



Associazione tra due polimorfismi del gene HLA-G e patologia coronarica

Benedetta Matrone¹, Sara Bozzini², Anna Colonna¹, Chiara Boiocchi³,
Rossana Falcone², Alberto Benzi¹, Mariaclara Cuccia³, Colomba Falcone¹

¹U.O. di Cardiologia, Ospedale Universitario "Istituti Clinici di Pavia e Vigevano",

²Centro Interdipartimentale di Medicina Molecolare (CIRMC), Università degli Studi di Pavia, e

³Laboratorio di Immunogenetica, Dipartimento di Genetica e Microbiologia,
Università degli Studi di Pavia, Pavia, Italia

Associazione tra due polimorfismi del gene HLA-G e patologia coronarica

L'aterosclerosi e le sue complicanze rappresentano la più frequente causa di morbilità e mortalità nei paesi industrializzati. Risulta dunque di preminente importanza approfondire le ricerche riguardo le molecole coinvolte nei processi infiammatori a livello del sistema cardiovascolare. In letteratura è dimostrato che il ruolo fisiologico dell'espressione tissutale del gene HLA-G e delle proteine ad esso correlate è influenzato da due polimorfismi: (Inserzione/Delezione (Ins/Del) di 14 bp (rs16375 ed rs1632933). Nel nostro studio le frequenze alleliche, genotipiche ed aplotipiche dei due polimorfismi sono state analizzate in una popolazione di 664 pazienti con patologia coronarica (CAD) ed in 345 soggetti di controllo. Le tecniche utilizzate sono PCR-RFLP e real-time PCR. La frequenza del genotipo Ins/Ins è risultata significativamente maggiore nei pazienti CAD rispetto ai controlli ($p=0.018$). Dopo attenta analisi dei fattori confondenti, i risultati hanno mostrato che la condizione di omozigosi Ins/Ins era significativamente ed indipendentemente associata con il riscontro angiografico di CAD (odds ratio 2.09, 95% intervallo di confidenza 1.10-4.02, $p=0.03$). Dai nostri dati emerge il possibile ruolo di HLA-G come fattore di rischio per questa patologia multifattoriale su base infiammatoria.

Association between two polymorphisms in the HLA-G gene and angiographic coronary artery disease

Atherosclerosis and related complications still represent the major cause of morbidity and mortality in industrialized countries. Therefore, it is particularly important to investigate the molecules involved in cardiac inflammation. Evidence exists showing that the human leukocyte antigen-G (HLA-G) gene tissue expression and related protein physiological significance is influenced by two polymorphisms, rs16375 and rs1632933. In this study, allelic, genotypic and haplotypic frequencies of a 14-bp insertion/deletion (Ins/Del) (rs16375) and of rs1632933 polymorphisms of the HLA-G gene were investigated in 664 patients with coronary artery disease (CAD) and 345 matched controls by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism analysis and real-time PCR. The frequency of the Ins/Ins genotype was significantly higher in patients with CAD compared to the controls ($p=0.018$). After analysis of confounding variables, the results showed that the homozygous Ins/Ins was significantly and independently associated with the presence of angiographic CAD (odds ratio 2.09, 95% confidence interval 1.10-4.02, $p=0.03$). Our data demonstrate a new risk factor for this multifactorial inflammatory disease.

Introduzione

L'aterosclerosi e le complicanze ad essa correlate rappresentano la più frequente causa di morbilità e mortalità nei paesi industrializzati. I meccanismi che regolano la progressione e destabilizzazione delle lesioni ateromasiche sono multipli e complessi, e coinvolgono sia reazioni immuni che infiammatorie. Le interazioni tra le cellule del sistema immunitario innato ed i mediatori dell'infiammazione sono responsabili di vari aspetti della disfunzione endoteliale e della conseguente formazione della placca aterosclerotica [1]. HLA-G è una molecola HLA di classe I non classica [2], la cui espressione basale è generalmente limitata a tessuti fetali [3], tessuto midollare del timo adulto, cornea, isole pancreatiche [4] ed ai precursori delle cellule endoteliali [5]. È noto che l'espressione di HLA-G è aumentata in una serie di condizioni infiammatorie [6]. In particolare, nell'ambito delle risposte infiammatorie, HLA-G espresso dai monociti agisce come regolatore negativo dell'immunità [7-8] riducendo la produzione di citochine sia di tipo Th1 che Th2. Questa attività è di estrema importanza per l'evoluzione dei processi infiammatori. Evidenze suggeriscono che l'espressione tissutale di HLA-G possa essere influenzata da polimorfismi del gene HLA-G [9]. Il polimorfismo inserzione (Ins)/delezione (Del) di una sequenza di 14 paia di basi nell'esone 8 (rs16375) sembrerebbe avere un ruolo nella stabilità dell'mRNA e quindi nell'espressione della proteina HLA-G [10]. Questo polimorfismo risulta collegato con un altro polimorfismo, rs1632933, all'interno dello stesso gene. Precedenti studi hanno mostrato un significativo coinvolgimento di questi polimorfismi in situazioni in cui la disregolazione immune svolge un ruolo patogenetico cruciale, tra le quali vi sono numerose patologie umane immunomediate [11-12].

Scopo del lavoro

Considerando l'aterosclerosi come patologia infiammatoria cronica e considerando la presenza della molecola HLA-G nei precursori di cellule endoteliali umane, risulta di estrema importanza determinare la frequenza di queste varianti polimorfiche nei pazienti con patologia aterosclerotica coronarica (CAD).

Materiali e metodi

La popolazione oggetto dello studio è composta da 664 pazienti caucasici italiani con CAD (530 maschi, 114 femmine; età media 63.2 ± 8 anni) reclutati tra i pazienti afferenti all'Unità funzionale di Cardiologia dell'Università degli Studi di Pavia per eseguire angiografia coronarica. In ciascun paziente arruolato la coronarografia documentava la presenza di lesione coronarica con stenosi $>50\%$ del lume vasale in almeno una delle arterie coronarie maggiori. Sono stati esclusi dallo studio pazienti con precedente infarto miocardico o rivascolarizzazione coronarica, malattie infiammatorie intestinali, asma, disordini allergici, infezione da HIV, patologie autoimmuni, patologie maligne, storia di trapianto d'organo, patologia renale o epatica. Ciascun paziente arruolato nello studio non era affetto da malattia arteriosa periferica o cerebrovascolare. Un totale di 345 soggetti sani di età e sesso sovrapponibili sono stati arruolati come pazienti di controllo. Ciascun paziente è stato sottoposto ad accurata anamnesi patologica e fisiologica. Il protocollo di studio è stato approvato dal comitato etico locale dell'Università di Pavia e ciascun soggetto ha sottoscritto un consenso informato allo studio.

Definizione dei fattori di rischio cardiovascolare

I fattori di rischio stabiliti sono stati considerati come segue: la presenza di ipertensione arteriosa è stata definita in base al riscontro di valori pressori >140/90 mmHg in più misurazioni od in base all'utilizzo di farmaci antiipertensivi. L'ipercolesterolemia è stata diagnosticata in base a livelli di colesterolo >220 mg/dl o per l'utilizzo di terapia ipolipemizzante. Sono stati considerati diabetici tutti i pazienti con storia di patologia già diagnosticata, utilizzo di farmaci antidiabetici o a seguito del riscontro di valori di glucosio plasmatico >126 mg/dl in due o più occasioni. Per quanto riguarda l'abitudine al fumo di sigaretta, i soggetti considerati fumatori erano quelli che avevano fumato quotidianamente >3 sigarette per almeno 1 anno. La familiarità per cardiopatia ischemica (CAD) è stata identificata in base alla presenza di parenti di primo e secondo grado con storia precoce di CAD (evento coronarico <60 anni per i maschi e <70 anni per le femmine. Ciascuno di questi fattori di rischio è stato considerato come variabile categorica presente o assente.

Analisi genetiche

Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue periferico in acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) utilizzando il kit di purificazione GFX (American Biosciences, Piscataway, NJ, USA). L'amplificazione dell'esone 8 del gene HLA-G è stata attuata tramite PCR-RFLP [30]. Utilizzando un termociclatore I-Cycler (BioRad, Monza, Italia), sono state condotte le reazioni di amplificazione tramite PCR, effettuate in un volume totale di 25 µl contenenti: 1µl di DNA genomico, 0.1 µl di Taq polimerasi (Eurobio, Les Ulis, Francia; concentrazione finale 0.02 U/µl), 1 µl di ciascun primer (concentrazione finale 4 ng/µl), 2.5 µl tampone 10X (Eurobio), 0.75 µl MgCl₂ (Eurobio) (concentrazione finale 1.5 nM), 2.5 µl dNTPs (concentrazione finale 2mM). Le condizioni di PCR erano le seguenti: denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti; seguita da 35 cicli ciascuno composto da denaturazione a 94°C per 30 secondi, annealing a 64°C per un minuto ed estensione a 72°C per 2 minuti; estensione finale a 72°C per 7 minuti. I prodotti amplificati mediante PCR sono stati poi visualizzati su gel di agarosio al 3% con etidio bromuro. Le dimensioni dei frammenti amplificati per il polimorfismo 14 bp Ins/Del erano di 224 bp in caso di presenza dell'allele inserzione e di 210 bp in caso di assenza della sequenza di 14bp. Il polimorfismo rs 1632933 è stato analizzato mediante real-time PCR utilizzando LC480 thermocycler (Roche) utilizzando i seguenti primer HLA-G R2 (5'-TGTCCTTAGCCAG GGACCTT-3') e HLA-G F2 (5'-TGTGACAATGAAGGACAGATTT ATAACCTT-3') e le seguenti sonde Fret: sensor (5'-CTGTGATTACTGGGATCAG-3') e anchor (5'-CTGTGATTACTAGGATCAG-3').

Analisi statistiche

Tutte le analisi statistiche sono state condotte utilizzando il pacchetto statistico SPSS versione 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato effettuato per verificare la distribuzione dei dati continui. Il test χ^2 è stato utilizzato per verificare se la frequenza osservata dell'allele concordava con quella attesa nel rispetto dell'equilibrio Hardy-Weinberg. Le distribuzioni alleliche e genotipiche sono state stimate contando gli alleli e confrontandoli nel gruppo CAD e nel gruppo di controllo tramite test chi-quadro. Le analisi di regressione univariata e multivariata sono state effettuate per valutare se il polimorfismo 14 bp Ins/Del fosse associato con un maggior rischio per CAD anche dopo aver corretto i dati in base ad età, sesso e comuni fattori di rischio cardiovascolare. Odds ratio (ORs) sono riportati con i loro intervalli di confidenza al 95% (IC). Il potere dello studio è stato calcolato usando il software StatMate, versione 2.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). La significatività statistica è stata fissata per valori di p value a due code <0.05. Le frequenze aploipatiche sono state calcolate con il programma HPLUS (<http://cougar.fhcr.org/hplus/>). Il linkage disequilibrium è stato calcolato usando il software JLIN 1.6.0 (<http://www.genepi.org.au/jlin/>).

Risultati

Le caratteristiche generali della popolazione oggetto di studio sono mostrate in tabella 1. Come atteso, la prevalenza dei comuni fattori di rischio era significativamente maggiore nei pazienti CAD rispetto ai controlli. La distribuzione del polimorfismo Ins/Del del gene HLA-G è riportata in tabella 2. I genotipi risultavano in equilibrio di Hardy Weinberg sia nei pazienti che nei controlli. Basandoci sulla prevalenza osservata del genotipo omozigote Ins/Ins nella popolazione sana, la dimensione del nostro campione ha mostrato un potere del 95% nel determinare un rischio relativo del 2.10 per patologia coronarica nei soggetti portatori rispetto ai non portatori, con livello di significatività (α) di 0.05 (due code). La frequenza del genotipo omozigote Ins/Ins era significativamente maggiore in pazienti con CAD (21.2%) rispetto ai controlli (15%, $p=0.018$). L'OR per la presenza di CAD in soggetti portatori del genotipo omozigote Ins/Ins era pari a 1.51 (95% IC 1.07-2.15; $p=0.018$). Per valutare se l'associazione osservata fosse indipendente da potenziali fattori confondenti, abbiamo effettuato una analisi di regressione logistica multivariata dopo aver corretto i dati in base ai possibili fattori confondenti, che includono tutti i comuni fattori di rischio elencati in Tabella 1. Anche dopo questa correzione i risultati mostravano che lo stato di omozigosi Ins/Ins era indipendentemente e significativamente associato con la presenza angiografica di patologia coronarica (OR 2.09, 95% IC 1.10-4.02, $p=0.03$). Abbiamo analizzato un secondo polimorfismo di HLA-G che determina una sostituzione nucleotidica A/G (rs1632933). I nostri dati non hanno evidenziato significative differenze tra le due popolazioni oggetto dello studio sia per quanto riguarda le frequenze alleliche che genotipiche (Tabella 3). Abbiamo quindi svolto l'analisi delle frequenze aplotipiche da cui non è emersa alcuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo di pazienti CAD e i controlli. Tuttavia, è stato possibile osservare un trend di significatività per le frequenze dell'aplotipo Del/A (OR 0.71, 95% IC 0.49±1.03, $p=0.072$).

Discussione

Questo studio è il primo a dimostrare che il genotipo omozigote Ins/Ins del polimorfismo HLA-G 14 bp Ins/Del (rs16375) è significativamente associato con la presenza di CAD nella popolazione italiana. Come emerso dalla analisi di regressione logistica multivariata, questa associazione permane anche dopo aver corretto i dati per i possibili fattori confondenti, inclusi i comuni fattori di rischio cardiovascolare. Sempre più studi mostrano che il polimorfismo 14bp del gene HLA-G è associato a varianti di splicing e con la stabilità dell'mRNA [10]. In particolare l'inserzione della sequenza di 14 bp è collegata ad una ridotta stabilità dell'mRNA e di conseguenza a più bassi livelli di molecola HLA-G solubile (sHLA-G) prodotta [13-14]. I risultati ottenuti nel presente studio mostrano significative differenze nella distribuzione del polimorfismo 14bp HLA-G tra la popolazione italiana con CAD ed i soggetti sani. La popolazione CAD è caratterizzata da una maggior frequenza di soggetti con ridotta produzione di molecole HLA-G anti-infiammatorie geneticamente determinata. Sulla base di questa prima dimostrazione di associazione tra il polimorfismo di 14bp nell'esone 8 del gene HLA-G e la patologia coronarica, non si può escludere che l'associazione sia conseguenza di linkage disequilibrium con un altro locus genetico nella regione MHC. È stato già ben descritto come l'intero aplotipo HLA, inclusa la combinazione HLA-DRB1*01/*04, è associato con morbilità e mortalità cardiovascolare [15]. Appare interessante inoltre come diverse associazioni siano state plurimamente descritte tra polimorfismi HLA-G ed altre patologie infiammatorie croniche quali le malattie infiammatorie intestinali [16], l'asma allergico [17], la sclerosi multipla [18]. Oltre al potenziale ruolo di HLA-G nei processi infiammatori ed immuni, evidenze suggeriscono che questa molecola possa anche modulare l'attività

endoteliale [19]. In tale senso è stato precedentemente dimostrato che HLA-G solubile ricombinante purificato è in grado di ridurre la proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali in vitro [20]. Nel loro insieme questi dati indicano un ruolo ben definito di HLA-G nell'omeostasi vascolare e suggeriscono l'utilità di ulteriori ricerche riguardo al suo potenziale fisiopatogenetico nell'aterogenesi. Nell'interpretazione dei nostri risultati tuttavia devono essere prese in considerazione alcune limitazioni. In primo luogo il nostro è uno studio caso-controllo unicentrico; ulteriori indagini con un più ampio numero di pazienti sarebbero utili per confermare l'importanza di questo polimorfismo nel rischio di patologia coronarica. In secondo luogo l'associazione tra polimorfismo di HLA-G e CAD è stata osservata in un gruppo di soggetti caucasici italiani. Quindi ulteriori studi sono necessari per chiarificare l'associazione con CAD in diverse popolazioni ancestrali. Infine nel nostro studio non abbiamo misurato i livelli di HLA-G solubile nel siero dei partecipanti; tuttavia, poiché è noto che i livelli di sHLA-G si modificano in base a diverse risposte infiammatorie, sarebbe difficile correlare i livelli di sHLA-G con la patologia coronarica.

Conclusioni

In conclusione, dal nostro studio emerge una significativa associazione tra il genotipo HLA-G Ins/Ins e CAD e pertanto questo dato aggiunge un nuovo fattore di rischio all'insieme delle cause multifattoriali di questo processo infiammatorio cronico. Future ricerche dovrebbero concentrarsi sulla comprensione del ruolo esatto delle varianti genetiche di HLA-G nel processo aterosclerotico, possibilmente incentrandosi sulla associazione funzionale tra ridotti livelli di HLA-G e polimorfismo 14bp HLA-G.

Tabelle e figure

Tabella 1. Caratteristiche generali della popolazione oggetto di studio.

<i>Caratteristiche</i>	<i>CAD (n=664)</i>	<i>Controlli (n=345)</i>	<i>P value</i>
<i>Età, anni</i>	63.2±8.0	64.1±10.8	Ns
<i>Sesso maschile, n%</i>	530 (80)	250 (73)	Ns
<i>DMT2, n%%</i>	119 (15)	13 (4)	<0.01
<i>Iperensione, n%</i>	381 (57)	27 (9)	<0.001
<i>Fumo, n%</i>	252 (38)	22 (6)	<0.001
<i>Ipercolesterolemia, n%</i>	173 (26)	18 (5)	<0.001
<i>Familiarità per CAD, n%</i>	143 (21)	15 (4)	<0.001

Tabella 2. Distribuzione del genotipo HLA-G del polimorfismo 14bp Ins/Del nella popolazione in studio.

<i>Genotipo</i>	<i>CAD (n=664)</i>	<i>Controlli (n=345)</i>	<i>P value</i>	<i>OR (95% CI)</i>
<i>Ins/Ins (%)</i>	141 (21.2)	52 (15)	0.018	1.51 (1.07-2.15)
<i>Ins/Del più Del/Del (%)</i>	523 (78.8)	293 (85)	Ns	

Tabella 3. Distribuzione dei genotipi HLA-G del polimorfismo Rs 1632933 nella popolazione in studio.

<i>Genotipo</i>	<i>CAD (n=664)</i>	<i>Controlli (n=345)</i>	<i>P value</i>	<i>OR (95% CI)</i>
<i>A/A (%)</i>	165 (25)	95 (27)	0.9184	1.0172 (0.7478-1.3838)
<i>A/G più G/G (%)</i>	499 (75)	250 (72)	Ns	

Bibliografia

- Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138:S419-S420.
- Heinrichs H, Orr Hat. HLA non-A,B,C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res* 1990;9:265-274.
- Redman CW, McMichael AJ, Stirrat GM et al. Class I major histocompatibility complex antigens on human extravillous cytotrophoblast. *Immunology* 1984;52:457-468.
- Cirulli V, Zalatan J, McMaster M et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes* 2006;55:1214-1222.
- Hiby SE, King A, Sharkey A et al. Molecular studies of trophoblast HLA-G: polymorphism, isoforms, imprinting and expression in preimplantation embryo. *Tissue Antigens* 1999;53:1-13.
- Carosella ED, Paul P, Moreau P et al. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunol Today* 2000;21:532-534.
- Lila N, Rouas-Freiss N, Dausset J et al. Soluble HLA-G protein secreted by allo-specific CD4+ T cells suppresses the alloproliferative response: a CD4+ T cell regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12150-12155.
- Contini P, Ghio M, Merlo A et al. Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas ligand/Fas mediated: evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and Calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF-kappaB and NF-AT nuclear translocation. *J Immunol* 2005;175:7244-7254.
- Van der Ven K, Skrablin S, Engels G et al. HLA-G polymorphisms and allele frequencies in Caucasians. *Hum Immunol* 1998;59:302-312.
- Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G et al. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003;64:1005-1010.
- Gazit E, Slomov Y, Goldberg I et al. HLA-G is associated with *Pemphigus vulgaris* in Jewish patients. *Hum Immunol* 2004;65:39-46.
- Glas J, Török HP, Tonenchi L et al. The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with leocecal resection in Crohn's disease. *Int Immunol* 2007;19:621-626.
- Crisa L, McMaster MT, Ishii JK et al. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. *J Exp Med* 1997;186:289-298.
- Rebmann V, Van der Ven K, Passler M et al. Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 2001;57:15-21.
- Farragher TM, Goodson NJ, Naseem H et al. Association of the HLA-DRB1 gene with premature death, particularly from cardiovascular disease, in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:359-369.
- Torres MI, Le Discorde M, Lorite P et al. Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int Immunol* 2004;16:579-583.
- Nicolae D, Cox NJ, Lester LA et al. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am J Hum Genet* 2005;76:349-357.
- Maier S, Geraghty DE, Weiss EH. Expression and regulation of HLA-G in human glioma cell lines. *Transplant Proc* 1999;31:1849-1853.
- Dorling A, Monk N, Lechler R. HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells. *Eur J Immunol* 2000;30:586-593.
- Le Bouteiller P, Pizzato N, Barakonyi A et al. HLA-G, pre-eclampsia, immunity and vascular events. *J Reprod Immunol* 2003;59:219-234.