the replication sample sets, we could not validate the haplotype association. At this point, we cannot exclude the possibility that certain

haplotypes at *IL1A* may contribute to RA susceptibility. If this is the case, however, the magnitude of the effect is likely to be small.

We did not examine the relevance of polymorphisms in *IL1RN*, the gene that encodes the competitive antagonist of IL-1 α and IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra). In fact, similar to the case with *IL1A* and *IL1B*, small studies have suggested an association with polymorphism in *IL1RN* and RA susceptibility and/or severity (49,50), but results have been contradictory (20,21), and therefore replication is needed. Given the importance of IL-1 in inflammatory arthritis, it may be interesting to perform a well-powered candidate gene study to examine the contribution of polymorphisms in other members of the IL-1 pathway, including the genes for the IL-1 receptors, IL-Ra, and components of the inflammasome.

In summary, based on our comprehensive study of variation at the *IL1A* and *IL1B* loci and genotyping in a large number of patients with RA and control subjects, we observed no evidence that common variants in *IL1* contribute significantly to the risk or severity of RA in the majority of patients.

Acknowledgements

Scholarship, Arthritis National Research Foundation

K08 AI072044-01A1, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH

T32 AR 007530-21, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, NIH

R01 AR046580-08, National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, NIH

Abbreviations

RA	rheumatoid arthritis
CCP	cyclic citrullinated peptides
SNP	single-nucleotide polymorphism
PCR	polymerase chain reaction
SE	shared epitope
DAS	disease activity score
RF	rheumatoid factor
LD	linkage disequilibrium
r²	correlation of alleles at two different sites (measure of LD)
OR	

Arthritis Rheum. Author manuscript; available in PMC 2008 September 10.

odds ratio

References

1. Dinarello CA. The many worlds of reducing interleukin-1 [editorial]. *Arthritis Rheum* 2005;52:1960–7. [PubMed: 15986340]
2. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation [review]. *J Exp Med* 2005;201:1355–9. [PubMed: 15867089]
3. Fitzgerald AA, Leclercq SA, Yan A, Homik JE, Dinarello CA. Rapid responses to anakinra in patients with refractory adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum* 2005;52:1794–803. [PubMed: 15934079]
4. Goldring SR. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(Suppl 2):ii11–6. [PubMed: 12817090]
5. Dayer JM. The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(Suppl 2):ii3–10. [PubMed: 12817089]
6. Bresnihan B, Cobby M. Clinical and radiological effects of anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42(Suppl 2):ii22–8. [PubMed: 12817092]
7. Gregersen PK. Teasing apart the complex genetics of human autoimmunity: lessons from rheumatoid arthritis [review]. *Clin Immunol* 2003;107:1–9. [PubMed: 12738244]
8. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:1205–13. [PubMed: 2446635]
9. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004;75:330–7. [PubMed: 15208781]
10. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661–78. [PubMed: 17554300]
11. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007;357:977–86. [PubMed: 17804842]
12. Lee HS, Remmers EF, Le JM, Kastner DL, Bae SC, Gregersen PK. Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population. *Mol Med* 2007;13:455–60. [PubMed: 17932559]
13. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis: a genomewide study. *N Engl J Med* 2007;357:1199–209. [PubMed: 17804836]
14. Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G, et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis [published erratum appears in *PLoS Med* 2007;4:e358]. *PLoS Med* 2007;4:e278. [PubMed: 17880261]
15. Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, et al. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2007;39:1477–82. [PubMed: 17982456]
16. Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, et al. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet* 2007;39:1431–3. [PubMed: 17982455]
17. Ohmura K, Johnsen A, Ortiz-Lopez A, Desany P, Roy M, Besse W, et al. Variation in IL-1 gene expression is a major determinant of genetic differences in arthritis aggressivity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12489–94. [PubMed: 16113081]
18. Barrera P, Faure S, Prud'homme JF, Balsa A, Migliorini P, Chimenti D, et al. for the European Consortium on Rheumatoid Arthritis Families (ECRAF). European genetic study on rheumatoid arthritis: is there a linkage of the interleukin-1 (IL-1), IL-10 or IL-4 genes to RA? *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:709–14. [PubMed: 11791644]
19. Cox A, Camp NJ, Cannings C, Di Giovine FS, Dale M, Worthington J, et al. Combined sib-TDT and TDT provide evidence for linkage of the interleukin-1 gene cluster to erosive rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 1999;8:1707–13. [PubMed: 10441334]

Arthritis Rheum. Author manuscript; available in PMC 2008 September 10.

20. Buchs N, Di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun* 2001;2:222–8. [PubMed: 11477478]
21. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, et al. Interleukin-1, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1093–100. [PubMed: 10366101]
22. Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S, Lefvert AK. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-, IL-1, and IL-1Ra genes. *J Rheumatol* 2002;29:212–9. [PubMed: 11838837]
23. Genevay S, Di Giovine FS, Perneger TV, Silvestri T, Stingelin S, Duff G, et al. Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;47:303–9. [PubMed: 12115161]
24. Jouvenne P, Chaudhary A, Buchs N, Giovine FS, Duff GW, Miossec P. Possible genetic association between interleukin-1 gene polymorphism and the severity of chronic polyarthritis. *Eur Cytokine Netw* 1999;10:33–6. [PubMed: 10210770]
25. The International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426:789–96. [PubMed: 14685227]
26. Shadick NA, Heller JE, Weinblatt ME, Maher NE, Cui J, Ginsburg GS, et al. Opposing effects of the D70 mutation and the shared epitope in HLA-DR4 on disease activity and certain disease phenotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1497–502. [PubMed: 17491100]
27. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts: development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44–8. [PubMed: 7818570]
28. Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Etzel C, et al. for the North American Rheumatoid Arthritis Consortium. Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: a replication study and combined analysis of 512 multicase families. *Arthritis Rheum* 2003;48:906–16. [PubMed: 12687532]
29. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24. [PubMed: 3358796]
30. Rodriguez-Lopez J, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Regulatory polymorphisms in extracellular matrix protease genes and susceptibility to rheumatoid arthritis: a case-control study. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R1. [PubMed: 16356191]
31. Wolfe F, Michaud K, Gefeller O, Choi HK. Predicting mortality in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1530–42. [PubMed: 12794820]
32. Fries JF, Wolfe F, Apple R, Erlich H, Bugawan T, Holmes T, et al. HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum* 2002;46:2320–9. [PubMed: 12355479]
33. Bombardier C, Deaton RL, Gregerson P, Massarotti E, Formica C, Weisman MH. Pattern of DMARD use in a North American cohort of patients with early rheumatoid arthritis (RA) (SONORA) [abstract]. *Arthritis Rheum* 2002;46(Suppl 9):S344.
34. Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I. VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 2004;32(Web Server issue):W273–9. [PubMed: 15215394]
35. Tang K, Fu DJ, Julien D, Braun A, Cantor CR, Koster H. Chip-based genotyping by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10016–20. [PubMed: 10468554]
36. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;296:2225–9. [PubMed: 12029063]
37. Zucchelli S, Holler P, Yamagata T, Roy M, Benoist C, Mathis D. Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity* 2005;22:385–96. [PubMed: 15780994]
38. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21:263–5. [PubMed: 15297300]

39. Purcell S, Daly MJ, Sham PC. WHAP: haplotype-based association analysis. *Bioinformatics* 2007;23:255–6. [PubMed: 17118959]
40. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68:978–89. [PubMed: 11254454]
41. Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003;73:1162–9. [PubMed: 14574645]
42. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001;27:234–6. [PubMed: 11242096]
43. Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, et al. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet* 2006;15:519–29. [PubMed: 16399797]
44. De Bakker PI, Burtt NP, Graham RR, Guiducci C, Yelensky R, Drake JA, et al. Transferability of tag SNPs in genetic association studies in multiple populations. *Nat Genet* 2006;38:1298–303. [PubMed: 17057720]
45. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001;29:229–32. [PubMed: 11586305]
46. De Bakker PI, Yelensky R, Pe'er I, Gabriel SB, Daly MJ, Altshuler D. Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet* 2005;37:1217–23. [PubMed: 16244653]
47. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 2003;19:149–50. [PubMed: 12499305]
48. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet* 2005;77:1044–60. [PubMed: 16380915]
49. Carreira PE, Gonzalez-Crespo MR, Ciruelo E, Pablos JL, Santiago B, Gomez-Camara A, et al. Polymorphism of the interleukin-1 receptor antagonist gene: a factor in susceptibility to rheumatoid arthritis in a Spanish population. *Arthritis Rheum* 2005;52:3015–9. [PubMed: 16200608]
50. Kapetanovic MC, Lindqvist E, Sturfelt G, Saxne T, Truedsson L, Eberhardt K. The impact of IL-1Ra and MBL gene polymorphisms on joint damage after 5 and 10 years in patients with early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2007;34:894–5. [PubMed: 17407253]

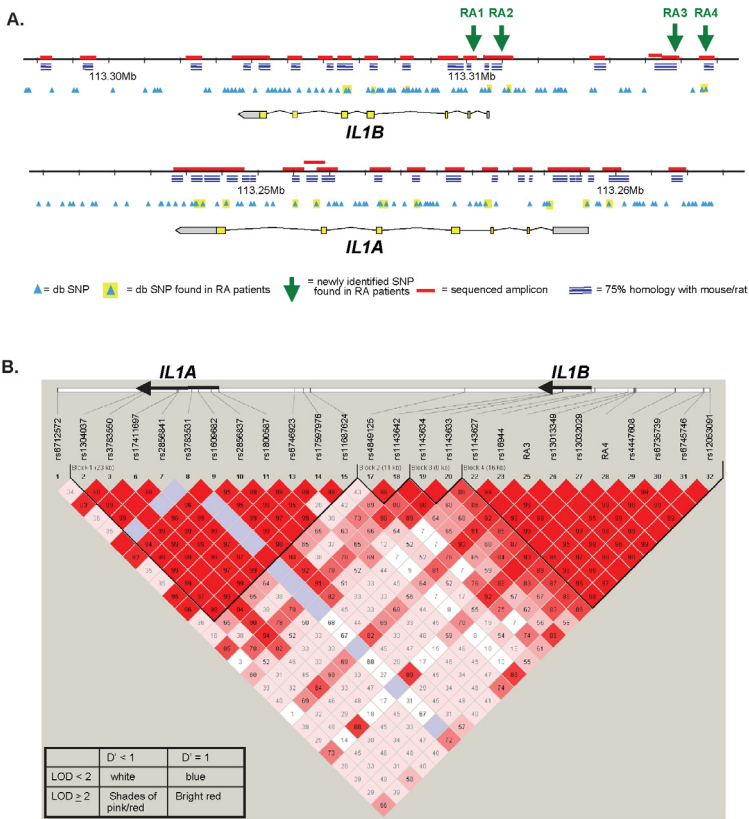


Figure 1.
A. Schematic diagram of the *IL1A* and *IL1B* loci. B. Linkage disequilibrium map of the SNPs genotyped in *IL1A* and *IL1B* in NARAC, as displayed by the Haploview software package. Haplotype blocks (black lines) are drawn according to confidence intervals (35). D' values are shown in the boxes.

Table 1

28 SNPs from *IL1A* and *IL1B* were genotyped in 1314 NARAC RA cases and 1103 controls. The allele that is more frequent in cases is shown in bold capital letters and the allele frequency and odds ratio are given for this allele. Genotype counts: (homozygotes of the allele more frequent in cases, heterozygotes, homozygotes of the alternate allele). P-values are from chi-squared analysis performed on the allele counts for single markers in RA patients versus controls.

Allelic Polymorphism in *IL1* in Cases vs. Controls: NARAC

Gene	SNP	SNP Info.	Alleles	Cases Freq (Gen. Cts)	Controls Freq (Gen. Cts)	OR	95% CI	P-value
<i>IL1A</i>	rs6712572	intron (<i>CKAP2L</i>)	T/g	0.51 (332, 552, 296)	0.50 (282, 536, 276)	1.04	0.93	5.0E-01
	rs1304037	3' UTR (<i>IL1A</i>)	A/g	0.73 (686, 506, 92)	0.70 (546, 444, 105)	1.16	1.02	2.1E-02
	rs3783350	intron (<i>IL1A</i>)	C/a	0.31 (133, 530, 609)	0.30 (107, 416, 538)	1.08	0.95	2.6E-01
	rs17560	intron (<i>IL1A</i>)	G/t	0.73 (686, 513, 87)	0.70 (545, 443, 104)	1.17	1.03	1.5E-02
	rs3783351	intron (<i>IL1A</i>)	A/g	0.31 (133, 530, 609)	0.30 (107, 416, 538)	1.08	0.95	2.6E-01
	rs3783351	intron (<i>IL1A</i>)	A/g	0.00 (0, 7, 1089)	0.00 (0, 7, 1089)	1.09	0.41	8.6E-01
	rs169682	intron (<i>IL1A</i>)	C/a	0.31 (142, 516, 621)	0.29 (110, 418, 559)	1.10	0.97	1.4E-01
	rs2856837	intron (<i>IL1A</i>)	C/t	0.73 (686, 507, 90)	0.70 (560, 442, 104)	1.15	1.02	2.8E-02
	rs180887	5' UTR (<i>IL1A</i>)	C/t	0.73 (687, 507, 89)	0.70 (546, 445, 105)	1.17	1.03	1.5E-02
	rs6746923	5' non-gene region	A/g	0.42 (233, 615, 440)	0.40 (176, 535, 383)	1.06	0.94	1.19
<i>IL1B</i>	rs1759976	5' non-gene region	A/g	0.13 (29, 283, 979)	0.12 (15, 242, 842)	1.08	0.91	1.28
	rs11687624	5' non-gene region	C/t	0.44 (249, 543, 392)	0.42 (192, 532, 372)	1.10	0.98	1.24
	rs44545	5' non-gene region	A/g	0.32 (163, 571, 111)	0.30 (148, 561, 108)	1.08	0.95	1.51
	rs44545	intron (<i>IL1B</i>)	C/a	0.93 (761, 417, 63)	0.92 (692, 143, 10)	1.22	0.98	1.51
	rs1143634	synonymous (<i>IL1B</i>)	G/a	0.78 (761, 417, 63)	0.78 (663, 378, 55)	1.02	0.89	1.17
	rs1143633	intron (<i>IL1B</i>)	T/c	0.37 (159, 580, 485)	0.37 (154, 493, 445)	1.00	0.89	1.13
	RA1	intron (<i>IL1B</i>)	C/t	1.00 (1300, 0, 0)	1.00 (1098, 0, 0)	NA	NA	NA
	rs1143627	5' non-gene region	A/g	0.66 (544, 544, 149)	0.65 (465, 493, 135)	1.04	0.92	1.17
	rs16944	5' non-gene region	G/a	0.66 (573, 548, 156)	0.65 (466, 501, 134)	1.06	0.94	1.20
	RA2	5' non-gene region	C/t	1.00 (1236, 0, 0)	1.00 (1095, 1, 0)	NA	NA	NA
<i>IL1B</i>	rs13013249	5' non-gene region	A/g	0.66 (537, 547, 153)	0.65 (467, 493, 135)	1.02	0.90	1.15
	RA3	5' non-gene region	T/c	0.47 (198, 451, 250)	0.45 (190, 429, 276)	1.09	0.95	1.24
	rs13032029	5' non-gene region	C/g	0.94 (829, 100, 21)	0.92 (778, 123, 6)	1.35	1.03	2.7E-02
	rs447608	5' non-gene region	T/c	0.48 (203, 469, 250)	0.46 (200, 432, 270)	1.06	0.93	1.21
	rs6735739	5' non-gene region	C/t	0.66 (568, 576, 156)	0.66 (475, 495, 130)	1.01	0.90	1.14
	rs6745746	5' non-gene region	A/g	0.46 (228, 637, 332)	0.45 (222, 534, 329)	1.03	0.91	1.16
	rs12053091	5' non-gene region	C/t	0.27 (77, 346, 499)	0.26 (69, 327, 504)	1.06	0.92	1.23

Table 2

RA3 and RA4 were genotyped in two independent replication case-control sample sets. First, they were genotyped in 948 CCP-positive cases from the WRDDB/NICRAP/SONORA cohort and 1455 controls from the NYCP. Next, they were genotyped in 525 RA cases and 504 controls from Northern Spain. Frequencies and odds ratios are shown for the allele that is capitalized and in bold. Genotype counts: (homozygotes of the allele capitalized and in bold, heterozygotes, homozygotes of the alternate allele). Chi-squared analysis of allele counts was performed for cases versus controls.

Allelic Polymorphism in RA3 and RA4 in Cases vs. Controls: Replication Sets

SNP	Allele	Cases Freq (Gen. Cts.)	Controls Freq (Gen. Cts)	OR	95% CI	P value
WRDDB/NICRAP/SONORA						
RA3	A/g	0.79 (589, 322, 37)	0.89 (940, 452, 62)	0.94	0.81	3.9E-01
RA4	C/g	0.94 (844, 104, 6)	0.93 (1261, 194, 6)	1.23	0.96	9.7E-02
SPANISH COHORT						
RA3	A/g	0.77 (310, 185, 26)	0.79 (318, 166, 20)	0.88	0.71	2.2E-01
RA4	C/g	0.92 (432, 73, 4)	0.91 (415, 83, 5)	1.18	0.86	3.0E-01

Table 3

24 SNPs from *IL1A* and *IL1B* were genotyped in 712 RA patients. A chi-squared analysis was performed comparing *IL1* allele counts in the 403 of these patients that had erosions on plain radiographs of the hands versus the 309 that did not. Frequencies and odds ratios are shown for the allele that is capitalized and in bold. Genotype counts: (homozygotes of the allele capitalized and in bold, heterozygotes, homozygotes of the alternate allele). Chi-squared analysis of allele counts was performed for cases versus controls.

Allelic Polymorphism in *IL1* in Patients With vs. Without erosions: BRASS Cohort

Gene	SNP	SNP Info	Alleles	Eros pos. Freq (Gen. Cts)	Eros neg. Freq (Gen. Cts)	OR	95% CI	P value
<i>IL1A</i>	rs6716572	intron (CKAP2L)	T/g	0.52 (108, 209, 93)	0.51 (72, 154, 71)	1.06	0.86	1.32
	rs3783550	intron (<i>IL1A</i>)	C/a	0.28 (34, 160, 203)	0.28 (24, 115, 153)	1.01	0.79	1.25
	rs1725131	missense (<i>IL1A</i>)	G/t	0.74 (223, 137, 30)	0.70 (145, 117, 34)	1.23	0.97	1.60
	rs1803391	missense (<i>IL1A</i>)	C/g	0.60 (60, 140, 180)	0.60 (50, 110, 160)	1.00	0.80	1.20
	rs1803399	5' UTR (<i>IL1A</i>)	C/g	0.74 (222, 138, 26)	0.71 (145, 116, 29)	1.18	0.93	1.55
	rs1805387	5' UTR (<i>IL1A</i>)	C/t	0.74 (222, 138, 30)	0.70 (146, 118, 34)	1.21	0.95	1.57
	rs6746923	5' non-gene region	A/g	0.45 (80, 200, 127)	0.40 (50, 136, 110)	1.20	0.96	1.49
	rs17597976	5' non-gene region	A/g	0.14 (4, 104, 294)	0.13 (7, 61, 226)	1.12	0.81	1.46
	rs4849125	3' non-gene region	A/g	0.72 (213, 155, 37)	0.68 (137, 119, 37)	1.22	0.96	1.57
	rs7596684	3' non-gene region	T/c	0.82 (271, 117, 17)	0.79 (180, 97, 16)	1.19	0.91	1.61
<i>IL1B</i>	rs1143634	synonymous (<i>IL1B</i>)	G/a	0.79 (252, 129, 19)	0.78 (167, 106, 10)	1.09	0.84	1.45
	rs1143633	intron (<i>IL1B</i>)	C/g	0.38 (38, 151, 156)	0.36 (34, 113, 114)	1.12	0.89	1.38
	rs1143627	intron (<i>IL1B</i>)	C/g	0.67 (181, 168, 44)	0.60 (73, 111, 36)	1.27	0.95	1.69
	rs16944	5' non-gene region	A/g	0.67 (181, 168, 44)	0.66 (120, 129, 31)	1.07	0.85	1.37
	rs13013349	5' non-gene region	G/a	0.67 (177, 177, 44)	0.66 (118, 134, 30)	1.05	0.84	1.34
	rs13013349	5' non-gene region	A/g	0.80 (254, 125, 17)	0.82 (189, 84, 8)	0.86	0.65	1.17
	rs13032029	5' non-gene region	G/a	0.67 (180, 176, 44)	0.66 (119, 136, 28)	1.04	0.83	1.33
	rs13032029	5' non-gene region	T/c	0.48 (93, 196, 107)	0.46 (56, 142, 80)	1.11	0.89	1.37
	rs447608	5' non-gene region	C/g	0.94 (357, 36, 5)	0.91 (232, 49, 0)	1.56	1.03	2.58
	rs447608	5' non-gene region	T/c	0.49 (84, 158, 146)	0.46 (53, 138, 76)	1.09	0.88	1.36
<i>IL1B</i>	rs6745739	5' non-gene region	A/g	0.47 (82, 208, 105)	0.45 (46, 160, 76)	1.05	0.83	1.34
	rs6745746	5' non-gene region	A/g	0.47 (82, 208, 105)	0.45 (46, 160, 76)	1.05	0.89	1.37
	rs12053091	5' non-gene region	C/t	0.25 (23, 148, 215)	0.23 (17, 89, 161)	1.12	0.87	1.41

Table 4

All of the SNPs within the 20kb region of *IL1A* were used to construct haplotypes for the NARAC cases and controls. Haplotypes of a frequency > 0.005 are shown. SNPs are ordered as in Table 1. OR = odds ratio and 95% CI = 95% confidence interval of the OR. *IL1A* Haplotype Association with NARAC Cases vs. Controls

Haplotype <i>IL1A</i>		No.		Freq.		OR	95% CI	P value
cases	ctrls	cases	ctrls	cases	ctrls			
G A C T G G G G C C C C C C C C	T T G T C G T C G A A T C C C C C C C	776	607	0.30	0.28	1.12	0.99	1.27
T G G A A T T G G A A T C C C C C C C	G G G T C G T C G A A T C C C C C C C	775	443	0.29	0.28	1.12	0.99	1.27
T G G A A T T G G A A T C C C C C C C	G G G T C G T C G A A T C C C C C C C	443	443	0.17	0.20	0.82	0.70	0.94
T G G A A T T G G A A T C C C C C C C	G G G T C G T C G A A T C C C C C C C	319	261	0.12	0.12	1.04	0.87	1.24
T G G A A T T G G A A T C C C C C C C	G G G T C G T C G A A T C C C C C C C	229	203	0.09	0.09	0.95	0.78	1.16
T G G A A T T G G A A T C C C C C C C	G G G T C G T C G A A T C C C C C C C	14	26	0.01	0.01	0.45	0.24	0.87
T G G A A T T G G A A T C C C C C C C	G G G T C G T C G A A T C C C C C C C	10	20	0.00	0.01	0.42	0.20	0.90
Remaining Haplotypes		83	42	0.03	0.02			

Otros genes candidatos en AR

Lack of Association to Rheumatoid Arthritis of Four Candidate Genes:

CFH, CD209, Eotaxin-3 and MHC2TA

Rebeca Dieguez-Gonzalez¹, Servet Akar¹, Manuel Calaza¹, Isidoro Gonzalez-Alvaro², Benjamin Fernandez-Gutierrez³, Jose Ramon Lamas³, Arturo R de la Serna⁴, Rafael Caliz⁵, Francisco J Blanco⁶, Alejandro Balsa⁷, Maria Luisa Velloso⁸, Eva Perez-Pampin¹, Jose Luis Pablos⁹, Federico Navarro¹⁰, Javier Narvaez¹¹, Francisco Javier Lopez-Longo¹², Gabriel Herrero-Beaumont¹³, Juan J Gomez-Reino^{1,14}, Antonio Gonzalez¹

¹ Laboratorio de Investigacion 2 and Rheumatology Unit, Hospital Clinico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela, Spain

² Rheumatology Unit, Hospital Universitario de la Princesa. Madrid, Spain

³ Rheumatology Unit, Hospital Clinico San Carlos. Madrid, Spain

⁴ Rheumatology Unit, Hospital Santa Creu e San Pau. Barcelona, Spain

⁵ Rheumatology Unit, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada, Spain

⁶ Laboratorio de Investigación Osteoarticular y del Envejecimiento. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, Spain

⁷ Rheumatology Unit, Hospital La Paz. Madrid, Spain

⁸ Rheumatology Unit, Hospital Universitario de Valme. Sevilla, Spain

⁹ Rheumatology Unit, Hospital 12 de Octubre. Madrid, Spain

¹⁰ Rheumatology Unit, Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla, Spain

¹¹ Rheumatology Unit, Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona, Spain

¹² Rheumatology Unit, Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid, Spain

¹³ Rheumatology Unit, Fundacion Jimenez Diaz. Madrid, Spain

¹⁴ Department of Medicine, University of Santiago de Compostela. Spain

Corresponding author:

Antonio Gonzalez

Laboratorio de Investigacion 2

Hospital Clinico Universitario de Santiago

Travesia de Choupana sn.

15706-Santiago de Compostela

Spain

Tfn: 34 981 950 903

Fax: 34 981 951 068

Antonio.Gonzalez.Martinez.Pedrayo@sergas.es

anlugon@hotmail.com

Key words: Rheumatoid arthritis, Complex diseases, Genetics, Case-control study, Candidate genes, Replication

Running Title: Four Candidate Genes Not Associated to RA

ABSTRACT

Objectives: We aimed to explore association to rheumatoid arthritis (RA) of single nucleotide polymorphisms (SNP) in 4 candidate genes, Complement Factor H (CFH), CD209 or DC-SIGN, eotaxin-3 and the MHC class II Transactivator (MHC2TA) genes, which have been previously reported as important for RA (eotaxin-3 and MHC2TA) or for other immune-mediated diseases (CFH and CD209).

Material and methods: Genotypes for the 7 selected SNPs were obtained in 1587 patients with RA and 1570 controls of Spanish ancestry. Analyses after stratification for gender, erosions, rheumatoid factor, shared epitope, anti-CCP antibodies (ACPA) and the R620W PTPN22 SNP were done.

Results: None of the comparisons between patients with RA and controls or between the different strata of patients according to disease features was significant.

Conclusion: None of the newly explored genes in relation with RA, CFH and CD209, showed evidence of association. However, is still possible that other polymorphisms in the CFH locus influence RA because it shows a very complex genetics. In addition, we did not replicate the association of eotaxin-3 to RA described in Koreans, which has not been addressed in any other replication study, or that of the MHC2TA SNP, which has already been largely disproved by other replication studies.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) has a complex genetic etiologic component that accounts for about 50 % of disease liability and is made of multiple low penetrance polymorphisms [1]. Great efforts have been made in recent years to identify these polymorphisms with some notable successes, but still a large fraction of the genetic component awaits explanation. The most comprehensive results have been obtained with the genome-wide association (GWA) studies [2-5]. Each of these studies has addressed a large number of SNPs along the genome in large sample collections. Recently, a meta-analysis of some of these studies has been performed [6]. As a result of these efforts, there is currently very definitive evidence supporting a series of RA genetic factors that include the classical HLA and PTPN22 factors, and the newly discovered factors in the STAT4, C5-TRAF1, CD40 and 6q23 loci. Also very compelling, although not supported in the WGAS, is the evidence of the involvement of IRF5 in some subset of RA patients still not definitively defined [7-9] and of other genetic factors that seem largely specific of the Asian ethnicity, like PADI4 [10] and FCRL3 [11]. A lot of research is still needed because all of the associated loci together only account for less than half the genetic component and for most of these genetic associations no causal polymorphism has been identified. It will be unwarranted to rely only in GWA to identify the remaining factors because they do not cover yet all the variation in the genome and because other less comprehensive approaches have been successful in RA, leading to the identification of PTPN22 [12], STAT4 [13] among others. With this idea in mind we have selected seven SNPs in four genes, complement factor H (CFH), CD209, eotaxin-3 and MHC Class II Transactivator (MHC2TA), for study in RA. They had been shown to be associated to RA or to related diseases in previous studies. However, none was associated to RA in the 1600 Spanish patients that we have studied.

MATERIAL AND METHODS

Samples

DNA samples were obtained from peripheral blood of Spanish patients with RA and healthy controls. Recruiting was done as described [14]. Briefly the study included a total of 1587 patients and 1570 controls from the Spanish tertiary hospitals included in Supplementary Table 1. Patients with RA were classified according to the 1987 American College of Rheumatology criteria [15]. Clinical data for patients are provided in Table 1. The Ethical Committee for Clinical Research of Galicia approved this study as well as the ethic committees from the recruiting centers and all participants gave their written informed consent.

SNP genotyping

We have studied 7 polymorphisms from 4 genes, CFH (rs1061170, rs800292, rs3766404), CD209 (rs4804803), Eotaxin3 (rs6965556, rs2302009) and MHC2TA (rs3087456), in a single multiplex reaction. They were amplified in a single PCR reaction done with the Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, Valencia, CA) on 30 ng of genomic DNA. PCR conditions were: initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 90 seconds, and extension at 72°C for 90 seconds. Final extension was performed for 10 min at 72°C. PCR products were purified by Exo-SAP digestion with Exonuclease I (Epicentre, Madison, WI) and Shrimp Alkaline Phosphatase (GE Healthcare, Baelona, Spain) for 1 hour at 37°C, and 15 min at 75°C to inactivate the enzymes. Subsequently, single-base extension reactions with the SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) were done. Reaction conditions were: 25 cycles of denaturation at 96° C for 10 s, annealing at 50° C for 5 s and single-base extension at 60° C for 30 s. Post-extension treatment with SAP was done for 1 hour at 37° C. Genotypes were obtained in the Abi Prism 3130xl Genetic

Analyzer (Applied Biosystems). The used primers and probes are detailed in Supplementary Table 2.

Statistical analysis

Analysis of results relied on three software: Haploview [16], a customized version of Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK), and Phase2 [17]. HWE was tested in control samples with a threshold of 0.05 without correction for multiple testing. Chi square association tests were performed to compare allele frequencies in 2 x 2 contingency tables. Effects on clinical subgroups of patients were explored by sample stratification. Power estimates were obtained with the Power and Sample size software [18]. We excluded from analysis of the MHC2TA SNP samples that were already included in previous reports to avoid duplications [19, 20].

RESULTS

Genotypes of the 7 SNPs were obtained in 99.9 % of the samples and they were in HWE in control samples. None of them was associated to RA even with a nominal threshold of significance ($p < 0.05$; Table 2). In a similar way, allele frequency comparisons were done after stratifying the samples by sex, SE, ACPA, RF, presence of joint erosions, or the R620W PTPN22 SNP, most of these analyses did not show any significant difference between the two RA patient groups or between each of these groups and the controls (not shown). There was only a nominal difference in a specific comparison: the rare allele of the rs1061170 SNP in the CFH gene was less common in SE negative patients than in the SE positive patients (31.5 % vs 37.9 %, $P = 0.02$), but it was not different from controls (35.8 %, $P = 0.06$) and the difference did not persist after correction by multiple testing. The corresponding genotype frequency comparisons gave similar results (Table 2 and not shown). Haplotype analysis

of the CFH gene, where three SNPs were studied, did not show any difference between cases and controls (data not shown).

DISCUSSION

We have taken a candidate gene approach in this study to confirm or to identify new RA genetic factors. The selected SNPs had already been described as important in susceptibility to RA or to other diseases that share pathological mechanisms with RA. However, none of them was associated with RA in our samples. Confronted with these negative results it is important to critically assess the strength of the previous evidence suggesting a role of these genes in RA and the power of our study. It is also necessary to determine the status of these putative genetic factors in light of the all available all evidence.

Three of the studied SNPs are in the complement factor H gene (CFH) that shows a definitive and marked association with age-related macular degeneration (AMD) [21-24], the commonest form of blindness in the adult. We choose three SNPs because they represent independent association signals to AMD [22]. However, most studies have focused in one of them, rs1061170, a non-synonymous SNP in exon 9 of the CFH gene, resulting in the Y402H aminoacid change and to a lower extent in other non-synonymous SNP (rs800292, I62V). CFH is necessary to prevent the spontaneous activation of the alternative complement pathway in fluids or in tissue surfaces bearing polyanions which are bound by CFH [25]. Polymorphisms in CFH predispose to AMD by a deficient complement-inhibitory activity of the at-risk alleles. We hypothesized that the AMD-associated polymorphisms could be related to RA due to multiple pieces of evidence: complement consumption in RA synovial fluid, together with increased levels of C5a and C5b-9, and positive correlation between complement activation in synovial fluid and RA disease activity [26].

In addition, CFH is expressed and secreted by synovial fibroblasts and is present at increased levels in the synovium and synovial fluid from patients with RA [27, 28]; the alternative activation pathway is the only critical in some experimental models of arthritis [29, 30]; and CFH is encoded in a locus that has been linked to RA susceptibility [31].

We also considered that a regulatory SNP in the promoter of CD209 (rs4804803), coding for Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin (DC-SIGN), whose minor allele is quite convincingly associated with protection from dengue fever [32] and tuberculosis [33] deserved to be analyzed in RA. CD209 is a dendritic cell (DC) specific C-type lectin superfamily receptor that has functions of pattern recognition receptor in the innate response to infection, DC migration, and the initial steps of T cell activation [34]. Interestingly for our study, CD209 is expressed by most synovial macrophages in addition to by DCs in RA, but not by OA or control synovial macrophages or by macrophages in other tissues or in the blood of RA patients [35]. This particular expression pattern together with the specific colocalization of the CD209 positive cells with ICAM-3 positive T cells in RA synovium suggested a significant involvement of this receptor in RA pathology [35].

The remaining SNPs were associated to RA in previous studies and our aim, here, was to replicate these results. Two of SNPs are in eotaxin-3 or CC chemokine ligand 26 (CCL26). The rs2302009 SNP showed a remarkable association to RA in Koreans (O.R. = 2.99) [36]. This same SNP was also associated to allergic rhinitis, asthma, IgE levels and eosinophil counts also in Koreans [37, 38] and to eosinophil esophagitis in Europeans [39]. It is located in the 3' UTR of the gene but has not an identified functional effect. The rs6965556 SNP is an intronic SNP in the same gene that has shown association in some of the same studies including the one addressing RA [36, 38]. No direct functional RA involvement of eotaxin-3 has been reported, though a possible

role in recruiting mast cells to the inflamed synovium can be hypothesized. These cells are present in limited numbers in normal human synovium, but they constitute 5% or more of all synovial cells in RA [40] and they are critical for joint inflammation in a murine arthritis model [41]. The other SNP we tried to replicate is rs3087456 in the MHC2TA gene, which is a good candidate for a role in RA. This SNP was associated to RA and to other immune-mediated diseases in a Swedish study [42]. However, multiple subsequent case-control studies by different groups have been negative and a recent metaanalysis of 10 studies has concluded that this SNP is not associated to RA [43]. Our results reinforce this conclusion and we will not discuss them further.

Regarding the statistical power of our study, it was enough to detect an effect size of O.R. between 1.16 and 1.21 for SNPs rs3766404 and rs1061170, respectively (for $\alpha = 0.05$ and $1 - \beta = 0.8$). These two were the SNPs with the lowest and the highest MAF and, consequently, with least and most power. Therefore, the study was much larger than the necessary for replication of the described effects in eotaxin-3 (O.R. = 2.99 and 2.13) [36]. It is unclear what could be the cause of the lack of replication of the eotaxin-3 results. Most likely factors include ethnic differences in RA genetics or in the interaction between environmental and genetic factors; or, on the contrary, false positive associations in the Korean study. The first possibility is suggested by the differences between Europeans and Asians in other RA genetic factors including PTPN22 [44], PADI4 [10], FCLR3 [11] and IRF5 [45]. The possibility of a false positive is suggested by the relative small size of the Korean study, 292 cases and 281 controls [36], because it has become clear that the reproducibility of studies showing significant associations is directly related with their size [46].

Two of the SNPs from CFH, rs800292 and rs3766404 are included in the SNP panels used in the GWA of two of the large RA sample collections that have

been reported, but no mention of them was done [4]. None of the other SNPs included in our study was covered in any of the GWA. Therefore, for CFH and CD209 no other RA association analysis is available and we cannot exclude effects below the level of about O.R. = 1.18, which corresponds to moderate-weak effects in the current context of RA genetics[1]. It is still possible that other polymorphisms in CFH or nearby sequences could have an effect on RA because the genetics of this locus is very complex and new associations to AMD have been discovered in the same gene [47, 48] and in neighboring CFH related genes, as the large deletion of two of them [49].

In summary, our exploration of four candidate RA genes, CFH, CD209, eotaxin-3 and MHC2TA, in a large collection of Spanish samples has not shown association with any of them.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Cristina Fernandez-Lopez for her excellent technical assistance. This project was supported by grants PI04/1513 and PI06/0620 from the Instituto de Salud Carlos III (Spain) with participation of funds from FEDER (European Union). S. Akar was the recipient of an ARTICULUM Fellowship.

REFERENCES

1. Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; **47**:399-402
2. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007; **447**:661-78

3. Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J *et al.* Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2007; **39**:1477-82
4. Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B *et al.* TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007; **357**:1199-209
5. Julia A, Ballina J, Canete JD, Balsa A, Tornero-Molina J, Naranjo A *et al.* Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in the Spanish population: KLF12 as a risk locus for rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum.* 2008; **58**:2275-86
6. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burt NP *et al.* Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2008; **40**:1216-23
7. Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman FA, Liljedahl U, Wiman AC, Alfredsson L *et al.* Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; **56**:2202-10
8. Shimane K, Kochi Y, Yamada R, Okada Y, Suzuki A, Miyatake A *et al.* A single nucleotide polymorphism in the IRF5 promoter region is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in the Japanese patients. *Ann Rheum Dis.* 2008
9. Dieguez-Gonzalez R, Calaza M, Perez-Pampin E, de la SeA, Fernandez-Gutierrez B, Castaneda S *et al.* Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; **58**:1264-74
10. Barton A, Bowes J, Eyre S, Spreckley K, Hinks A, John S *et al.* A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis

- in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum.* 2004; **50**:1117-21
11. Begovich AB, Chang M , Schrodi SJ. Meta-analysis evidence of a differential risk of the FCRL3 -169T-->C polymorphism in white and East Asian rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2007; **56**:3168-71
 12. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP , Alexander HC *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2004; **75**:330-7
 13. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G , Behrens TW *et al.* STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007; **357**:977-86
 14. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Perez-Pampin E, Costas J , Torres M *et al.* Genetic variation in the NFkappaB pathway in relation to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008
 15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988; **31**:315-24
 16. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* 2005; **21**:263-5
 17. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001; **68**:978-89
 18. Dupont WD, Plummer WD Jr. Power and sample size calculations. A review and computer program. *Control Clin Trials.* 1990; **11**:116-28
 19. Orozco G, Robledo G, Linga Reddy MV, Garcia A, Pascual-Salcedo D , Balsa A *et al.* Study of the role of a functional polymorphism of MHC2TA in rheumatoid arthritis in three ethnically different populations. *Rheumatology (Oxford).* 2006; **45**:1442-4

20. Martinez A, Sanchez-Lopez M, Varade J, Mas A, Martin MC , de Las HeV *et al.* Role of the MHC2TA gene in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.* 2007; **66**:325-9
21. Edwards AO, Ritter R 3r, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C , Farrer LA *et al.* Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science.* 2005; **308**:421-4
22. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI *et al.* A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; **102**:7227-32
23. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM , Gallins P *et al.* Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science.* 2005; **308**:419-21
24. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS , Haynes C *et al.* Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science.* 2005; **308**:385-9
25. Alexander JJ, Quigg RJ. The simple design of complement factor H: Looks can be deceiving. *Mol Immunol.* 2007; **44**:123-32
26. Solomon S, Kassahn D , Illges H. The role of the complement and the Fc gamma R system in the pathogenesis of arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005; **7**:129-35
27. Friesse MA, Hellwage J, Jokiranta TS, Meri S, Muller-Quernheim HJ , Peter HH *et al.* Different regulation of factor H and FHL-1/reconnectin by inflammatory mediators and expression of the two proteins in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol.* 2000; **121**:406-15
28. Friesse MA, Manuelian T, Junnikkala S, Hellwage J, Meri S , Peter HH *et al.* Release of endogenous anti-inflammatory complement regulators FHL-1

- and factor H protects synovial fibroblasts during rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2003; **132**:485-95
29. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM , Boackle SA *et al.* Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity.* 2002; **16**:157-68
30. Banda NK, Thurman JM, Kraus D, Wood A, Carroll MC , Arend WP *et al.* Alternative complement pathway activation is essential for inflammation and joint destruction in the passive transfer model of collagen-induced arthritis. *J Immunol.* 2006; **177**: 1904-12
31. Etzel CJ, Chen WV, Shepard N, Jawaheer D, Cornelis F , Seldin MF *et al.* Genome-wide meta-analysis for rheumatoid arthritis. *Hum Genet.* 2006; **119**:634-41
32. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T , Kajaste-Rudnitski A *et al.* A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet.* 2005; **37**:507-13
33. Barreiro LB, Neyrolles O, Babb CL, Tailleux L, Quach H , McElreavey K *et al.* Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. *PLoS Med.* 2006; **3**
34. Zhou T, Chen Y, Hao L , Zhang Y. DC-SIGN and immunoregulation. *Cell Mol Immunol.* 2006; **3**:279-83
35. van Lent PL, Figdor CG, Barrera P, van Ginkel K, Sloetjes A, van den BeW *et al.* Expression of the dendritic cell-associated C-type lectin DC-SIGN by inflammatory matrix metalloproteinase-producing macrophages in rheumatoid arthritis synovium and interaction with intercellular adhesion molecule 3-positive T cells. *Arthritis Rheum.* 2003; **48**:360-9
36. Chae SC, Park YR, Shim SC, Lee IK , Chung HT. Eotaxin-3 gene polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population. *Hum Immunol.* 2005^a; **66**:314-20

37. Chae SC, Lee YC, Park YR, Shin JS, Song JH , Oh GJ *et al.* Analysis of the polymorphisms in eotaxin gene family and their association with asthma, IgE, and eosinophil. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; **320**:131-7
38. Chae SC, Park YR, Oh GJ, Lee JH, Chung HT. The suggestive association of eotaxin-2 and eotaxin-3 gene polymorphisms in Korean population with allergic rhinitis. *Immunogenetics.* 2005^b; **56**:760-4
39. Blanchard C, Wang N, Stringer KF, Mishra A, Fulkerson PC, Abonia JP *et al.* Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Clin Invest.* 2006; **116**:536-47
40. Eklund KK. Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev.* 2007; **217**:38-52
41. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB *et al.* Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science.* 2002; **297**:1689-92
42. Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E , Jagodic M *et al.* MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet.* 2005; **37**:486-94
43. Bronson PG, Criswell LA , Barcellos LF. The MHC2TA -168A/G polymorphism and risk for rheumatoid arthritis: a meta-analysis of 6861 patients and 9270 controls reveals no evidence for association. *Ann Rheum Dis.* 2008; **67**:933-6
44. Ikari K, Momohara S, Inoue E, Tomatsu T, Hara M , Yamanaka H *et al.* Haplotype analysis revealed no association between the PTPN22 gene and RA in a Japanese population. *Rheumatology (Oxford).* 2006; **45**:1345-8
45. Kim YJ, Park JH, Kim I, Kim JO, Bae JS , Shin HD *et al.* Putative Role of Functional Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) Polymorphism in Rheumatoid Arthritis in a Korean Population. *J Rheumatol.* 2008

46. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES , Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet.* 2003; **33**:177-82
47. Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KE, Khanna R , Wade MS *et al.* CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006; **38**:1049-54
48. Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D , Daly MJ *et al.* Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006; **38**:1055-9
49. Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T , Chakravarthy U *et al.* A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006; **38**:1173-7

Table 1: Clinical characteristics of the patients with RA included in the study

Characteristic (scale)	Value
Female (%)	0.752
Age of disease onset (Median. IQR)	48 (37-57)
Morning stiffness (%)	96.1
Arthritis of 3 or more joint areas (%)	99.7
Arthritis of hand joints (%)	99.0
Symmetric arthritis (%)	99.3
Rheumatoid nodules (%)	19.4
Rheumatoid factor (%)	72.5
Erosions (%)	71.9
S. Sicca (%)	9.0
Interstitial pneumonitis (%)	3.0
Shared epitope (carrier %) ^a	54.2
ACPA (%) ^b	66.5

^a Data available for 578 patients

^b Data available for 639 patients

Table 2: Comparison between patients with RA and controls of the SNP allele and genotype frequencies in the 4 candidate genes. None of these comparisons was significant at $p < 0.05$.

Gene	SNP	Minor allele frequencies ^a			Genotype frequencies					
		Patients	Controls	O.R. (95% C.I.)	Patients			Controls		
					11 ^b	12	22	11	12	22
CFH	rs8002209	22.3 (692)	23.3 (722)	0.95 (0.8-1.1)	60.4 (937)	34.6 (536)	5.0 (78)	58.5 (908)	36.5 (566)	5.0 (78)
	rs3766404	16.2 (501)	16.1 (499)	1.01 (0.9-1.2)	70.7 (1096)	26.4 (409)	3.0 (46)	70.2 (1089)	27.5 (427)	2.3 (36)
	rs1061170	35.3 (1095)	35.8 (1110)	0.98 (0.9-1.1)	42.2 (655)	44.9 (697)	12.8 (199)	40.7 (631)	47.0 (728)	12.3 (191)
CD209	rs4804803	21.3 (660)	21.8 (677)	0.97 (0.9-1.1)	62.3 (967)	32.8 (508)	4.9 (76)	60.8 (944)	34.7 (538)	4.5 (70)
Eotaxin3	rs2302009	23.1 (716)	22.1 (686)	1.06 (0.9-1.2)	59.4 (921)	35.1 (544)	5.5 (86)	60.7 (942)	34.3 (533)	5.0 (77)
	rs6965556	23.0 (715)	22.0 (682)	1.06 (0.9-1.2)	59.6 (924)	34.8 (539)	5.7 (88)	61.1 (947)	33.9 (526)	5.0 (78)
MHC2TA	rs3087456	25.6 (666)	25.4 (737)	1.01 (0.9-1.1)	56.2 (731)	36.3 (472)	7.5 (97)	56.4 (818)	36.5 (529)	7.2 (104)

^a Allele frequencies as percentages (number of minor alleles); genotype frequencies as percentages (number of genotypes)^b Genotype codes are: 11 = homozygote for the major allele; 12 = heterozygote; 22 = homozygote for the minor allele

Supplementary Table 1: Hospitals providing samples from patients with RA and controls for this study.

Hospital name	Spanish town
Hospital de la Santa Creu I Sant Pau	Barcelona
Hospital Príncipes de España	Barcelona
Hospital Virgen de las Nieves	Granada
Hospital Universitario de Valme	Sevilla
Hospital Virgen de La Macarena	Sevilla
Hospital Universitario de La Princesa	Madrid
Fundación Jiménez Díaz	Madrid
Hospital Universitario Doce de Octubre	Madrid
Hospital Clínico San Carlos	Madrid
Hospital Universitario La Paz	Madrid
Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña	A Coruña
Hospital Universitario Gregorio Marañón	Madrid
Hospital Clínico Universitario de Santiago	Santiago

Supplementary Table 2: Primers and probes used for SNP genotyping.

Genes	SNP ID	Position	Minor allele	PCR primers		Minisequencing probe	Lenght
				Forward	Reverse		
CFH	rs800292	193373890	A	tgcataatgaactttctccaag	ccattctccttctcgcata	gcaccaggctatctataaatgcgcgcctggatagatctctctggaaat	50
	rs3766404	193383489	C	tgcacctctcatagcttttgacttc	tcttcagtggtttgatgttgacact	gtatatgaaaatcatgatagagaagaatgaagtgcacagaaaaaagaagaatacaattaggact	68
	rs1061170	194925860	C	tgtgttatggtccttaggaaaaatgt	acggatgcactctggagtag	gcaggcaacgtctctatagatttaccctgacaaactttcttccat	44
CD209	rs4804803	7718733	C	caaaaatgagcagcagcagca	caggagagaagcactcatcca	aactggggggtgctactgccc	20
Forxin-3	rs2302009	75043649	G	ccaggaggcaaaagatcttca	gggtccatgtgagccttcaga	aatgggfgcaaaaatacatttctttactgaaaactccgaaacaattggaactcagctgaatt	62
MHC2TA	rs6965556	75237854	A	gcggaatttgcaggagtaga	gggtttctccacgttgggt	gcagatcaatttaatacgaatacactgcgggttctgtcttctgtgacatgaggtctctcctgaggttggagtttc	71
	rs3087456	10878403	G	gaaggttcccccaacagact	gcggtcagaatttctgtttctg	tctgtcttccaccaatttcagtcacagaaaggaaagtgaatttaatttcagaggtgt	56

Discusión general

Discusión

La AR es una enfermedad compleja que afecta al 1% de la población caucásica. Hay numerosas evidencias que indican que la susceptibilidad a la AR tiene un componente genético significativo, aunque esta contribución todavía no está claramente definida. En este aspecto, estudios epidemiológicos sugieren que el 50% de la susceptibilidad a desarrollar AR se debe a factores genéticos. Por lo tanto, se han llevado a cabo una serie de estudios con la finalidad de identificar los loci genéticos implicados en la etiología de esta enfermedad. Hasta ahora los dos factores genéticos más claros son la región *HLA* y el gen *PTPN22* (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007) (Plenge RM *et al.*, 2007^a) (Plenge RM *et al.*, 2007^b). Además, y gracias al desarrollo de los estudios de asociación de genoma completo (GWA), se han ido identificando otros factores genéticos como el locus *TRAF1-C5*, la *región intergénica 6q23* (Plenge RM *et al.*, 2007^a) (Plenge RM *et al.*, 2007^b) (Thomson W *et al.*, 2007) (Barton A *et al.*, 2008) y polimorfismos en el gen *STAT4* (Barton A *et al.*, 2008) (Lee HS *et al.*, 2007) (Remmers EF *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo ha sido la identificación de nuevos factores genéticos implicados en la susceptibilidad a la AR, y la confirmación de algunas de las señales de asociación ya publicadas. Para ello se ha llevado a cabo el estudio de polimorfismos en diferentes genes, y estudios de confirmación. El estudio de cada uno de estos genes se ha abordado desde una estrategia basada en estudios de asociación caso-control de genes candidatos. La selección de los genes estudiados procede de dos vías que incluyen:

1. La implicación de los mismos en rutas de señalización directamente relacionadas con la patofisiología de la AR
2. Genes asociados con la AR en distintas poblaciones, o genes asociados con otras enfermedades de carácter autoinmune.

De forma resumida, en relación a las señales estudiadas debido a su directa implicación en procesos de inflamación, se llevó a cabo el estudio de la ruta de señalización NFκB. Esta ruta tiene un papel crítico en la patogénesis de la artritis reumatoide debido a su participación en la expresión de muchos de los genes implicados en las respuestas inmune e inflamatoria (Firestein GS, 2004) (Andreaskos E *et al.*, 2005) (Roman-Blas JA, Jimenez SA, 2006). Sin embargo, no se ha hecho una investigación sistemática del papel que juega la variabilidad genética en esta ruta con relación a la AR. En este aspecto, el estudio de la ruta NFκB se planteó como una variante de un estudio gen candidato, en el que se exploró la variación genética en una unidad funcional implicada en la patogénesis de la AR. Se seleccionaron 181 SNP para cubrir la variabilidad genética de 17 genes que incluían tanto elementos claves de la ruta (*IKBKB*, *REL*, *RELA*, *RELB*, *NFKB1*...), como otros miembros relacionados con otras rutas de activación menores (*IKBKE* y *MAP3K1*), o factores reguladores (*KBRAS1* y *KBRAS2*). Los resultados obtenidos evidenciaron una ligera asociación entre el gen *IKBKE* y la AR.

En relación con esta ruta de señalización se analizó también el gen *TNFAIP3*, un conocido inhibidor de NFκB, y por tanto un excelente gen candidato en la susceptibilidad a la enfermedad, que además se presenta como un potencial factor de riesgo en los GWA de AR (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Los resultados de este estudio mostraron asociación con uno de los SNPs seleccionados, (rs582757) y el haplotipo constituido por

los alelos comunes de todos los polimorfismos genotipados en el estudio. Además, analizamos la variabilidad genética de la *región intergénica 6q23* en vista a los datos obtenidos estudios GWA. En estos estudios se identificaron señales de asociación con un patrón complejo que podían deberse a la variabilidad genética en *TNFAIP3*, debido a la proximidad entre este gen y los polimorfismos asociados.

Otro de los genes analizados por su potencial papel en inflamación fue *IRF5*. Existen evidencias que muestran una relación entre IFNs tipo 1 y la AR (Borg FA, Isenberg DA, 2007). Sin embargo, los trabajos en los que se ha estudiado la relación entre *IRF5* y AR, han mostrado resultados poco concluyentes. Por lo tanto, con la finalidad de esclarecer estos resultados realizamos un estudio de asociación en *IRF5* para analizar su potencial papel en la susceptibilidad a la AR.

Por último, dentro de las señales implicadas directamente en la patología de la AR, se analizó el papel de *IL-1 β* . Este gen es un potente activador de la respuesta inmune humoral (Nakae S, 2001). Nuestro trabajo forma parte de un estudio llevado a cabo por los Drs. Mathis y Benoist, en el que se pretendía confirmar la hipótesis, planteada en trabajos previos, de que polimorfismos asociados a *IL-1 β* pueden influir en la severidad de AR.

Además se realizó otro estudio de genes candidatos seleccionados por haberse visto asociados con AR en diferentes poblaciones, o por evidencias de asociación con otras enfermedades de carácter autoinmune. Los genes seleccionados fueron *Eotaxin3*, *MHC2TA*, *CD29* y *CFH*. De forma resumida se puede decir que en el gen *Eotaxin3* se seleccionaron dos SNPs (rs2302009 y rs6965556) que se habían visto significativamente asociados con susceptibilidad

a AR en población coreana (Chae S-C *et al.*, 2005^b). En el caso de *CD209*, se estudió un SNP (rs4804803) localizado en el promotor del gen, que se sabía que estaba asociado con aumento a la susceptibilidad y/o severidad a infección (Sakuntabhai A *et al.*, 2005). En *MHC2TA* se genotipó un SNP del promotor (rs3087456) asociado con el aumento de la susceptibilidad en AR, esclerosis múltiple e infarto de miocardio (Swanber M *et al.*, 2005). Por último, tres variantes en el gen *CFH* que se encontraron asociadas con degeneración macular relacionada con la edad (AMD) (Klein RJ *et al.*, 2005). Dos de ellas (rs800292 y rs3766404) forman parte de dos haplotipos independientes con un papel protector en AMD, y la otra variante (rs1061170) mostró asociación con susceptibilidad a esta enfermedad. El objetivo de este estudio de genes candidatos fue explorar y confirmar el papel de estos genes en la susceptibilidad a AR.

Estudio de la variabilidad de la ruta NFκB en relación con susceptibilidad a la AR

La selección de los genes para el estudio de la ruta de NFκB incluía genes centrales de la misma, teniendo en cuenta, fundamentalmente, los genes que codifican para las IκB quinasas (*IKBKA*, *IKBKB*, *IKBKE*), los inhibidores de NFκB o IκBs (*NFKBIA*, *NFKBIB*, *NFKBIE* y *NFKBI*), así como genes implicados en la degradación de esos inhibidores (*KABRASI*, *KBRAS2*), ya que la fosforilación y la degradación de las IκBs es un paso crítico en la regulación de esta ruta. Además, se seleccionaron los genes que codifican los factores de transcripción propios de la ruta (*NFKBI*, *NFKB2*, *RELA*, *RELB* y *REL*). No se incluyeron genes de receptores o moléculas desencadenantes como citocinas. Del mismo modo, no se tuvieron en cuenta moléculas que interaccionan con esta ruta, a excepción de *MAP3K14* y *MAP3K1* (implicados en la activación de

la ruta alternativa y rutas secundarias de NF κ B). El estudio de los genes seleccionados se hizo a través del genotipado de SNPs localizados en la secuencia codificante de los diferentes loci así como en las 10 Kb de la región *upstream* y *downstream* de los mismos. Además, los SNP se seleccionaron de forma que la frecuencia del alelo menor fuera superior al 10%.

El estudio se dividió en una fase exploratoria, que incluyó todos los SNPs y una fracción de las muestras (sólo del Hospital Clínico Universitario de Santiago), y una segunda fase de confirmación, en la que se analizaron únicamente los SNPs que mostraron diferencias significativas en un grupo de muestras procedentes de diferentes hospitales españoles. Con este planteamiento, se facilitaba el análisis del conjunto de SNPs, en una colección más reducida de muestras, y además permitía la confirmación de los hallazgos en una segunda colección de pacientes y controles. Esta confirmación, como se comentó anteriormente, es un paso crítico para diferenciar entre asociaciones reales, y aquellas que se producen por cambios al azar en las frecuencias.

Los resultados obtenidos en la fase exploratoria parecían prometedores puesto que se observaron asociaciones significativas en algunos SNPs de los genes *IKBKB*, *IKBKE* y *REL*. Sin embargo, ninguna de estas asociaciones se confirmó en la segunda fase del estudio. Con la finalidad de encontrar una explicación a esta falta de confirmación de los resultados, se analizaron posibles diferencias en las frecuencias alélicas entre las dos fases. Las diferencias solamente se apreciaron entre los pacientes, y no se encontró ninguna correlación con ninguna de las variables clínicas analizadas.

Únicamente dos SNPs del gen *IKBKE* mostraron una cierta tendencia a la asociación en la fase de confirmación. Estos dos polimorfismos incrementaron

su nivel de significación estadística cuando se analizaron conjuntamente las muestras incluidas en ambas fases del estudio. Ambos SNPs presentan correlación entre sí, por lo tanto, estas dos asociaciones podían deberse, realmente, a un único factor genético. Por otra parte, una correlación de estos polimorfismos con el cluster de interleucinas localizado a 270 kb hacia la región telomérica de *IKBKE*, podría ser otra posible explicación. En este cluster se incluye la *IL-10* en la que se han analizado una serie de polimorfismos reguladores que parecen participar en la susceptibilidad y la severidad a la AR, en algunos estudios realizados (Huizinga TW *et al.*, 2000) (Lard LR *et al.*, 2003) (Padyukov L *et al.*, 2004). Sin embargo, este hecho no parece confirmado por las discrepancias con otros trabajos publicados (Cantrigel A *et al.*, 1999) (Mackay K *et al.*, 2003).

En la misma línea de lo comentado anteriormente, nos planteamos si las diferencias encontradas en los SNPs de *IKBKB* en la primera fase, pudieran deberse a una correlación con algún polimorfismo regulador del gen *PLAT*, localizado a solo 63 kb en dirección telomérica de *IKBKB*. *PLAT* codifica para el activador tisular del plasminógeno, y se ha visto implicado en la susceptibilidad a la AR en estas mismas muestras (Rodríguez-Lopez J *et al.*, 2006). En todo caso, no detectamos desequilibrio de ligamiento significativo entre SNPs de *PLAT* y los SNPs estudiados en *IKBKB*.

Paralelamente al desarrollo de nuestro trabajo, se publicaron los datos del primer GWA realizado en AR. Esto permitió llevar a cabo una serie de comparaciones entre este estudio y el nuestro, con la finalidad de confirmar los resultados. Hay que tener en cuenta que este análisis a nivel de genoma tiene una gran potencia estadística (se incluían 2000 casos de AR y 3000 controles), y gran cobertura genética (se genotiparon 500000 SNPs a lo largo de todo el

genoma). Ninguno de los SNPs considerados como señales significativas en el GWA (polimorfismos con niveles de asociación $<5 \times 10^{-7}$) resultaron estar próximos a los genes de NFκB que analizamos nosotros. De todas formas, en este análisis comparativo también tuvimos en cuenta las diferencias obtenidas en el GWA que no son significativas a nivel de genoma, pero que sí son útiles a la hora de confirmar los resultados obtenidos en estudios independientes como el nuestro. Así, comprobamos que el GWA incluía el mismo número de SNPs en el locus de *IKBKB* que nuestro trabajo. En el estudio de genoma completo, solamente uno de estos polimorfismos presentó diferencias significativas entre casos y controles (rs5029748, $p=0.01$). Este SNP estaba incluido en el panel que diseñamos para la fase exploratoria de la ruta NFκB, pero no mostró evidencias de asociación. Por el contrario, dos SNPs con diferencias significativas en esta primera fase (rs12676482 y rs17875732), se mostraban en el GWA como altamente correlacionados entre sí ($r^2=1$) y no presentaron diferencias entre casos y controles. De la misma manera, dos de los SNPs incluidos en *REL* en el GWA, estaban incluidos en nuestro panel sin que se observara asociación con AR para ninguno de ellos. En este primer GWA no se incluyó ningún SNP en el gen *IKBKE* ni en las 40 kb próximas al gen, por lo que no se pudo obtener ninguna información sobre este locus. Además, los WGA posteriores (Plenge RM *et al.*, 2007^b) (Plenge RM *et al.*, 2007^a) (Julià A *et al.*, 2008) tampoco evidenciaron señales de asociación en ninguno de estos genes inicialmente asociados en nuestro estudio.

Como, la variación en *IKBKE* o secuencias cercanas podría tener un papel en la susceptibilidad a la AR según los resultados que obtuvimos, decidimos profundizar en su estudio. Para ello hemos genotipando un total de 13 SNPs adicionales que completaban la cobertura genética de los polimorfismos presentados en este trabajo. Los datos preliminares no parecen

mostrar ninguna otra variante con asociación con la susceptibilidad a la AR. Una confirmación de la asociación de *IKBKE* con la enfermedad podría añadir nuevas perspectivas en la patología de AR ya que IKK ϵ no es un componente del complejo IKK y tampoco está implicado en la ruta canónica de activación de NF κ B (Peters RT *et al.*, 2000). Su función es la de activar los factores de transcripción IRF-3 e IRF-7, y la ruta de NF κ B en células T, a través de la fosforilación directa de RelA (Mattiloli I *et al.*, 2006). Por otra parte, se sabe que IKK ϵ se expresa en sinoviocitos tipo fibroblastos y en la sinovia, donde participa en la inducción de MMPs a través de la fosforilación de c-Jun (Sweeney SE *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta nuestros resultados y todas las observaciones anteriores podemos concluir, que los 17 genes inicialmente estudiados en la ruta de señalización de NF κ B no parecen ser factores genéticos importantes en la susceptibilidad a la AR. En todo caso, es importante señalar que, la cobertura genética proporcionada por los SNPs seleccionados no fue completa, y el poder estadístico de la primera fase del estudio no permite excluir efectos modestos. También es posible que existan interacciones genéticas complejas o asociaciones limitadas a subgrupos de pacientes que no estemos detectando. Lo más probable sin embargo, es que las asociaciones obtenidas con los SNPs de los genes *IKBKB*, *IKBKE* y *REL*, sean el resultado de fluctuaciones al azar en las frecuencias alélicas debido a la propia naturaleza del estudio, en el que se están analizando múltiples SNPs. La falta de confirmación de los resultados en el segundo grupo de muestras, así como las evidencias obtenidas a partir del GWA, apoyan esta conclusión.

TNFAIP3 y la región intergénica 6q23 en AR

El estudio de *región intergénica 6q23* y del gen *TNFAIP3* se diseñó teniendo en cuenta dos objetivos:

- La confirmación de las dos señales de asociación evidenciadas en esta región en dos de los GWA (The Wellcome Trust Case Control Consortium) (Plenge RM *et al.*, 2007^a), y otros estudios (Plenge RM *et al.*, 2007^b) (Thomsom W *et al.*, 2007) (Barton A *et al.*, 2008),

-El estudio de la variación genética en el gen *TNFAIP3*, para comprobar si esta variación, podría explicar la asociación en la *región intergénica 6q23*. Este planteamiento parte de la proximidad del gen *TNFAIP3* con la *región 6q23*, y del hecho de que este locus se presentaba como un buen candidato en la susceptibilidad a la AR.

La hipótesis del estudio, por tanto, se fundamenta por una parte, en que la *región 6q23* en la que se localizaban los dos SNPs asociados (rs6920220 y rs10499194), no contiene secuencias codificantes de proteínas y carece de cualquier evidencia de posibles consecuencias funcionales (Plenge RM *et al.*, 2007^a) (Thomsom W *et al.*, 2007). Además, ambas señales (rs6920220 y rs10499194) se presentaban como independientes, lo que parecía indicativo de la existencia de múltiples efectos (Plenge RM *et al.*, 2007^a). Por otra parte, esta región intergénica está flanqueada por los genes *TNFAIP3* y *OLIG3*, de los cuales *TNFAIP3*, debido a sus implicaciones biológicas, parecía el mejor de los candidatos para llevar a cabo su estudio en AR

TNFAIP3 es un inhibidor de la ruta de NFκB con un claro papel anti-inflamatorio. Sus niveles proteicos están altamente incrementados bajo la

estimulación de NFκB a través de TNF e IL1 (Heyninck K, Beyaert R, 2005) (Beyaert R *et al.*, 2000). La inhibición de la actividad de NFκB se da a diferentes niveles. Un efecto inhibitorio genérico de la ruta canónica es la ubiquitinización de IKKγ y su posterior degradación (Mauro C *et al.*, 2006). Además, este gen regula negativamente diferentes rutas específicas que llevan a la activación de NFκB. De especial relevancia para AR es su acción sobre la proteína de interacción con el receptor de TNF (RIP, *TNF receptor-interacting protein*), a la cual marca para la degradación, con lo que se inhiben las señales derivadas del TNFR (Wertz IE *et al.*, 2004). Por otra parte, *TNFAIP3* podría estar implicado en la respuesta a antagonistas de TNF. Esto ha sido sugerido en estudios recientes en los que se mostraba que cambios tempranos en los niveles de *TNFAIP3* después de un tratamiento con antagonistas de TNF, predecían el tipo de respuesta a largo plazo de los pacientes (Koczan D *et al.*, 2008).

En la *región intergénica 6q23* se estudiaron 10 *tagSNPs* además de los dos SNPs que habían mostrado asociación en los estudios anteriores. Para *TNFAIP3* se genotiparon 5 *tagSNPs* que cubrían la variabilidad genética del locus y las 20 kb flanqueantes por cada lado. Ambos loci se analizaron en un total de 1651 pacientes y 1619 controles.

En relación con los resultados obtenidos en la *región intergénica 6q23*:

- Identificamos un SNP asociado que no se había visto previamente (rs609438). La asociación con este SNP fue preferencial en mujeres y se vio que seguía un modelo genético de tipo dominante.
- Confirmamos la señal de asociación del SNP rs13207033 (este SNP está completamente correlacionado con el rs10499194) en pacientes con ACPA, lo

que sugiere que el efecto del factor genético recogido por este polimorfismo, se da solamente en este subtipo de pacientes. Esta conclusión está apoyada por estudios anteriores ya que el rs13207033 (o rs10499194) se vio de manera más clara en un GWA en el que se analizaron exclusivamente pacientes con ACPA (Plenge RM *et al.*, 2007^b).

- No pudimos confirmar sin embargo, la asociación con el SNP rs6920220 en nuestros pacientes de AR, a pesar de que nuestros resultados van en la misma dirección de lo anteriormente publicado. Esta falta de asociación no fue debida a la falta de poder estadístico en nuestro estudio (que fue de 0.8 para un p valor de 0.01 y O.R.=1.23), sino a un menor efecto del polimorfismo (O.R.=1.12) en comparación con lo obtenido en los otros trabajos (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007) (Plenge RM *et al.*, 2007^a) (Thomsom W *et al.*, 2007). Diferencias similares en el tamaño del efecto también se han visto en los estudios de confirmación de los factores genéticos *STAT4* y *TRAF1-C5* (Barton A *et al.*, 2008).

Por lo tanto, nuestros resultados en esta región han de tomarse con precaución debido a que las señales encontradas son débiles y además, la asociación es preferencial o exclusiva de determinados fenotipos (el SNP rs609438 se encuentra más asociado en el grupo de las mujeres, y el SNP rs13207033 está asociado en pacientes con ACPA). De hecho, lo que da mayor consistencia a estos resultados son los datos obtenidos de los estudios previos, aunque no sean plenamente concordantes entre sí. Así, como ya se comentó en la introducción, la asociación entre el rs6920220 y AR fue identificada en un estudio (Thomsom W *et al.*, 2007) realizado con la finalidad de confirmar las señales con un valor p de significación de entre 10^{-5} y 5×10^{-7} vistas en el primer WGA en AR (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). En el

segundo de los WGA (Plenge RM *et al.*, 2007^a) se observó la señal de asociación con el SNP rs10499194, que se correlacionaba perfectamente ($r^2=1$) con otro SNP que no mostraba asociación en el GWA del WTCCC (rs13207033), y se confirmó, además, la asociación con el SNP rs6920220. Estas discrepancias observadas para el rs10499194 (o rs13207033) entre ambos estudios, aumentan la dificultad a la hora de establecer estos efectos presentes en esta región.

En relación con el locus *TNFAIP3*:

- Identificamos la asociación de uno de los *tagSNPs* seleccionados (rs582757), que se confirmó indirectamente, a través de la comparación con los datos estadísticos disponibles del GWA del WTCCC (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Además, un SNP en *TNFAIP3*, altamente correlacionado con el rs582757 ($r^2=0.9$), se había visto asociado con enfermedad coronaria en pacientes con diabetes de tipo 2. Este polimorfismo se correlacionaba con la reducción de la expresión del gen (Boonyrisawat W *et al.*, 2007). Por lo tanto, esto sugiere que este SNP puede ser *tag* de una variante funcional en *TNAIP3*.
- También se vio asociados el haplotipo constituido por los alelos comunes de todos los *tagSNPs* estudiados en este gen.

Nuestra hipótesis inicial era que polimorfismos en *TNFAIP3* podían explicar la asociación encontrada en la *región intergénica 6q23*, sin embargo, los análisis de regresión logística multivariable mostraron que la contribución de los polimorfismos en estos loci era independiente. Resultados similares se han obtenido en dos estudios recientes llevado a cabo en LES (Graham. RR *et*

al., 2008) (Musone SL *et al.*, 2008). En estos estudios, se observó una fuerte evidencia de la presencia de factores genéticos independientes en esta región, incluyendo *TNFAIP3*. Por lo tanto, parece que esta región contiene múltiples factores genéticos que parecen estar implicados en AR y LES, y posiblemente, en otras enfermedades inmunes. Sin embargo, la identificación de estos múltiples efectos resulta complicada debido a que, como se comentó anteriormente, las asociaciones observadas en la zona parecen dependientes de ciertas características clínicas. Además, las discrepancias entre los diferentes estudios aumentan la dificultad a la hora de establecer los diferentes factores genéticos presentes. Por otro lado, la heterogeneidad poblacional y las interacciones entre factores genéticos podrían estar jugando un papel decisivo en el complejo patrón de asociaciones observadas en esta región.

Por lo tanto, una investigación más profunda de esta región resulta tremendamente interesante debido a las implicaciones que podría tener en múltiples enfermedades. En este aspecto, las posibilidades a testar incluirían el análisis del pseudogen *PTPN11*, localizado en la *región 6q23*, y en el que se encontraron señales de asociación cuando se llevó a cabo el análisis combinado de los pacientes de AR, diabetes de tipo 1 y enfermedad inflamatoria intestinal, frente a los controles, en el GWA del WTCCC (The Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007). Con respecto a los pseudogenes, un estudio reciente ha sugerido que más del 20% de los mismos pueden llegar a transcribirse (Zheng D *et al.*, 2007). Además, este gen resulta ser un buen candidato en susceptibilidad a la AR ya que pertenece a la misma familia de fosfatasa de tirosina que *PTPN22*, el segundo factor genético más relevante en AR. Recordemos que las PTPs son moléculas de señalización que regulan una gran variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica. En concreto,

PTPN11 se expresa en la mayor parte de los tejidos, y juega un papel en la regulación de varias rutas de señalización importantes en las diversas funciones celulares como son, la activación mitogénica, el control metabólico, la regulación de la transcripción y la migración celular.

Haplotipos de IRF5 en AR

Otro de los genes incluido como posible candidato en la susceptibilidad a la AR fue *IRF5*. El objetivo de este estudio fue confirmar las evidencias que sugieren una posible implicación de este gen en la AR (Sigurdsson S *et al.*, 2007), y clarificar así su papel en la susceptibilidad a la enfermedad, ya que otros estudios no encontraron asociación entre la variabilidad genética en este locus y la AR (Rueda B *et al.*, 2006) (Garnier S *et al.*, 2007). Para el estudio de este gen se analizaron un total de 9 polimorfismos en 1338 pacientes con AR y 1342 controles. Los SNPs seleccionados incluían los tres polimorfismos funcionales conocidos (rs10954213, rs2004640, y la inserción/delección del exón 6 que estaba recogida en nuestro estudio por el SNP rs4731535). El análisis se llevó a cabo en dos fases. Las colecciones de muestras se clasificaron de acuerdo con la presencia o ausencia de ACPA, FR, SE, el alelo 620W de *PTPN22* y erosiones. Además, se llevó a cabo un metaanálisis que incluía los resultados de estudios previos.

En la primera fase del estudio (516 pacientes y 503 controles), se encontró asociación en 6 de los nueve polimorfismos estudiados, siendo las más destacadas las asociaciones con los SNPs rs2004640, rs10954213 y rs10488631. En todos ellos, la frecuencia del alelo menor estaba aumentada en controles y disminuida en los casos, a excepción de un SNP (rs10488631) cuyo alelo raro tenía mayor frecuencia en pacientes en comparación con los controles. Cuando

se analizaron de nuevo las frecuencias alélicas teniendo en cuenta la presencia/ausencia de ACPA, se vio una asociación claramente preferencial en el grupo de pacientes que no presentaban ACPA. En concreto, el rs2004640, mostró una clara asociación significativa con este grupo de pacientes corroborando los resultados obtenidos por Sigurdsson y colaboradores (Sigurdsson S *et al.*, 2007). En la segunda fase del estudio (822 casos y 839 controles), no se confirmaron estos resultados, aunque los SNPs mostraron las mismas tendencias que se habían mostrado en la fase inicial. Además, llevamos a cabo un análisis conjunto con todas las muestras añadiendo 313 controles españoles procedentes de otros trabajos previos (Ferreiro-Neira I *et al.*, 2007). Se evidenciaron de nuevo asociaciones significativas para los SNPs rs10488631 y rs10954213, con la misma tendencia que mostraron en la fase exploratoria.

Para completar el estudio se llevó a cabo un metaanálisis de todos los trabajos publicados. Como el único SNP en común era el rs2004640, éste fue el que se analizó. Se observó una clara asociación de este polimorfismo en el conjunto de pacientes con AR sin clasificar por estatus de ACPA. Este resultado contrasta con lo obtenido en el estudio de Sigurdsson y colaboradores (Sigurdsson S *et al.*, 2007) en el que, como comentamos anteriormente, sólo se veía asociación en el grupo de pacientes que no presentaban ACPA. Por otro lado, está en concordancia con lo obtenido en nuestros resultados, en los que aunque la asociación de este SNP era más fuerte en el grupo de pacientes sin ACPA, también se encontraba en los pacientes sin estratificar por esta variable clínica. Recordemos que este SNP es uno de los 3 polimorfismos funcionales identificados en *IRF5*, y su asociación sugiere que otras variantes funcionales pueden tener un papel en AR. Esto es lo que de alguna manera muestran los resultados obtenidos en la primera fase de nuestro estudio, donde se ven múltiples asociaciones de polimorfismos de *IRF5* con la enfermedad.

Además de los datos obtenidos en el metaanálisis, los resultados del GWA llevado a cabo por el WTCCC confirman la asociación de la variación genética de *IRF5* con AR. En el estudio del WTCCC se encontraron 2 SNPs asociados con AR dentro del locus *IRF5*. Uno de ellos, rs12531711, muestra una correlación perfecta con el SNP rs10488631 y la frecuencia de su alelo menor está incrementada en pacientes con AR. El otro, rs3807306, se correlaciona con una r^2 de 0.75 con el rs13244262, y la frecuencia del alelo menor está disminuida en pacientes. Resultados que son muy similares a los observados para los SNPs rs10488631 y rs13244262 en la primera fase de nuestro estudio. Este análisis comparativo con el GWA también confirma, de forma indirecta, que la asociación de *IRF5* con AR es independiente de la presencia/ausencia de ACPA, tal y como se deduce de nuestros resultados.

La estratificación de pacientes con AR de acuerdo con otras características clínicas, nos permitió la identificación de fuertes asociaciones con *IRF5* en el subgrupo de pacientes portador del SE, mientras que las asociaciones presentes en el subgrupo sin SE fueron mucho más modestas. A la vista de estos resultados, decidimos tener en cuenta las dos variables, SE y ACPA, a la hora de diferenciar entre los pacientes en los que se veía asociación, de aquellos que no presentaban asociación. De esta manera, se obtuvo un grupo mayoritario (constituido por el 73% de los pacientes) con asociaciones en *IRF5* caracterizado por la ausencia de ACPA o por ser portadores de SE (“ACPA- o SE+”). Solamente los pacientes “ACPA+ y SE-” no presentaron ninguna asociación con los SNPs de *IRF5*. Las características que definen a este último subgrupo de pacientes son discordantes, debido a que las evidencias apuntan a que el SE parece estar asociado con pacientes de AR que presentan ACPA (Huizinga TW *et al.*, 2005). Sin embargo, actualmente no se conoce si existe alguna característica particular que defina a los pacientes de AR que desarrollan

ACPA en ausencia de SE. Por lo tanto, investigaciones futuras en este grupo pueden ayudar a identificar características clínicas o de laboratorio que puedan diferenciar a estos pacientes.

En el subgrupo de pacientes “ACPA- o SE+” se llevó a cabo un análisis de haplotipos que resultó ser similar a lo encontrado en LES (Cunninham Graham. DS *et al.*, 2007) (Graham RR *et al.*, 2007) (Ferreiro-Neira *et al.*, 2007). Se obtuvieron 6 haplotipos con una frecuencia mayor del 5%. Dos de ellos presentaron frecuencias significativamente diferentes entre pacientes y controles. Uno de estos resultó ser un haplotipo de susceptibilidad identificado por el incremento de la frecuencia del alelo raro del rs104886631 en pacientes. Este haplotipo presentaba la combinación de los tres polimorfismos funcionales de *IRF5*. Los pacientes de AR y LES (Ferreiro-Neira *et al.*, 2007) parecen compartir el mismo haplotipo de susceptibilidad. Como decíamos, este haplotipo combina el alelo rs2004640, que introduce un *donor splice site* para el exón 1B, y el alelo del rs10954213 que determina una mayor estabilidad en el mensajero, así como un aumento en la longitud de la región rica en prolina dentro del exón 6. Las consecuencias específicas de esta combinación alélica se desconocen, pero constituyen un claro ejemplo de epistasis.

El otro haplotipo asociado que es menos común en el grupo de pacientes que en el de controles, es el haplotipo de protección. Este haplotipo protector es uno de los dos que se encontraron en el estudio de LES. El otro haplotipo protector que se vio en el estudio de LES, no aparece como protector en AR (Ferreiro-Neira *et al.*, 2007). No tenemos una idea clara de cuál es la causa del haplotipo protector de AR. En el caso de LES propusimos que la protección puede estar ligada a un polimorfismo recogido por el SNP rs729302, pero este SNP es irrelevante en AR. Otros estudios han propuesto que los haplotipos

protectores carecen del lugar del *splicing* del exón 1B e incluyen sólo uno de los otros dos alelos funcionales (Graham RR *et al.*, 2007), pero esta hipótesis tampoco coincide con nuestros hallazgos en AR.

La similitud entre los haplotipos asociados entre el subgrupo de pacientes de AR ACPA- o SE+ y los pacientes de LES sugiere que el impacto de esos haplotipos en el proceso etiológico de estas dos enfermedades puede ser parecido. Esto es curioso ya que AR y LES son dos enfermedades claramente diferentes, y la presencia de ambas enfermedades en el mismo sujeto es menos frecuente de lo que podría esperarse por azar (Panush RS *et al.*, 1988). Además, los pacientes de AR en el grupo asociado con *IRF5*, no muestran un incremento en la presencia de anticuerpos antinucleares (14.1%) en comparación con los pacientes de AR del grupo en el que no se observa ninguna asociación con polimorfismos de *IRF5* (20.7%). Es posible que la AR y el LES compartan algunos factores genéticos relacionados con el fallo en la tolerancia inmune a autoantígenos, pero el papel de *IRF5* en este contexto no es del todo claro, y los resultados del GWA no evidenciaron una asociación en pacientes con diabetes de tipo 1 o en aquellos que sufren enfermedad de Crohn. Además, nuestro conocimiento del papel de *IRF5* o del de IFN de tipo I en AR es insuficiente como para predecir el papel de las variantes de *IRF5* en esta enfermedad. El hecho de que la combinación de varios polimorfismos sea necesaria para incrementar la susceptibilidad, que haplotipos de susceptibilidad y protección estén presentes, y que la asociación sea preferencial en un subgrupo de pacientes con AR, complica más aún la interpretación.

En conclusión, se confirma la asociación de variantes genéticas de *IRF5* con susceptibilidad a AR. El hecho de que esta asociación no se hubiera confirmado en estudios previos puede ser debida por una parte, al reducido

tamaño muestral de esos estudios que no permite que se alcance la potencia estadística suficiente para detectar asociaciones de efecto modesto (Garnier S *et al.*, 2007) (Rueda B *et al.*, 2006). Además, en el estudio español previo (Rueda B *et al.*, 2006), no se tiene en cuenta el estatus de ACPA a la hora de hacer el análisis, por lo tanto, no se observa si hay un efecto en alguno de los subgrupos de pacientes. A esto se le añade, de nuevo, el hecho de que el tamaño muestral no es suficiente para detectar la asociación en el conjunto de pacientes sin subclasificar

La asociación que encontramos, parece ser preferencial en pacientes con ACPA- o en pacientes con SE+. La combinación de ambos criterios nos permite diferenciar un subgrupo minoritario de pacientes de AR, no asociados con *IRF5*, caracterizados por ser ACPA+ y SE-, del grupo mayoritario de pacientes con AR que muestran una marcada asociación con este locus. Se espera que investigaciones futuras en esta clasificación puedan colaborar en el conocimiento de los diferentes mecanismos implicados en la expresión de AR. Además encontramos que el patrón de asociación de los polimorfismos de *IRF5* con AR es similar al descrito en pacientes con LES sugiriendo la implicación de mecanismos moleculares similares.

Análisis de polimorfismos del gen $IL-1\beta$ en relación a la susceptibilidad a la AR

Otro de los análisis que llevamos a cabo fue el estudio de polimorfismos en el gen de la *IL-1 β* . Nuestro trabajo parte del llevado a cabo por Ohmura K (2005) en modelos animales. Este grupo encontró asociado un haplotipo de polimorfismos no codificantes en *IL-1 β* con susceptibilidad a artritis mediada por anticuerpos. Para este análisis se utilizaron dos capas de ratones, la BALB/c

y la SJL, en función de la diferente respuesta (mucho más agresiva en el caso de BALB/c) que presentaron ante la inducción de un modelo de artritis (K/BxNT) con características clínicas, histológicas e inmunológicas muy similares a las características de AR en humanos. A partir de estos resultados, hicieron un mapeo genómico que proporcionó evidencias de asociación con el cluster de genes de la familia *IL-1*. Tras la definición del intervalo de susceptibilidad en el cromosoma 2, se realizaron análisis de gen candidato. Dichos análisis identificaron polimorfismos en *IL-1 β* , que ocasionaban diferencias en la producción de ARN mensajero de este gen. Estos resultados motivaron que el mismo grupo (Christopher Benoist y col.) se planteara estudiar la asociación de cuatro SNPs, localizados en el gen de la *IL-1 β* , con susceptibilidad a la AR en humanos. Su estudio en una cohorte de pacientes, demostró la asociación de uno de los SNPs (RA3) con AR (Alyssa KJ *et al.*, 2008).

De nuevo el grupo de investigación de los Drs Mathis y Benoist quiso confirmar este hallazgo en cuatro colecciones de muestras independientes, una de las cuales fue nuestra colección de muestras de Santiago. Los resultados no confirmaron la asociación de este polimorfismo de *IL1 β* , pero además, la distribución alélica entre pacientes y controles fue en dirección opuesta en dos de las poblaciones analizadas, sugiriendo que la falta de confirmación no puede ser atribuible a una falta de poder estadístico exclusivamente. La explicación más probable para estas discrepancias es que el hallazgo inicial fuera un falso positivo y no una asociación real. Otra explicación alternativa sería que los pacientes incluidos en la fase de confirmación difieran significativamente de los pacientes en los que se evidenció la asociación. De hecho, los pacientes utilizados en esta primera fase (de la colección NARAC) representan a un subgrupo de pacientes con una enfermedad más severa y agresiva, de manera que sería posible que la asociación fuera relevante únicamente en una AR

severa y erosiva. En todo caso, si esta hipótesis fuera cierta, debería haberse visto la asociación cuando se estratificó por el estatus de erosión, y no fue así. En conclusión, este estudio no pudo confirmar que la variación en el gen de la *IL-1* contribuya significativamente al riesgo o severidad en la mayoría de los pacientes con AR.

En concreto, en nuestra parte del análisis se genotiparon los SNPs rs1143633, rs1143627, RA4 y RA3 en el gen de la *IL-1 β* , en un total de 524 pacientes con AR y 504 controles, un tamaño muestral que en principio, es suficiente para detectar efectos moderados de los polimorfismos. Ninguno de los SNPs presentó asociación con AR cuando el análisis se hizo de forma general, comparando pacientes y controles. Sin embargo, cuando se llevó a cabo una estratificación por sexo, encontramos por un lado, una ligera asociación con el SNP RA3 en mujeres, y por otro lado, con el SNP rs1143633 en varones. Esta asociación dependiente del sexo no fue observada en la primera serie estudiada en la Universidad de Harvard por el grupo con el que colaboramos. Por lo tanto, no pudimos concluir asociación de ningunos de los SNPs analizados con susceptibilidad o con severidad de la AR. De nuevo, esto puede deberse a que los pacientes incluidos en estos estudios tengan manifestaciones clínicas más severas que las de nuestros pacientes.

Exploración de otros genes candidatos: CFH, CD209, Eotaxin-3 y MHC2TA

Con el objetivo de confirmar o identificar nuevos factores genéticos en AR, nos propusimos el estudio de cuatro genes candidatos (*CD209*, *CFH*, *Eotaxin3* y *MHC2TA*). Los SNP seleccionados ya se habían descrito como importantes en la susceptibilidad a la AR, o en otras enfermedades que

comparten mecanismos patológicos con ella. Este estudio se llevó a cabo en una colección de 1587 pacientes y 1570 controles. No encontramos asociación entre ninguno de los polimorfismos asociados y AR.

A la vista de estos resultados negativos, es importante hacer una valoración crítica sobre la consistencia de las evidencias previas que sugerían un papel de estos genes en susceptibilidad a AR, y acerca del poder de nuestro estudio. También es necesario evaluar estos posibles factores genéticos a la luz de todos los datos de los que disponemos.

En el caso de *CFH*, y como se comentó anteriormente, seleccionamos tres SNPs que se habían visto asociados, de forma independiente, con AMD (Edwards AO *et al.*, 2005) (Hageman GS *et al.*, 2005) (Haines JL *et al.*, 2005) (Klein RJ *et al.*, 2005). Se sabe que los polimorfismos en este gen predisponen a AMD debido a una actividad deficiente del complemento, ya que la función de *CFH* es prevenir la activación espontánea de la ruta alternativa del complemento en líquidos o superficies titulares (Alexander JJ, Quigg RJ, 2007). Nuestra hipótesis, por tanto, se basó en que los polimorfismos asociados a AMD podían tener alguna relación con AR debido a varias evidencias. Por una parte, los componentes del complemento están disminuidos en el líquido sinovial de pacientes con AR, y los niveles de C5a y C5b-9 están incrementados. También se ha visto una correlación existente entre la activación del complemento en el líquido sinovial y la actividad de la AR (Solomon S *et al.*, 2005). Además, *CFH* se expresa en fibroblastos sinoviales y es secretado por este tipo de células, y su expresión está aumentada en la sinovia y líquido sinovial de pacientes con AR (Friese MA *et al.*, 2000) (Friese MA *et al.*, 2003). Por otra parte, la activación a través de la ruta alternativa es crítica en algunos modelos experimentales de artritis (Ji H *et al.*, 2002^a) (Banda NK *et al.*, 2006).

A esto hay que sumarle que el gen *CFH* se localiza dentro de un loci de ligamiento a AR (Etzel CJ *et al.*, 2006).

En este estudio, también se analizó un SNP regulador situado en el promotor de *CD209* (rs4804803), cuyo alelo menor se encontró asociado con protección a fiebre dengue (Sakuntabhai A *et al.*, 2005) y tuberculosis (Barreiro LB *et al.*, 2006). *CD209* es un receptor específico de células dendríticas de la superfamilia de las lectinas de tipo C. Está implicado en la respuesta innata ante infecciones, así como en la migración de células dendríticas, y en los primeros estadios de activación de las células T (Zhou T *et al.*, 2006). Nuestro interés por este gen se centró en el hecho de que se expresa en la mayor parte de los macrófagos sinoviales y células dendríticas en AR, pero no en artrosis, ni en macrófagos sinoviales controles, ni tampoco en los macrófagos de otros tejido ni de sangre periférica de pacientes con AR (van Lent PL *et al.*, 2003). Este particular patrón de expresión, junto con la específica colocalización que muestran las células positivas para *CD209* con las células T positivas para *ICAM-3* en la sinovia de AR, sugieren un posible papel de este receptor en la patogenia de la enfermedad (van Lent PL *et al.*, 2003).

El resto de los SNPs seleccionados se habían visto asociados con AR en estudios previos, por lo tanto, nuestro objetivo fue el de confirmar dichas asociaciones. Como se comentó anteriormente, en el gen *eotaxin-3* se estudiaron dos SNPs. Uno de ellos, el rs2302009 se vio asociado con AR en coreanos (Chae SC *et al.*, 2005^b). Este mismo SNP también estaba asociado con rinitis alérgica, asma, niveles de IgE y concentración de eosinófilos, de nuevo en población coreana (Chae SC *et al.*, 2004) (Chae SC *et al.*, 2005^a), así como con esofagitis eosinófila en europeos (Blanchard C *et al.*, 2006). Este polimorfismo se localiza en la región 3'UTR del gen, pero no se ha identificado ningún efecto

funcional del mismo. El otro SNP, rs6965556, ha mostrado asociación en alguno de los estudios nombrados anteriormente, incluyendo uno en AR (Chae SC *et al.*, 2005^b) (Chae SC *et al.*, 2005^a). Hasta el momento no se han publicado datos que apunten a una implicación funcional de *eotaxin-3* en AR. Un posible papel sería reclutando mastocitos en la sinovia inflamada. Los mastocitos están presentes, en un número limitado, en la sinovia humana en condiciones normales, sin embargo, constituyen más del 5% de todas las células sinoviales en AR (Eklund KK, 2007), y son críticas en la articulación inflamada en modelos murinos (Lee DM *et al.*, 2002).

El otro SNP del que tratamos de confirmar su asociación con AR fue el rs3087456 (168A/G) localizado en el gen *MHC2TA* (o *CIITA*), un buen candidato para AR, cuya función es regular la expresión de las moléculas de MHC de Clase II (Chang CH, Flavell RA, 1995). Este gen se localiza en el cromosoma 16p13, un locus que se vio asociado con AR en un estudio de ligamiento en familias (Eyre S *et al.*, 2004). En este estudio se observó además, que el efecto de asociación era mayor cuando los pacientes portaban dos copias de SE. En un estudio posterior (Swanberg M *et al.*, 2005) se demostró que el alelo menor de un polimorfismo localizado en el promotor de este gen (rs3087456) estaba asociado con el incremento en el riesgo de AR. Además, el genotipo constituido por los dos alelos raros del SNP se vio implicado en la expresión de la proteína CIITA, así como en las moléculas del MHC Clase II. El mismo grupo que localizó el pico de ligamiento, llevó a cabo un estudio de asociación entre el gen *MHC2TA* y AR (Eyre S *et al.*, 2006). Los resultados no mostraron asociación entre el polimorfismo rs3087456, independientemente del estatus del SE. Solamente un estudio más tuvo en cuenta la variable SE a la hora de testar la asociación entre el SNP rs3087456 y AR. En este estudio (Martínez A *et al.*, 2007^b), no se encontró asociación entre el polimorfismo 168A/G y AR,

pero se vio la asociación de dos haplotipos (que comprenden el SNP rs3087456 y rs4774) con AR, y además el efecto aumentaba en pacientes con SE. Múltiples estudios posteriores no confirmaron la asociación. Recientemente, un metaanálisis de los 10 estudios publicados concluye que este SNP no está asociado con AR (Bronson PG *et al.*, 2008). Nuestro estudio no encontró asociación entre este SNP en el gen *MHC2TA* y AR, y este resultado fue independiente de la presencia o ausencia de SE en los pacientes.

En lo que se refiere al poder estadístico de nuestro estudio, este fue suficiente como para detectar efectos con una OR entre 1.16 y 1.21 para el SNP rs3766404 y el rs1061170, respectivamente (para un $\alpha=0.05$ y $1-\beta=0.8$). Estos dos SNPs, fueron los que presentaron la menor y mayor MAF, y en consecuencia, el menor y mayor poder estadístico. Por lo tanto la potencia del estudio fue más que suficiente para haber confirmado los efectos descritos en *eotaxin-3* (OR=2.99 y 2.13) (Chae SC *et al.*, 2005^b). Esto hace que sea difícil explicar la causa de la falta de confirmación de dichos resultados. Lo más probable es que se deba a diferencias genéticas entre poblaciones, o a interacciones entre factores genéticos y ambientales. Una tercera posibilidad, es que las asociaciones encontradas en el estudio de coreanos se deban a un resultado falso positivo. En relación a las posibles diferencias entre asiáticos y europeos, los genes *PTPN22* (Ikari K *et al.*, 2006), *PADI4* (Barton A *et al.*, 2004), *FCLR3* (Begovich AB *et al.*, 2007) e *IRF5* (kim YJ *et al.*, 2008), son un claro ejemplo de las mismas, ya que estos genes no juegan un papel relevante en AR en población asiática y sí en europeos. El que pensemos, por otra parte, que pudiera deberse a un falso positivo, se debe al pequeño tamaño del estudio coreano (Chae SC *et al.*, 2005^b), ya que el tamaño muestral de los estudios en los que se muestran asociaciones significativas, está directamente relacionado con la reproducibilidad de los resultados. En relación a esto, nuestro estudio en

MHC2TA es el de mayor tamaño muestral de los trabajos publicados anteriormente, lo cual le aporta credibilidad a nuestro resultado, en el que no se encuentra asociación entre este gen y susceptibilidad a AR. Además, el metaanálisis que incluye un total de 6861 pacientes y 9270 confirma nuestro resultado.

Si analizamos nuestros resultados en relación a los datos existentes vemos que solamente dos de los SNPs de *CFH* (rs800292 y rs3766404) están incluidos en los paneles empleados en dos de los GWA publicados (Plenge RM *et al.*, 2007^b). Ninguno de los restantes SNPs que hemos estudiado fue cubierto en ninguno de los GWA publicados. Por lo tanto, no se pueden llevar a cabo análisis de tipo comparativo. En conclusión, tanto de *CFH* como de *CD209* no podemos excluir efectos por debajo de OR de 1.18, que se corresponde con efectos moderados en el contexto del conocimiento actual (Bowes J, Barton A, 2008). Es posible que otros polimorfismos en *CFH* o en secuencias cercanas puedan tener un papel en la AR debido a la complejidad de la genética en este locus, y las nuevas asociaciones publicadas en AMD en relación a este gen (Li M *et al.*, 2006) (Maller J *et al.*, 2006), y en genes próximos relacionados (Hughes AE *et al.*, 2006).

En resumen, el estudio de los cuatro genes candidatos en AR, *CFH*, *CD209*, *eotaxin-3* y *MHC2TA*, en una amplia colección de muestras españolas, no ha mostrado la asociación de ninguno de ellos.

Sumario

Nuestro trabajo ha abordado el estudio de la variabilidad de diferentes genes con dos objetivos claros: explorar genes candidatos en la susceptibilidad a la AR y confirmar evidencias de asociación ya publicadas. Con respecto al primero de los objetivos, la hipótesis a testar fue la posible implicación de estos genes en AR a partir de lo que se conoce de la enfermedad. De esta manera, llevamos a cabo el análisis de la ruta NFκB, de la que pudimos concluir evidencias de asociación entre el gen *IKBKE* y AR, así como entre el locus *TNFAIP3* y la enfermedad. Dentro de los estudios de exploración, también nos planteamos el análisis de genes candidatos que se habían visto asociados no con AR, sino con otras enfermedades con características comunes. Con esta hipótesis analizamos genes como *CD209* y *CFH*, aunque no obtuvimos evidencias de asociación para ninguno de ellos.

Por otra parte, en algunos casos, las evidencias funcionales de los potenciales genes candidatos, estaban reforzadas por estudios previos en los que ya se habían visto la asociación de algún polimorfismo del locus a estudiar con AR. Este es el caso de *IRF5*, *IL1β*, y los genes *MHC2TA* y *eotaxin-3*. Por lo tanto, estos trabajos cumplen el segundo de los objetivos, el de confirmar los resultados publicados. Además, aportan nueva información en la investigación biomédica de la AR. Así, con respecto a este último punto, en el estudio de *IRF5* confirmamos la asociación entre este gen y AR, añadiendo el dato de cómo era el efecto de esta asociación en diferentes subgrupos de pacientes. De esta forma, planteamos la posibilidad de una subclasificación de los pacientes de AR teniendo en cuenta dos características claves en esta enfermedad, el estatus de SE y ACPA. En todo caso, esta clasificación no ha sido testada en estudios posteriores, ni en relación con *IRF5* ni con el estudio de ningún otro gen. Para el

resto de los genes de los que se pretendía confirmar su papel en susceptibilidad con AR no se obtuvieron resultados positivos.

Por último, en el estudio de la *región intergénica 6q23* y *TNFAIP3* abordamos los dos objetivos planteados. Por un lado quisimos confirmar los resultados de asociación en el primero de los locus, y por otra parte exploramos la variabilidad genética de *TNFAIP3* en relación con AR. Confirmamos los resultados obtenidos en estudios previos para la *región 6q23* e identificamos asociaciones nuevas en ambos loci.

Por lo tanto, los estudios de asociación caso-control en genes candidatos siguen siendo fundamentales en la investigación de la AR a pesar de la existencia de metodologías con mayor poder resolutivo como los GWA. Esto se debe, a que los estudios GWA no cumplen todas las necesidades. Las nuevas señales de asociación detectadas, han de ser exploradas y confirmadas en estudios independientes. De esta manera, se pretende evaluar y concluir la veracidad de las señales identificadas, y excluir falsos positivos que se hayan podido generar debido a la propia naturaleza de este tipo de estudios, en los que se testan miles de SNPs. Del mismo modo, y de nuevo debido a la mecánica de los estudios de genoma completo, pueden no detectarse señales de asociación debido a que no cumplen el criterio de significación establecido, o bien porque la cobertura de los SNPs presentes en el *chip* de genotipado no es suficiente para cubrir la región de interés. Por este motivo, los estudios genéticos de asociación caso-control a más pequeña escala siguen siendo necesarios a la hora de identificar los elementos genéticos implicados en la AR, bien sea con la finalidad de identificar nuevos factores que se sumen para explicar el 50% que supone la genética en la etiología de la enfermedad, o para confirmar las asociaciones identificadas.

Además, en este trabajo se ha puesto de manifiesto la dificultad que tiene el estudio genético de enfermedades complejas como la AR. En este aspecto, y continuando con lo anteriormente comentado, es un requisito indispensable no solamente que los estudios genéticos tengan buena cobertura y una óptima potencia estadística para evitar fluctuaciones al azar, sino que además los criterios para seleccionar las muestras estén bien definidos. La finalidad no es otra que la de esclarecer los factores genéticos que afectan a los diferentes subfenotipos presentes en los pacientes con AR. Con relación a esto, el reciente descubrimiento de los ACPA, claramente específicos de un subgrupo mayoritario de pacientes con AR (Schellekens GA et al., 2000), ha de ser un criterio más a tener en cuenta tanto en la selección de las muestras como en el análisis de los resultados.

Por último, la identificación de los factores genéticos es sólo un primer paso. Es necesario continuar investigando para conocer los mecanismos en los que los están implicados. En este aspecto, los estudios funcionales son una herramienta básica a la hora de identificar los efectos generados por polimorfismos o mutaciones genéticas en este tipo de enfermedades.

Por lo tanto, nuestro trabajo ha contribuido al estudio genético de la AR, de la que aún no se conocen todos los factores genéticos implicados en su etiología.

Conclusiones

Conclusiones

1. Hemos confirmado la asociación de variantes genéticas de *IRF5* con susceptibilidad a AR en un subgrupo mayoritario de pacientes de AR caracterizados por ser ACPA- o SE+. Además el patrón de asociación de los polimorfismos de *IRF5* con AR es similar al descrito en pacientes con LES, sugiriendo la implicación de mecanismos moleculares similares.
2. Se han encontrado claras evidencias de asociación entre polimorfismos presentes en la *región intergénica 6q23* y *TNFAIP3* con AR. Nuestros resultados muestran independencia estadística entre las señales obtenidas para ambos loci. Además el patrón de asociación de los polimorfismos de la *región 6q23* con AR es similar al descrito recientemente en pacientes con LES.
3. Nuestros datos sugieren que la variación genética en *IKBKE*, uno de los genes de la ruta de NFκB, tiene influencia en la susceptibilidad a la AR, pero requieren confirmación.
4. No se han encontrado evidencias que indiquen que la variabilidad genética del resto de los genes estudiados en la ruta de señalización NFκB, contribuyan a la AR.

5. Ninguno de los genes candidatos explorados *IL1*, *CD209*, *eotaxin 3*, *MHC2TA*, *CFH*, mostró asociación con AR. Sin embargo, es posible que otros polimorfismos presentes en *CFH* tengan influencia en AR, debido a la compleja genética de esta región en otras enfermedades

Bibliografía

Bibliografia

- Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J. *Occurrence of rheumatoid arthritis in a nation wide series of twins*. J Rheumatol. 1986; 13:899-902
- Aida Y, Maeno M, Suzuki N, Namba A, Motohashi M, Matsumoto M, *et al*. *The effect of IL-1 β on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes*. Life Sciences. 2006; 79(8):764-771
- Akahoshi M, Nakashima H, Shirakawa T. *Roles of genetic variations in signalling/immunoregulatory molecules in susceptibility to systemic lupus erythematosus*. Semin Immunol. 2006; 18(4):224-9.Review.
- Alexander JJ, Quigg RJ. *The simple design of complement factor H: Looks can be deceiving*. Mol Immunol. 2007; 44:123-32
- Andreaskos E, Sacre S, Foxwell BM, Feldmann M. *The toll-like receptor-nuclear factor kappaB pathway in rheumatoid arthritis*. Front Biosci. 2005; 10:2478-88
- Arend W, Gordon D, Wood W, Janson R, Joslin F, Jameel S. *Il-1 production in cultured human monocytes is regulated at multiple levels*. J Immunol. 1989; 143:118-26
- Arend WP, Dayer JM. *Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1990; 33:305-315.
- Arend WP, Guthridge CJ. *Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms*. Ann Rheum Dis. 2000; 59 (Suppl 1):i60–i64
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, *et al*. *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1988; 31(3):315-24.
- Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, Lee JC, Adams JL, Griswold DE. *Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine*

- suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 279:1453-1461.
- Balasa B, Krah T, Patstone G, Lee J, Tisch R, McDevitt HO, Sarvetnick N. *CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. J. Immunol.* 1997; 159:4620–4627
 - Banda NK, Thurman JM, Kraus D, Wood A, Carroll MC, Arend WP *et al.* *Alternative complement pathway activation is essential for inflammation and joint destruction in the passive transfer model of collagen-induced arthritis. J Immunol.* 2006; 177:1904-12
 - Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE, Pitha PM. *Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. Mol Cell Biol.* 2002; 22:5721-40.
 - Barnes BJ, Moore PA, Pitha PM. *Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon genes. J Biol Chem.* 2001; 276:23382-90.
 - Barnes BJ, Richards J, Manc M, Hanash S, Beretta L, Pitha PM. *Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. J Biol Chem.* 2004; 279(43):45194-207.
 - Barreiro LB, Neyrolles O, Babb CL, Tailleux L, Quach H, McElreavey K *et al.* *Promoter variation in the DC-SIGN-encoding gene CD209 is associated with tuberculosis. PLoS Med.* 2006; 3
 - Barrett JC, Cardon LR. *Evaluating coverage of genome-wide association studies. Nat Genet.* 2006; 38(6):605-6.
 - Barton A, Eyre S, Bowes J, Ho P, John S, Worthington J. *Investigation of the SLC22A4 gene (associated with rheumatoid arthritis in a Japanese*

- population) in a United Kingdom population of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(3):752-8.
- Barton A, Jury F, Eyre S, Bowes J, Hinks A, Ward D, Worthington J. *Haplotype analysis in simplex families and novel analytic approaches in a case-control cohort reveal no evidence of association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis.* *Arthritis Rheum.* 2004; 50:748–752
 - Barton A, Myerscough A, John S, Gonzalez-Gay M, Ollier W, Worthington J. *A single nucleotide polymorphism in exon 1 of cytotoxic T-lymphocyte-associated-4 (CTLA-4) is not associated with rheumatoid arthritis.* *Rheumatology (Oxford).* 2000; 39:63-66. |
 - Barton A, Platt H, Salway F, Symmons D, Barrett E, Bukhari M, *et al.* *Polymorphism in the tumor necrosis factor gene are not associated with severity of inflammatory polyarthritis.* *Ann Rheum Dis* 2004; 63:280–284
 - Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, *et al.* *Rheumatoid arthritis susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13.* *Nat Genet.* 2008; 40(10):1156-9.
 - Barton A, John S, Ollier WE, Silman A, Worthington J. *Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians.* *Arthritis Rheum.* 2001; 44:61–65.
 - Bayley JP, Bakker AM, Kaijzel EL, Huizinga TW, Verweij CL. *Association of polymorphisms of the tumor necrosis factor receptors I and II and rheumatoid arthritis.* *Rheumatology (Oxford).* 2003; 42:969–971.
 - Begovich AB, Caillier SJ, Alexander HC, Penko JM, Hauser SL, Barcellos LF, Oksenberg JR. *The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 is not associated with multiple sclerosis.* *Am J Hum Genet.* 2005; 76:184–7.

- Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC *et al.* *A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis.* Am J Hum Genet. 2004; 75:330-7
- Begovich AB, Chang M, Schrodi SJ. *Meta-analysis evidence of a differential risk of the FCRL3 -169T-->C polymorphism in white and East Asian rheumatoid arthritis patients.* Arthritis Rheum. 2007; 56:3168-71
- Beutler BA. *The role of tumor necrosis factor in health and disease.* J Rheumatol Suppl. 1999; 57:16-21
- Beyaert R, Heyninck K, Van Huffel S. *A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis.* Biochem Pharmacol. 2000; 60(8):1143-51
- Blanchard C, Wang N, Stringer KF, Mishra A, Fulkerson PC, Abonia JP *et al.* *Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis.* J Clin Invest. 2006; 116:536-47
- Bonizzi G, Karin M. *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity.* Trends Immunol. 2004; 25:280-8
- Boone DL, Turer EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, *et al.* *The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses.* Nat Immunol. 2004; 5(10):1052-60.
- Borg FA, Isenberg DA. *Syndromes and complications of interferon therapy.* Curr Opin Rheumatol 2007; 19: 61-6.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, *et al.* *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes.* Nat Genet 2004; 36:337–8.
- Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Crougton K, *et al.* *A physical and functional map of the human TNF-*

- alpha/NF-kappa B signal transduction pathway*. Nat Cell Biol. 2004; 6:97-105
- Bowes J, Barton A. *Recent advances in the genetics of RA susceptibility*. Rheumatology (Oxford). 2008; 47:399-402.
 - Bradley JR, Poher JS. *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)*. Oncogene. 2001; 20(44):6482-91
 - Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. *Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis*. Springer Seminars in Immunopathology. 1998; 20:133–147.
 - Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, *et al*. *Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist*. Arthritis Rheum. 1998; 58 (Suppl 1):196-198
 - Bresnihan B. *Anakinra as a new therapeutic option in rheumatoid arthritis: clinical results and perspectives*. Clin Exp Rheumatol. 2002; 20(5Suppl 27):S32-4
 - Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, *et al*. *Tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility, or severity of disease?* Br J Rheumatol. 1997; 36:516–521
 - Bronson PG, Criswell LA, Barcellos LF. *The MHC2TA -168A/G polymorphism and risk for rheumatoid arthritis: a meta-analysis of 6861 patients and 9270 controls reveals no evidence for association*. Ann Rheum Dis. 2008; 67(7):933-6
 - Buchan G, Barrett K, Turner M, Chantry D, Maini RN, Feldmann M. *Interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-?* Clin Exp Immunol. 1988; 73:449-455.

- Buchs N, Di Giovine FS, Silvestri T, Vannier E, Duff GW, Miossec P. *IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels*. Genes Immun. 2001; 2:222–8.
- Butler DM, Maini RN, Feldmann M, Brennan F.M. *Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist*. European Cytokine Network. 1995; 6:225–230
- Calandra T, Roger T. *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. Nat Rev Immunol. 2003; 3(10):791-800
- Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, et al. *Interleukin-1, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1999; 42:1093–100.
- Cantón I, Akhtar S, Gavalas NG, Gawkrödger DJ, Blomhoff A, Watson PF, et al. *A single-nucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo*. Genes Immun 2005; 6:584–7.
- Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. *Mapping complex disease loci in whole-genome association studies*. Nature 2004; 429:446-452.
- Chang CH, Flavell RA. *Class II transactivator regulates the expression of multiples genes involved in antigen presentation*. J Exp Med 1995; 181:765-7
- Chae SC, Lee YC, Park YR, Shin JS, Song JH, Oh GJ et al. *Analysis of the polymorphisms in eotaxin gene family and their association with asthma, IgE, and eosinophil*. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 320:131-7

- Chae SC, Park YR, Oh GJ, Lee JH, Chung HT. *The suggestive association of eotaxin-2 and eotaxin-3 gene polymorphisms in Korean population with allergic rhinitis*. Immunogenetics. 2005^a; 56:760-4
- Chae SC, Park YR, Shim SC, Lee IK, Chung HT. *Eotaxin-3 gene polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis in a Korean population*. Hum Immunol. 2005^b; 66(3):314-20
- Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP. *CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy*. Annu Rev Immunol. 2001; 19:565-94.
- Chang M, Rowland CM, Garcia VE, Schrodi SJ, Catanese JJ, van der Helm-van Mil AH, et al. *A large-scale rheumatoid arthritis genetic study identifies association at chromosome 9q33.2*. PLoS Genet. 2008; 4(6):e1000107
- Charles A, Dinarello MD. *Interleukin-1 β* . Crit Care Med. 2005; 33(12):460-2
- Choy EH, Panayi GS. *Cytokine pathway and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. N Engl J Med 2001; 344:907-916
- Chu CQ, Field M, Feldmann M, Maini RN. *Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 1991; 34(9):1125–1132.
- Chung-Ming H, Fuu-Jen T, Jer-Yuarn W, Mei-Chen W. *Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in rheumatoid arthritis*. Scand J Rheumatol 2001; 30:225-8
- Clayton DG, Walker NM, Smyth DJ, Pask R, Cooper JD, Maier LM, et al. *Population structure, differential bias and genomic control in a large-scale, case-control association study*. Nature Genetics. 2005; 37: 1243 - 1246

- Cloutier JF, Veillette A. *Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase*. J Exp Med 1999; 189:111–21.
- Constantin A, Dieudé P, Gourraud PA, Serre G, Cambon-Thomsen A, Mazières B. *et al. Peptidylarginine deiminase 4 gene polymorphism and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides in the prognosis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 2004; 50:856
- Cooke TD, Hurd ER, Jasin HE, Bienenstock J, Ziff M. *Identification of immunoglobulins and complement in rheumatoid articular collagenous tissues*. Arthritis Rheum. 1975; 18(6):541-51
- Cornelis F, Barton A, Shephard N, Hinks A, Brintnell W, MacKay K, *et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome wide linkage study*. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 10746-50
- Cunninghame Graham DS, Manku H, Wagner S, Reid J, Timms K, Gutin A, *et al. Association of IRF5 in UK SLE families identifies a variant involved in polyadenylation*. Hum Mol Genet 2007; 16: 579-91.
- Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S, Lefvert AK. *Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-, IL-1, and IL-1Ra genes*. J Rheumatol. 2002; 29:212–9.
- Dasgupta B, Corkill M, Kirkham B, Gibson T, Panayi G. *Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol. 1992; 19:22–5.
- Dayer JM, Beutler B and Cerami A. *Cachectin/tumor necrosis factor (TNF) stimulates collagenase and PGE2 production by human sinovial cells and dermal fibroblast*. J Exp Med. 1985; 162: 2163-68
- Dayer JM. *Evidence for the biological modulation of IL-1 activity: the role of IL-1Ra*. Clin Exp Rheumatol. 2002; 20(5 Suppl 27):S14-20.

- Dayer JM. *The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford). 2003; 42(Suppl 2):ii3–10.
- de Vries N, Tijssen H, van Riel PL, van de Putte LB. *Reshaping the shared epitope hypothesis: HLA-associated risk for rheumatoid arthritis is encoded by amino acid substitutions at positions 67-74 of the HLA-DRB1 molecule*. Arthritis Rheum. 2002; 46(4):921-8
- Deighton CM, Walter DJ, Griffiths ID, Roberts DF. *The contribution of HLA to rheumatoid arthritis*. Clin Genet. 1989; 36:178-82
- Demirci FY, Manzi S, Ramsey-Goldman R, Minster RL, Kenney M, Shaw PS, *et al.* *Association of a common interferon regulatory factor 5 (IRF5) variant with increased risk of systemic lupus erythematosus (SLE)*. Ann Hum Genet. 2006; 71:308-11.
- di Giovanni FS, Takhsh E, Blakemore AI, Duff GW. *Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta (IL1 beta)*. Human Mol Genet. 1992; 1:450
- Dinarello C, Moldawer L. *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis: A primer for clinicians*. 3rd. Thousand Oaks, CA: Amgen Inc.; 2002.
- Dinarello CA. *Interleukin-1, interleukin 1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist*. Int Rev Immunol 1998; 16(5-6):457-99
- Donn R, Alourfi Z, De Benedetti F, Meazza C, Zeggini E, Lunt M, *et al.* *Mutation screening of the macrophage migration inhibitory factor gene: positive association of a functional polymorphism of macrophage migration inhibitory factor with juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Rheum. 2002; 46(9):2402-9
- Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, Herwig J, *et al.* *CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus*. J. Clin. Endocrinol. 1997; 82:143–146

- Duff GW. *Genetic variation in cytokines and relevance to inflammation and disease*. The cytokine Network. *Frontiers in Molecular Biology* 2000; 25:52
- Durie FH, Fava RA, Foy TM, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. *Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40*. *Science* 1993; 261:1328–1330.
- Edwards AO, Ritter R 3r, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA *et al*. *Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration*. *Science*. 2005; 308:421-4
- Eklund KK. *Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy*. *Immunol Rev*. 2007; 217:38-52
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, Mc Coll KE, Bream JH, Young HA,, *et al*. *Interleukin-1 polymorphism associated with increased risk of gastric cancer*. *Nature* 2000; 404:398-402
- Etzel CJ, Chen WV, Shepard N, Jawaheer D, Cornelis F , Seldin MF *et al*. *Genome-wide meta-analysis for rheumatoid arthritis*. *Hum Genet*. 2006; 119:634-41
- Eyre S, Barton A, Shephard N, Hinks A, Brintnell W, MacKay, *et al*. *Investigation of susceptibility loci identified in the UK affected sibling pairs*. *Arthritis Rheum* 2004; 50:729-35
- Eyre S, Bowes J, Spreckley K, Potter C, Ring S, Strachan D *et al*. *Investigation of MHC2TA gene, associated with rheumatoid arthritis in a Swedish population, in a UK rheumatoid arthritis cohort*. *Arthritis Reum* 2006; 54:3417-22
- Fabris M, Tolusso B, Di Poi E, Assaloni R, Sinigaglia L, Ferraccioli G. *Tumor necrosis factor-alpha receptor II polymorphism in patients from southern Europe with mild-moderate and severe rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*. 2002; 29(9):1847-50

- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. *Role of cytokines in rheumatoid arthritis*. Annu Rev Immunol 1996; 14:397-440.
- Feldmann M, Maini RN. *The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford). 1999; 38 Suppl 2:3-7
- Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ, Rioux JD. *Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis*. PLoS Genet. 2008; 25; 4(4):e1000024.
- Ferreira-Neira I, Calaza M, Alonso-Perez E, Marchini M, Scorza R, Sebastiani GD, *et al.* *Opposed independent effects and epistasis in the complex association of IRF5 to SLE*. Genes Immun 2007; 8:429-39
- Fichera M, Lo Giudice M, Falco M, Sturnio M, Amata S, Calabrese O, *et al.* *Evidence of kinesin heavy chain (KIF5A) involvement in pure hereditary spastic paraplegia*. Neurology 2004; 63:1108–1110
- Finnegan A, Grusby MJ, Kaplan CD, O'Neill SK, Eibel H, Koreny T, *et al.* *IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms*. J Immunol. 2002; 169(6):3345-52
- Firestein GS. *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature. 2003; 423(6937): 356-61. Review.
- Firestein GS. *NF-kappaB: Holy Grail for rheumatoid arthritis?* Arthritis Rheum. 2004; 50:2381-6
- Fisher SA, Hampe J, Onnie CM, Daly MJ, Curley C, Purcell S, *et al.* *Direct or indirect association in a complex disease: the role of SLC22A4 and SLC22A5 functional variants in Crohn disease*. Hum Mutat. 2006; 27(8):778-85
- Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. *Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history*. Cytokine Growth Factor Rev. 2008; 19(1):3-19.

- Francis SE, Camp NJ, Dewberry RM, Gunn J, Syrris P, Carter ND, *et al.* *Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and coronary artery disease.* Circulation. 1999; 99(7):861-6
- Frieze MA, Hellwage J, Jokiranta TS, Meri S, Muller-Quernheim HJ, Peter HH *et al.* *Different regulation of factor H and FHL-1/reconectin by inflammatory mediators and expression of the two proteins in rheumatoid arthritis (RA).* Clin Exp Immunol. 2000; 121:406-15
- Frieze MA, Manuelian T, Junnikkala S, Hellwage J, Meri S, Peter HH *et al.* *Release of endogenous anti-inflammatory complement regulators FHL-1 and factor H protects synovial fibroblasts during rheumatoid arthritis.* Clin Exp Immunol. 2003; 132:485-95
- Gao X, Gazit E, Livneh A, Stastny P. *Rheumatoid arthritis in Israeli Jews: shared sequences in the third hypervariable region of DRB1 alleles are associated with susceptibility.* J Rheumatol. 1991; 18(6):801-3.
- Garnier S, Dieude P, Michou L, Barbet S, Tan A, Lasbleiz S, *et al.* *IRF5 rs2004640-T allele, the new genetic factor for systemic lupus erythematosus, is not associated with rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis. 2007; 66: 828-31.
- Genevay S, di Giovine FS, Perneger T, Silvestri T, Stingelin S, Duff G, Guerne PA. *Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene Variants with Larsen Score Progression in Rheumatoid Arthritis.* Arthritis and Rheumatism 2002; 47(3):303-309
- Goldring SR, Goldring MB. *The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis.* Clin Orthop Rel Res. 2004; 427S:27-36.
- Graham RR, Cotsapas C, Davies L, Hackett R, Lessard CJ, Leon JM, *et al.* *Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus.* Nat Genet. 2008. [Epub ahead of print]

- Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, *et al.* *A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus.* Nat Genet. 2006; 38:550-5.
- Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, *et al.* *Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus.* Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104:6758-63.
- Gregersen PK, Behrens TW. *Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis.* Nat Rev Genet. 2006; 7(12):917-28
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. 1987; 30(11):1205-13. Review
- Griffin WS, Nicoll JA, Grimaldi LM, Sheng JG, Mrak RE. *The prevasiveness of interleukin-1 in Alzheimer pathogenesis: a role for specific polymorphisms in disease risk.* Exp Gerontol 2000; 35: 481-487
- Hadj Kacem H, Kaddour N, Adyel FZ, Bahloul Z, Ayadi H, *HLA-DQB1 CARI/CAR2, TNFa IR2/IR4 and CTLA-4 polymorphisms in Tunisian patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome.* Rheumatology. 2001; 40:1370–1374.
- Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, Hancox LS, Taiber AJ, Hardisty LI *et al.* *A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102:7227-32
- Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, Gallins P *et al.* *Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration.* Science. 2005;308:419-21

- Hajeer AH, Hutchinson IV. *Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease*. Hum Immunol. 2001; 62(11):1191-9
- Hall FC, Weeks DE, Camilleri JP, Williams LA, Amos N, Darke C, *et al*. *Influence of HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis*. QJM 1996; 89:821-829
- Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. *Meta-analysis of the association of CTLA-4 exon-1 + 49A/G polymorphism with rheumatoid arthritis*. Hum Genet. 2005; 118:123-32.
- Han Z, Boyle DL, Manning AM, Firestein GS. *AP-1 and NF-kB Regulation in Rheumatoid Arthritis and Murine Collagen-Induced Arthritis*. Autoimmunity. 1998; 28(4):197 - 208
- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning A M, Firestein, G.S. *c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis*. J. Clin. Invest. 2001; 108, 73–81.
- Harney S, Wordsworth BP. *Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis*. Tissue Antigens. 2002; 60(6):465-73. Review.
- Harney SM, Meisel C, Sims AM, Woon PY, Wordsworth BP, Brown MA. *Genetic and genomic studies of PADI4 in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford). 2005; 44(7):869-72.
- Hayashi K, Altman A. *Protein kinase C theta (PKCtheta): a key player in T cell life and death*. Pharmacol. Res. 2007; 55, 537–544. |
- Hayden MS, Ghosh S. *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev. 2004; 18:2195-224
- Heyninck K, Beyaert R. *A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions*. Trends Biochem Sci. 2005; 30(1):1-4

- Hietala MA, Jonsson IM, Tarkowski A, Kleinau S, Pekna M. *Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice*. J Immunol. 2002; 169(1):454–9.
- Hildner KM, Schirmacher P, Atreya I, Dittmayer M, Bartsch B, Galle PR, Wirtz S, Neurath MF. *Targeting of the transcription factor STAT4 by antisense phosphorothioate oligonucleotides suppresses collagen-induced arthritis*. J Immunol. 2007; 178(6):3427-36
- Hill RJ, Zozulya S, Lu YL, Ward K, Gishizky M, Jallal B. *The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation*. Exp Hematol. 2002; 30(3):237-44
- Hinks A, Barton A, John S, Bruce I, Hawkins C, Griffiths CE, *et al*. *Association between the PTPN22 gene and rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis in a UK population: further support that PTPN22 is an autoimmunity gene*. Arthritis Rheum 2005; 52:1694–9.
- Hirschhorn JN, Daly MJ. *Genome-wide association studies for common diseases and complex traits*. Nat Rev Genet. 2005; 6(2):95-108.
- Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T. *Regulation of the type I IFN induction: a current view*. Int Immunol. 2005; 17(11):1367-78.
- Hoppe B, Häupl T, Gruber R, Kiesewetter H, Burmester GR, Salama A, Dörner T. *Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study*. Arthritis Res Ther. 2006; 8(2):R34
- Hossiau, FA, Devogelaer JP, Van Damme J, De Deuxchaisnes CN, Van Snick J. *Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides*. Arthritis Rheum 1988. 31:784

- Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, *et al.* *Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins.* Arthritis Rheum 2005; 52: 3433-8.
- Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U *et al.* *A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration.* Nat Genet. 2006;38:1173-7
- Huizinga TW, Keijsers V, Yanni G, Hall M, Ramage W, Lanchbury J *et al.* *Are differences in interleukin 10 production associated with joint damage?* Rheumatology (Oxford). 2000; 39:1180-8
- Ikari K, Momohara S, Inoue E, Tomatsu T, Hara M, Yamanaka H, *et al.* *Haplotype analysis revealed no association between the PTPN22 gene and RA in a Japanese population.* Rheumatology 2006; 45:1345–8.
- Iwamoto T, Ikari K, Nakamura T, Kuwahara M, Toyama Y, Tomatsu T, *et al.* *Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a meta-analysis.* Rheumatology (Oxford). 2006; 45(7):804-7
- Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, Yeow WS, Megjugorac N, Dai J, *et al.* *Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells.* J Leukoc Biol. 2003; 74(6):1125-38.
- Jacobson EM, Huber AK, Akeno N, Sivak M, Li CW, Concepcion E, Ho K, Tomer Y. *A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression.* Genes Immun. 2007; 8:205–214.
- Jacoviello L, Di Castelnuovo A, Gattone M, Pezzini A, Assanelli D, Lorenzet R, *et al.* *Polymorphism of the interleukin-1 beta gene affect the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age and the*

- response of mononuclear cells to stimulation in vitro*. Arterioscler. Thromb Vasc Biol 2005; 25: 222-227
- Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Etzel C, *et al*. *Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: a replication study and combined analysis of 512 multicase families rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum 2003; 48 906-16
 - Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, Chen WV, Shigeta R, Monteiro J, *et al*. *A genome wide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases*. Am J Hum Genet 2001; 68:927-36
 - Ji H, Gauguier D, Ohmura K, Gonzalez A, Duchatelle V, Danoy P, *et al*. *Genetic influences on the end-stage effector phase of arthritis*. J Exp Med. 2001; 194(3):321-30.
 - Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM , Boackle SA *et al*. *Arthritis critically dependent on innate immune system players*. Immunity. 2002^a;16:157-68
 - Ji H, Pettit A, Ohmura K, Ortiz-Lopez A, Duchatelle V, Degott C, *et al*. *Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis*. J Exp Med. 2002^b; 196(1):77-85
 - Julià A, Ballina J, Cañete JD, Balsa A, Tornero-Molina J, Naranjo A, *et al*. *Genome-wide association study of rheumatoid arthritis in the Spanish population: KLF12 as a risk locus for rheumatoid arthritis susceptibility*. Arthritis Rheum. 2008; 58(8):2275-86
 - Kang CP, Lee HS, Ju H, Cho H, Kang C, Bae SC. *A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans*. Arthritis Rheum. 2006; 54(1):90-6.

- Kannan P, Buettner R, Chiao PJ, Yim SO, Sarkiss M, Tainsky MA. *N-ras oncogene causes AP-2 transcriptional self-interference, which leads to transformation*. Genes Dev. 1994; 8(11):1258-69
- Ke X, Miretti MM, Broxholme J, Hunt S, Beck S, Bentley DR, Deloukas P, Cardon LR. *A comparison of tagging methods and their tagging space*. Human Molecular Genetics. 2005; 14(18):2757-2767.
- Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. *Transgenic mice expressing human tumor necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis*. EMBO J. 1991; 10(13): 4025–4031
- Kim YJ, Park JH, Kim I, Kim JO, Bae JS, Shin HD *et al. Putative Role of Functional Interferon Regulatory Factor 5 (IRF5) Polymorphism in Rheumatoid Arthritis in a Korean Population*. J Rheumatol. 2008; 35(11):2106-2118
- Kinne RW, Palombo-Kinne E, Emmrich F. *Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. 1995; 54(6): 501–504.
- Klareskog L, Padyukov L, Rönnelid J, Alfredsson L. *Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis*. Curr Opin Immunol. 2006; 18(6):650-5.
- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C *et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration*. Science. 2005;308:385-9
- Klinman DM, Gursel I, Klaschik S, Dong L, Currie D, Shirota H. *Therapeutic potential of oligonucleotides expressing immunosuppressive TTAGGG motifs*. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1058:87-95
- Koch AE, Kunkel SL, Strieter RM. *Cytokines in rheumatoid arthritis*. J Investig Med. 1995; 43:28-38
- Koczan D, Drynda S, Hecker M, Drynda A, Guthke R, Kekow J, Thiesen HJ. *Molecular discrimination of responders and nonresponders to anti-*

- TNFalpha therapy in rheumatoid arthritis by etanercept*. Arthritis Res Ther. 2008; 10(3):R50.
- Kormman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG, *et al*. *The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease*. J Clin Periodontol 1997; 24: 72-77
 - Kotake S, Sato K, Kim KJ, Takahashi N, Udagawa N, Nakamura I, *et al*. *Interleukin 6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation*. J Bone Miner Res 1996; 11: 88-95.
 - Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. *A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves' disease and autoimmune hypothyroidism*. Clinical Endocrinology. 1997; 46: 551-554.
 - Kozyrev SV, Lewen S, Reddy PM, Pons-Estel B and the Argentine Collaborative Group, Witte T and the German Collaborative Group, Junker P, *et al*. *Structural insertion/deletion variation in IRF5 is associated with a risk haplotype and defines the precise IRF5 isoforms expressed in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum 2007; 56: 1234-41.
 - Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. *CTLA-4 in autoimmune diseases a general susceptibility gene to autoimmunity?* Genes Immun. 2000; 1:170-184
 - Kroot EJ, De Jong BAW, Van Leeuwen MA, Swinkels H, Van den Hoogen FHJ, van't Hof M, *et al*. *The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent onset rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 2000; 43:1831-1835.
 - Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G, *et al*. *A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis*. PLoS Med. 2007; 4:e278. [published erratum appears in PLoS Med 2007;4:e358]

- Kurreeman FA, Rocha D, Houwing-Duistermaat J, Vrijmoet S, Teixeira VH, Migliorini P, *et al.* *Replication of the tumor necrosis factor receptor-associated factor 1/complement component 5 region as a susceptibility locus for rheumatoid arthritis in a European family-based study.* Arthritis Rheum. 2008; 58(9):2670-4
- Kuwahara M, Ikari K, Momohara S, Nakamura T, Hara M, Yamanaka H, *et al.* *Failure to confirm association between SLC22A4 polymorphism and rheumatoid arthritis in a Japanese population.* Arthritis Rheum. 2005; 52(9):2947-8
- Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, *et al.* *Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE.* Am J Hum Genet 2004; 75:504-7.
- Kyogoku C, Tsuchiya N. *A compass that points to lupus: genetic studies on type I interferon pathway.* Genes Immun. 2007; 8(6):445-55.
- Lacki JK, Moser R, Korczowska I, Mackiewicz S, Muller W. *TNF-alpha gene polymorphism does not affect the clinical and radiological outcome of rheumatoid arthritis.* Rheumatol Int. 2000; 19:137-140
- Lader CS, Flanagan AM. *Prostaglandin E2, interleukin-1, and tumor necrosis factor-1 increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro.* Endocrinology. 1998; 139:3157-3164
- Ladner MB, Bottini N, Valdes AM, Noble JA. *Association of the single nucleotide polymorphism C1858T of the PTPN22 gene with type 1 diabetes.* Hum Immunol 2005; 66:60-4.
- Lande R, Giacomini E, Serafini B, Rosicarelli B, Sebastiani GD, Minisola G, *et al.* *Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis.* J Immunol 2004; 173:2815-24.

- Lander ES, Schork Nj. *Genetic dissection of complex traits*. Science 1994; 265 (5181): 2037-48
- Lard LR, van Gaalen FA, Schonkeren JJ, Pieterman EJ, Stoeken G , Vos K, *et al*. *Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum. 2003; 48:1841-8
- Larwance RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini, *et al*. *Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States*. Arthritis Rheum 1998; 41:778-99
- Lee CS, Lee YJ, Liu HF, Su CH, Chang SC, Wang BR, *et al*. *Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism with rheumatoid arthritis in Chinese*. Clin Rheumatol 2003; 22:221-224.
- Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB *et al*. *Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis*. Science. 2002; 297:1689-92
- Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A. *Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice*. Science. 2000; 289(5488):2350-4
- Lee HS, Remmers EF, Le JM, Kastner DL, Bae SC, Gregersen PK. *Association of STAT4 with rheumatoid arthritis in the Korean population*. Mol Med 2007; 13:455–60.
- Lee YH, Choi SJ & Ji JD *et al*. *No association of polymorphisms of the CTLA-4 exon 1(+49) and promoter (-318) genes with rheumatoid arthritis in the Korean population*. Scand J Rheumatol 2002; 31:266-270.
- Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. *PADI4 polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: a meta-analysis*. Rheumatol Int. 2007; 27(9):827-33

- Lei C, Dongqing Z, Yeqing S, Oaks M, Lishan C, Jianzhong J, Jie Q, Fang D, Ningli L, Xinghai H *et al.* *Association of the CTLA-4 gene with rheumatoid arthritis in Chinese Han population.* Eur J Hum Genet. 2005; 13: 823–828
- Libby P. *Inflammation in atherosclerosis.* Nature 2002; 420: 868-874
- Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, Branham KE, Khanna R , Wade MS *et al.* *CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration.* Nat Genet. 2006;38:1049-54
- Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breed-veld FC, Kalden JR, *et al.* *For the Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis.* N Engl J Med. 2000; 343:1594–1602.
- MacKay K, Eyre S, Myerscough A, Milicia A, Barton A, Laval S, *et al.* *Whole genome linkage analyses of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the United Kingdom.* Arthritis Rheum 2002; 46:632-9
- MacKay K, Milicic A, Lee D, Tikly M, Laval S , Shatford J *et al.* *Rheumatoid arthritis susceptibility and interleukin 10: a study of two ethnically diverse populations.* Rheumatology (Oxford). 2003;42:149-53
- Mancl ME, Hu G, Sangster-Guity N, Olshalsky SL, Hoops K, Fitzgerald-Bocarsly P, *et al.* *Two discrete promoters regulate the alternatively spliced human interferon regulatory factor-5 isoforms. Multiple isoforms with distinct cell type-specific expression, localization, regulation, and function.* J Biol Chem. 2005; 280(22):21078-90.
- Martínez A, Fernández-Arquero M, Pascual-Salcedo D, Conejero L, Alves H, Balsa A, de la Concha EG. *Primary association of tumor necrosis*

factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2000; 43(6):1366-70

- Martínez A, Orozco G, Varadé J, Sánchez López M, Pascual D, Balsa A, García A, *et al.* *Macrophage migration inhibitory factor gene: influence on rheumatoid arthritis susceptibility.* Hum Immunol. 2007^a; 68(9):744-7.
- Martínez A, Sanchez-Lopez M, Varade J, Mas A, Martin MC, DE la Hera V *et al.* *Role of MHC2TA gene in autoimmune diseases.* Ann Rheumatic Dis 2007^b; 66:325-9.
- Martínez A, Valdivia A, Pascual-Salcedo D, Balsa A, Fernández-Gutiérrez B, De la Concha E, Urcelay E. *Role of SLC22A4, SLC22A5, and RUNX1 genes in rheumatoid arthritis.* J Rheumatol. 2006; 33(5):842-6
- Martinez A, Valdivia A, Pascual-Salcedo D, Lamas JR, Fernández-Arquero M, Balsa A, *et al.* *PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population.* Rheumatology (Oxford). 2005; 44(10):1263-6.
- Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, Stritesky GL, Yu Q, O'Malley JT, *et al.* *Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells.* J Immunol. 2007; 178(8):4901-7
- Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, Maurice M, Simmons B, Brenner M, *et al.* *How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease.* Nat Immunol. 2002; 3(4):360-5.
- Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. *New polymorphisms of human CD80 and CD86: lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.* Genes and Immunity. 2000; 1(7):428-434
- Mattioli I, Geng H, Sebald A, Hodel M, Bucher C , Kracht M, *et al.* *Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon.* J Biol Chem. 2006; 281:6175-83

- Mauro C, Pacifico F, Lavorgna A, Mellone S, Iannetti A, Acquaviva R, *et al.* *ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB.* J Biol Chem. 2006; 7; 281(27):18482-8.
- Maller J, George S, Purcell S, Fagerness J, Altshuler D, Daly MJ *et al.* *Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration.* Nat Genet. 2006; 38:1055-9
- McDaniel DO, Alarcón GS, Pratt PW, Reveille JD. *Most African-American patients with rheumatoid arthritis do not have the rheumatoid antigenic determinant (epitope).* Ann Intern Med. 1995; 123(3):181-7.
- Michou L, Croiseau P, Petit-Teixeira E, du Montcel ST, Lemaire I, Pierlot C, *et al.* *European Consortium on Rheumatoid Arthritis Families. Validation of the reshaped shared epitope HLA-DRB1 classification in rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther. 2006; 8(3):R79.
- Mikulowska A, Metz CN, Bucala R, Holmdahl R. *Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice.* J Immunol. 1997; 158(11):5514-7
- Milicic A, Brown MA, Wordsworth BP. *Polymorphism in codon 17 of the CTLA-4 gene (+49 A/G) is not associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in British Caucasians.* Tissue Antigens 2001; 58:50-54. |
- Mitterski B, Drynda S, Boschow G, Klein W, Oppermann J, Kekow J, Epplen JT. *Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis.* BMC Genet. 2004; 5:2
- Mollnes TE, Lea T, Mellbye OJ, Pahle J, Grand O, Harboe M. *Complement activation in rheumatoid arthritis evaluated by C3dg and the terminal complement complex.* Arthritis Rheum. 1986; 29(6):715–21.
- Morel J, Berenbaum F. *Signal transduction pathways: new targets for treating rheumatoid arthritis.* Joint Bone Spine. 2004; 71(6):503-10

- Morinobu A, Gadina M, Strober W, Visconti R, Fornace A, Montagna C, *et al.* *STAT4 serine phosphorylation is critical for IL-12-induced IFN-gamma production but not for cell proliferation.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(19):12281-6.
- Morita C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hatta N, Kikuchi T, Arinobu Y, *et al.* *Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis.* Arthritis Rheum 2001; 44: 2819-27.
- Mrak RE, Griffin WS. *Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging 2001; 22: 903-908
- Musone SL, Taylor KE, Lu TT, Nititham J, Ferreira RC, Ortmann W, *et al.* *Multiple polymorphisms in the TNFAIP3 region are independently associated with systemic lupus erythematosus.* Nat Genet. 2008. [Epub ahead of print]
- Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y. *Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production.* Immunology 2001; 104:402-9
- Neidel J, Schulze M, Lindschau J. *Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor a in the Knee-joints patients with rheumatoid arthritis.* Inflamm Res. 1995; 44:217-221.
- Nemec P, Pavkova-Goldbergova M, Stouracova M, Vasku A, Soucek M, Gatterova J. *Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter is associated with severity of rheumatoid arthritis in the Czech population.* Clin Rheumatol. 2008; 27(1):59-65.
- Newman B, Wintle RF, van Oene M, Yazdanpanah M, Owen J, Johnson B, Gu X, *et al.* *SLC22A4 polymorphisms implicated in rheumatoid arthritis and Crohn's disease are not associated with rheumatoid arthritis in a Canadian Caucasian population.* Arthritis Rheum. 2005; 52(2):425-9

- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, *et al.* *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors.* Arthritis Rheum. 2004; 50:380–386.
- Niiro H, Clark EA. *Branches of the B cell antigen receptor pathway are directed by protein conduits Bam32 and Carma1.* Immunity. 2003; 19:637–640.
- Nishikomori R, Usui T, Wu CY, Morinobu A, O'Shea JJ, Strober W. *Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R beta 2 chain expression and signaling.* J Immunol. 2002; 169(8):4388-98
- Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, *et al.* *The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes.* Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet. 1996; 5:1075- 80.
- Nistor I, Nair RP, Stuart P, Hiremagalore R, Thompson RA, Jenisch S, *et al.* *Protein tyrosine phosphatase gene PTPN22 polymorphism in psoriasis: lack of evidence for association.* J Invest Dermatol 2005; 125:395–6.
- Núñez C, Rueda B, Martínez A, López-Nevot MA, Fernández-Arquero M, de la Concha EG, *et al.* *Involvement of macrophage migration inhibitory factor gene in celiac disease susceptibility.* Genes Immun. 2007; 8(2):168-70.
- Ohmura K, Johnsen A, Ortiz-Lopez A, Desany P, Roy M, Besse W, *et al.* *Variation in IL-1 gene expression is a major determinant of genetic differences in arthritis aggressivity in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102:12489–94.
- Okada Y, Mori M, Yamada R, Suzuki A, Kobayashi K, Kubo M, *et al.* *SLC22A4 polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility: a*

- replication study in a Japanese population and a metaanalysis. J Rheumatol.* 2008; 35(9):1723-8.
- Ollier W, Thomson W. *Population genetics of rheumatoid arthritis.* Rheum Dis Clin North Am 1992; 18:741-759
 - Olmez U, Garred P, Mollnes TE, Harboe M, Berntzen HB, Munthe E. *C3 activation products, C3 containing immune complexes, the terminal complement complex and native C9 in patients with rheumatoid arthritis.* Scand J Rheumatol. 1991; 20(3):183–9.
 - Oppenheim J, Kovacs E, Matsushima K, Durum S. *There is more than one interleukin-1.* Immunol today 1986; 7:45-56
 - Orozco G , Torres B , Núñez-Roldán A, González-Escribano MF, Martín J. *Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-CT60 polymorphism in rheumatoid arthritis.* Tissue Antigens. 2004; 64(6):667 - 670
 - Orozco G, Sanchez E, Collado MD, Lopez-Nevot MA, Paco L, Garcia A, *et al.* *Analysis of the functional NFKB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.* Tissue Antigens. 2005; 65:183-6
 - Orozco G, Sánchez E, González-Gay MA, López-Nevot MA, Torres B, Pascual-Salcedo D, *et al.* *Association of a functional single nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum 2005; 52:219–24.
 - Orozco G, Sánchez E, González-Gay MA, López-Nevot MA, Torres B, Pascual-Salcedo D, *et al.* *SLC22A4, RUNX1, and SUMO4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis: a case-control study in a Spanish population.* J Rheumatol. 2006; 33(7):1235-9
 - Osorio Y Fortéa J, Bukulmez H, Petit-Teixeira E, Michou L, Pierlot C, Cailleau-Moindrault S, *et al.* *Dense genome-wide linkage analysis of*

- rheumatoid arthritis, including covariates. Arthritis Rheum. 2004; 50(9):2757-65*
- Otero M, Goldring MB. *Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. Arthritis Res Ther. 2007; 9(5):220*
 - Padyukov L, Hytonen AM, Smolnikova M, Hahn-Zoric M, Nilsson N, Hanson LA, *et al. Polymorphism in promoter region of IL10 gene is associated with rheumatoid arthritis in women. J Rheumatol. 2004; 31:422-5*
 - Panush RS, Edwards NL, Longley S, Webster E. *Rhupus syndrome. Arch Intern Med 1988; 148:1633-6.*
 - Pawlik A, Florczak M, Ostanek L, Brzosko M, Brzosko I, Szklarz BG. *TNF-alpha -308 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 2005; 34:22-26*
 - Pearce SH, Merriman TR. *Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. Trends Mol Med. 2006; 12:90-8.*
 - Pekin, TJ Jr, Zvaifler NJ. *Hemolytic Complement in Synovial Fluid. J Clin Invest. 1964; 43:1372-82.*
 - Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, *et al. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. Nat Genet. 2004; 36(5):471-5.*
 - Peters RT, Liao SM, Maniatis T. *IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. Mol Cell. 2000; 5:513-22*
 - Pierer M, Kaltenhäuser S, Arnold S, Wahle M, Baerwald C, Häntzschel H, Wagner U. *Association of PTPN22 1858 single nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis in a German cohort: higher frequency of the risk allele in male compared to female patients. Arthritis Res Ther 2006; 8:R75*

- Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, *et al.* *Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis.* Nat Genet. 2007^b; 39:1477–82.
- Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, *et al.* *Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4.* Am J Hum Genet. 2005; 77:1044–60.
- Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, *et al.* *TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis: a genomewide study.* N Engl J Med. 2007^a; 357:1199–209.
- Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Wosaae H, Nerup J. *A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro.* Eur J Clin Invest 1992; 22:396-402
- Qu H, Tessier MC, Hudson TJ, Polychronakos C. *Confirmation of the association of the R620W polymorphism in the protein tyrosine phosphatase PTPN22 with type 1 diabetes in a family based study.* J Med Genet 2005; 42:266–70.
- Radstake TR, Fransen J, Toonen EJ, Coenen MJ, Eijlbouts AE, Donn R *et al.* *Macrophage migration inhibitory factor polymorphisms do not predict therapeutic response to glucocorticoids or to tumor necrosis factor alpha-neutralising treatments in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis. 2007; 66(11):1525-30
- Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, *et al.* *Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. 2003; 48 (10):2741–2749

- Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burt NP, *et al.* *Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis.* Nat Genet. 2008; 40(10):1216-23.
- Reddy MV, Velazquez-Cruz R, Baca V, Lima G, Granados J, Orozco L, *et al.* *Genetic association of IRF5 with SLE in Mexicans: higher frequency of the risk haplotype and its homozygosity than Europeans.* Hum Genet 2007; 121:721-7.
- Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, *et al.* *STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.* N Engl J Med. 2007; 357:977-86
- Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH. *Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes.* J Immunol 2007; 179:4704–10.
- Rodríguez-Carreón AA, Zúñiga J, Hernández-Pacheco G, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Montes de Oca JV, *et al.* *Tumor necrosis factor- α -308 promoter polymorphism contributes independently to HLA alleles in the severity of rheumatoid arthritis in Mexicans.* J Autoimmun. 2005; 24:63–68
- Rodriguez-Lopez J, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. *Regulatory polymorphisms in extracellular matrix protease genes and susceptibility to rheumatoid arthritis: a case-control study.* Arthritis Res Ther. 2006; 8:R1.
- Roman-Blas JA, Jimenez SA. *NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.* Osteoarthritis Cartilage. 2006; 14:839-48
- Rosenwasser LJ. *Biologic activities of IL-1 and its role in human disease.* J Allergy Clin Immunol 1998; 102 (3): 344-50.Review

- Rueda B, Reddy MV, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Petersson IF, *et al.* *Analysis of IRF5 gene functional polymorphisms in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum 2006; 54: 3815-9.
- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A *et al.* *A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease.* Nat Genet. 2005;37:507-13
- Schellekens GA, Vidder H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC *et al.* *The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide.* Arthritis Rheum 2000; 43:155-163
- Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, *et al.* *Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. 2000; 43:2501–2512.
- Seckinger P, Williamson K, Balavoine JF, Mach B, Mazzei G, Shaw A, Dayer JM. *A murine inhibitor of interleukin 1 activity affects both interleukin 1 alpha and 1 beta but not tumor necrosis factor alpha.* J Immunol. 1987; 139(5):1541-5
- Seidl C, Donner H, Fischer B, Usadel KH, Seifried E, Kaltwasser JP, *et al.* *CTLA4 codon 17 dimorphism in patients with rheumatoid arthritis.* Tissue Antigens 1998; 51:62-66.
- Seidl C, Körbitzer J, Badenhoop K, Seifried E, Hoelzer D, Zanelli E, Kaltwasser JP. *Protection against severe disease is conferred by DERA bearing HLA-DRB1 alleles among HLA-DQ3 and HLA-DQ5 positive rheumatoid arthritis patients.* Hum Immunol 2001; 62:523-529

- Seki N, Kamizono S, Yamada A, Higuchi T, Matsumoto H, Niiya F, *et al.* *Polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in patients with rheumatoid arthritis.* Tissue Antigens. 1999; 54:194-197
- Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. *The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum 1999; 42:1071-9.
- Seldin MF, Shigeta R, Laiho K, Li H, Saila H, Savolainen A, *et al.* *Finnish case-control and family studies support PTPN22 R620W polymorphism as a risk factor in rheumatoid arthritis, but suggest only minimal or no effect in juvenile idiopathic arthritis.* Genes Immun. 2005; 6:720-2.
- Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. *Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor.* Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:3168-3171.
- Shibue T, Tsuchiya N, Komata T, Matsushita M, Shiota M, Ohashi J, *et al.* *Tumor necrosis factor 5-flanking region, tumor necrosis factor receptor II, and HLA-DRB1 polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum 2000; 43:753-7.
- Shin HD, Sung YK, Choi CB, Lee SO, Lee HW, Bae SC. *Replication of the genetic effects of IFN regulatory factor 5 (IRF5) on systemic lupus erythematosus in a Korean population.* Arthritis Res Ther 2007; 9:R32.
- Shiozawa S, Hayashi S, Tsukamoto Y, Goko H, Kawasaki H, Wada T, *et al.* *Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis.* Int Immunol 1998; 10:1891-5
- Sigurdsson S, Nordmark G, Goring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, *et al.* *Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus.* Am J Hum Genet 2005; 76:528-37.

- Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman FA, Liljedahl U, Wiman AC, Alfredsson L, *et al.* *Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum 2007; 56:2202-10.
- Silman AJ, Macgregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WER. *Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study.* Br J Rheumatol 1999; 32:903-7
- Silverberg MS, Duerr RH, Brant SR, Bromfield G, Datta LW, Jani N, *et al.* *Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease.* Eur J Hum Genet. 2007; 15(3):328-35.
- Solomon S, Kassahn D, Illges H. *The role of the complement and the Fc gamma R system in the pathogenesis of arthritis.* Arthritis Res Ther. 2005;7:129-35
- Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, *et al.* *Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus.* Diabetes 2004; 53:3020–3.
- Stastny P. *Association of the B-cell alloantigen DRw4 in rheumatoid arthritis.* N Engl J Med 1978; 298:869-71
- Stastny P. *Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis.* J Clin Invest 1976; 57:1148-57
- Stuart, JM; Dixon, FJ. *Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice.* J Exp Med. 1983; 158(2):378–92.
- Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, *et al.* *Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis.* Nat. Genet.2003; 34:395–402.

- Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M, *et al.* *MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction.* Nat Genet. 2005; 37(5):486-94
- Sweeney SE, Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS. *Regulation of c-Jun phosphorylation by the I kappa B kinase-epsilon complex in fibroblast-like synoviocytes.* J Immunol. 2005; 174:6424-30
- Tak P, Bresnihan B. *The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis. Advances from synovial biopsy and tissue analysis.* Arthritis Rheum. 2000; 43:2619-2633.
- Tak PP. *IFN- in rheumatoid arthritis.* Front Biosci 2004; 9:3242-7.
- Takata Y, Inoue H, Sato A, Tsugawa K, Miyatake K, Hamada D, *et al.* *Replication of reported genetic associations of PADI4, FCRL3, SLC22A4 and RUNX1 genes with rheumatoid arthritis: results of an independent Japanese population and evidence from meta-analysis of East Asian studies.* J Hum Genet. 2008; 53(2):163-73.
- Taniguchi T, Takaoka A. *A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2001; 2(5):378-86.
- Teller K, Budhai L, Zhang M, Haramati N, Keiser HD, Davidson A. *HLA-DRB1 and DQB typing of Hispanic American patients with rheumatoid arthritis: the "shared epitope" hypothesis may not apply.* J Rheumatol. 1996; 23(8):1363-8
- The Wellcome Trust Case Control Consortium. *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls.* Nature. 2007; 447:661-78.
- Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J *et al.* *Rheumatoid arthritis association at 6q23.* Nat Genet. 2007; 39:1431-3

- Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, *et al.* *An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis.* Nat Genet. 2003; 35(4):341-8.
- Trifunovic Cvetkovic J, Wallerg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapää-Dahlqvist S, Kari Lefvert A. *Susceptibility for and clinical manifestations of Rheumatoid Arthritis are associated with polymorphism of the TNF- , IL-1, and IL-1Ra genes.* J Rheumatol 2002; 29:212-219
- Tsitsikov EN, Laouini D, Dunn IF, Sannikova TY, Davidson L, *et al.* *TRAF1 is a negative regulator of TNF signaling. enhanced TNF signaling in TRAF1-deficient mice.* Immunity. 2001; 15(4):647-57
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, *et al.* *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease.* Nature. 2003; 423:506–511
- Undelien DE, Lie BA, Thorsby E. *HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved?* Trends Genet 2001; 17:93-100
- Vaidya B, Pearce SHS, Charlton S, Marshall N, Rowan AD, Griffiths ID, *et al.* *An association between the CTLA4 exon 1 polymorphism and early rheumatoid arthritis with autoimmune endocrinopathies.* Rheumatology. 2002; 41:180–183.
- Vaidya B, Imrie H, Perros P, Young E, Kell W, Carr D, *et al.* *The cytotoxic T lymphocyte antigen-4 is a major Graves' disease locus.* Human Molecular Genetics. 1999; 1195–1199.
- van den Berg WB, van Riel PL. *Uncoupling of inflammation and destruction in rheumatoid arthritis: myth or reality?* Arthritis Rheum 2005; 52:995-9

- van den Berg WB. *Animal models of arthritis. What have we learned?* J Rheumatol Suppl. 2005; 72:7-9.
- van den Berg WB, van de Putte LB, Zwarts WA, Joosten LA. *Electrical charge of the antigen determines intraarticular antigen handling and chronicity of arthritis in mice.* J Clin Invest. 1984; 74(5):1850-9.
- van der Helm-van Mil AH, Huizinga TW, de Vries RR, Toes RE. *Emerging patterns of risk factor make-up enable subclassification of rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum. 2007; 56(6):1728-35
- van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. *Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther. 2005; 7(5):R949-58.
- Van der Horst-Bruinsma IE, Visser J, Hazes JM, *et al.* *HLA-DQ-associated predisposition to and codominant HLA-DR-associated protection against rheumatoid arthritis.* Hum Immunol 1999; 60:152-158
- Van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, *et al.* *Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients.* Ann Rheum Dis 2007; 66:1008-14.
- van Gaalen FA, Linn-Rasker SP , van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, *et al.* *Autoantibodies predict progression to rheumatoid arthritis in undifferentiated arthritis: a prospective cohort study.* Arthritis Res Ther 2003; 5(Suppl):28
- Van Holten J, Pavelka K, Vencovsky J, Stahl H, Rozman B, Genovese M *et al.* *A multicentre randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis 2005; 64:64-9.

- Van Holten J, Smeets TJ, Blankert P, Tak PP. *Expression of interferon in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis: comparison with patients with osteoarthritis and reactive arthritis*. Ann Rheum Dis 2005; 64:1780-2.
- van Krugten MV, Huizinga TW, Kaijzel EL, Zanelli E, Drossaers-Bakker KW, van de Linde P *et al*. *Association of the TNF +489 polymorphism with susceptibility and radiographic damage in rheumatoid arthritis*. Genes Immun. 1999; 1(2):91-6
- van Lent PL, Figdor CG, Barrera P, van Ginkel K, Sloetjes A, van den BeW *et al*. *Expression of the dendritic cell-associated C-type lectin DC-SIGN by inflammatory matrix metalloproteinase-producing macrophages in rheumatoid arthritis synovium and interaction with intercellular adhesion molecule 3-positive T cells*. Arthritis Rheum. 2003;48:360-9
- van Oene M, Wintle RF, Liu X, Yazdanpanah M, Gu X, Newman B, *et al*. *Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in Canadian populations*. Arthritis Rheum 2005; 52:1993–8.
- Van Snick J. *Interleukin-6: an overview*. Annu Rev Immunol. 1990; 8:253-78. Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, *et al*. *Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant*. Nat Genet 2005; 37:1317–9.
- Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT, *et al*. *The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease*. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:5862–5.
- Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, *et al*. *Localisation of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of*

- tag single nucleotide polymorphisms*. Am. J. Hum. Genet. 2005; 76(5):773-779.
- Vetto, AA; Mannik, M; Zatarain-Rios, E; Wener, MH. *Immune deposits in articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis have a granular pattern not seen in osteoarthritis*. Rheumatol Int. 1990; 10(1):13-9.
 - Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Pareja E, Mataran L, Martín J. *Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis*. Tissue Antigens. 1997; 49:74-78
 - Vos K, van der Horst-Bruinsma IE, Hazes JM, Breedveld FC, le Cessie S, Schreuder GM, *et al*. *Evidence for a protective role of the human leukocyte antigen class II region in early rheumatoid arthritis*. Rheumatol 2001; 40:133-139
 - Vossenaar ER, Radstake TR, Van Der Heijden A, Van Mansum MA, Dieteren C, De Rooij DJ, *et al*. *Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages*. Ann Rheum Dis 2004; 63:373-81.
 - Wajapeyee N, Somasundaram K. *Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha-mediated growth inhibition*. J Biol Chem. 2003; 278(52):52093-101
 - Wandstrat A, Wakeland E. *The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes*. Nature 2001; 2 (9):802-9
 - Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. *Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns*. Nat Rev Genet 2005; 6(2):109-118.
 - Wang Y, Kristan J, Hao L, Lenkoski CS, Shen Y, Matis LA. *A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis*. J Immunol. 2000; 164(8):4340-7

- Wang Y, Rollins SA, Madri JA, Matis LA. *Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92:8955–8959.
- Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ. *Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4*. Immunol Rev. 2004; 202:139-56
- Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, *et al*. *Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial*. Arthritis Rheum. 2003; 48:35-45.
- Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, *et al*. *A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate*. N Engl J Med. 1999; 340:253-9.
- Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, *et al*. *De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling*. Nature. 2004; 430(7000):694-9.
- Weyand CM, Xie C, Goronzy JJ. *Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestation in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest 1992; 89:2033-2039
- Williams RO, Feldmann M, Maini RN. *Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis*. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89:9784–9788.
- Wilson AG, de Vries N, van de Putte LB, Duff GW. *A tumor necrosis factor alpha polymorphism is not associated with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis. 1995; 54:601–603

- Wooddrow JC, Nichol FE, Zaphiropoulos G. *DR antigens and rheumatoid arthritis: a study of two populations*. Br Med J (Clin Res Ed) 1981; 283:1287-8
- Wooley PH, Whalen JD, Chapman DL, Berger AE, Richard KA, Aspar DG, Staite ND. *The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice*. Arthritis Rheum. 1993; 36:1305–1314.
- Yanagawa T, Gomi K, Nakao EI, Inada S. *CTLA-4 gene polymorphism in Japanese patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol 2000; 27:2740-2742
- Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ *CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population*. J. Clin. Endocrinol. 1995; 80:41–45
- Yen JH, Chen CJ, Tsai WC, Lin CH, Ou TT, Wu CC, Liu HW. *Tumor necrosis factor promoter polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan*. J Rheumatol. 2001; 28(8):1788-92
- Zanelli E, Huizinga TW, Guerne PA, Vischer TL, Tiercy JM, Verduyn W, *et al*. *An extended HLA-DQ-DR haplotype rather than DRB1 alone contributes to RA predisposition*. Immunogenetics. 1998 ; 48(6):394-401
- Zhang Z, Bridges SL Jr. *Pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of B lymphocytes*. Rheum Dis Clin North Am. 2001; 27:335-53.
- Zheng D, Frankis A, Baertsch R, Kapranov P, Choo SW, Lu Y *et al*. *Pseudogenes in the ENCODE regions: consensus, annotation, analysis of transcription, and evolution*. Genome Res. 2007; 17 (6):839-51
- Zheng W, She JX. *Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type 1 diabetes*. Diabetes 2005; 54:906–8.

- Zhernakova A, Eerligh P, Wijmenga C, Barrera P, Roep BO, Koeleman BP. *Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population*. Genes Immun 2005; 6:459–61.
- Zhou T, Chen Y, Hao L, Zhang Y. *DC-SIGN and immunoregulation*. Cell Mol Immunol. 2006; 3:279-83