









































































# **ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

### A

ACR: colegio Americano de Rheumatología

ACPA: antiproteínas citrulinadas

ACCP: anticuerpo antipéptido cíclico citrulinado

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADAMPS: metalopeptidasa con motivo trombospondina tipo 1

AINES: antiinflamatorios no esteroideos

ANK: repeticiones de anquirina

AR: artritis reumatoide

### B

BAFF: factor activador de células B

BAFFR: receptor del factor activador de células B

BCR: receptor de linfocitos B

BLC: quimioatrayente de linfocitos B

BRM: terapia biológica

### C

CC: dominio *coiled-coil*

CD: células denticricas

CD40L: ligando CD40

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

COX2: ciclooxigenasa-2

## **D**

DAS: disease activity index (índice de actividad de la enfermedad)

DAMP: patrones moleculares asociados a peligro

DD: región con homología al dominio de muerte

## **E**

E: glutamato

ELAM-1: moléculas de adhesión de leucocitos endoteliales-1

ELISA: inmunoensayo ligado a enzima

EMSA: ensayo de cambio de la movilidad electroforética

EULAR: liga europea contra los reumatismos

## **F**

FAMES: fármacos modificadores de la enfermedad

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

FLS: fibroblastos de tipo sinovial

FR: factor reumatoide

## **G**

GC: glucocorticoides

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GRR: región rica en glicina

GWAS: estudio de asociación del genoma completo

## **H**

HA: ácido hialurónico

HCQ: hidroxicloroquina

HLA: antígenos leucocitarios humanos

HLH: *hélix-loop-hélix*

## **I**

ICAM-1: moléculs de adhesión intracelular-1

IFN- $\delta$ : interferon  $\delta$

IgG: inmunoglobulina G

IgM: inmunoglobulina M

IKK: complejo quinasa I $\kappa$ B

IL-1 $\beta$ : interleuquina 1 $\beta$

INF- $\alpha$ : interfron  $\alpha$

INF- $\beta$ : interferon  $\beta$

iNOS: sintasa inducible de óxido nitroso

## **J**

JAK1: janus quinasa 1

JAK3: janus quinasa 3

## **K**

KD: dominio quinada N-terminal

## **L**

LFN: leflunomida

LT: linfotoxina

LTB: linfotoxina B

LT $\beta$ R: receptores de linfotoxina B

LTCD8+: linfocitos T citotóxicos

LTCD4+: linfocitos T colaboradores

Lys 21: lisina 21

LZ: dominio de transactivación RelB conteniendo un motivo de cremallera de leucina

## **M**

MAP-3K: proteína activadora de mitosis cinasa-cinasa-cinasa

MCF: metacarpofalángicas

MCP-1: proteínas inflamatorias de macrófagos 1

MEKK3: MAPK/ERK-cinasa reguladora de señales extracelulares

MIP-1 $\alpha$ : proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$

MMP: metaloproteinasas de la matriz

MPT: metalarsofalángicas

mTECs: células epiteliales tímicas medulares

MTX: metotrexato

## **N**

NBD: dominio de unión a NEMO

NCAM: moléculas de adhesión celular neural

NF $\kappa$ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NIK: quinasa inductora de NF $\kappa$ B

NKT: célula TNK

NLS: señal de localización nuclear

## **P**

P: prolina

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos

PCR: proteína C reactiva

PEST: dominio rico en prolina, glutamato, serina y treonina

PIF: interfalángicas proximales

PLAS2: fosfolipasa 2

PRR: receptores de reconocimiento de patrones

pTrCP: proteína que contiene repeticiones de transducción p

## **R**

RAG: genes de activación de recombinación

RANK: receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B

RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B

RANTES: quimoquina expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación

RHD: dominio de homología Rel

## **S**

S: serina

SCF: complejo de ligasa de ubiquitina Skp1/Cull/F-box

SDF1: factor derivado de células del estroma 1

Ser 32: serina 32

SLC: citocinas del tejido linfoide

SSZ: sulfasalazina

## **T**

T: treonina

TAD: dominio de activación transcripcional

TAK1: factor de crecimiento transformante p

TCR: receptor de antígenos

Th1: linfocitos T colaboradores tipo 1



Th2: linfocitos T colaboradores tipo 2

Th17: linfocitos T colaboradores tipo 17

TIMP: tejido inhibidor de metaloproteasas

TLR: receptores tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alpha

TNF $\alpha$ -R: receptor del factor de necrosis tumoral alpha

Treg: linfocitos T reguladores

## **V**

VCAM-1: moléculas de citoadhesión vascular 1

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VN: valor normal

VSG: velocidad de sedimentación globular

## **Z**

ZF: *zinc-finger*

# **1. INTRODUCCIÓN**



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Artritis reumatoide**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistémica autoinmune. Se caracteriza por una hiperplasia sinovial, activación celular e inflamación crónica de las articulaciones (Lefevre et al., 2009). Su inicio comienza con una inflamación de la membrana sinovial, que con frecuencia lleva a la destrucción erosiva del cartílago adyacente y el hueso, lo que provoca una disminución de la capacidad física, pérdida de calidad de vida y acortamiento de la supervivencia, siendo una de las enfermedades reumáticas que mayor grado de incapacidad produce.

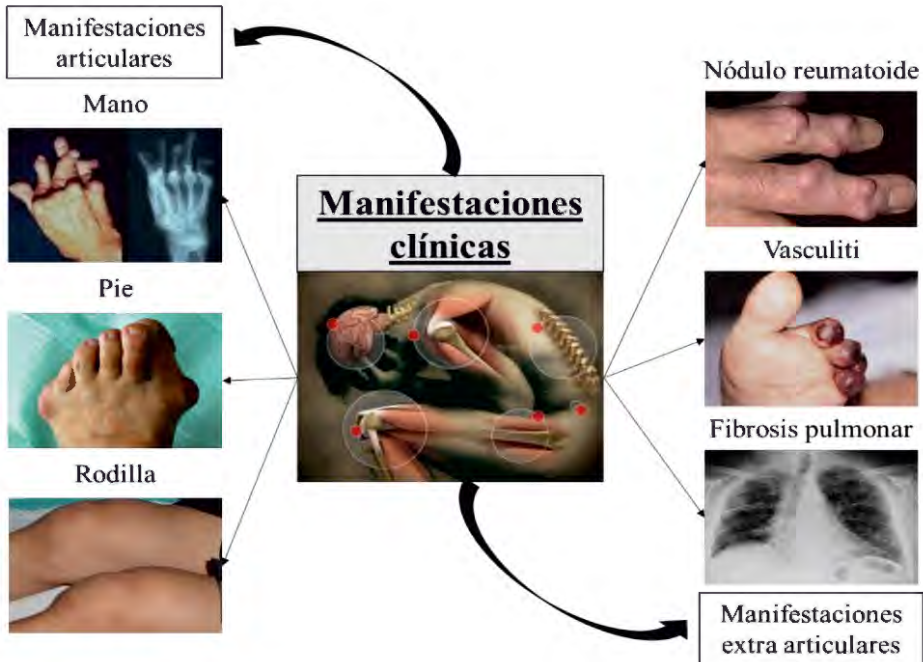
#### **1.1.1 Epidemiología**

La AR se caracteriza por ser una enfermedad de patogenia compleja lo que dificulta su descripción epidemiológica al no estar bien definido el momento de su inicio. Se considera la enfermedad reumática más frecuente, con una prevalencia a nivel mundial de entre el 0,3 y el 1,2% (Carmona et al., 2002) y una incidencia de 20-50 por cada 100.000 casos al año (Carmona et al., 2010). Es más habitual en mujeres que en hombres, con una razón 3:1 pudiendo aparecer a cualquier edad aunque es más frecuente entre los 40 y los 50 años.

A excepción de algunos estudios en África, se encuentra en cualquier región del mundo, variando su prevalencia según el país y el área geográfica (Tobon et al., 2010). Se trata de una enfermedad común en el norte de Europa y Norteamérica mientras que aparece con menor frecuencia en regiones como África oriental y Oceanía (Kalla and Tikly, 2003). Los países en vías de desarrollo tienen una prevalencia aún menor, siendo muy baja en ciertas tribus nativas Africanas mientras que es muy frecuente en ciertas tribus nativas americanas. En España cinco de cada mil adultos (0,5%) padece AR (Carmona et al., 2010).

### **1.1.2 Manifestaciones clínicas**

La AR se caracteriza por presentar una gran variedad de signos y síntomas no específicos de la enfermedad siendo las manifestaciones más frecuentes el dolor y la tumefacción de las articulaciones afectadas, acompañado de una rigidez que se acentúa tras periodos de inmovilidad. Principalmente afecta a las articulaciones periféricas destacando las pequeñas articulaciones de manos (metacarpofalángicas e interfalángicas proximales) y pies (metatarsofalángicas), pudiendo afectar otras mayores como rodillas, hombros, codos y caderas así como la columna cervical y articulaciones temporo mandibulares. Se trata de una afectación generalmente simétrica y poliarticular en la que destaca su ausencia en la columna dorsal y columna lumbar.



**Figura 1. Imagen representativa de las manifestaciones clínicas presentes en los pacientes con AR.**

Además de las manifestaciones articulares, en aproximadamente un 40% de los pacientes también existen manifestaciones extra articulares, siendo graves en casi 15% de los casos (Figura 1) (Turesson, 2013). Las más comunes son:

- Nódulos reumatoides: Son las manifestaciones extra articulares más frecuentes. Se trata de estructuras granulomatosas que se expresan como nódulos de hasta 5 cm, localizadas en zonas de fricción, alta presión o de roce. Están formados por un vaso con

necrosis rodeado por células inflamatorias, histiocitos y fibroblastos.

- Vasculitis: Es la primera de las manifestaciones extra articulares específicas descritas en los pacientes con AR. Está relacionada con valores altos del factor reumatoide y puede causar polineuropatía, mononeuritis múltiple, necrosis dérmica, gangrena, ulceraciones etc.
- Manifestaciones pleuropulmonares: Pleuritis, fibrosis intersticial, nódulos pleuropulmonares, neumonitis y arteritis pulmonar.
- Manifestaciones oculares: Epiescleritis, escleritis y en el 20% de los pacientes con AR que padecen Síndrome de Sjogren o queratoconjuntivitis seca.
- Manifestaciones cardiacas: Pericarditis e insuficiencia cardiaca congestiva.
- Afección renal: Puede aparecer amiloidosis, vasculitis o glomerulonefritis.
- Síndrome de Felty: Afecta a menos del 1% de los pacientes con artritis reumatoide. Se trata de un síndrome más común de la AR de larga evolución, con presencia de esplenomegalia, neutropenia y úlcera cutánea.

### **1.1.3 Patogénesis**

De naturaleza autoinmune, la AR es una enfermedad cuya etiología permanece desconocida. Se sabe que posee un origen multifactorial resultado de la combinación de factores genéticos, ambientales, e inmunológicos. Estos mecanismos provocan una alteración

de la respuesta inmune que lleva a la pérdida de la tolerancia frente a lo propio (Rioux and Abbas, 2005).

### **1.1.3.1 Factores genéticos**

La AR es una enfermedad poligénica. Se estima que el componente genético supone aproximadamente un 60% de los factores predisponentes de la enfermedad (MacGregor et al., 2000). Mediante estudios de agregación familiar se vio que la concordancia de la enfermedad era más alta en familiares de primer grado entre 2 y 4%, y en gemelos monocigóticos entre el 12 y el 15%, que en la población general donde oscila entre el 0,5 y el 1% (Bali et al., 1999; Carmona et al., 2010; Dieude and Cornelis, 2005).

Se ha descrito que el componente genético más importante a la hora de determinar la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes reside en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), una familia de genes presentes en todos los vertebrados que conforman el sistema HLA (antígenos leucocitarios humanos). Se trata de los genes más polimórficos del genoma habiéndose identificado para alguno de los locus más de 250 alelos. Según la organización que presenten van a determinar diferentes tipos de moléculas implicadas en la presentación de antígenos a los linfocitos T interviniendo así en la diferenciación de lo propio y lo ajeno en el sistema inmunitario y regulando la respuesta inmune adaptativa frente a patógenos. En la AR se estima que el 30% de la influencia genética está asociada a genes HLA siendo el locus HLA-DRB1 el que



mayor asociación con la enfermedad presenta y por tanto el mejor estudiado (Stastny, 1976; Viatte et al., 2013).

Sin embargo, a pesar de la importancia de los genes HLA en la artritis, se ha visto que su influencia no supone el 100% de la contribución genética (Deighton et al., 1989). Así mediante estudios de ligamiento y estudios de asociación como instrumentos fundamentales en la identificación de nuevos genes, numerosos nuevos locis fuera de la región CMH han sido asociados tanto a susceptibilidad como a pronóstico en AR. Hoy en día, la reciente disponibilidad de estudios de genoma completo GWAS (*genome-wide association studies*) ha hecho que los estudio de asociación no queden limitados a regiones del genoma con genes candidatos, sino que puede ampliarse la búsqueda habiéndose identificado en los últimos años numerosos nuevos loci potenciales de susceptibilidad para la AR. Entre los genes identificados destacan PTPN22, CCR6, STST4 y TRAF1/C5 (Cheng et al., 2015; Kochi et al., 2014; Ohmura, 2015; Okada et al., 2014).

### **1.1.3.2 Factores ambientales**

Se sabe que existe una interacción entre los factores genéticos y los ambientales, siendo éstos últimos un pilar clave en el desarrollo de la AR. Diversos factores ambientales han sido estudiados y relacionados con la AR, sin embargo su implicación en la enfermedad sigue sin estar clara. Se han descrito como más influyentes en el desarrollo de la patología, el polvo de sílice, factores socioeconómicos, factores dietéticos como el alcohol, el café o el aceite mineral, factores hormonales, enfermedad

periodontal, la vitamina D y como elemento de riesgo principal, el tabaco (Figura 2) (Klareskog et al., 2009).

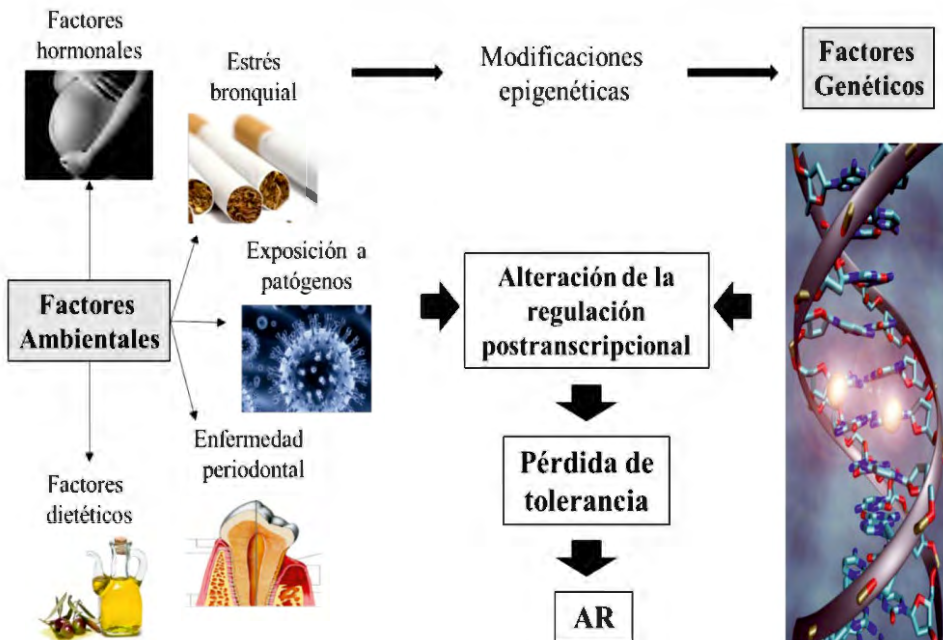
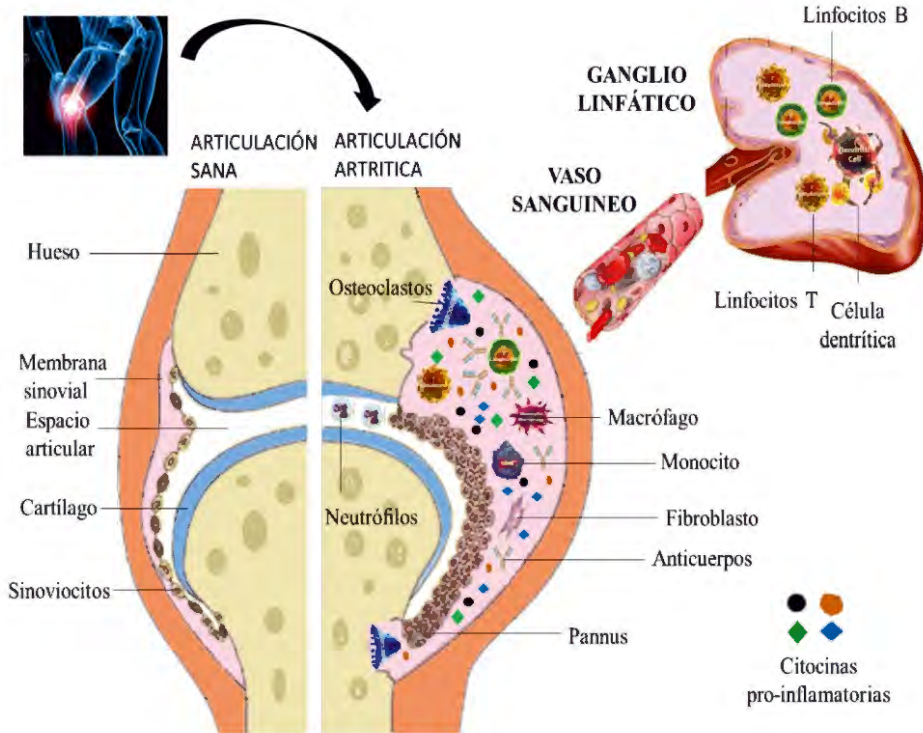


Figura 2. Factores que influyen en el desarrollo de la AR.

### 1.1.3.3 Factores inmunológicos

La AR es una enfermedad de etiopatogenia completa donde la respuesta mediada por el sistema inmunitario es fundamental. Esta respuesta madura en los ganglios linfáticos donde tiene lugar las interacciones celulares precisas para la maduración de los linfocitos autorreactivos que desencadenan las respuestas celulares y/o humorales.

Junto a ello sucede la neoformación de vasos sanguíneos sinoviales que van a provocar la migración de linfocitos y células polimorfonucleares a la membrana sinovial y al líquido sinovial. Esto tiene lugar gracias a la activación endotelial que provoca un incremento en la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas responsables de los procesos de quimiotaxis y migración transendotelial. En la fisiopatología de la AR intervienen muchos tipos celulares pero destaca la presencia de monocitos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos T y células mesenquimales conocidas como sinoviocitos de tipo fibroblasto, contribuyendo cada uno de ellos al desarrollo de la enfermedad (Figura 3) (McInnes and Schett, 2011). A continuación se resumen las principales contribuciones celulares a la patogenia.



**Figura 3. Diferencias entre una articulación sinovial sana y una articulación afectada con AR.**

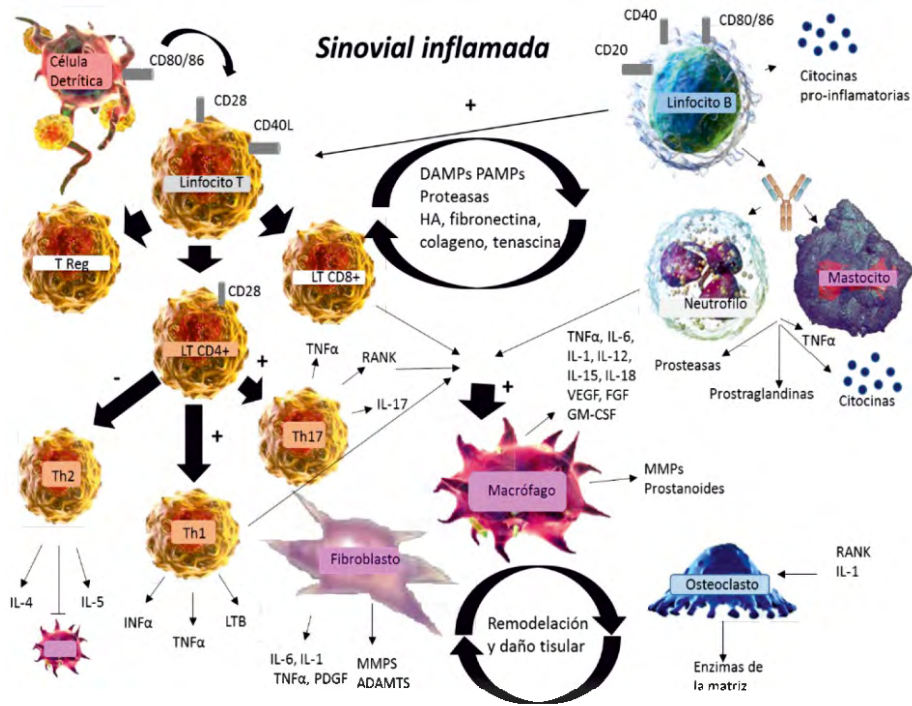
Los linfocitos T representan el tipo celular más abundante en la sinovial inflamada en pacientes con AR, pudiendo suponer el 50% del total de células presentes (Goronzy and Weyand, 2004). De entre ellos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son los más abundantes en el líquido sinovial de pacientes con AR, siendo considerados clave en la iniciación y perpetuación de la respuesta autoinmune (Ma and Deenick, 2014). Debido

a su predominancia frente a otros tipos de linfocitos, los linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1) fueron considerados esenciales en la rotura de la tolerancia inmune, y, por lo tanto, unos de los pilares fundamentales en la patogenia de la AR (Skapenko et al., 2005). Cuando se activan, dan lugar a la producción de citocinas pro-inflamatorias, entre las que destacan el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), linfotóxina B (LTB) y el factor de necrosis tumoral (TNF), colaborando en la activación de los macrófagos, la defensa frente a los microorganismos intracelulares y la inflamación (Mellado et al., 2015). El papel de los linfocitos T colaboradores tipo 2 (Th2) en AR parece ser importante en las etapas tempranas. Estas células dan lugar a la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-5 regulando negativamente la activación de los macrófagos e inhibiendo la producción de otras citocinas inflamatorias (Abbas et al., 1996; Raza et al., 2005). Diversos estudios han puesto de manifiesto el efecto de estas citocinas en AR indicando un papel protector (Schulze-Koops and Kalden, 2001).

En los últimos años, sin embargo, cabe destacar el papel crucial que se ha asignado a los linfocitos T colaboradores tipo 17 (Th17) en la AR (Kuuliala et al., 2015). Estas células son las responsables de la producción de IL-17, una citocina pro inflamatoria con un posible papel clave en la AR mediante la activación de fibroblastos y sinoviocitos. Se ha descrito como IL-17 sería una activadora del factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B que induciría la producción de IL-6, IL-8, PGE2, IL-22, G-CSF e ICAM-1 en fibroblastos, así como la producción de óxido nítrico por el cartílago favoreciendo la inflamación y el daño articular (Kim et al., 2015; Pacifici, 2010).

A diferencia de los linfocitos T, los linfocitos B y las células plasmáticas representan menos del 5% del total de células presentes en el líquido sinovial (Edwards et al., 2004). Su principal papel en la AR podría verse vinculado a la generación de autoanticuerpos que favorecen la formación de inmunocomplejos quienes a través de la unión a los receptores Fc y la activación del complemento, activan la producción de factores pro-inflamatorios por los macrófagos (Edwards and Cambridge, 1998). Destaca también su papel en la presentación antigénica funcionando como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T, induciendo su activación (Takemura et al., 2001) y la producción de factores solubles como citocinas con capacidad pro-inflamatoria (Pistoia and Corcione, 1995).

En la membrana sinovial se produce así la integración de la respuesta inmune innata y adaptativa dando lugar a la remodelación del tejido articular. La aparición de citocinas pro-inflamatorias lleva a la proliferación de las células sinoviales, pasando de 1-3 capas de células de espesor a 6 ó 7 y formándose lo que conocemos como pannus. La reorganización de la estructura sinovial y la activación de fibroblastos hacen así que la sinovial en pacientes con AR se comporte como un tejido invasor, que causa destrucción del tejido articular y la aparición de erosiones en la unión del cartílago con la sinovial. (Figura 4) (McInnes and Schett, 2011).



**Figura 4. Modelo representativo de los mecanismos inmunológicos que contribuyen a la AR.** ADAMTS metalopeptidasa con motivo trombospondina tipo 1; DAMP, patrones moleculares asociados a peligro; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; HA, ácido hialurónico; IFN- $\alpha$  /  $\beta$ , interferón- $\alpha$  /  $\beta$ ; MMP, metaloproteinasas de matriz; PAMP, patrones moleculares asociados a patógenos; RANKL, ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B; TNF $\alpha$ , factor de necrosis tumoral; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular; LTCD8+, linfocitos T citotóxicos; LTCD4+, linfocitos T colaboradores.

#### **1.1.4 Diagnóstico**

Hoy en día, el diagnóstico de la AR es esencialmente clínico. Dado que ningún hallazgo es específico, su diagnóstico debe ser efectuado mediante la caracterización y suma de diferentes parámetros. La forma de llevarlo a cabo se realiza en base a los criterios propuestos en 1988 por el American College of Rheumatology (ACR) para la clasificación de la AR (Tabla I) (Arnett et al., 1988). Según esta clasificación, se considera que un paciente sufre AR cuando se cumplen al menos cuatro de los siete criterios. El objetivo es poder discriminar pacientes de AR establecida de aquellos que padecen otras enfermedades reumáticas, aportando una sensibilidad del 91% y una especificidad del 89% (Arnett et al., 1988; Hakala et al., 1993).



Tabla I. Criterios del ACR 1988 para la clasificación de la AR

Criterio	Definición
Rigidez matutina	Rigidez matutina en y alrededor de las articulaciones, durante al menos una hora antes de la mejora máxima.
Artritis en tres o más articulaciones	Afectación poliarticular en al menos tres áreas con hinchazón de los tejidos blandos o líquido sinovial. Las catorce posibles áreas son PIF, MCF, MPT, muñeca, codo, rodilla y tobillo.
Afectación de las articulaciones de las manos	Inflamación de al menos un área en articulaciones de PIF, MCF o muñeca.
Artritis simétrica	Implicación simultánea de las mismas áreas en ambos lados del cuerpo.
Nódulos reumatoides	Presencia de nódulos subcutáneos, sobre prominencias óseas en zonas de extensores o en regiones yuxtaarticulares.
FR positivo	Niveles anormalmente elevados de FR en suero.
Cambios radiológicos	Alteraciones radiológicas típicas de la AR (erosiones o descalcificaciones óseas inequívocas localizadas en o adyacentes a las articulaciones afectadas) en radiografías posteroanteriores de mano y muñeca.

FR, factor reumatoide; PIF, interfalángicas proximales; MCF, metacarpofalángicas; MPT, metatarsofalángicas.

Sin embargo, la aparición de cambios en el escenario de la AR en los tratamientos disponibles (aparición de los fármacos biológicos), en los biomarcadores de la AR (aparición y estandarización de los ACPA), en los objetivos terapéuticos (búsqueda de la remisión o baja actividad de la enfermedad), cambios en la estrategia y en las recomendaciones de tratamiento hacen que estos criterios no resulten útiles cuando se aplican a AR de corta evolución (Combe et al., 2007). En 2010 la EULAR y el ACR, publicaron los nuevos criterios de clasificación para la artritis reumatoide (Tabla II) (Aletaha et al., 2010). Estos criterios tienen como objetivo mejorar la clasificación de la AR de corta evolución, de manera que se pueda establecer un tratamiento lo antes posible.

Tabla II. Criterios de ACR/EULAR 2010 para la clasificación de la AR

	Puntuación
<b>Afectación articular</b>	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas	3
> 10 articulaciones pequeñas afectadas	5
<b>Serología</b>	
FR y ACPA negativos	0
FR y/o ACPA positivos bajos (< 3 VN)	2
FR y/o ACPA positivos alto (> 3 VN)	3
<b>Reactantes de fase aguda</b>	
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
<b>Duración de los síntomas</b>	
<6 semanas	0
>6 semanas	1

ACPA, anticuerpos contra péptidos citrulinados; FR, factor reumatoide; PCR, proteína C reactiva; VN, valor normal; VSG, velocidad de sedimentación globular.

Teniendo en cuenta estos criterios, se clasificara una enfermedad como AR definida si se presenta al menos 1 articulación con sinovitis clínica no explicable por el padecimiento de otra enfermedad y si la puntuación según el sistema presentado en la Tabla II es igual o superior a 6. Esta puntuación considera la distribución de la afectación articular, serología del FR y/o ACPA, aumento de los reactantes de fase aguda y la duración igual o superior a 6 semanas (Aletaha et al., 2010).

### **1.1.5 Tratamiento**

#### **1.1.5.1 Objetivos y recomendaciones en el tratamiento de la AR**

Debido a la falta de conocimiento en la etiología de esta enfermedad, no existe un tratamiento específico que permita curar la AR, siendo el objetivo de las estrategias terapéuticas el intentar conseguir la remisión, y en el peor de los casos, un grado bajo de actividad evitando así la progresión del daño mediante el control temprano de la enfermedad (Ramiro et al., 2016; Sanmarti et al., 2015). Tres ideas han sido consideradas claves en los últimos años: la importancia de reducir la inflamación para minimizar el daño en las articulaciones, la importancia de conocer los mecanismos moleculares implicados en la patogénesis de la enfermedad y el considerar la aplicación de diferentes tratamientos en el mismo paciente (Klareskog et al., 2009).

### **1.1.5.2 Fármacos utilizados en la AR**

Los fármacos que se utilizan para tratar la AR se dividen en cuatro clases:

1- Antiinflamatorias no esteroideas (AINES)

Se trata de un grupo de fármacos principalmente antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, que reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre respectivamente. Tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de la enzima cicloxigenasa. Son fármacos de efecto rápido a corto plazo pero no modifican el curso de la enfermedad ni evitan la progresión del daño estructural (O'Dell, 2004).

2- Glucocorticoides (GC)

Esta clase de fármacos suele utilizarse en fases iniciales de la enfermedad habiéndose descrito una mejora de los síntomas así como una disminución del daño radiológico en pacientes tras su uso (Gaujoux-Viala and Gossec, 2014). A pesar de estos resultados no se recomienda su uso mantenido dados sus efectos secundarios, siendo tanto la dosis como la duración del tratamiento motivo de controversia (Blanco-Morales et al., 2011).

3- Fármacos antirreumáticos modificadores del curso de la enfermedad (FAMES)

A pesar de tratarse de fármacos de acción lenta se ha visto que están asociados con una menor evolución de las lesiones radiológicas. Los más destacados son:

Fármaco	Descripción
<b>Metotrexato (MTX)</b>	Interfiere en la síntesis de ADN y bloquea la proliferación y activación de linfocitos T.
<b>Sulfasalazina (SSZ)</b>	Interfiere en la activación y replicación de linfocitos T.
<b>Leflunomida (LFN)</b>	Interfiere en la síntesis de ADN e inhibe la proliferación de linfocitos.
<b>Hidroxicloroquina (HCQ)</b>	Influye en la producción de inmunoglobulinas, liberación de citocinas pro-inflamatorias y en la presentación de antígenos.

4- Terapia biológica (BRM) y moléculas pequeñas

Se trata de anticuerpos o proteínas de fusión que provocan el bloqueo de moléculas, sus receptores o la lisis de determinados subgrupos celulares mediante su acción en dianas específicas de la enfermedad. Su uso está recomendado en los tratamientos de AR moderada o grave debido

a su especificidad y eficacia cuando los FAMES tradicionales no son suficientes. Los más relevantes son:

<b>Fármaco</b>	<b>Target</b>	<b>Descripción</b>
<b>Infliximab</b>	TNF $\alpha$	Anticuerpo monoclonal quimérico de isotipo IgG1.
<b>Etanercept</b>	TNF $\alpha$	Proteína de fusión recombinante humana compuesta de 2 receptores TNF $\alpha$ humanos unidos a la porción Fc de un anticuerpo monoclonal humano IgG1.
<b>Adalimumab</b>	TNF $\alpha$	Anticuerpo monoclonal de isotipo IgG1 completamente humano.
<b>Tocizumab</b>	IL-6R	Anticuerpo monoclonal humanizado. Bloquea la IL-6.
<b>Anakinra</b>	IL-1	Forma recombinante no glicosilada del antagonista del receptor de interleukina 1 (IL-1R). Bloquear la actividad biológica de la IL-1.
<b>Rituximab</b>	CD20	Anticuerpo monoclonal quimérico. Produce una depleción de células B.
<b>Golimumab</b>	TNF $\alpha$	Anticuerpo monoclonal de isotipo IgG1 humano.

<b>Abatacept</b>	CD80 y CD86	Proteína de fusión recombinante formada por el dominio extracelular del CTLA-4 humano y el fragmento Fc de la IgG1 humana. Previene la activación de los linfocitos T.
<b>Certolizumab</b>	TNF $\alpha$	Fragmento Fab' de un anticuerpo humanizado recombinante contra TNF $\alpha$ , conjugado con polietilenglicol (PEG).
<b>Tofacitinib</b>	Inhibidor de la enzima Janus quinasa 1 (JAK1) y Janus quinasa 3 (JAK3) interfiere con la vía de señalización JAK-STAT influyendo en la transcripción del ADN.	

## 1.2 Factor de transcripción NF $\kappa$ B

El factor de transcripción nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) fue descrito por primera vez en 1986 en el laboratorio de D. Baltimore como un modulador de la transcripción, detallando su capacidad de unión a la región reguladora del gen que codifica la Ig $\kappa$  (cadena ligera de la inmunoglobulina) en linfocitos B maduros y células plasmáticas (Sen and Baltimore, 2006) . Forma parte de una familia de factores de transcripción presentes en la mayoría de los tipos celulares en eucariotas. Estudios posteriores han mostrado que NF $\kappa$ B es un factor de transcripción nuclear dimérico de expresión ubicua implicado en la regulación de múltiples



procesos celulares como la proliferación, supervivencia o diferenciación celular, la respuesta inmune innata y adaptativa, la reparación del daño al ADN, o los procesos inflamatorios (Karin et al., 2002). Forma parte de lo que conocemos como factores de transcripción primarios de “acción rápida” ya que es un factor de transcripción que está siempre presente en la célula de forma inactiva sin necesitar nueva síntesis de proteínas para ser activados permitiéndole ser la primera respuesta a los estímulos celulares nocivos.

### **1.2.1 Componentes de la ruta de señalización NFκB**

Tres elementos pueden considerarse como los principales componentes de la ruta de señalización NFκB: los dímeros NFκB, la familia de proteínas IκB y el complejo IKK (Figura 5).

#### **1.2.1.1 Dímeros NFκB**

En vertebrados, NFκB incluye una familia de más de una docena de factores de transcripción inducibles compuesta por homodímeros y heterodímeros de cinco proteínas diferentes, p50, p52, c-Rel, Rel A/p65 y Rel B, codificadas por los genes *nfκb1*, *nfκb2*, *rel*, *rela* y *relb* (Gilmore, 2006). Estas proteínas se caracterizan por la presencia en el extremo N-terminal de una región conservada de 300 aminoácidos denominada dominio de homología Rel (RHD). Esta región incluye los dominios de unión con los motivos κB del ADN y de dimerización entre los distintos

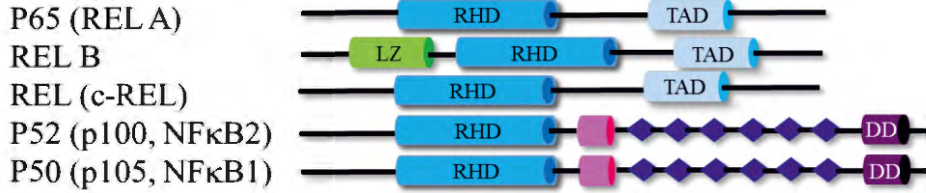
miembros de la familia NF $\kappa$ B, la señal de localización nuclear (NLS), y el dominio implicado en la unión con las proteínas I $\kappa$ B (Ghosh et al., 1998).

En función a diferencias estructurales, se establecen dos grupos dentro de la familia de proteínas NF $\kappa$ B. El primer grupo, está formado por las proteínas Rel A (p65), Rel B y c-Rel caracterizado por presentar en el extremo C-terminal un dominio de activación transcripcional (TADs) que confiere la habilidad para iniciar la transcripción participando en su regulación positiva (Hayden and Ghosh, 2008). El segundo grupo, formado por las proteínas p50 y p52, se caracteriza por presentar múltiples repeticiones de anquirina en su extremo C-terminal en lugar del dominio TAD.

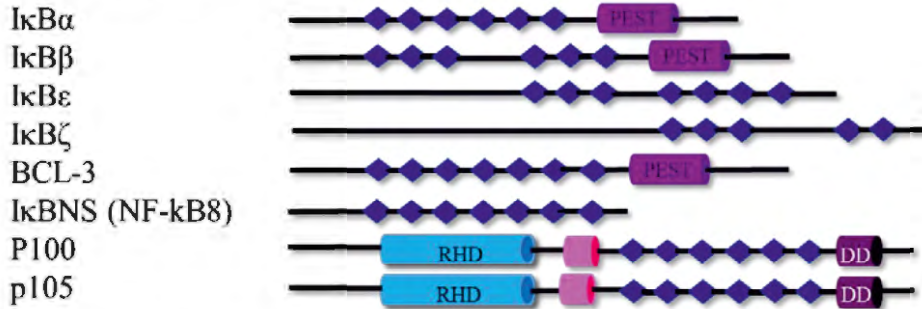
Aunque las funciones de los dominios RHD y TAD son muy distintas, ambos pueden sufrir modificaciones post-traduccionales que pueden afectar la activación transcripcional de NF $\kappa$ B así como su unión al ADN (Hayden and Ghosh, 2004). Inicialmente p50 y p65 son sintetizadas en su forma inactiva y es necesaria la degradación del dominio C-terminal para que puedan unirse al ADN. Mediante un proceso de proteólisis dependiente de la vía ubiquitin-proteosoma el dominio C-terminal es eliminado dando lugar así a las formas maduras de p50 a partir de p105 mediante un mecanismo co-traducciona l y de p65 a partir de p100 siendo este procesamiento dependiente de estímulos celulares y estrictamente regulado (Karin and Ben-Neriah, 2000). Una vez formadas, estas proteínas maduras pueden ya unirse a la región TAD de otros miembros NF $\kappa$ B formando dímeros.

Las proteínas NFκB pueden asociarse formando una gran variedad de homodímeros y heterodímeros que se asocian con diferente respuesta biológica dada su capacidad para regular la transcripción génica. Los homodímeros formados solo por p50 y p65 se asocian principalmente con represión transcripcional al unirse a proteínas que contienen dominios TAD como Bcl-3, mientras los heterodímeros con RelA, c-Rel, actúan como dímeros activadores de la transcripción génica. Rel B a su vez presenta una gran flexibilidad en la regulación pudiendo actuar como activador o represor (Bonizzi and Karin, 2004; Hayden et al., 2006)

**Familia NFκB**



**Familia IκB**



**Complejo IKK**



**Figura 5. Componentes de la ruta de señalización NFκB. Se indican cada uno de los dominios relevantes de cada familia de proteínas. La nomenclatura alternativa es mostrada entre paréntesis. ANK, repeticiones de anquirina; DD, región con homología al dominio de muerte; RHD, dominio de homología Rel; TAD, dominio de activación transcripcional; LZ, dominio de transactivación RelB conteniendo un motivo de cremallera de leucina (leucine-zipper); GRR, región rica en glicina; PEST, dominio rico en prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T); CC, dominio *coiled-coil*; HLH *helix-loop-helix*; NBD, dominio de unión a NEMO; ZF, *zinc-finger*. Imagen modificada de Sankar Ghosh & Matthew S (Hayden and Ghosh, 2012).**

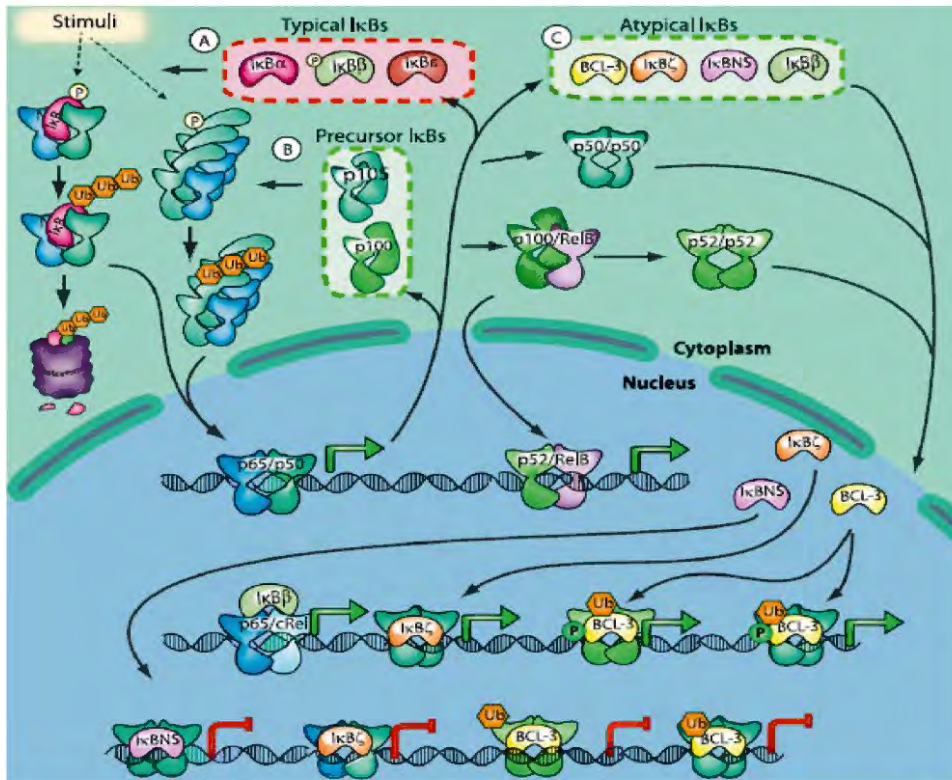
### **1.2.1.2 Proteínas IκB**

Otro componente fundamental en la ruta de señalización NFκB son los miembros de la familia IκB quienes participan de forma clave en el papel de NFκB en los procesos biológicos. La familia IκB está formada por las proteínas clásicas, IκBα, IκBβ, IκBε e IκBζ, los precursores de proteínas p100 y p105, BCL-3 e IκBNS (Hayden and Ghosh, 2012). Las proteínas precursoras p100 y p105 son consideradas como proteínas tipo IκB denominadas IκBs y IκBy respectivamente al retener los dominios de repetición anquilina manteniendo una función equivalente a las proteínas IκB (Basak et al., 2007). Todas ellas tienen en común su estructura tridimensional y se distinguen por el número de repeticiones de los dominios de anquirina que presentan en su extremo C-terminal. Estos dominios son los responsables de la interacción con los dímeros de NFκB (Baeuerle, 1998).

El principal papel de estas proteínas es ser inhibidoras de la ruta, secuestrando el complejo NFκB en el citoplasma e impidiendo su translocación al núcleo. En condiciones de no estimulación, estas proteínas IκB interactúan con los dominios RHD de las proteínas NFκB lo que deja oculta una de las dos secuencias NSL en los factores NFκB reteniendo a los dímeros en el citoplasma, por ello, el dímero debe primero disociarse del inhibidor IκB para alcanzar su destino nuclear. El proceso de separación de IκB requiere su fosforilación y posterior ubiquitinación y degradación por el proteosoma (Ghosh et al., 1998).

Además de su papel inhibidor, las proteínas IκB pueden interactuar con otras proteínas actuando como mediadores entre NFκB

y las vías de señalización heterólogas. Se ha visto que pueden influir también en el reclutamiento de cofactores y en la respuesta transcripcional contribuyendo de forma fundamental a los mecanismos que permiten la participación de NFκB en los procesos biológicos. Las isoformas mejor caracterizadas son las IKKα e IKKβ las cuales se encuentran en casi todos los tipos celulares y son las responsables de la mayor parte de la regulación de la vía NFκB. Entre las funciones de los precursores de proteínas p100 y p105 está la activación de NFκB y ERK por las subunidades p50 y p65 consecuencia de su procesamiento. En el caso de las proteínas atípicas, funcionan a nivel de regulación transcripcional mediante su unión a los dímeros NFκB asociados al ADN. IκBβ actúa aumentando la transcripción de los dímeros p65: c-Rel, BCL3 actúa como inhibidor o promotor de la transcripción dependiendo del PTMs, IκBζ promueve la transcripción e IκBNS, a diferencia de la anterior, la inhibe mediante unión a dímeros p50 (Figura 6)(Hayden and Ghosh, 2012).



**Figura 6. Función de las proteínas IκB.** A. Función de las proteínas clásicas secuestrando el complejo NFκB en el citoplasma. B. Generación de las subunidades p50 y p65 resultado del procesamiento de los precursores de las proteínas p100 y p105. C. Función de las proteínas atípicas a nivel de regulación transcripcional mediante su unión a los dímeros NFκB asociados al ADN. Imagen tomada de Sankar Ghosh & Matthew S (Hayden and Ghosh, 2012).

### **1.2.1.3 Complejo IKK**

El tercer miembro clave en la de la ruta de señalización NFκB es un complejo multiproteico de quinasas IκB denominado complejo IKK. Tres miembros componen el complejo IKK. Las quinasas IKKα e IKKβ, dos quinasas serinas/treoninas de 85 y 87 kDa respectivamente, catalíticamente activas, con una estructura similar compuesta por un dominio quinasa N-terminal (KD) que funciona modulando la actividad quinasa IKK, y un dominio de transactivación RelB (LZ). Este dominio permite la homo o heterodimerización de las quinasas gracias a lo cual son capaces de fosforilar múltiples miembros de la familia IκB in vitro (Zandi et al., 1997). El tercer miembro del complejo es una subunidad reguladora sin actividad quinasa llamada NEMO (IKKγ) de 48 kDa.

A pesar del papel clave de estos componentes en la ruta de señalización NFκB (Gerondakis et al., 2006), el mecanismo exacto de activación permanece poco claro. El complejo IKK es activado a través de fosforilación de residuos de serina (Ser 177 y 181 para IKKβ y Ser 176 y 180 para IKKα) claves en el procesamiento de IKKα e IKKβ por el reclutamiento de quinasas IKK (IKK-K) o por autofosforilación inducida por oligomerización de IKK dependiente de NEMO. Una vez activo, IKK fosforila las proteínas IκB llevando a su degradación proteosomal (Oeckinghaus et al., 2011).



### **1.2.2 Activación de la señalización NFκB**

En la mayoría de tipos celulares, el factor transcripcional NFκB se encuentra inactivo, manteniéndose en el citoplasma a través de la asociación a la familia de proteínas inhibidoras IκB. Cuando la ruta de señalización es activada, el complejo quinasa IKK lleva a la fosforilación, ubiquitinación y degradación de las proteínas IκB liberando así los dímeros NFκB los cuales se translocarán al núcleo, uniéndose a los sitios κB del ADN y promoviendo la transcripción de genes diana (Hayden and Ghosh, 2012). Dos principales caminos llevan a la translocación de los dímeros NFκB desde el citoplasma hasta el núcleo, la vía canónica o clásica y la vía alternativa o no canónica.

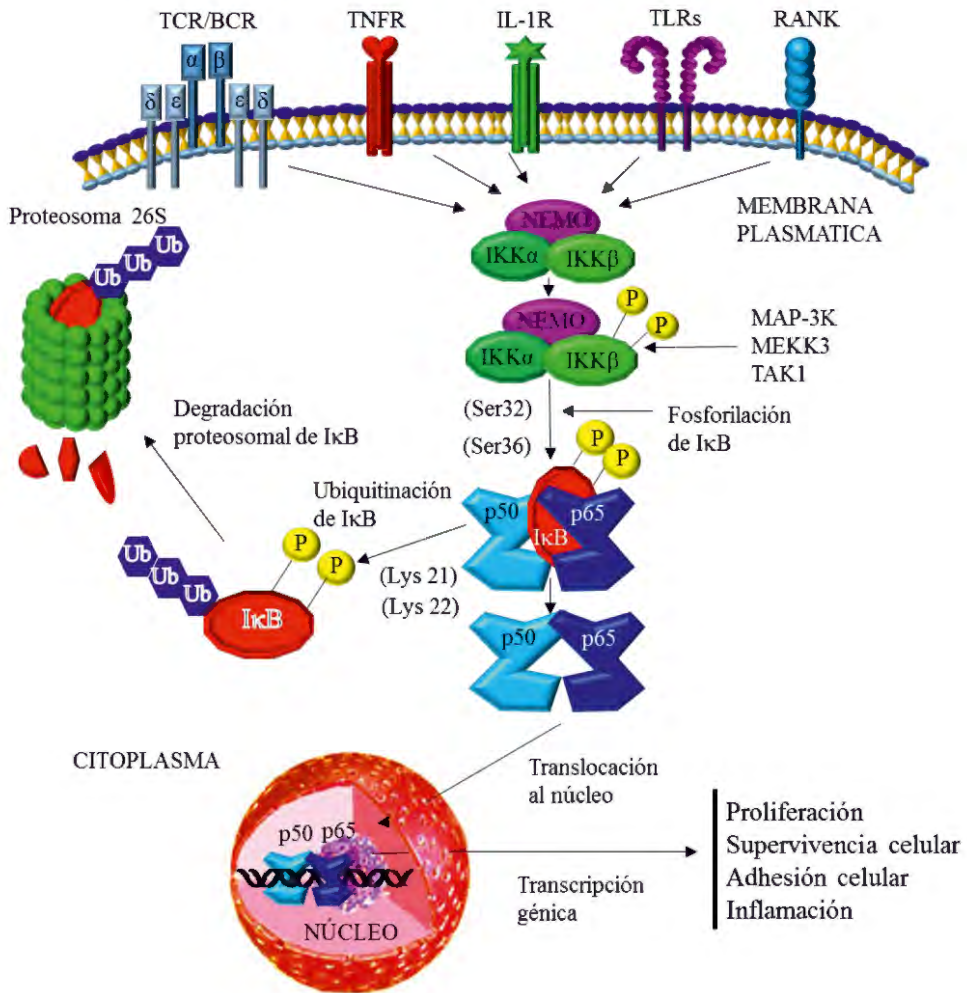
#### **1.2.2.1 Vía canónica o clásica**

La vía canónica es el camino representativo de cómo la ruta NFκB es activada. Se trata de la principal vía reguladora de la respuesta inflamatoria e inmunológica. La activación de esta vía comienza con el reconocimiento de ligandos por receptores extracelulares, citocinas pro-inflamatorias receptoras como el receptor de TNFα (TNFα-R), los receptores de antígenos (TCR) o el receptor de interleuquina 1 (IL-1R) y los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como la superfamilia de receptores tipo Toll (TLR) (Hayden and Ghosh, 2012).

La vía canónica, se caracteriza por ser dependiente de IKKβ y NEMO. La activación de IKKβ por estos estímulos requiere de la proteína activadora de mitosis cinasa-cinasa-cinasa (MAP-3K), MAPK/ERK-

cinasa reguladora de señales extracelulares (MEKK3) y cinasa activadora del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TAK1) las cuales probablemente fosforilan directamente IKK $\beta$  (Guzman et al., 2001). En el caso de NEMO, se localiza en el núcleo, donde es sumoilizado y ubiquitinizado en un proceso dependiente de la quinasa ATM. Posteriormente NEMO y ATM vuelven al citoplasma en donde se activa de una forma dependiente de IKK.

En esta vía, el complejo IKK es activado catalizando la fosforilación de las proteínas I $\kappa$ B en residuos de serina (Ser32 y Ser36 de I $\kappa$ B $\alpha$  y Ser 19 y Ser 23 de I $\kappa$ B $\beta$ ) permitiendo así la unión de I $\kappa$ B con el complejo de ligasa de ubiquitina Skp1/Cul1/F-box (SCF) a través de la proteína que contiene repeticiones de transducción  $\beta$  (pTrCP). Este complejo cataliza la poliubiquitinación en el sitio equivalente a Lys 21 y Lys 22 de I $\kappa$ B $\alpha$  y la subsecuente degradación por el proteosoma 26S (Beg et al., 1993; Bonizzi and Karin, 2004). Una vez degradadas las proteínas I $\kappa$ B, los dímeros NF $\kappa$ B, principalmente el heterodímero formado por las subunidades Rel A (p65)/p50, son translocados al núcleo donde se unen al ADN y activan la transcripción génica (Figura 7) (Ghosh and Karin, 2002).

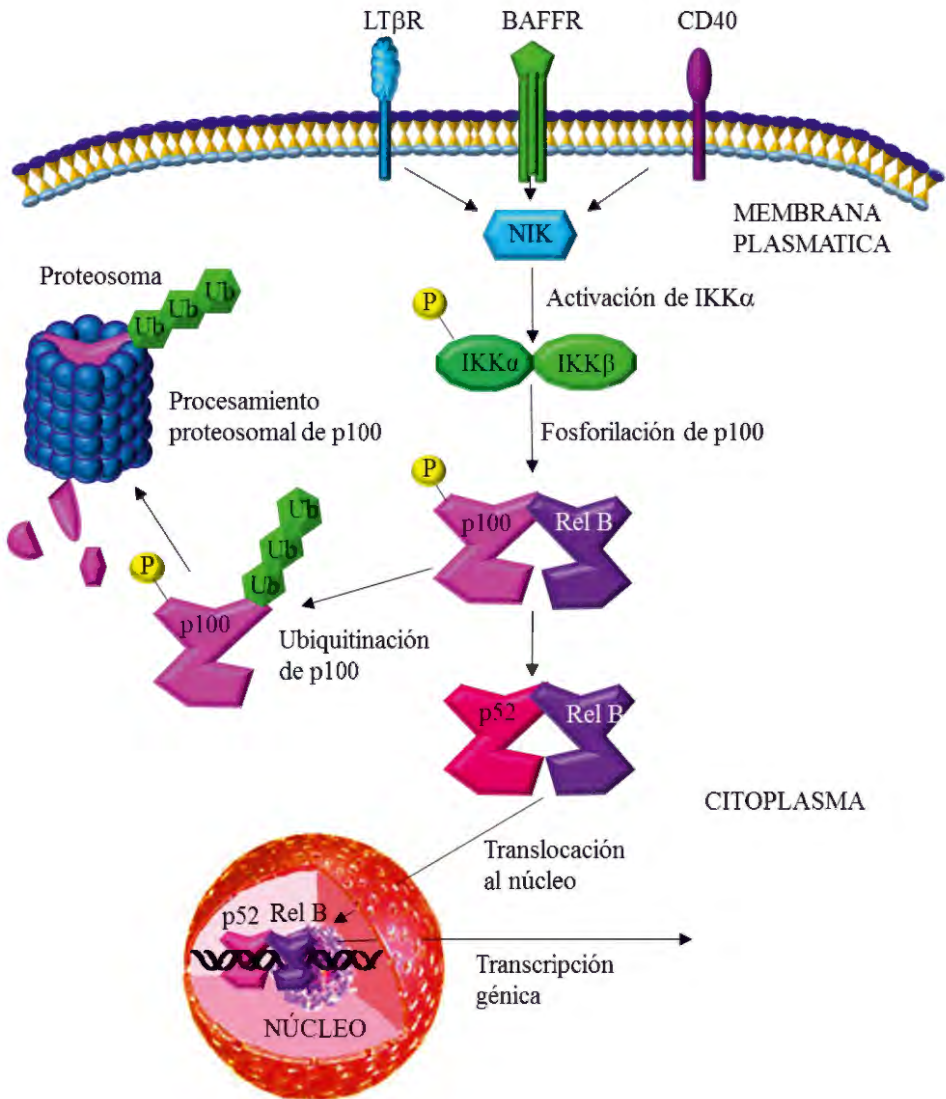


**Figura 7. Ruta canónica de señalización de la vía NFκB.** MAP-3K, proteína activadora de mitosis quinasa quinasa quinasa; MEKK3, MAPK/ERK-cinasa reguladora de señales extracelulares; TAK1, cinasa activadora del factor de crecimiento transformante p; TCR, receptor de linfocitos T; BCR, receptor de linfocitos B; TNFR, receptor del factor de necrosis tumoral; IL-1R, receptor de interleucina-1; TLR, receptor de tipo Toll; RANK, receptor activador del factor nuclear κB; Lys 21, lisina 21; Ser 32, serina 32.

### **1.2.2.2 Vía no-canónica o alternativa**

Se trata de una vía reguladora principalmente de la respuesta adaptativa. En este caso la ruta de señalización NFκB es activada por miembros de receptores específicos de la familia de citocinas TNF (TNFR), incluyendo el receptor de CD40, BAFF y CD27 o los receptores de linfotoxina B (LTβR) y RANK (Basak et al., 2007).

La vía no canónica se caracteriza por ser estrictamente dependiente de IKKα (Senfleben et al., 2001). Se trata de una vía independiente de IKKβ e IKKγ, donde el blanco de los dímeros IKKα es NFκB2/p100. Esta ruta comienza por la activación del homodímero IKKα por medio de quinasa inductora de NFκB (NIK) el cual da lugar a la fosforilación y ubiquitinación de p100 asociado comúnmente a Rel B llevando a un procesamiento parcial de p100 (Oeckinghaus et al., 2011). Al igual que ocurre con IκBs, la ubiquitinación mediante fosforilación de p100 lleva a la degradación parcial de la región inhibidora C-terminal liberándose así la porción N-terminal de NFκB, el polipéptido maduro p52 el cual contiene la región RHD (Xiao et al., 2001). Las subunidades p52/RelB se translocan así al núcleo donde inician la transcripción específica (Dejardin et al., 2002). Se considera que la activación de esta ruta puede además resultar en la activación de la vía canónica o clásica ya que p100 tiene un papel inhibitor, análogo a las proteínas IκB impidiendo la unión al ADN de los dímeros p65-p50 y RelB-p50 (Figura 8) (Basak et al., 2007).



**Figura 8. Ruta alternativa de señalización de la vía NFκB.** NIK, quinasa inductora de NFκB; LTβR, receptor de linfotóxina β; BAFFR, receptor del factor activador de células B.

### **1.2.2.3 Unión ADN-Dímeros NFκB**

Uno de los principales mecanismos por el cual la actividad NFκB es controlada es regulando su capacidad para unirse al ADN. Una vez en el núcleo, los dímeros de NFκB son capaces de unirse a secuencias específicas del ADN conocidas como sitios κB. Se trata de regiones de 10pb cuya secuencia común es 5'- GGGRN W YYYCC-3' (en donde R es una purina, Y es una pirimidina, W es una adenina o una timina y N es cualquier nucleótido) dentro de los promotores de los genes diana regulando su transcripción mediante la unión de co-activadores o co-represores (Hoffmann et al., 2006). De las 15 posibles dímeros de NFκB, al menos 12 son capaces de unirse al ADN. Estudios estructurales mediante rayos-x han revelado que las subunidades p50 y p52 se unen preferentemente a la región 5'- GGGRN - 3' mientras que las subunidades Rel A, c-Rel y Rel B muestran preferencia por la secuencia 5'-W YYYCC-3' (Chen and Ghosh, 1999). Así mismo se ha visto que homodímeros de p50 y p52 parecen preferir sitios κB de 11pb mientras que heterodímeros prefieren sitios de 10pb y que los homodímeros de RelA y c-Rel se unen a 9pb (Hoffmann et al., 2006).

### **1.2.3 Papel de NFκB en la respuesta inmune e inflamatoria**

NFκB es considerado uno de los principales reguladores de la respuesta inmune innata y adaptativa. Más de 150 genes diferentes implicados en la respuesta celular a estrés, tanto físico como químico, enzimas mediadoras de la inflamación o reguladores de la apoptosis, proliferación e invasión celular son regulados transcripcionalmente por la

familia de factores NFκB (Karin et al., 2002; Pahl, 1999). La mayoría de las proteínas codificadas por estos genes se ha visto que está principalmente implicadas en el sistema inmunológico por lo que se considera a este factor un componente clave de la respuesta inmune e inflamatoria (Pahl, 1999).

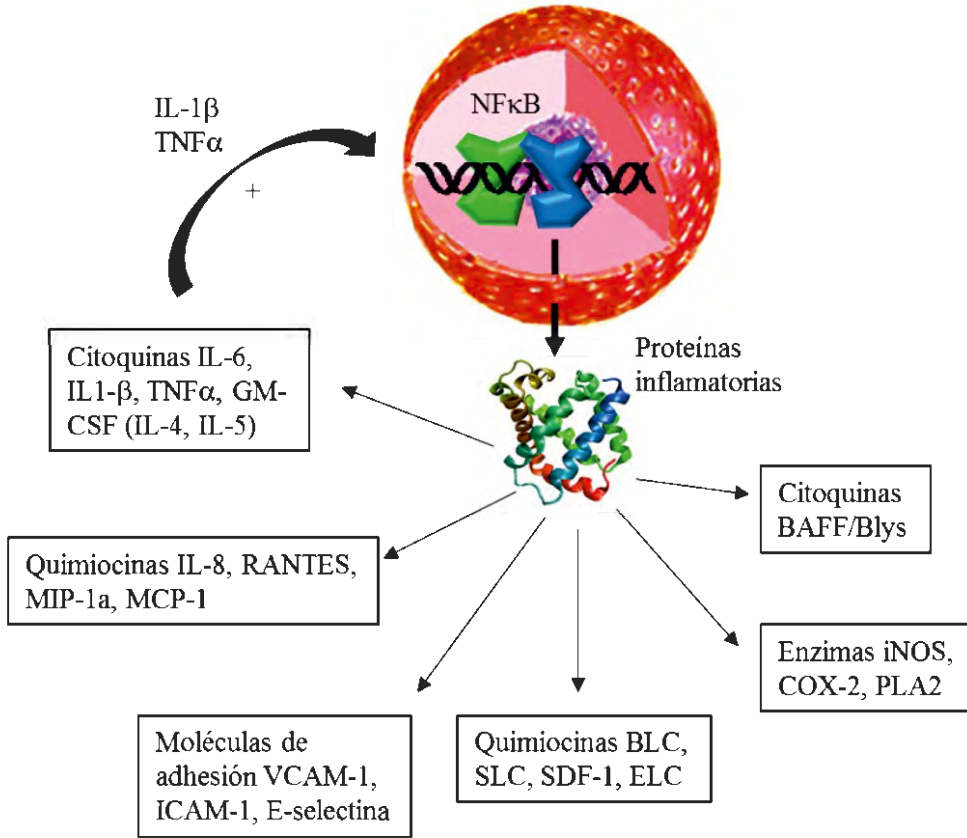
Se ha descrito que la vía de activación canónica de NFκB es esencial en numerosos estadios del desarrollo y función del sistema inmune, teniendo un papel esencial en la respuesta innata desarrollada frente a microorganismos (Bonizzi and Karin, 2004). En este contexto, parece ser que IKKβ es esencial para la activación de la respuesta inmune controlando la producción de quimiocinas como la proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MCP-1) o las quimiocina expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación (RANTES), que permite el reclutamiento de macrófagos, granulocitos, linfocitos y células dendríticas. Además, esta proteína es también esencial para la expresión de moléculas de adhesión, como CD44, moléculas de adhesión celular neural (NCAM), moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), moléculas de adhesión de leucocitos endoteliales-1 (ELAM-1) o moléculas de citoadhesión vascular-1 (VCAM-1) (Ghosh et al., 1998) requeridas para la migración de las células inflamatorias y fagocíticas a los tejidos donde NFκB ha sido previamente activado como respuesta a la infección (Bonizzi and Karin, 2004).

Se ha visto también una asociación entre la activación de esta ruta y un incremento de la transcripción de genes que codifican citocinas pro-inflamatorias incluidas TNFα/β, IL-1α/β, IL-6, IL-8, IL-11, CCL2 y MIP-1/2 así como con una regulación positiva de la expresión de proteínas

implicadas en la presentación de antígenos entre las que se incluyen el MHC clase I y  $\beta$ 2-microglobulina e inmunoreceptores como CD80, CD40 o CD48. Además, la activación de NF $\kappa$ B induce enzimas que contribuyen a la respuesta inmune y los procesos inflamatorios mediante la liberación de radicales oxidativos como la sintasa inducible de óxido nitroso (iNOS) y la Ciclooxygenasa-2 (COX2) (Pahl, 1999).

La posterior respuesta inmune adaptativa parece ser a su vez, dependiente de la ruta alternativa. Esta vía está implicada fundamentalmente en el desarrollo de los órganos linfoides secundarios, el desarrollo, selección y supervivencia de los linfocitos T y B, y en la diferenciación de las células presentadoras de antígeno como células dendríticas (DCs) y las células epiteliales tímicas medulares (mTECs) (Bonizzi and Karin, 2004; Brown et al., 2008; Hayden and Ghosh, 2004). La migración de las células presentadoras de antígenos a los órganos linfoides es así regulada por quimiocinas organogénicas como quimiocinas del tejido linfoide secundario (SLC), o quimioatrayente de linfocitos B (BLC), cuya producción es dependiente de IKK $\alpha$  (Figura 9).





**Figura 9. Papel de NFκB en la respuesta inflamatoria.** iBAFF, factor activador de célula B perteneciente a la familia del TNF; BLC, quimioatrayente de linfocitos B; CD40L, ligando CD40; COX-2, ciclooxigenasa 2; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos; PLAS2, fosfolipasa 2; VCAM-1, molécula de citoadhesión vascular-1; ICAM-1, molécula de adhesión intercelular-1; MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos 1; SDF-1, Factor derivado de células del estroma 1; SLC, quimiocina del tejido linfoide secundario; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; LT, linfoxina; TNFα factor de necrosis tumoral; MIP-1α, proteína inflamatoria de macrófagos 1α; IL-1β, interleuquina 1β; IKK, quinasa IκB; NIK, quinasa inductora de NFκB.

#### **1.2.4 Papel de NFκB en Artritis reumatoide**

Como mencionamos, la principal característica de las articulaciones en pacientes con AR es la inflamación crónica provocada por la infiltración de células del sistema inmune en el sinovium. Este sinovium contiene un 30%-40% de macrófagos, un 30% de células T y fibroblastos así como células B y células dendríticas entre otras (Muller-Ladner et al., 2005). En los mamíferos, NFκB es un factor clave para la diferenciación, activación y supervivencia celular, relacionándose de múltiples formas con enfermedades autoinmunes como la AR. En este sentido, destaca su papel en la activación y desarrollo linfocitario, así como en la morfogénesis de los órganos linfoides (Claudio et al., 2006). Defectos en su regulación llevan a una mala selección de células B autorreactivas así como células T en el timo iniciando así los procesos patogénicos característicos de las enfermedades autoinmunes (Brown et al., 2008).

En el caso de las células B, cuando el BDR expresado durante el desarrollo es autorreactivo es eliminado por los genes de activación de recombinación (RAG) quienes a su vez son regulados negativa y positivamente por NFκB. Defectos en el bazo y medula ósea en la regulación de NFκB llevan a una falta de selección negativa de estas células (Milne et al., 2004; Thomas et al., 2005). Por otra parte, durante el desarrollo de las células T en el timo, ocurre igualmente una regulación positiva y negativa en la que NFκB está fuertemente implicada siendo tanto las células reguladoras (Treg) como las natural killer (NKT) positivamente seleccionadas por el reconocimiento de antígenos propios

regulado por NFκB durante el desarrollo (Schmidt-Supprian et al., 2003; Sivakumar et al., 2003).

Además de las características observadas a nivel celular, el líquido sinovial contiene una gran variedad de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, MMPs y proteínas metabólicas que interaccionan juntas provocando la emisión de señales pro-inflamatorias que llevan a una inflamación crónica y persistente (Simmonds and Foxwell, 2008). Como hemos visto, NFκB es posiblemente el principal modulador de la respuesta inflamatoria y por ello su activación es también considerada un factor clave en el desarrollo de la AR (van Loo and Beyaert, 2011). Unos de los principales datos que indican la relevancia de NFκB en AR es su implicación en la regulación de la expresión de TNF, IL-1, IL-6, quimiocinas, sintasas y MMPs (Simmonds and Foxwell, 2008).

Algunos de los tratamientos biológicos más eficaces en AR va dirigido a bloquear los inductores de la ruta NFκB (Gartlehner et al., 2006). Además, se ha detectado la activación de este factor transcripcional en tejido sinovial de pacientes con AR (Marok et al., 1996), así como una prevención de la recurrencia con inhibidores de NFκB en modelos animales de artritis (Tas et al., 2006). Otros estudios han mostrado la presencia de ambas proteínas p50 y p65 en núcleo de macrófagos y células de la membrana sinovial (Benito et al., 2004). A nivel genético, se ha demostrado que existe un aumento en la representación de genes implicados en la señalización de TNF y en la vía de NFκB en el desarrollo de la AR, incluyendo CD40, TRAF1, TNFAIP3 y Rel, entre otros (Ohmura, 2015; Okada et al., 2014) así como una asociación de diversas variantes génicas de los genes reguladores de la ruta NFκB, como NLRP3,

NLRP4, NOD2 y NOD1 con enfermedades inflamatorias crónicas (p.ej., enfermedad de Crohn) o síndromes autoinflamatorios (p.ej., síndrome de Muckle-Wells o síndrome de Blau) (Criswell, 2010).

A parte de su papel en la expresión de genes pro-inflamatorios, destaca también la implicación de NF $\kappa$ B en la regulación de la osteoclastogénesis, una de las mayores causas de erosión ósea en AR, mediante la activación del ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL)(Wada et al., 2006). Su papel en la hiperplasia sinovial es otra evidencia de su participación en esta enfermedad al promover la proliferación e inhibición de la apoptosis a través de la inhibición de c-Myc en los sinoviocitos tipo fibroblastos (FLSs) (Figura 10) (Makarov, 2001).

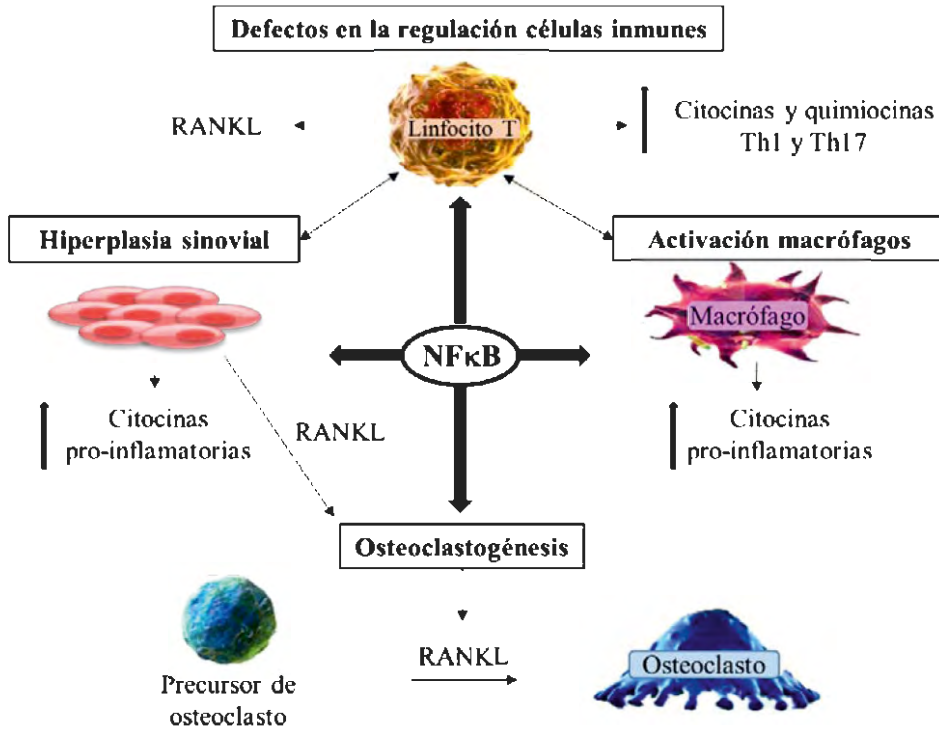


Figura 10. Efecto de la activación de NFκB en distintos tipos celulares involucrados en el desarrollo de la AR.

## **2. OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS**

NFκB es uno de los principales moduladores de las respuestas inmune e inflamatoria. Diversos estudios en pacientes con artritis reumatoide sugieren que NFκB es esencial para la expresión de citocinas pro-inflamatorias y de enzimas que promueven la destrucción articular. Nuestra hipótesis de trabajo es que pueden existir mutaciones en los principales genes involucrados en la regulación de NFκB que pueden tener consecuencias funcionales relevantes y por tanto asociarse bien con la susceptibilidad a padecer AR, o bien con el pronóstico de la enfermedad. Para esta Tesis se han planteado los siguientes objetivos:

1.- Identificar por medio de secuenciación genómica de nueva generación variantes génicas relevantes de la vía de NFκB en pacientes con AR.

2.- Confirmar en una serie amplia de pacientes la asociación de las mutaciones encontradas con la susceptibilidad a padecer AR o su posible influencia en el pronóstico de la enfermedad.

3.- En aquellas variantes génicas identificadas como relevantes, determinar las consecuencias funcionales de dichas mutaciones.





## **3. RESULTADOS**



### 3. RESULTADOS

Como resultado de ésta Tesis Doctoral se describe el papel de dos genes, ASCC1 y TLR10 en la ruta de señalización NFκB arrojando luz a los posibles mecanismos de regulación de esta vía. Además se reporta la existencia de tres variantes génicas presentes en los genes ASCC1, TLR8 y TLR10 como marcadores de gravedad en pacientes con AR abriendo la posibilidad a desarrollar nuevos tratamientos que actúen de forma selectiva sobre los componentes de esta vía y que puedan por tanto influir en el desarrollo de la enfermedad.

**Artículo 1.** *A truncated variant of ASCC1, a novel inhibitor of NFκB, is associated with disease severity in patients with rheumatoid arthritis* (2015); **Silvia Torices, Lorena Álvarez-Rodríguez, Lara Grande, Ignacio Varela, Pedro Muñoz Cacho, Dora Pascual, Alejandro Balsa, M López-Hoyos, Víctor Martínez-Taboada, José L. Fernández-Luna;** J Immunol 195: 5415-5420.

**Artículo 2.** *High-throughput variant analysis of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis* (2016); **Silvia Torices, Lorena Alvarez-Rodríguez, Ignacio Varela, Pedro Muñoz, Alejandro Balsa, M López-Hoyos, Víctor Martínez-Taboada, José L. Fernández-Luna;** enviado a publicación.

**Artículo 3.** *A functional variant of TLR10 modifies the activity of NF $\kappa$ B and may help predict a worst prognosis in patient with rheumatoid arthritis (2016);. Silvia Torices, Antonio Julia, Pedro Muñoz, Ignacio Varela, Alejandro Balsa, Sara Marsal, Antonio Fernandez-Nebro, Francisco Blanco, M López-Hoyos, Víctor Martínez-Taboada, José L. Fernández-Luna ; Arthritis Res Ther 4;18(1):221.*

# A Truncated Variant of ASCC1, a Novel Inhibitor of NF- $\kappa$ B, Is Associated with Disease Severity in Patients with Rheumatoid Arthritis

Silvia Torices,<sup>\*,†</sup> Lorena Alvarez-Rodríguez,<sup>\*</sup> Lara Grande,<sup>†</sup> Ignacio Varela,<sup>‡</sup> Pedro Muñoz,<sup>§</sup> Dora Pascual,<sup>¶</sup> Alejandro Balsa,<sup>¶</sup> Marcos López-Hoyos,<sup>||</sup> Víctor Martínez-Taboada,<sup>\*,#</sup> and Jose L. Fernández-Luna<sup>†</sup>

Loss of the regulatory mechanisms that avoid excessive or constitutive activation of NF- $\kappa$ B may be associated with chronic inflammatory disorders, including rheumatoid arthritis (RA). After massive sequencing of 158 regulators of the NF- $\kappa$ B pathway in RA patients, we focused on a scarcely known gene, ASCC1, and showed that it potently inhibits the expression of NF- $\kappa$ B target genes (TRAIL, TNF- $\alpha$ , cIAP-1, IL8) and blocks activation of a NF- $\kappa$ B-luciferase reporter construct in five different human cell lines. Therefore, ASCC1 may contribute to avoiding a pathologic activation of this transcription factor. A truncated variant of ASCC1 (p.S78\*) was found in RA patients and control individuals. Functional *in vitro* studies revealed that truncation abrogated the NF- $\kappa$ B inhibition capacity of ASCC1. In contrast with full-length protein, truncated ASCC1 did not reduce the transcriptional activation of NF- $\kappa$ B and the secretion of TNF- $\alpha$  in response to inflammatory stimuli. We analyzed the clinical impact of p.S78\* variant in 433 patients with RA and found that heterozygous carriers of this variant needed more disease-modifying antirheumatic drugs, and more patients with this genotype needed treatment with corticoids and biologic agents. Moreover, the truncated allele-carrier group had lower rates of remission compared with the full-length variant carriers. Overall, our findings show for the first time, to our knowledge, that ASCC1 inhibits NF- $\kappa$ B activation and that a truncated and inactive variant of ASCC1 is associated with a more severe disease, which could have clinical value for assessing the progression and prognosis of RA. *The Journal of Immunology*, 2015, 195: 5415–5420.

**R**heumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by progressive joint destruction caused by the chronic inflammation of the synovial tissue (1, 2). Although several genes have been suggested to be associated with RA, the genetic regulation that contributes to the development of disease in these patients remains unclear (3, 4).

There is increasing evidence that NF- $\kappa$ B is a major, if not the main, transcription factor controlling inflammation (5). Activation of the NF- $\kappa$ B pathway is involved in the pathogenesis of chronic inflammatory disorders, including RA and inflammatory bowel disease (6, 7). NF- $\kappa$ B proteins are regulated by the inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase (I $\kappa$ B) complex formed by inhibitor of NF- $\kappa$  kinase (IKK) $\alpha$  and IKK $\beta$  and the regulatory subunit IKK $\gamma$ . This kinase complex phosphorylates I $\kappa$ B, which is subsequently ubiquitinated and degraded, thus leading to the activation of NF- $\kappa$ B (8, 9). In addition, some members of the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing (NLR) family including NOD1, NOD2, NLR pyrin domain containing (NLRP3), and NLRP2 regulate the activity of NF- $\kappa$ B (10, 11). Aberrant NF- $\kappa$ B signaling has been described in various cancers and immune diseases. Gene variants of IKK $\beta$  have been associated with colorectal cancer (12), lymphomas, multiple myeloma (13), and combined immunodeficiency (14). Previous work has also identified variants of MYD88 and TNFRSF11A that promote constitutive activation of NF- $\kappa$ B (15, 16). Our group has previously described that a truncating variant that abrogates the capacity of CARD8 to inhibit the NF- $\kappa$ B transcriptional activity is associated with disease severity in RA patients (17).

ASCC1 encodes the p50 subunit of a protein complex, which includes ASCC2, ASCC3, and TRIP4 (also known as ASC1), among others (18) involved in transcriptional regulation. TRIP4 contains a transactivation domain with a putative zinc finger motif, which serves as a binding site for TATA-binding protein, TFIIA, SRC1, CBP/p300, and nuclear receptors (19). It also interacts with a wide range of transcription factors including serum response factor, NF- $\kappa$ B, and AP1, and has been shown to be part of a coactivator complex that links these factors to the transcriptional machinery (18). Overexpressed TRIP4 has been normally local-

<sup>\*</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Marques de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla, 39011 Santander, Spain; <sup>†</sup>Unidad de Genética, Hospital Universitario Marques de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla, 39011 Santander, Spain; <sup>‡</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Universitario La Paz, 08946 Madrid, Spain; <sup>§</sup>Sección de Inmunología, Hospital Universitario Marques de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla, 39011 Santander, Spain; <sup>¶</sup>Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (Universidad de Cantabria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas), 39011 Santander, Spain; <sup>||</sup>Gerencia Atención Primaria, Servicio Cantabro de Salud, 39011 Santander, Spain; and <sup>#</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain

ORCID: 0000-0002-0969-506X (I.V.); 0000-0002-1387-2655 (P.M.); 0000-0001-8070-7062 (A.B.).

Received for publication July 8, 2015. Accepted for publication September 27, 2015.

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Science and Innovation Grants PI11/02012 and RD12/0036/0022 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, Federación Española de Reumatología Grant FER13/13, Instituto de Investigación Valdecilla Grant APG-03, and the programa Ramón y Cajal, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain (I.V.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Jose L. Fernández-Luna, Unidad de Genética, Hospital Universitario Marques de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla, Avenida Cardenal Herrera Oria, 39011 Santander, Spain. E-mail address: lluna@humv.es

Abbreviations used in this article: DMARD, disease-modifying antirheumatic drug; HUMV, Hospital Universitario Marques de Valdecilla; I $\kappa$ B, inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase; IKK, inhibitor of NF- $\kappa$  kinase; NGS, next-generation sequencing; NLR, nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing; NLRP, NLR pyrin domain containing; RA, rheumatoid arthritis; SNP, single nucleotide polymorphism.

Copyright © 2015 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/15/525.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1501532

ized in the nucleus but accumulates in the cytoplasm under serum-deprived conditions (19). Thus, it is suggested that TRIP4 plays an important role in establishing distinct coactivator complexes under different cellular conditions (19). Very little is known about the association between other members of the ASCC1-containing complex and disease. A recent study described a germline missense mutation in exon 8 of ASCC1 (p.N290S) in patients with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma (20), but no functional studies were shown.

A number of studies suggest that NF- $\kappa$ B is essential for the expression of both inflammatory cytokines and tissue-destructive enzymes in RA (21, 22). Consistently, activation of NF- $\kappa$ B has been shown in synovial tissue from RA patients, and this appears to be related to clinical manifestations (23). In this study, we describe that ASCC1 potently inhibits NF- $\kappa$ B signaling, which may limit a constitutive activation of this transcription factor, a feature of many chronic inflammatory disorders, including RA. We also showed that a truncating variant (p.S78\*) abrogates the capacity of ASCC1 to inhibit the NF- $\kappa$ B transcriptional activity, and that this variant is associated with the severity of RA.

## Materials and Methods

### Patient samples

A total of 433 patients with RA, diagnosed according to the 2010 American College of Rheumatology classification criteria (24), were included in this study. The study cohort consisted of unselected RA patients followed at Hospital Universitario Marques de Valdecilla (HUMV) (Santander, Spain) and Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain). Clinical information, including demographic data, disease characteristics, and treatment, was summarized in Table I. As a control population, 214 sex- and age-matched individuals who had no known history of serious disease, including autoimmune or chronic infectious disorders, were also genotyped. The study was approved by the HUMV Research Ethics Committee, and informed consent was obtained from all subjects.

### Cell lines

HEK293T and U87 cells were maintained in DMEM-GlutaMAX medium (Life Technologies, Paisley, U.K.) supplemented with 10% FBS (Lonza, Verviers, Belgium). MCF7 and HELA cells were incubated in RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% FBS. HCT116 cells were maintained in McCoy's 5A medium (Lonza) supplemented with 10% FBS. Cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Middlesex, U.K.).

### Sequencing analyses

A total of 158 regulator genes of the NF- $\kappa$ B pathway have been analyzed by next-generation sequencing (NGS) in 66 patients from the HUMV patient population and 30 healthy control subjects. DNA libraries were processed for hybrid enrichment using a custom SeqCap EZ design (Roche Nimblegen, Basel, Switzerland) containing the coding sequences of the selected genes. Then, double-barcoded libraries were sequenced by using a MiSeq NGS platform (Illumina, Madison, WI). A polymorphism in

ASCC1 was selected and analyzed in the other 367 patients with RA and 184 age-matched control individuals. DNA was extracted from whole blood by using the QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Hamburg, Germany) and amplified with primers for human ASCC1: 5'-TGAGGACTATGG-CAACAGC-3' and 5'-ACTTGATAGCCCTGTGATGGC-3'. Sequence analysis of amplified fragments was carried out by Sanger sequencing.

### Expression analyses of NF- $\kappa$ B target genes

To assess the expression of individual genes, we generated and amplified a cDNA by using primers for human TNF- $\alpha$  (5'-CAATGGCCGTGGAGCTGAGAG-3' and 5'-GGCTGATGGTGGTGGTGGAGG-3'), CCL2 (5'-CTCGCTCAGCCA-GATGCAAT-3' and 5'-GTCTTCGGAGTTTGGGTTTGC-3'), IL-8 (5'-CTGG-CCGTGGCTCTCTTG-3' and 5'-TCTTTAGCACTCCTTGGCAAAC-3'), TRAIL (5'-GAGCTGAAGCAGATGCAGGAC-3' and 5'-TGAACGGAGTTGGC-CACTTGACT-3'), cIAP-1 (5'-TGAGCATGCAGACATGC-3' and 5'-TGA-CGGATGAACCTCTGTCC-3'), and  $\beta$ -Actin (5'-GCTGCCTCAACACCTCA-AC-3' and 5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCCTGTG-3'). Quantitative real-time PCR was performed in a 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The ratio of the abundance of differentiation markers to that of  $\beta$ -Actin transcripts was calculated as  $2^{-\Delta n}$ , where  $n$  is the threshold cycle value of  $\beta$ -Actin minus the threshold cycle value of the corresponding mRNA and normalized by the value of the sample with the lowest expression level of these genes. Specificity of the desired PCR products was determined with melting curve analysis.

The quantitative determination of TNF- $\alpha$  in culture medium was performed by an ELISA kit (eBioscience, Vienna, Austria) following the manufacturer's instructions.

### Transfections and gene reporter assays

ASCC1 cDNA cloned into pCMV6 was obtained from Origene (Rockville, MD). Site-directed mutagenesis of the pCMV6-ASCC1 vector was conducted by using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) with the following primers: 5'-CACTT-GAACACATGAACGACTGTGGG-3' and 5'-CCCACAGTCGTTTCA-TGTGTTCAAGTG-3'. The modified insert was sequenced to verify the mutation. HEK293T, U87, HCT116, HELA, and MCF7 cells were cotransfected with 5  $\mu$ g wild type and mutant ASCC1 constructs, unless otherwise indicated, 1  $\mu$ g reporter plasmid pBVLuc-Luc, containing six tandem repeats of the NF- $\kappa$ B recognition sites within the promoter region linked to the luciferase gene (25), and 0.2  $\mu$ g pRSV- $\beta$ -gal by using Lipofectamine 2000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or X-fect Transfection Reagent (Clontech, Palo Alto, CA). As a positive control of NF- $\kappa$ B inhibition, cells were transfected with 4  $\mu$ g of a vector containing a mutated form of I $\kappa$ B $\alpha$  (mut I $\kappa$ B) (Clontech). After 24 h of transfection, MCF7 cells were incubated with 10 ng/ml TNF- $\alpha$  for 16 h; then cell extracts were prepared and analyzed for the relative luciferase activity by a dual-light reporter gene assay system (Applied Biosystems). Results were normalized for transfection efficiency with values obtained with pRSV- $\beta$ -gal.

### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS 20 program (IBM, Armonk, NY). Differences in quantitative variables between groups of patients were compared with the Mann-Whitney  $U$  test, and the  $\chi^2$  statistic was used for categorical variables. Statistical significance between groups in *in vitro* analyses was performed by using the unpaired two-tailed Student  $t$  test. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### An allelic variant of ASCC1 leads to a truncated protein

The impact of NF- $\kappa$ B regulators on inflammatory diseases has been assessed through the identification of sequence variants that modify the activity of the protein. Thus, we analyzed 158 regulatory genes of the NF- $\kappa$ B pathway (Table II) by NGS in 66 patients with RA and 30 healthy control subjects. We selected variants in protein coding regions with high functional impact and found four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TLR5, RIPK3, CARD8, and ASCC1 that give rise to truncated proteins (Table III). The TLR5 SNP rs5744168 truncates the protein at position 392 within a leucine-rich region. The resulting protein lacks the transmembrane and cytoplasmic domains that lack signaling capacity. The RIPK3 SNP rs146886719 introduces a stop codon at position 422, within the proline-rich region, but main-

Table I. Main features of the patients

	Cohort (N = 433)
Female sex, %	73.1
Mean age $\pm$ SD, y	65.6 $\pm$ 14.5
Mean duration of follow-up $\pm$ SD, mo	123.8 $\pm$ 91.5
Extra-articular manifestations, %	22.2
Erosive disease, %	57.1
RF positive, %	64.8
Patients (%) treated with:	
DMARDs	99.5
Corticoid therapy	58.8
Biologic therapy	36.6
Mean no. of DMARDs $\pm$ SD	2.2 $\pm$ 1.5
Mean no. of biologics $\pm$ SD	1.8 $\pm$ 1.2

RF, rheumatoid factor.

Table II. NF-κB regulatory genes analyzed by NGS

Gene Name	Gene Name	Gene Name
ASCC1	IL25	TLR2
ASCC2	IL4	TLR3
ASCC3	IL7	TLR4
BCL10	IL9	TLR5
BCL3	IRAK1	TLR6
BLNK	LTA	TLR7
BRE	LTB	TLR8
BST2	LTBR	TLR9
CARD10	MAGI2	TNF
CARD11	MAVS	TNFAIP3
CARD14	MYD88	TNFRSF10A
CARD16	NDFIP1	TNFRSF10B
CARD18	NFKB1	TNFRSF11A
CARD6	NFKB2	TNFRSF13B
CARD8	NFKBIA	TNFRSF14
CARD9	NFKBIB	TNFRSF17
CASP8AP2	NFKBIE	TNFRSF18
CD14	NFKBIZ	TNFRSF19
CD19	NKAP	TNFRSF1A
CD27	NLRCP	TNFRSF1B
CD28	NLRP1	TNFRSF21
CD40	NLRP10	TNFRSF25
CD70	NLRP12	TNFRSF4
CD8A	NLRP2	TNFRSF8
CHUK	NLRP3	TNFRSF9
COP53	NLRP4	TNFSF10
DAPP1	NLRP6	TNFSF11
DEDD2	NLRP7	TNFSF12
ECSIT	NOD1	TNFSF13
EDA2R	NOD2	TNFSF13B
EDAR	PYDC1	TNFSF14
FADD	PYDC2	TNFSF15
FAS	REL	TNFSF8
FASLG	RELA	TNFSF9
FOXO3	RELB	TNIP1
FUS	RELT	TNIP2
GNB2L1	RIPK1	TNIP3
GRB2	RIPK2	TRADD
HSPB1	RIPK3	TRAF1
IFIH1	SH2D1A	TRAF2
IKBKAP	SH3RF1	TRAF3
IKBKB	SHGIR1	TRAF3IP2
IKBKE	SPP1	TRAF4
IKBKG	SQSTM1	TRAF5
IL10	TAB2	TRAF6
IL13	TAB3	TRAF7
IL17A	TANK	TRIP6
IL17B	TDP2	TRPC4AP
IL18	TICAM1	TSC22D3
IL1A	TICAM2	VAV1
IL1B	TRAP	ZDHHC13
IL1R1	TLR1	ZNF675
IL24	TLR10	

tains the protein kinase domain. The CARD8 SNP rs2043211 codes for a protein of only 10 aa from the N terminus and has been previously associated with disease severity in RA patients (17). Finally, ASCC1 SNP rs11000217 introduces a stop codon at

amino acid position 78 (p.S78\*) that deletes all predicted domains of the protein (Fig. 1A, 1B). Based on allelic frequencies, predicted impact on protein function, and novelty, we focused on ASCC1 for further functional and clinical association studies. The genotype distribution was found to be similar in both control and RA populations (Fig. 1C), which was in line with the genotypes described for the European population in HapMap database (Fig. 1D). Therefore, these data indicate that the ASCC1 variant is not associated with disease susceptibility.

*ASCC1 inhibits NF-κB activity*

It has been shown that ASCC1-containing protein complex is a transcriptional coactivator of NF-κB (19). To investigate whether ASCC1 has influence on NF-κB activation, we cotransfected MCF7 cells with ASCC1 and a luciferase reporter gene driven by a promoter sequence containing six NF-κB-responsive elements. The expression of ASCC1 reduced the NF-κB transcriptional activity in a dose-dependent manner (Fig. 2A). Moreover, ASCC1 consistently reduced (>2-fold) the expression of NF-κB target genes TRAIL, TNF-α, cIAP-1, and IL8 (Fig. 2B). To demonstrate that this effect is not cell line dependent, we transfected different cell models, MCF7, U87, HELA, and HCT116, with ASCC1 and found a significant reduction of luciferase activity in all cases (Fig. 2C).

*p.S78\* variant of ASCC1 lacks NF-κB inhibition activity*

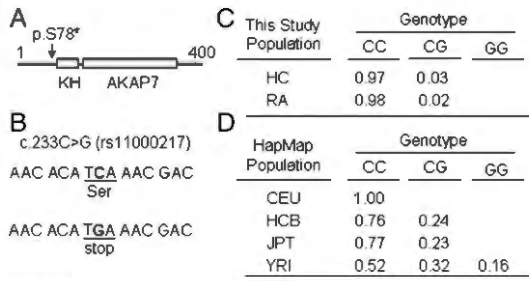
We decided to continue with the analysis of the truncated ASCC1 variant because of the predicted functional consequences, the frequency of the rare allele in the studied population, and the lack of data of this variant in RA. All domains described for ASCC1 are deleted in the truncated variant. To analyze the functional consequences of this deletion on the activity of NF-κB, we introduced the rare nucleotide in a construct containing ASCC1 by site-directed mutagenesis and studied the capacity of this variant to inhibit uninduced NF-κB activity. As shown in Fig. 3A, wild type ASCC1, but not the truncated variant, reduced the NF-κB transcriptional activity compared with the control (empty vector). Moreover, activation of NF-κB by TNF-α was drastically reduced in the presence of wild type ASCC1, but no inhibition was observed when cells were transfected with the truncated variant (Fig. 3B). We studied the effect of ASCC1 allelic variants on the formation of NF-κB-DNA complexes by using EMSA and observed consistent but slight differences between wild-type and mutant variants (data not shown). However, consistent with our previous functional results, at least a 4-fold reduction in the levels of cIAP-1 and CCL2 was shown in cells transfected with ASCC1 after activation of NF-κB (Fig. 4A). On the contrary, transfection of the same cells with the truncated ASCC1 did not significantly modify the expression of the NF-κB target genes compared with the control, empty vector-transfected cells (Fig. 4A). The functional effect of the truncated variant was further confirmed by analyzing the release of an NF-κB target, TNF-α, into the culture medium by using an ELISA system. As expected, only the wild type variant reduced the secretion of TNF-α (Fig. 4B).

Table III. Truncating variants of NF-κB regulatory genes in control and RA patients

Gene	ID	REF	ALT	AF		p	AA Change
				Control Subjects	Patients		
TLR5	rs5744168	C	T	0.01667	0.007576	0.5652	R392*
ASCC1	rs11000217	C	G	0.01667	0.0303	0.5824	S78*
RIPK3	rs146886719	C	T	0	0.007576	0.4991	R422*
CARD8	rs2043211	T	A	0.4	0.3712	0.7033	C10*

AF, allelic frequencies; ALT, alternative allele; REF, reference allele.

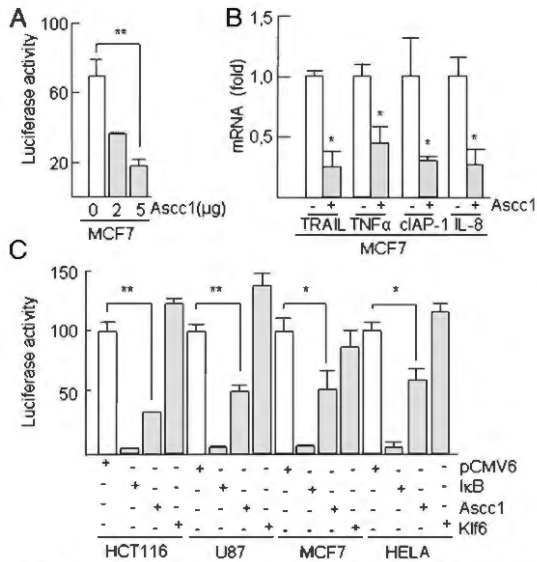




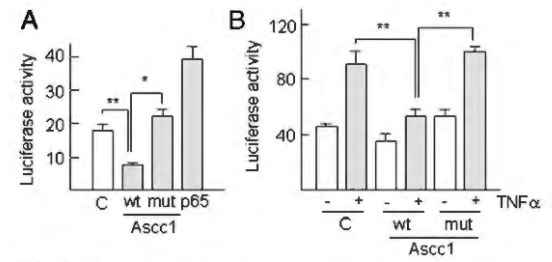
**FIGURE 1.** Analysis of the p.S78\* variant in ASCC1. **(A)** Schematic representation of the ASCC1 protein that illustrates the position of the truncating variant. **(B)** Sequence of the ASCC1 genotypes. **(C)** Genotype distribution of the ASCC1 variant in our healthy control (HC) and RA patient populations. **(D)** ASCC1 genotype frequencies in HapMap populations.

*p.S78\* variant is associated with disease severity in patients with RA*

NF-κB plays a relevant role in the induction of inflammatory mediators in chronic inflammatory disorders such as RA (21). Our previous data indicated that truncated ASCC1 reduced the capacity to interfere with the activation of NF-κB. To assess whether ASCC1 may contribute to modify the course of the disease in RA patients, we studied the p.S78\* variant in DNA samples from 433



**FIGURE 2.** ASCC1 inhibits the transcriptional activity of NF-κB. **(A)** MCF7 cells were cotransfected with increasing amounts of the ASCC1 vector and a luciferase reporter construct containing NF-κB consensus sites. Luciferase activity was analyzed 48 h after transfection. **(B)** MCF7 cells were transfected with ASCC1, and the expression of NF-κB target genes TRAIL, TNF-α, cIAP-1, and IL-8 was determined by quantitative RT-PCR. β-Actin was used for normalization. **(C)** MCF7, HCT116, HELA, and U87 cells were cotransfected with the reporter construct and ASCC1. IκB and KLF6 were used as positive and negative controls for NF-κB inhibition, respectively. β-Galactosidase reporter plasmid was used as an internal standard to normalize luciferase activity. Histograms represent the mean ± SD of three independent experiments. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.005 compared with control (cells transfected with empty vector).

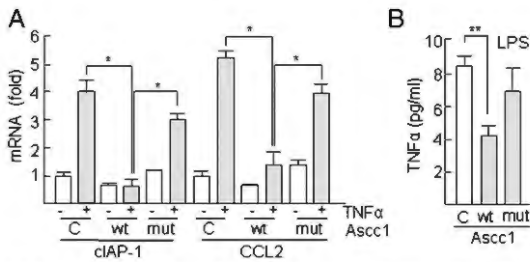


**FIGURE 3.** Regulation of the NF-κB transcriptional activity by ASCC1 and its truncated variant. **(A)** HEK293T cells were cotransfected with wild-type (wt) ASCC1 or its truncated variant (p.S78\*) and a reporter vector containing NF-κB responsive sequences. After 48 h of transfection, uninduced luciferase activity was determined. Overexpression of p65 is used here as a positive control of NF-κB activation. **(B)** Transfected MCF7 cells were stimulated with 10 ng/ml TNF-α for 24 h; then cell extracts were prepared and analyzed for luciferase activity. β-Galactosidase reporter plasmid was used as an internal standard to normalize luciferase activity. Histograms show the mean ± SD of three independent experiments. \**p* < 0.01, \*\**p* < 0.005. C, Cells transfected with the empty expression vector as a negative control.

patients with RA and 214 control subjects. As expected, the genotype frequencies were not significantly different between patient (98.2% CC, 1.8% CG, 0% GG) and control (97.7% CC, 2.3% CG, 0% GG) populations. However, the presence of the truncated allele in heterozygosis was positively correlated with the number of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) needed by patients (*p* = 0.03; Fig. 5A). Thus, this variant appears to select a group of patients with more severe disease. Consistently, more patients in the truncated allele-carrier group needed treatment with corticoids and biologics (Fig. 5B). Moreover, two criteria of poor prognosis such as lack of clinical remission after treatment and the presence of serum anti-CCP autoantibodies were associated with the truncated variant in RA patients. Although these clinical parameters did not reach statistical significance, most likely because of the low frequency of the rare allele, the results consistently associate the truncated variant with disease severity in RA patients.

**Discussion**

Deciphering the mechanisms that regulate the activity of NF-κB is of major importance for understanding the response to inflammatory stimuli. Nowadays, ASCC1 protein is considered to establish a cross talk with Jun and NF-κB that links inflammatory to tumor suppressive/oncogenic pathways (18). However, very little is known about ASCC1 function and its role in the NF-κB pathway. In this study, we show that ASCC1 displays an NF-κB inhibitory activity. We have demonstrated that ASCC1 impairs basal and inflammatory stimuli-induced activation of NF-κB in different cell models. However, a previous study described that ASCC1 activates NF-κB in HELA cells after cotransfection with p65 (18). There are a number of differences that may explain the discrepancy between both studies. Activation was proved in a single-cell model, using a shorter variant of ASCC1 that affects the functional KH domain, and inducing NF-κB activity by overexpression of p65. On the contrary, we used the largest variant with a complete KH domain and proved its activity in five different cell lines, including HELA cells, with and without TNF-α or LPS as NF-κB activators. Besides methodological differences, ASCC1 forms complexes with other proteins, including ASCC3, ASCC2, and ASC1, among others, and the subunit composition and activity of



**FIGURE 4.** Regulation of the levels of NF- $\kappa$ B target genes by ASCC1 and its truncated variant. **(A)** MCF7 cells were transfected with the ASCC1 variants and then treated or not with 25 ng/ml TNF- $\alpha$  for 24 h. The expression of NF- $\kappa$ B target genes, cIAP-1 and CCL2, was determined by quantitative RT-PCR.  $\beta$ -Actin was used for normalization. **(B)** The expression of secreted TNF- $\alpha$  was determined in the culture medium of cells transfected with ASCC1 variants and treated with LPS by using an ELISA assay. Histograms show the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p$  < 0.01, \*\* $p$  < 0.05.

the resulting complex may vary depending on the activation stimuli. In line with this, it has been suggested that p65 interacts with members of the ASC protein complex (18). Thus, triggering the NF- $\kappa$ B pathway by overexpression of p65 may bias the formation or activity of the complexes.

Misregulation of proteins that control the NF- $\kappa$ B pathway is likely to contribute to susceptibility or severity of chronic inflammatory diseases (6, 22). We showed that an ASCC1 truncated variant (p.S78\*), which lacks all functional domains, is unable to inhibit the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B. In line with this, a genetic variant of the best known NF- $\kappa$ B inhibitor, I $\kappa$ B $\alpha$  (NFKBIA), has been shown to contain inactivating mutations in

Hodgkin's lymphoma cell lines and in ~20% of patients, which leads to strong constitutive NF- $\kappa$ B activity that is thought to contribute to malignant transformation (26, 27). Other I $\kappa$ B $\alpha$  variants resulting in decreased expression of the inhibitor have been described in inflammation-associated disorders including asthma and bronchiolitis (28). The existence of regulatory proteins that lead to inactivation of NF- $\kappa$ B provides a rationale to consider that a genetic variant that reduces their inhibitory activity may be clinically relevant in chronic inflammatory disorders where NF- $\kappa$ B is constitutively active. We studied the p.S78\* variant of ASCC1 in RA, a chronic disease where NF- $\kappa$ B has been well recognized as a pivotal regulator of inflammation. Our data suggest that despite the fact that there were no differences in genotype distribution between patients with RA and healthy control subjects, those patients carrying the variant needed a significantly higher amount of DMARDs and received more corticoids and biologic agents. To our knowledge, this is the first time that a variant of ASCC1 is associated with an inflammatory disorder and little else is known about the role of this inhibitor in human disease. A previous study identified an ASCC1 germline p.N290S variant, affecting a region conserved across species, in patients with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma (20). The variant studied in this investigation leads to the complete deletion of all functional domains, which is consistent with its clinical impact. In view of our data, the clinical consequences of the ASCC1 truncated variant in RA and other chronic inflammatory disorders will need to be further studied on larger series of patients with different genetic backgrounds. Taking into account the complex control on the activation of NF- $\kappa$ B and the increasing number of proteins involved, further analysis of genetic variants of NF- $\kappa$ B regulatory genes will provide novel markers of disease susceptibility or severity in chronic inflammatory disorders or autoimmune diseases.

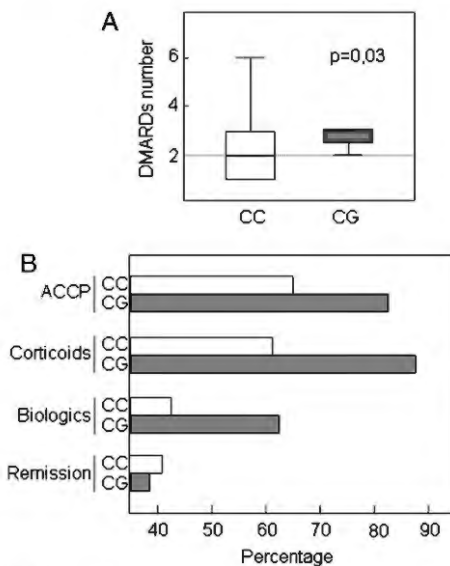
Overall, our observations identify ASCC1 as an inhibitor of NF- $\kappa$ B activation. We also studied a variant (p.S78\*) that may contribute to disease outcome in patients with RA. This allelic variant of ASCC1 lacks the capacity to inhibit the NF- $\kappa$ B transcriptional pathway providing the rationale for studying the association between this inactivating variant and disease activity or an inherited predisposition to autoimmune or chronic inflammatory disorders.

**Disclosures**

The authors have no financial conflicts of interest.

**References**

- Carmona, L., M. Cross, B. Williams, M. Lassere, and L. March. 2010. Rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 24: 733–745.
- Cho, Y. G., M. L. Cho, S. Y. Min, and H. Y. Kim. 2007. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 7: 65–70.
- Maksymowych, W. P., and M. A. Brown. 2009. Genetics of ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: where are we at currently, and how do they compare? *Clin. Exp. Rheumatol.* 27(4Suppl. 55): S20–S25.
- Okada, Y., D. Wu, G. Trynka, T. Raj, C. Terao, K. Ikari, Y. Kochi, K. Ohmura, A. Suzuki, S. Yoshida, et al; RACI consortium; GARNET consortium. 2014. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506: 376–381.
- Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225–260.
- Yamamoto, Y., and R. B. Gaynor. 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* 107: 135–142.
- Hayden, M. S., and S. Ghosh. 2012. NF- $\kappa$ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26: 203–234.
- Harton, J. A., M. W. Linhoff, J. Zhang, and J. P. Ting. 2002. Cutting edge: CAT-ERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J. Immunol.* 169: 4088–4093.
- Oeckinghaus, A., M. S. Hayden, and S. Ghosh. 2011. Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12: 695–708.



**FIGURE 5.** Association of the p.S78\* variant with disease severity in patients with RA. **(A)** Box plot showing the association between the number of DMARDs and the ASCC1 genotypes in RA patients. **(B)** ASCC1 genotypes CC (395 patients) and CG (8 patients) were distributed in regard to therapy use (corticoids and biologics), presence of serum anticyclic citrullinated protein (ACCP), and clinical remission.

10. Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F. F. Chen, S. Yamaoka, and G. Núñez. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 276: 4812–4818.
11. Fontalba, A., O. Gutierrez, and J. L. Fernandez-Luna. 2007. NLRP2, an inhibitor of the NF- $\kappa$ B pathway, is transcriptionally activated by NF- $\kappa$ B and exhibits a nonfunctional allelic variant. *J. Immunol.* 179: 8519–8524.
12. Seufert, B. L., E. M. Poole, J. Whitton, L. Xiao, K. W. Makar, P. T. Campbell, R. J. Kulmacz, J. A. Baron, P. A. Newcomb, M. L. Slattery, et al. 2013. IKK $\beta$  and NF $\kappa$ B1. NSAID use and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis* 34: 79–85.
13. Kai, X., V. Chellappa, C. Donado, D. Reynon, Y. Sekigami, D. Ataca, A. Louissaint, H. Mattoo, J. K. Joung, and S. Pillai. 2014. IKK kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ) mutations in lymphomas that constitutively activate canonical nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) signaling. *J. Biol. Chem.* 289: 26960–26972.
14. Mousallem, T., J. Yang, T. J. Urban, H. Wang, M. Adeli, R. E. Parrott, J. L. Roberts, D. B. Goldstein, R. H. Buckley, and X. P. Zhong. 2014. A nonsense mutation in IKK $\beta$  causes combined immunodeficiency. *Blood* 124: 2046–2050.
15. Wang, J. Q., Y. S. Jeelani, L. L. Ferguson, and K. Horikawa. 2014. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation. *Front. Immunol.* 5: 367.
16. Gianfrancesco, F., D. Rendina, M. Di Stefano, A. Mingione, T. Esposito, D. Merlotti, S. Gallone, S. Magliocca, A. Goode, D. Formicola, et al. 2012. A nonsynonymous TNFRSF1A variation increases NF $\kappa$ B activity and the severity of Paget's disease. *J. Bone Miner. Res.* 27: 443–452.
17. Fontalba, A., V. Martinez-Taboada, O. Gutierrez, C. Pipaon, N. Benito, A. Balsa, R. Blanco, and J. L. Fernandez-Luna. 2007. Deficiency of the NF- $\kappa$ B inhibitor caspase activating and recruitment domain 8 in patients with rheumatoid arthritis is associated with disease severity. *J. Immunol.* 179: 4867–4873.
18. Jung, D. J., H. S. Sung, Y. W. Goo, H. M. Lee, O. K. Park, S. Y. Jung, J. Lim, H. J. Kim, S. K. Lee, T. S. Kim, et al. 2002. Novel transcription coactivator complex containing activating signal cointegrator 1. *Mol. Cell. Biol.* 22: 5203–5211.
19. Kim, H. J., J. Y. Yi, H. S. Sung, D. D. Moore, B. H. Jhun, Y. C. Lee, and J. W. Lee. 1999. Activating signal cointegrator 1, a novel transcription coactivator of nuclear receptors, and its cytosolic localization under conditions of serum deprivation. *Mol. Cell. Biol.* 19: 6323–6332.
20. Orloff, M., C. Peterson, X. He, S. Ganapathi, B. Heald, Y. R. Yang, G. Bebek, T. Romigh, J. H. Song, W. Wu, et al. 2011. Germline mutations in MSRI, ASCC1, and CTHRC1 in patients with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *JAMA* 306: 410–419.
21. Andreaskos, E., S. Sacre, B. M. Foxwell, and M. Feldmann. 2005. The toll-like receptor-nuclear factor  $\kappa$ B pathway in rheumatoid arthritis. *Front. Biosci.* 10: 2478–2488.
22. Lawrence, T. 2009. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1: a001651.
23. Marok, R., P. G. Winyard, A. Coumbe, M. L. Kus, K. Gaffney, S. Blades, P. I. Mapp, C. J. Morris, D. R. Blake, C. Kaltschmidt, and P. A. Baeuerle. 1996. Activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 39: 583–591.
24. Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, III, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, et al. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62: 2569–2581.
25. Inohara, N., Y. Ogura, F. F. Chen, A. Muto, and G. Núñez. 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 276: 2551–2554.
26. Cabannes, E., G. Khan, F. Aillet, R. F. Jarrett, and R. T. Hay. 1999. Mutations in the I $\kappa$ B $\alpha$  gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I $\kappa$ B $\alpha$ . *Oncogene* 18: 3063–3070.
27. Jungnickel, B., A. Staratschek-Iox, A. Bräuninger, T. Spieker, J. Wolf, V. Diehl, M. L. Hansmann, K. Rajewsky, and R. Küppers. 2000. Clonal deleterious mutations in the I $\kappa$ B $\alpha$  gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J. Exp. Med.* 191: 395–402.
28. Ali, S., A. F. Hirschfeld, M. L. Mayer, E. S. Fortunato, III, N. Corbett, M. Kaplan, S. Wang, J. Schneiderman, C. D. Fjell, J. Yan, et al. 2013. Functional genetic variation in NFKB1A and susceptibility to childhood asthma, bronchiolitis, and bronchopulmonary dysplasia. *J. Immunol.* 190: 3949–3958.

## **High-throughput variant analysis of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis**

Silvia Torices<sup>1,2</sup>, Lorena Alvarez-Rodríguez<sup>1</sup>, Ignacio Varela<sup>3</sup>, Pedro Muñoz<sup>4</sup>, Alejandro Balsa<sup>5</sup>, M López-Hoyos<sup>6</sup>, Víctor Martínez-Taboada<sup>1,7</sup>, Jose L. Fernández-Luna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Reumatología, <sup>2</sup>Unidad de Genética and <sup>6</sup>Sección de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Santander, Spain,

<sup>3</sup>Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Santander, Spain,

<sup>4</sup>Gerencia Atención Primaria, Servicio Cántabro de Salud, Santander, Spain

<sup>5</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain,

<sup>7</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

\*\*Corresponding author. Jose L. Fernandez-Luna, Unidad de Genética, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Av Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain. Phone: +34 942 315271; E-mail: [fluna@humv.es](mailto:fluna@humv.es).

**Keywords:** TLR8, rheumatoid arthritis, variant, disease severity, inflammatory cytokines

**Short title:** TLR variants in rheumatoid arthritis

**Abbreviations:** RA, rheumatoid arthritis; TLR, Toll-like receptor; DMARDs, disease-modifying antirheumatic drugs; NFκB, nuclear factor kappa-B; NGS, next-generation sequencing.

## Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease whose main feature is persistent joint inflammation. Toll-like receptors (TLRs) play critical roles in the activation of innate and adaptive immune responses, and influence the activity of NF $\kappa$ B, a key player in chronic inflammation. We aimed at investigating the association of TLR allelic variants with susceptibility and severity of RA through a systematic, high-throughput, analysis of TLR genes. All coding exons and flanking regions of nine members of the TLR family (TLR1-9) were analyzed in 66 patients with RA and 30 healthy controls by next generation sequencing. We focussed on three single allelic variants, N248S in TLR1, Q11L in TLR7 and M1V in TLR8 based on the allelic frequencies in both patient and control populations, the predicted impact on protein function and the novelty in RA research. These selected variants were studied in a larger cohort of 402 patients with RA and in 108 controls and showed that the M1V allele is associated with a lower need for disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) ( $p=0,008$ ) and biologic treatments ( $p=0,021$ ). Thus, the presence of this variant confers a significant protective effect on disease severity. Functional *in vitro* studies showed that the M1V variant leads to a reduced production of inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$ , in response to TLR8 agonists. Overall, our findings show for the first time the association between the M1V variant of TLR8 and disease severity in RA, which could have prognostic value for these patients.

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease caused by the chronic inflammation of the synovial lining. It is characterized by progressive joint destruction <sup>1</sup>. Although a number of genes have been identified as possible targets in this pathology, the genetic regulation that contributes to the development and progression of disease in RA patients remains unclear <sup>2</sup>. It has been suggested that viruses and bacteria may contribute to initiate or exacerbate RA by binding to Toll-like receptors (TLRs) <sup>3, 4</sup>. TLRs constitute a family of transmembrane proteins whose activation has been implicated in the loss of self-tolerance leading to autoimmunity and chronic inflammation <sup>5-7</sup>. They play an essential role in the activation and regulation of innate and acquired immune responses through recognition of specific pathogen-associated molecular patterns and endogenous peptides <sup>6, 8</sup>. The stimulation of the TLR pathway modulates NFκB activation and thus the production of proinflammatory cytokines and cell-adhesion molecules <sup>9, 10</sup>. Activation of the NFκB pathway plays a key role in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases, including RA and inflammatory bowel disease <sup>11</sup>. The most recently described TLRs involved in responding to viral stimulation are TLR7 and TLR8. They are located at the membranes of the endosomal compartment and recognize viral single-stranded RNA and short double-stranded RNA <sup>12, 13</sup>. Human TLR8 is expressed in monocytes/macrophages and myeloid dendritic cells <sup>14</sup>. TLR8 signaling is mediated by the adaptor protein MyD88 which activates NFκB, IRF-7 and p38 MAPK, resulting in the induction of proinflammatory cytokines and tissue-destructive enzymes <sup>15</sup>. TLR8 is located on the X chromosome and spans 15.5 kb (Xp22.3-p22.2). At the genomic level, two splice variants with alternative translation start sites, due to SNP rs3764880 (p.Met1Val), are encoded by TLR8 gene (TLR8v1 and TLR8v2) <sup>16, 17</sup>. Although

TLR8v2, that lacks the first three amino acids, is the most conserved isoform of TLR8 among primates, the long isoform (TLR8v1) plays a major role in the positive regulation of TLR8 function in differentiated monocytes<sup>18</sup>.

Genetic variants in TLRs have been mainly associated with disease susceptibility in patients with RA with variable level of significance and even discordant results<sup>5, 19-22</sup>. Although several polymorphisms of TLR8 have been studied in RA patients, only rs5741883 has shown a moderate association with rheumatoid factor positivity<sup>5, 23</sup>.

In this study, we analyzed the association of variants N248S in TLR1, Q11L in TLR7 and M1V in TLR8 in 402 patients with RA and showed that M1V variant is significantly associated with a reduced need for disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) and biologic treatment. We also described that monocytes from M1V variant carriers had a reduced production of inflammatory cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$ , in response to TLR8 agonists.

## **Materials and methods**

### **Patient samples**

A first cohort of 66 selected RA patients with high disease severity (RF and/or ACCP positivity, erosive disease and failure to at least one DMARD) and 30 healthy controls were enrolled for next-generation sequencing (NGS). Identified variants were analyzed in a second cohort of 402 unselected patients with RA, diagnosed according to the 1987 American College of Rheumatology (ACR) classification criteria<sup>24</sup>. As a control population, 108 sex and age matched individuals who had no known history of serious disease, including autoimmune or chronic inflammatory disorders, were also genotyped. All patients were followed

at Hospital Universitario Marques de Valdecilla (HUMV) (Santander, Spain) or Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain). Clinical information, including demographic data, disease characteristics, and treatment, has been previously described<sup>25</sup>. The study was approved by the corresponding Research Ethics Committees and informed consent was obtained from all subjects.

### Sequencing analyses

The coding exons and flanking regions of the TLR family (TLR1-9) gene were sequenced in 66 RA patients and 30 healthy controls by NGS. DNA libraries were processed for hybrid enrichment using a custom SeqCap EZ design (Roche Nimblegen, Basel, Switzerland) containing the coding sequences of TLRs. Then, double barcoded libraries were sequenced by using a MiSeq NGS platform (Illumina, Madison, WI). Sequencing reads were aligned against the human reference genome hg19 using BWA with the default parameters<sup>26</sup>. Single base variants and indel calling was performed using GATK Unified Genotyper<sup>27</sup>. Variants were restricted to the area of interest using GATK toolkit and annotated using snpEff<sup>28</sup>. Finally, association studies were performed using Plink software<sup>29</sup>. Allelic variants were analyzed in other 402 patients with RA and 108 age-matched control individuals by NGS sequencing. DNA was extracted from whole blood by using the QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Hamburg, Germany) and amplified with primers for human TLR8 5'-CTCTTCTCGGCCACCTCCTG-3' and 5'-GCAAGCCGCTTTACCTGCAT-3', TLR7 5'-GGGGTTGGGGATGCTGTTTA-3' and 5'-TGCAGTCCACGATCACATGG-3', and TLR1 5'-ATGCCAAACCAGCTGGAGGA-3' and 5'-CCCTGAGGGCCTTCAAGACT-3'.



### **Expression analyses of NF $\kappa$ B target cytokines**

TLR8 activity was assessed by measuring the production of intracellular cytokines in monocytes as previously described<sup>30</sup>. Briefly, blood cells were stimulated with the TLR8 agonist ssRNA40 (InvivoGen, San Diego, CA) for 18 h in the presence of brefeldin A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) to prevent cytokine release. Cells were then stained with FITC-conjugated anti-human CD14 (BD Biosciences, San Jose, CA) to identify the monocyte population. Erythrocytes were lysed with FACS lysing solution (BD Biosciences). Mononuclear cells were permeabilized and intracellularly stained with phycoerythrin (PE)-labelled monoclonal antibodies against IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  or IL-6 (BD Biosciences). Cytokine expression was analyzed by flow cytometry using Cell Quest Pro Software (BD Biosciences).

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using SPSS 20 program (IBM, Armonk, NY). Differences in quantitative variables between groups of patients were compared with the Mann-Whitney U test, and the chi-squared statistic was used for categorical variables. Statistical significance between groups in *in vitro* analyses was performed by using the unpaired 2-tailed Student's *t* test. For functional studies, the statistical comparisons of data between genotypes were performed using the Mann-Whitney U-test. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### **M1V variant of TLR8 is associated with disease severity in patients with RA**

Genetic variants within human TLR genes have been reported to be associated with susceptibility to RA with variable level of significance

and even discordant results. We aimed to assess whether TLR variants contribute to modify the course of the disease in RA patients. To approach this goal, we sequenced the coding exons of nine members of the TLR family (TLR1-9) gene in 66 selected patients with RA and 30 healthy controls. A total of 71 variants were identified (Table 1). Three variants, N248S in TLR1, Q11L in TLR7 and M1V in TLR8 genes were selected based on the allelic frequencies in both patient and control populations, the novelty in RA research and the predicted functional impact on the protein as assessed by using PolyPhen, SIFT and SNPs3D programs. We studied these variants in a larger cohort of 402 patients with RA and in 108 controls and showed that none of them was associated with disease susceptibility as the genotypes distribution was similar in both patient and control populations (Table 2). Then we analyzed a number of clinical findings associated with disease severity. Interestingly, we found that the presence of two copies of the G allele of TLR8 gene tended to correlate with clinical remission, better prognosis (less surgical interventions and prostheses), lower need for pharmacological therapies and the absence of two well-known serological markers of disease severity, rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated protein antibodies (Fig. 1A). Furthermore, when we analyzed the need for disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) and biologic therapy among GG (homozygotes for the V variant) and AG/AA genotype carriers, we showed that the GG genotype was significantly associated with lower number of DMARDs ( $p=0,008$ ) and biologics ( $p=0,021$ ) (Fig. 1B and 1C). Thus, this variant appears to select a group of patients with less severe and refractory disease.

**M1V variant leads to a reduced production of inflammatory cytokines**

M1V, a single variant at the start codon of TLR8 (ATG>GTG) causes a frame shift mutation that leads to the formation of a truncated protein lacking three amino acids at the N-terminus, which are predicted to be part of the signal peptide<sup>31-33</sup>. Our previous data indicated that the presence of M1V variant is associated with a less aggressive course of disease in RA patients. Thus, we wanted to correlate this result with the level of inflammatory mediators. To achieve this, we stimulated blood cells with a TLR8 agonist and analyzed the production of inflammatory cytokines by flow cytometry. As shown in Fig. 2A, 2B and 2C, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 levels in circulating monocytes were lower in GG genotype carriers compared with those in patients carrying the AA genotype. Although these differences did not reach statistical significance, most likely because of the low frequency of the rare allele, the results of three different cytokines consistently associate the GG genotype with a reduced inflammatory response following activation of TLR8. These results set a foundation for subsequent studies with larger cohorts that include a higher number of rare genotype carriers.

## Discussion

TLR8 variants have been associated with susceptibility to infectious and autoimmune diseases including tuberculosis and systemic lupus erythematosus<sup>34-36</sup>. In this study, we show that M1V variant of TLR8 is associated with disease severity in RA, and selects a group of patients with a lower need for therapeutic interventions. A meta-analysis that included 14 studies worldwide has been recently performed to determine whether TLR polymorphisms confer susceptibility to RA and/or influence the clinical features. This study, that included a TLR8 polymorphism (rs5741883) in the non-coding upstream region of the gene, did not find a clear association with any of the variants analyzed<sup>5</sup>. However, the lack of

a statistically significant amount of data precluded the possibility of reaching conclusive results. Another study that genotyped RA patients for 22 polymorphisms in 7 TLR genes concluded that only rs5741883 showed a moderate association with rheumatoid factor positivity<sup>23</sup>. To avoid SNP preselection bias, we conducted a systematic and high-throughput study by sequencing all coding and flanking regions of nine TLR genes in 66 patients. The selected TLR8 polymorphism, M1V, was further studied in a larger cohort of 402 patients to validate our data.

The SNP that leads to M1V variant (rs3764880, A>G) has been previously studied in patients with tuberculosis, showing that the major allele A was associated with susceptibility to this infectious disease<sup>37</sup>. In line with this, another report showed that the G allele conferred a significant protective effect to HIV-positive adults regarding progression of the disease<sup>38</sup>. Furthermore, these authors demonstrated that the G allele leads to impaired NFκB activation in vitro and reduced secretion of inflammatory cytokines. Consistently, we found that GG genotype carriers produced significantly lower levels of inflammatory cytokines, IL1β, IL6 and TNFα, when blood mononuclear cells were stimulated with TLR8 agonists. A>G change eliminates the start codon and provokes the use of the next in-frame ATG, which generates a deletion of the first three amino acids of TLR8, giving rise to TLR8v2 isoform. We showed that G allele carriers develop a less severe disease and reduce the need for therapy. A likely mechanistic explanation might be in the stability of TLR8 mRNA. Transfection experiments with both A and G allelic variants of TLR8 showed that the amount of the G variant mRNA was significantly lower, suggesting that this mRNA may be less stable<sup>39</sup>. A similar polymorphism has been described in the vitamin D receptor gene<sup>40</sup>. A T>C change at the initiation codon gives rise to a shorter isoform lacking the first three amino acids, which has functional consequences due to differences in the

transcriptional capacity of both alleles. Although a scenario where the G allele correlates with a lower inflammatory activity is consistent with our data, it has also been described that the same allele is more efficient than the A allele in promoting activation of the NF $\kappa$ B proinflammatory pathway<sup>39</sup>. This result was obtained by cotransfecting cells with a luciferase reporter construct and the A/G allelic variants of TLR8. Besides technical explanations due to differences in the experimental settings of the *in vitro* assays, including the use of different TLR agonists, we have shown consistent *in vivo* data in a large cohort of RA patients, which have been validated *in vitro* analyzing the production of inflammatory cytokines by monocytes from patients carrying AA or GG genotypes.

In conclusion, our observations identify an allelic variant of TLR8, M1V, which is significantly associated with the prognosis of RA patients. Replication of these results in larger cohorts of patients, including populations with different genetic background, will be of great value to unequivocally consider M1V variant as a marker of disease outcome in patients with RA.

In conclusion, we have identified, through a comprehensive and unbiased NGS approach, an association of a TLR8 variant, M1V that leads to the formation of a truncated protein lacking three amino acids at the N-terminus, with a reduced severity of rheumatoid arthritis and a reduced capacity of TLR8 to respond to inflammatory stimuli.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation grant PII1/02012, and grant RD12/0036/0022 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, Sociedad Española de Reumatología grant FER13/13 and

Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL) grant APG-03. I.V. is funded by programa Ramón y Cajal, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain.

Author contributions: ST, LAR and IV performed the experiments; PM, AB, MLH, VMT and JFL analyzed data; IV, VMT and JFL designed the study; JFL wrote the paper.

### **Disclosures**

The authors declare no conflict of interest.

### **References**

1. Carmona L, Cross M, Williams B, Lassere M, March L. Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010; 24:733-45.
2. Maksymowych WP, Brown MA. Genetics of ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: where are we at currently, and how do they compare? *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27:S20-5.
3. Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16+ blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1457-67.
4. Pierer M, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Brentano F, Wagner U, et al. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J Immunol* 2004; 172:1256-65.
5. Lee YH, Bae SC, Kim JH, Song GG. Toll-like receptor polymorphisms and rheumatoid arthritis: a systematic review. *Rheumatol Int* 2014; 34:111-6.
6. Wagner H. Endogenous TLR ligands and autoimmunity. *Adv Immunol* 2006; 91:159-73.

7. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:823-35.
8. Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Adv Immunol* 2001; 78:1-56.
9. Drexler SK, Foxwell BM. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42:506-18.
10. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:353-64.
11. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 2001; 107:135-42.
12. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303:1526-9.
13. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 2010; 32:305-15.
14. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-7.
15. Ohto U, Tanji H, Shimizu T. Structure and function of toll-like receptor 8. *Microbes Infect* 2014; 16:273-82.
16. Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11:372-8.
17. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11:362-71.

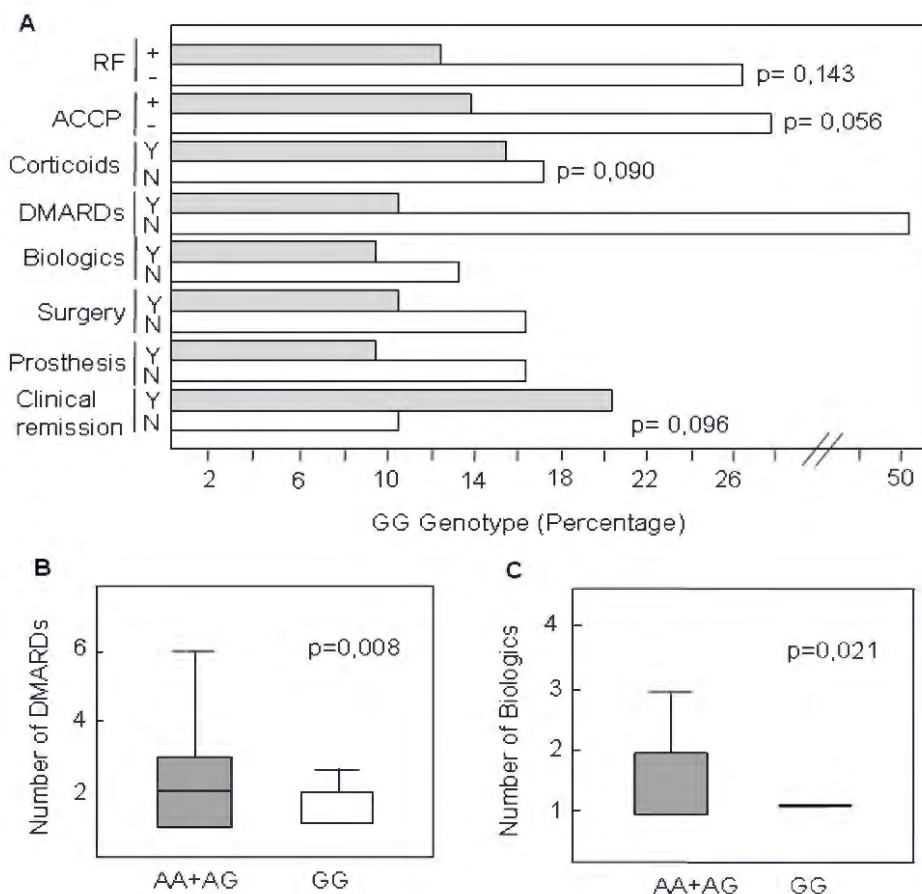
18. Gantier MP, Irving AT, Kaparakis-Liaskos M, Xu D, Evans VA, Cameron PU, et al. Genetic modulation of TLR8 response following bacterial phagocytosis. *Hum Mutat* 2010; 31:1069-79.
19. Kuuliala K, Orpana A, Leirisalo-Repo M, Kautiainen H, Hurme M, Hannonen P, et al. Polymorphism at position +896 of the toll-like receptor 4 gene interferes with rapid response to treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:1241-3.
20. Radstake TR, Franke B, Hanssen S, Netea MG, Welsing P, Barrera P, et al. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum* 2004; 50:999-1001.
21. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Beares I, Mata C, Garcia-Unzueta M, Calvo-Alen J, et al. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica and elderly-onset rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2011; 29:795-800.
22. Zheng B, Li Q, Wei C, Qin J, Shou T, Zhou R, et al. Lack of association of TLR4 gene Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with rheumatoid arthritis in Chinese Han population of Yunnan Province. *Rheumatol Int* 2010; 30:1249-52.
23. Enevold C, Radstake TR, Coenen MJ, Franssen J, Toonen EJ, Bendtzen K, et al. Multiplex screening of 22 single-nucleotide polymorphisms in 7 Toll-like receptors: an association study in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2010; 37:905-10.
24. 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.
25. Torices S, Alvarez-Rodriguez L, Grande L, Varela I, Munoz P, Pascual D, et al. A Truncated Variant of ASCC1, a Novel Inhibitor



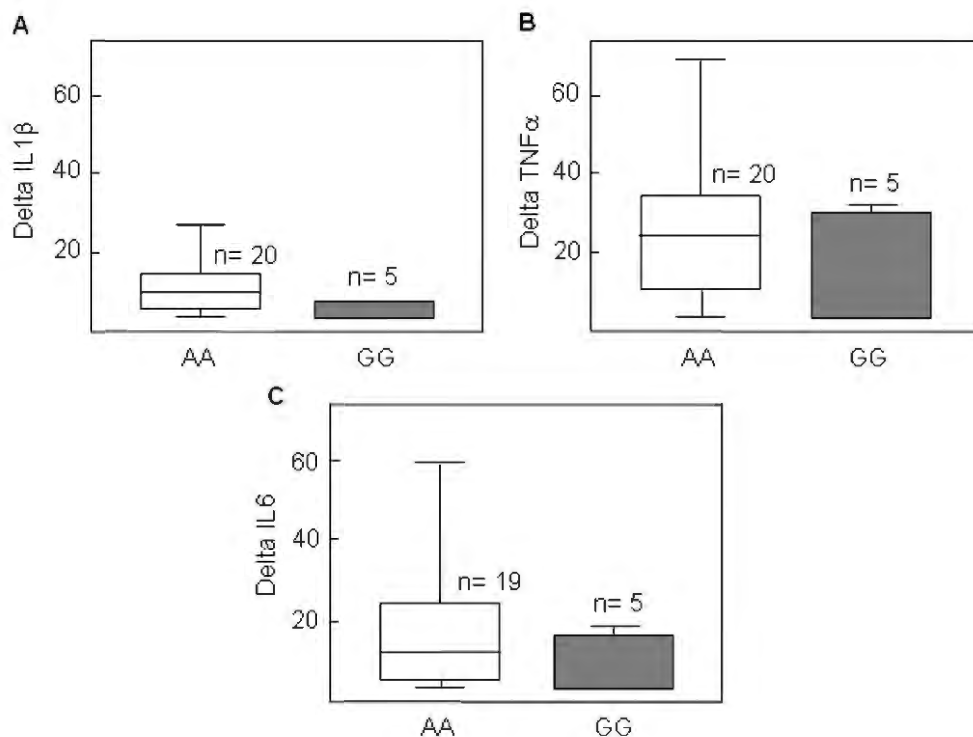
- of NF-kappaB, Is Associated with Disease Severity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Immunol* 2015; 195:5415-20.
26. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; 25:1754-60.
  27. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010; 20:1297-303.
  28. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 2012; 6:80-92.
  29. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81:559-75.
  30. Alvarez Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Mata C, Fontalba A, Calvo Alen J, Marin MJ, et al. Expression and function of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:1677-83.
  31. Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 1986; 44:283-92.
  32. Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 1987; 196:947-50.

33. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 1987; 15:8125-48.
34. Salie M, Daya M, Lucas LA, Warren RM, van der Spuy GD, van Helden PD, et al. Association of toll-like receptors with susceptibility to tuberculosis suggests sex-specific effects of TLR8 polymorphisms. *Infect Genet Evol* 2015; 34:221-9.
35. Xiao W, Liu Z, Lin J, Li J, Wu K, Ma Y, et al. Association of Toll-like receptor 7 and 8 gene polymorphisms with Graves' disease in Chinese Cantonese population. *Tissue Antigens* 2015; 85:29-34.
36. Enevold C, Nielsen CH, Jacobsen RS, Hermansen ML, Molbo D, Avlund K, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes encoding toll-like receptors 7, 8 and 9 in Danish patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 2014; 41:5755-63.
37. Sun Q, Zhang Q, Xiao HP, Bai C. Toll-like receptor polymorphisms and tuberculosis susceptibility: A comprehensive meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2015; 35:157-68.
38. Oh DY, Taube S, Hamouda O, Kucherer C, Poggensee G, Jessen H, et al. A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *J Infect Dis* 2008; 198:701-9.
39. Wang CH, Eng HL, Lin KH, Liu HC, Chang CH, Lin TM. Functional polymorphisms of TLR8 are associated with hepatitis C virus infection. *Immunology* 2014; 141:540-8.
40. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997; 12:915-21.

## Figures



**Fig 1. Association of the M1V variant of TLR8 with disease severity in a cohort of 402 patients with RA.** (A) Carriers of the GG genotype were distributed in regards to therapy use (corticoids and biologics), presence of serum ACCP and RF, need of surgery and prosthesis, and clinical remission. ACCP, anti-cyclic citrullinated protein antibodies; RF, rheumatoid factor; Y, yes; N, no. Box plot showing the association between the number of disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) (B), or the number of biologics (C), and TLR8 genotypes in RA patients.



**Fig 2. TLR 8 activity according to TLR8 genotypes in patients with RA.** (A-C) TLR8 activity was assessed by measuring intracellular proinflammatory cytokine production following treatment of circulating monocytes with ssRNA40, a TLR8 specific agonist. Cytokine and CD14 co-staining with specific antibodies was used to reveal the expression of cytokines in monocytes by using flow cytometry. Values represent the difference between the percentage of cells expressing the cytokine with and without treatment with the TLR8 agonist (delta).

**Table 1.** Allelic variants of TLR genes in control and RA populations.

<b>Gene</b>	<b>ID number</b>	<b>MAF<sup>a</sup> controls</b>	<b>MAF cases</b>	<b>P value</b>	<b>AA<sup>b</sup> change</b>	<b>Impact</b>
TLR1	rs113706342	0	0,007576	0,4991	H720P	MODERATE
TLR1	rs41311400	0	0,007576	0,4991	G676G	LOW
TLR1	rs151036585	0	0,007576	0,4991	D605Y	MODERATE
TLR1	rs5743618	0,4333	0,3333	0,1821	S602I	MODERATE
TLR1	rs5743614	0,3929	0,254	0,05834	S506S	LOW
TLR1	rs201398822	0,01667	0	0,137	L371F	MODERATE
TLR1	rs184548723	0	0,007576	0,4991	T363M	MODERATE
TLR1	rs3923647	0,01667	0,01515	0,9375	H305L	MODERATE
TLR1	rs4833095	0,4333	0,303	0,07807	N248S	MODERATE
TLR1	rs5743611	0,05	0,09091	0,3276	R80T	MODERATE
TLR1	rs145135062	0	0,007576	0,4991	I57M	MODERATE
TLR1	rs5743610	0,01667	0,01515	0,9375	H38H	LOW
TLR2	rs5743697	0	0,007576	0,4991	G38G	LOW
TLR2	rs200686000	0	0,007576	0,4991	T138I	MODERATE
TLR2	rs3804099	0,5167	0,4621	0,4831	N199N	LOW
TLR2	rs5743698	0	0,007576	0,4991	L213L	LOW
TLR2	rs3804100	0,06667	0,08333	0,69	S450S	LOW
TLR2	rs5743700	0,05	0,02273	0,3141	F541F	LOW
TLR2	rs5743704	0,01667	0,02273	0,7852	P631H	MODERATE
TLR2	rs5743708	0	0,007576	0,4991	R753Q	MODERATE
TLR3	rs3775291	0,4333	0,3409	0,2188	L135F	MODERATE
TLR3	rs3775290	0,3333	0,3258	0,9175	F182F	LOW

TLR3	rs73873710	0,06667	0,02273	0,1321	F574F	LOW
TLR4	rs78848399	0,01667	0	0,137	Y46C	MODERATE
TLR4	rs137853920	0,05	0,01515	0,1599	C241Y	MODERATE
TLR4	rs4986790	0,1	0,06061	0,3305	D259G	MODERATE
TLR4	rs56070048	0	0,007576	0,4991	K314K	LOW
TLR4	rs4986791	0,1	0,06061	0,3305	T359I	MODERATE
TLR4	rs5030721	0,01667	0,0303	0,5824	K613K	LOW
TLR4	rs5030724	0,01667	0	0,137	Q794K	MODERATE
TLR5	rs1053954	0,08333	0,07576	0,8561	K841K	LOW
TLR5	rs7512943	0	0	NA	F822L	MODERATE
TLR5	rs5744174	0,3333	0,3333	1	F616L	MODERATE
TLR5	rs2072493	0,1667	0,2652	0,1354	N592S	MODERATE
TLR5	rs5744169	0	0,007576	0,4991	L444L	LOW
TLR5	rs5744168	0,01667	0,007576	0,5652	R392*	HIGH
TLR5	rs45528236	0,01667	0,007576	0,5652	Q181K	MODERATE
TLR5	rs764535	0,01667	0	0,137	T82I	MODERATE
TLR5	rs5744165	0,03333	0,03788	0,8762	V61V	LOW
TLR5	rs187499609	0	0,007576	0,4991	R34H	MODERATE
TLR6	rs138342666	0,01667	0,02273	0,7852	I461V	MODERATE
TLR6	rs5743820	0,03333	0,007576	0,1822	T440M	MODERATE
TLR6	rs5743818	0,2167	0,2424	0,6961	A644A	LOW
TLR6	rs5743816	0,01667	0	0,137	V465I	MODERATE
TLR6	rs5743815	0,01667	0,0303	0,5824	V427A	MODERATE
TLR6	rs3775073	0,3	0,3182	0,8011	K421K	LOW
TLR6	rs3821985	0,3167	0,303	0,8494	T361T	LOW

TLR6	rs5743810	0,35	0,3712	0,7771	S249P	MODERATE
TLR6	rs189784331	0	0,01515	0,3378	V213V	LOW
TLR7	rs179008	0,3167	0,197	0,06955	Q11L	MODERATE
TLR7	rs55907843	0	0,007576	0,4991	V222D	MODERATE
TLR7	rs5743780	0	0,02273	0,2392	L345L	LOW
TLR7	rs5743781	0	0,0303	0,173	A448V	MODERATE
TLR7	rs864058	0,15	0,08333	0,161	T801T	LOW
TLR7	rs141270925	0	0,01515	0,3378	Y897Y	LOW
TLR7	rs189681811	0	0,007576	0,4991	R920K	MODERATE
TLR8	rs3764880	0,3667	0,2424	0,07593	M1V	HIGH
TLR8	rs56194919	0,01667	0,0303	0,5824	C25C	LOW
TLR8	rs2159377	0,2	0,1894	0,8629	D118D	LOW
TLR8	rs5744080	0,35	0,3636	0,8552	H215H	LOW
TLR8	rs2407992	0,4	0,3636	0,6295	L651L	LOW
TLR8	rs3747414	0,3	0,2803	0,7796	I751I	LOW
TLR8	rs2109135	0	0	NA	D923D	LOW
TLR9	rs445676	0,03333	0,02308	0,6814	Y980Y	LOW
TLR9	rs5743845	0	0,007576	0,4991	R863Q	MODERATE
TLR9	rs352140	0,4833	0,4848	0,9845	P545P	LOW
TLR9	rs141799890	0	0,007576	0,4991	H539Q	MODERATE
TLR9	rs35342983	0	0,007576	0,4991	S509S	LOW
TLR9	rs35654187	0	0,007576	0,4991	T383T	LOW
TLR9	rs150459369	0,01667	0,007576	0,5652	A7T	MODERATE
TLR9	rs5743842	0,01667	0	0,137	R5C	MODERATE

<sup>a</sup>MAF, minor allele frequency; <sup>b</sup>AA, amino acid

**Table 2.** Genotype frequencies of selected TLR variants in controls and RA patients.

Genotype	Controls	Cases	P value	OR <sup>a</sup> (95% CI <sup>b</sup> )
N248S variant of TLR1				
TT	0,35%	0,36%		
TC	0,46%	0,48%	0,900	1,032 (0.636-1.672)
CC	0,18%	0,14%	0,461	0,788 (0,417-1,487)
Q11L variant of TLR7				
AA	0,64%	0,69%		
AT	0,29%	0,20%	0,906	0,660 (0,399-1,095)
TT	0,05%	0,09%	0,350	1,539 (0,620-3,822)
M1V variant of TLR8				
AA	55.7%	55.7%		
AG	30.6%	30.1%	0.941	0.982 (0.608-1.585)
GG	13.9%	14.2%	0.957	1.018(0.539-1.923)

<sup>a</sup>OR, odds ratio; <sup>b</sup>CI, confidence interval





RESEARCH ARTICLE

Open Access



# A functional variant of TLR10 modifies the activity of NFκB and may help predict a worse prognosis in patients with rheumatoid arthritis

Silvia Torices<sup>1,2</sup>, Antonio Julia<sup>3</sup>, Pedro Muñoz<sup>4</sup>, Ignacio Varela<sup>5</sup>, Alejandro Balsa<sup>6</sup>, Sara Marsal<sup>3</sup>, Antonio Fernández-Nebro<sup>7</sup>, Francisco Blanco<sup>8</sup>, Marcos López-Hoyos<sup>9</sup>, Víctor Martínez-Taboada<sup>1,10†</sup> and Jose L. Fernández-Luna<sup>2\*†</sup>

## Abstract

**Background:** Toll-like receptor (TLR) family members are key players in inflammation. TLR10 has been poorly studied in chronic inflammatory disorders, and its clinical relevance in rheumatoid arthritis (RA) is as yet unknown. We aimed at identifying TLR10 variants within all coding regions of the gene in patients with RA as well as studying their functional and clinical significance.

**Methods:** TLR10 gene variants were studied by performing sequencing of 66 patients with RA and 30 control subjects. A selected variant, I473T, was then analyzed in 1654 patients and 1702 healthy control subjects. The capacity of this TLR10 variant to modify the transcriptional activity of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) was determined by using a luciferase reporter assay and analyzing the expression of NFκB target genes by quantitative polymerase chain reaction. Differences between groups were analyzed by using the Mann-Whitney *U* test and the unpaired two-tailed Student's *t* test.

**Results:** We detected ten missense variants in the TLR10 gene and focused on the I473T substitution based on allele frequencies and the predicted functional impact. I473T variant is not associated with susceptibility to RA, but it significantly correlates with erosive disease in patients seropositive for antibodies to citrullinated protein antigens ( $p = 0.017$  in the total cohort and  $p = 0.0049$  in female patients) and with a lower response to infliximab treatment as measured by the change in Disease Activity Score in 28 joints ( $p = 0.012$ ) and by the European League Against Rheumatism criteria ( $p = 0.049$ ). Functional studies showed that TLR10 reduced activation of the NFκB inflammatory pathway in hematopoietic cells, whereas the I473T variant lacked this inhibitory capacity. Consistently, after exposure to infliximab, cells expressing the I473T variant showed higher NFκB activity than cells carrying wild-type TLR10.

**Conclusions:** A TLR10 allelic variant, I473T, has impaired NFκB inhibitory activity and is highly associated with disease severity and low response to infliximab in patients with RA.

**Keywords:** TLR10 variant, NFκB, Rheumatoid arthritis, Infliximab

\* Correspondence: fluna@humv.es

<sup>†</sup>Equal contributors

<sup>2</sup>Unidad de Genética, Hospital Universitario Marques de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Avenida Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized mainly by chronic inflammation of the synovial lining and Th1 activation, which lead to progressive joint destruction. It has been suggested that viruses and bacteria may contribute to initiation or exacerbation of RA by binding to Toll-like receptors (TLRs) [1, 2].

TLRs belong to a family of transmembrane proteins that constitute one of the primary defense mechanisms in infectious and some noninfectious diseases in mammals [3]. Inappropriate activation of TLR-mediated pathways has been implicated in the loss of self-tolerance, leading to autoimmunity and chronic inflammation [4, 5]. TLRs are type I transmembrane glycoproteins with extracellular leucine-rich repeats (LRRs) and an intracellular Toll/interleukin (IL)-1 receptor (TIR) homology domain [6]. Signaling by TLRs involves interaction with TIR domain-containing adaptors, including MyD88, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF), TRIF-related adapter molecule (TRAM), TIR-related adapter protein (TIRAP), and sterile alpha and TIR motif-containing protein 1 (SARM1) [7]. These interactions promote nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF $\kappa$ B) activation, among other functions. TLR-dependent activation of NF $\kappa$ B drives the production of proinflammatory chemokines, cytokines, and cell adhesion molecules [7, 8]. There is increasing evidence that NF $\kappa$ B is a major, if not the main, transcription factor controlling inflammation [9].

TLR10 remains the only orphan member among the human TLRs because its ligands remain unknown and there are discordant data about its function [10, 11]. The expression of TLR10 has been reported mainly in B cells, dendritic cells, eosinophils, neutrophils, and non-immune cells such as trophoblasts [11–14]. In mammals, TLR10, TLR1, and TLR6 share a common locus on chromosome 4p14 and are structurally similar to one another [11]. Despite interacting with MyD88 [11], TLR10 differs from other TLRs by the lack of a classic downstream signaling pathway [15]. Phylogeny supports the idea that TLR10 arose before the gene duplication that generated TLR1 and TLR6 [16, 17]. TLR1 and TLR6 are able to form a protein complex with TLR2 and TLR10 [11, 14], although the individual contribution of each protein to the function of the complex is largely unknown.

Genetic variants in TLR family members have been associated mainly with disease susceptibility in patients with RA with variable levels of significance and even discordant results [18–21]. In a previous study, researchers investigated the association between TLR10 variants and RA susceptibility, but no statistical significance was found [20]. Although single-nucleotide variants of the

*TLR10* gene have been associated with other autoimmune [22] and tumor [23] diseases, the functional activity of this protein and the clinical significance of its gene variants are still controversial [11, 24].

In this article, we report that TLR10 is able to inhibit NF $\kappa$ B signaling in hematopoietic cells, which may limit the activation of this transcription factor that is involved in many chronic inflammatory disorders, including RA. We analyzed the association of a missense variant of TLR10, I473T, with RA and show that this amino acid substitution in an LRR domain gives rise to a protein lacking the NF $\kappa$ B inhibition activity that is associated with more severe disease and lower response to infliximab.

## Methods

### Samples

In this work, we included two cohorts of patients with RA, a first cohort of 453 unselected patients followed at Hospital Universitario Marques de Valdecilla (Santander, Spain) and Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain), and a second one of 1201 patients recruited by the Immune-Mediated Inflammatory Disease Consortium (Spain) [25]. Clinical information, including demographic data, disease characteristics, and treatments, are summarized in Table 1. All patients were diagnosed according to the American College of Rheumatology classification criteria [26]. As a control population, 1702 healthy individuals from the same genetic background were also genotyped [27]. All control individuals had been screened for the presence of an autoimmune disease or a family history of autoimmune disorders, and excluded in case of a positive result.

### Cell lines

K562 and U937 cells were maintained in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Paisley, UK) supplemented with 10 % FBS (Lonza, Verviers, Belgium). The medium was replaced every 2–3 days.

### Sequencing analysis

By next-generation sequencing (NGS), the coding exons and flanking regions of the *TLR10* gene were sequenced in 66 selected patients with severe RA, rheumatoid factor and/or antibodies to citrullinated protein antigens (ACPA) positivity, erosive disease, and resistance to at least one disease-modifying antirheumatic drug, as well as in 30 healthy control subjects. DNA libraries were processed for hybrid enrichment using a custom Nimblegen SeqCap EZ design (Roche Sequencing, Basel, Switzerland) containing the coding sequences of *TLR10*. Then, double-barcoded libraries were sequenced by using a MiSeq NGS platform (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequencing reads were aligned against the human reference genome (hg19) using BWA [28] with the

**Table 1** Main features of two cohorts of patients with rheumatoid arthritis

	Cohort I (n = 453)	Cohort II (n = 1201)
Females, %	73.1	76.8
Mean age, years	65.6 ± 14.5 <sup>a</sup>	46.5 ± 14.5 <sup>a</sup>
Duration of follow-up, months	123.8 ± 91.5 <sup>a</sup>	171.6 ± 123.6 <sup>a</sup>
Extraarticular manifestations, %	22.2	–
Presence of joint damage, %	–	100
RF-positive, %	64.8	74.6
ACPA-positive, %	62.2	74.1
Number of previous DMARDs	2.2 ± 1.5 <sup>a</sup>	1.7 ± 1.5 <sup>a</sup>
Number of previous biologic therapies	1.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.9 <sup>a</sup>

**Abbreviations:** RF Rheumatoid factor, DMARDs Disease-modifying antirheumatic drugs, ACPA Antibodies to citrullinated protein antigens

<sup>a</sup>Mean ± SD

default parameters. Several tools (SAM, GATK, Picard) for manipulating alignments, including sorting, merging, and indexing the BAM files, were used. Single-nucleotide variant and indel calling was performed using GATK Unified Genotyper [29]. Variants were annotated using snpEff, and association studies were performed using Plink software [30].

For Sanger sequencing, DNA was extracted from whole blood by using the QIAamp DNA blood kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and amplified with primers for human TLR10: 5'-CATGGCCAGAACTGTGGTC-3' and 5'-ACCATCCAACCATCATGACC-3'. Sequence analysis of amplified fragments was carried by using a genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The possible potential impact of an amino acid change on the encoded protein functions was assessed by using two different genomic programs: Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT), which uses evolutionary information from homologous proteins [31], and SNPs3D, based on both the structure and a sequence-based method that employs a multiple sequence alignment to build a sequence profile [32].

#### Single-nucleotide polymorphism analysis

TLR10 variant I473T (rs11466657) was analyzed in an independent cohort of 1201 patients with RA and 1493 healthy control subjects using the TaqMan<sup>®</sup> genotyping platform (assay identifier C\_25643390\_30; Applied Biosystems). All polymerase chain reactions (PCRs) and

**Table 2** Sixteen allele variants of the *TLR10* gene found by next-generation sequencing in control and rheumatoid arthritis populations

Reference SNP ID	Reference allele	Alternative allele	MAF	p Value	AA change	Functional class	SIFT prediction	SNPs3D prediction
rs10776482	A	G	0.29	0.2306	D809	Silent	nr	nr
rs4129008	C	T	0.01	0.5652	R799Q	Missense	–	–
rs4129009	T	C	0.271	0.1889	I775V	Missense	–	–
rs10776483	A	G	0.302	0.3296	H724	Silent	nr	nr
rs11466658	G	A	0.026	0.1599	R525W	Missense	–	–
rs11466657	A	G	0.089	0.04327	I473T	Missense	+	+
rs11096955	T	G	0.422	0.07296	I369L	Missense	–	–
rs11096956	C	A	0.292	0.3918	P344	Silent	nr	nr
rs11466653	A	G	0.026	0.5824	M326T	Missense	–	nr
rs11466652	T	C	0.13	0.1403	K303	Silent	nr	nr
rs11466651	C	T	0.026	0.5824	V298I	Missense	–	–
rs11096957	T	G	0.438	0.015	N241H	Missense	–	–
rs11466650	A	G	0.0005	0.137	L167P	Missense	+	+
rs11466649	C	A	0.026	0.5824	A163S	Missense	–	–
rs10856837	C	T	0.026	0.5824	T37	Silent	nr	nr
rs10856838	A	T	0.146	0.5813	I13	Silent	nr	nr

**Abbreviations:** MAF Minor allele frequency, + Damaging change, – No damaging change, nr No records, SNP Single-nucleotide polymorphism

endpoint fluorescence readings were performed using an ABI PRISM 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems). The genotyping error was estimated by genotyping 20 % of samples in duplicate (error <1 %) [33].

**Transfections and gene reporter assays**

TLR10 complementary DNA (cDNA) was cloned into a pCMV6 vector (OriGene, Rockville, MD, USA). The I473T variant was generated by site-directed mutagenesis using the QuikChange mutagenesis kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with the following primers: 5'-GGCCTTACGAGAACTAAATACTGCATTTAATTTCTAACTGATC-3' and 5'-GATCAGTTAGAAAAT TAAATGCAGTATTTAGTTCTCGTAAGGCC-3'. The modified insert was sequenced to verify the mutation. K562 and U937 cells were cotransfected with 2 µg of wild-type or mutant TLR10 constructs, 1 µg of reporter plasmid pBVIx-Luc, containing six tandem repeats of the NFκB recognition sites within the promoter region linked to the luciferase gene [34] and 0.2 µg of respiratory syncytial virus-β-galactosidase plasmid (pRSV-β-gal) by using Lipofectamine 2000 reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 24 h of transfection, cell viability was greater than 80 %. Then, K562 and U937 cells were incubated with 10 ng/ml and 20 ng/ml tumor necrosis factor-α (TNFα) in the presence or absence of 200 µg/ml infliximab, and, after 24 h, cell extracts were prepared and analyzed to measure relative luciferase activity by using a dual-light reporter gene assay system (Applied Biosystems). Results were normalized for transfection efficiency with values obtained with pRSV-β-gal.

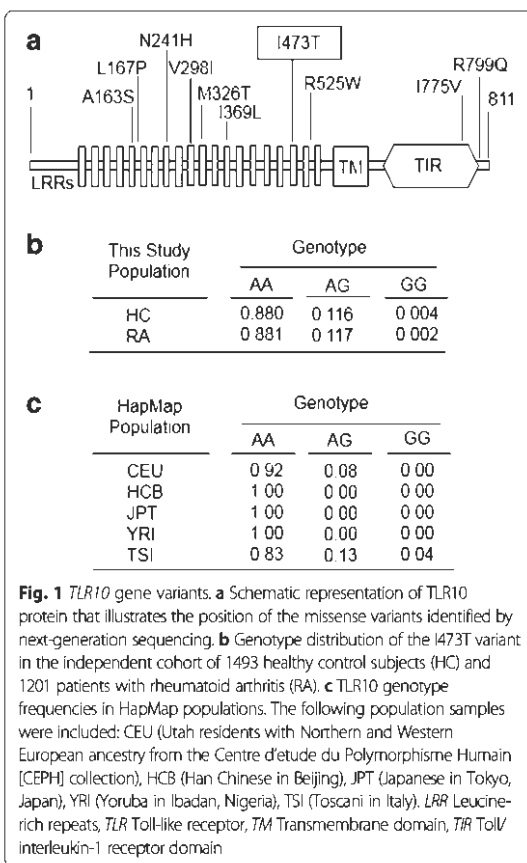
**Expression analyses of NFκB target genes**

To assess the expression of individual genes, cDNA was generated and amplified by using primers for human TNFα (5'-CAATGGCGTGGAGCTGAGAG-3' and 5'-GGCTGATGGTGTGGGTGAGG-3'), chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) (5'-CTCGCTCAGCCAGATGCAAT-3' and 5'-GTCTTCGGAGTTTGGGTTTGC-3'), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (5'-GAGCTGAAGCAGATGCAGGAC-3' and 5'-TGACG GAGTTGCCACTTGACT-3'), and β-actin (5'-GCTG CCTCAACACCTCAAC-3' and 5'-GATGGAGTTGAA GGTAGTTTTCGTG-3'). Quantitative real-time PCR was performed using the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The ratio of the abundance of differentiation markers to that of β-actin transcripts was calculated as 2<sup>n</sup>, where n is the threshold cycle value of β-actin minus the threshold cycle value of the corresponding messenger RNA (mRNA) and normalized by the value of the sample with the lowest expression level of these genes. The specificity of the

desired PCR products was determined by performing melting curve analysis.

**Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using the SPSS 20 software program (IBM, Armonk, NY, USA) and the R statistical software package (version 3.2.0). Differences in categorical variables between groups of patients were compared using Fisher's exact test. Statistical significance between groups in in vitro analyses was determined by using an unpaired, two-tailed Student's t test or the Mann-Whitney U test. The significance level was set at p < 0.05. Genetic association analyses were performed using linear and logistic regression models. The significance of the β regression coefficient was determined using the Wald test. As described previously, covariates in these genetic analyses included the years of disease evolution and the basal Disease Activity Score in 28 joints (DAS28) for the association of rs11466657 genotype with the level of joint damage [33] and the change in DAS28 at 12 weeks [35], respectively.



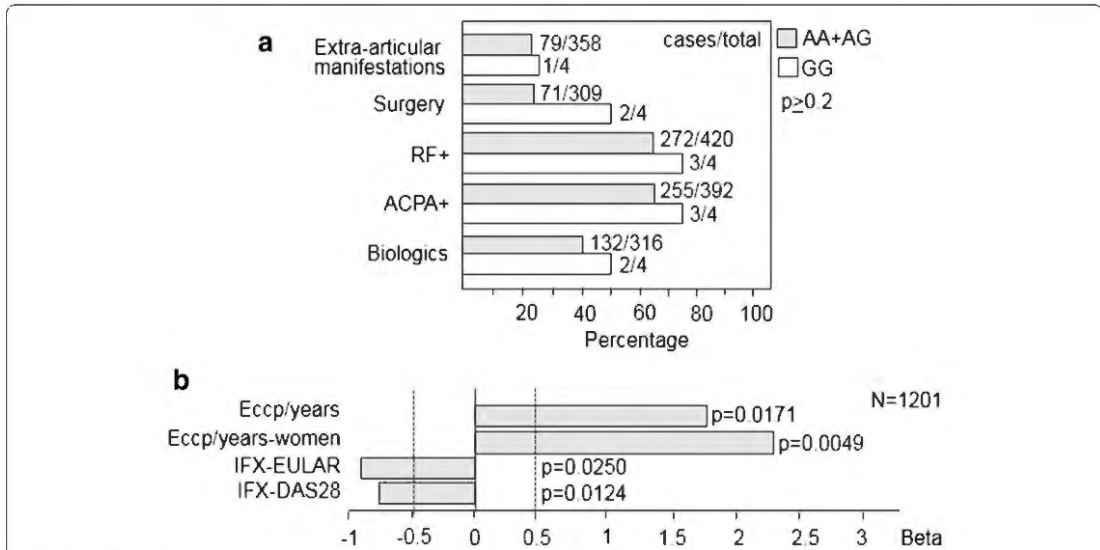
**Results**

**I473T variant is associated with disease severity and treatment response in patients with RA**

The function of TLR10 is controversial, and its association with RA has been poorly studied. In order to assess whether TLR10 variants contribute to modifying the course of the disease in patients with RA, we sequenced the coding exons of the *TLR10* gene in 66 selected patients with RA and 30 healthy control subjects. After filtering bases having at least 30x sequence coverage, 16 variants were identified (Table 2). The power to detect genetic effects depends to a great extent on the minor allele frequency (MAF) of the risk allele tested. Ten of the sixteen variants filtered corresponded to missense changes, which are located mainly in LRR domains (Fig. 1a); of these, only two, I473T and L167P, were predicted by using the SIFT and SNPs3D programs to have a functional impact on the protein. The MAF of the L167P variant was less than 0.1 %, whereas the MAF of I473T was about 9 %. Thus, we decided to focus on the I473T variant for clinical association studies.

First, we studied a population of 453 patients and found that the genotype frequencies (86.6 % AA, 11.9 % AG, 1.5 % GG) were not significantly different from those in a population of 209 control subjects (84.5 %

AA, 14.3 % AG, 1.2 % GG). This result was confirmed by analyzing the largest genome-wide association study (GWAS) meta-analysis performed to date, which included 29,880 RA cases and 73,758 control subjects [36]. Using the available summaries for the GWAS data in the Caucasian European population, we found no association between the I473T variant and RA susceptibility ( $p = 0.26$ ). We then analyzed a number of clinical findings in the patient population associated with disease severity, including the presence of typical RA autoantibodies, extraarticular manifestations, and the need for specific biologic treatments and surgery. Although differences between AA + AG and GG genotypes did not reach statistical significance ( $p \geq 0.2$ ), all five clinical criteria showed the same tendency associated with more severe disease only in GG genotype carriers (Fig. 2a). To strengthen this observation, we studied a larger cohort of 1201 patients with RA and 1493 healthy control subjects. As previously observed, the genotype distribution was found to be similar in both patient and control populations (Fig. 1b), which is consistent with the genotypes described for the European population in the HapMap database (Fig. 1c). Interestingly, as shown in Fig. 2b, the I473T variant is highly associated with erosive disease in ACPA-positive patients with RA ( $p = 0.017$  in the total



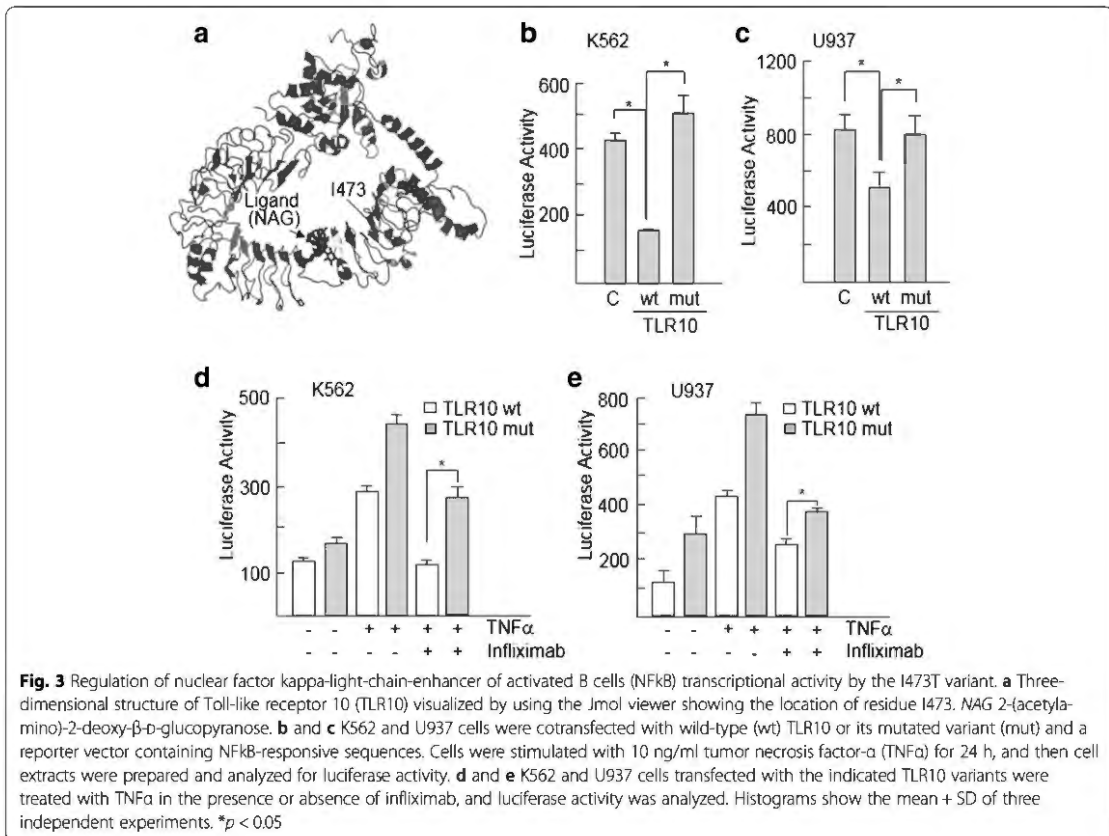
**Fig. 2** Association of the I473T variant with disease severity in patients with RA. **a** Frequency of clinical parameters associated with severity in AA + AG and GG genotypes in a cohort of 453 patients. Differences were analyzed with the Fisher’s exact test. RF+ Positive for (high levels of) rheumatoid factor, ACPA+ Seropositive for antibodies to citrullinated protein antigens. **b** Disease severity associated to the G allele in 1201 patients with RA. The  $\beta$  value (regression coefficient), used to evaluate the effect of I473T variant (genetic risk), was estimated for a number of clinical findings. A positive regression coefficient means that the variant increases risk. Dotted lines indicate cutoff values. Clinical parameters were categorized as binary variables. Significance of the  $\beta$  value was determined by using the Wald test. Eccp/years Association with erosions in ACPA+ patients including the years of disease evolution; Eccp/years-women Association with erosions in ACPA+ female patients including the years of disease evolution, IFX-EULAR Association with response to infliximab (European League Against Rheumatism response criteria: moderate/good vs none), IFX-DAS28 Association with change in Disease Activity Score in 28 joints in patients treated with infliximab

cohort and  $p=0.0049$  in female patients) and with a lower response to infliximab treatment as measured by the change in DAS28 score ( $p=0.012$  in the total cohort) as well as by the European League Against Rheumatism response criteria ( $p=0.025$  in the total cohort), which indicate that this variant is represented in a group of patients with more severe disease.

**Variant I437T modifies the NFkB regulatory capacity of TLR10**

On the basis of a three-dimensional structure model visualized by using the Jmol viewer (Fig. 3a), we found that position 437 is within a  $\beta$ -strand in the LRR18 domain and is occupied by an isoleucine, a highly hydrophobic amino acid, buried inside the protein core. This position is occupied by hydrophobic amino acids in TLR10 (Ile), TLR2 (Ile), and TLR1 (Val), which belong to the same subfamily of TLRs that are located at the cell membrane and dimerize with each other [37]. In the TLR10 variant, isoleucine is substituted by threonine, a polar amino acid that may participate in hydrogen bonds and is usually located at the protein surface. LRR domains provide an outstanding framework for achieving

diverse protein interactions. Thus, this structural change decreases hydrophobic contacts and may alter functionally relevant protein-protein interactions. TLR family members are known to be regulators of the NFkB activity, a key pathway in inflammation. To experimentally prove the functional consequences of the I437T variant on the activation of NFkB, we introduced the codon-altering nucleotide in a construct containing TLR10 cDNA by site-directed mutagenesis and studied the capacity of this variant to modify the NFkB transcriptional activity. As shown in Fig. 3b and c, wild-type TLR10 downregulates the transcriptional activity of NFkB after stimulation with an inflammatory cytokine, TNF $\alpha$ , in K562 and U937 hematopoietic cell lines, which are widely used to study NFkB activation [38]. However, the I437T substitution blocks the inhibition capacity of TLR10. In order to translate the reduced response to infliximab in patients to our in vitro model, we stimulated cells with TNF $\alpha$  in the presence or absence of infliximab. Consistently, cells expressing the I437T variant had a higher level of NFkB activity remaining after treatment with infliximab than cells expressing the wild-type variant (Fig. 3d, e). Next, we confirmed this result



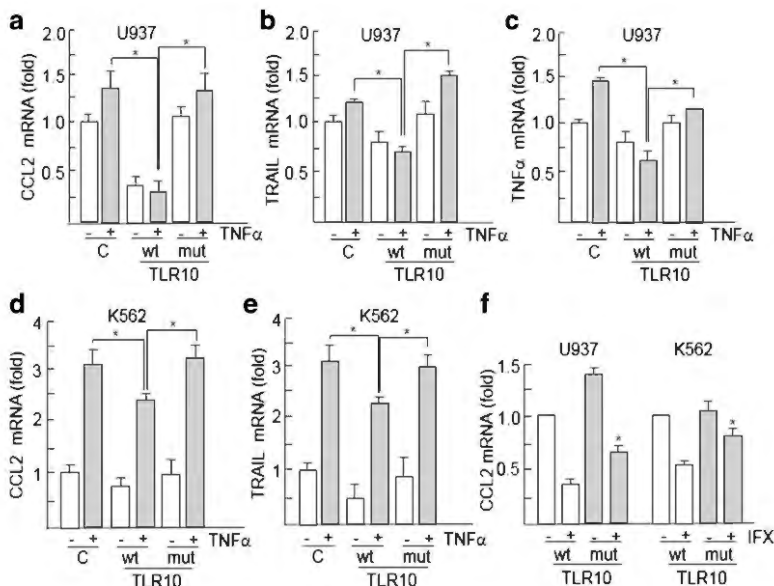
by analyzing the expression of NFkB target genes. The expression levels of CCL2, TRAIL, and TNF $\alpha$  were downregulated in the presence of wild-type TLR10 following stimulation of the NFkB pathway with TNF $\alpha$  (Fig. 4a–e). In line with our previous results, downregulation of NFkB target genes was abrogated when U937 and K562 cells were transfected with the variant-containing construct and cultured with TNF $\alpha$  (Fig. 4a–e). Moreover, gene expression also confirmed that the TLR10 variant slightly reduced the response of TNF $\alpha$ -activated cells to infliximab (Fig. 4f). Overall, the in vitro data show that the I437T variant abrogates the NFkB inhibition activity of TLR10 and displays a weak but consistent resistance to the anti-inflammatory effects of infliximab.

**Discussion**

Deciphering the mechanisms that regulate the activity of NFkB is of major importance for understanding the response to inflammatory stimuli. TLRs have been suggested to be implicated in responses to pathogens in RA [39]. Nowadays, TLR10 is the only member of the TLR family without a well-defined biological function. In this study, we show that TLR10 displays NFkB inhibitory activity in hematopoietic cells following treatment with

inflammatory stimuli. Researchers in several studies have described how TLR10 acts as a proinflammatory receptor activating NFkB signaling [11, 40]. Another study showed that TLR10 fails to activate typical TLR-induced signaling, including transcriptional activation mediated by NFkB or interferon- $\beta$  [15]. Recently, it has been shown that TLR10 is a modulator with mainly inhibitory effects [24]. In line with this, blocking TLR10 by antagonistic antibodies enhances proinflammatory cytokine production [10]. Also, evidence has been provided indicating that TLR10 induces apoptosis through activation of caspase-3 [18], which is consistent with the NFkB inhibitory activity of TLR10 because NFkB is an antiapoptotic transcription factor. These contradictory results may be due to the complexity of the modulatory effects of TLR10 that involve several mechanisms, including competition for ligands, heterodimerization with other TLRs, and activation of different signaling pathways.

On the basis of this information, the cell model used to study TLR10 may be relevant to evaluation of the functional activities of this receptor and should be taken into consideration when comparing different studies regarding the activities of TLR10. Researchers in several studies have investigated the role of TLR polymorphisms in RA, although the results obtained are controversial



**Fig. 4** Regulation of the levels of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFkB) target genes by the I437T variant. U937 and K562 cells were transfected with Toll-like receptor 10 (TLR10) (wild type [wt] or mutated variant [mut]) and then treated or not with 20 ng/ml tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) for 24 h. The expression of NFkB target genes chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) (a, d), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (b, e), and TNF $\alpha$  (c) were determined by performing quantitative real-time polymerase chain reactions. f Cells transfected with the indicated variants were treated with TNF $\alpha$  in the presence or absence of infliximab, and, 24 h later, the messenger RNA (mRNA) levels of CCL2 were determined.  $\beta$ -actin was used for normalization. C Cells transfected with empty vector as an additional control. Histograms show the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p$  < 0.05



[19–21, 41]. However, TLR10 genetic variants have not yet been associated with RA, but they have been associated with susceptibility to infectious and inflammatory diseases such as extrapulmonary tuberculosis and asthma [42, 43]. We found that the I473T variant significantly associates with the presence of ACPA and erosive disease, both in the total RA cohort and in female patients. It is well established that TNF $\alpha$  inhibitors help control disease activity. However, not all patients respond adequately to initial anti-TNF $\alpha$  treatment [44]. In line with this, we have demonstrated that patients with the I473T variant showed a significant lower response to infliximab, and this effect was also demonstrated *in vitro*. Thus, this TLR10 variant may be a good candidate marker of response to infliximab or other anti-TNF $\alpha$  treatment in patients with RA, which should be validated by replicating this study in other populations with different genetic backgrounds. Although there were no differences in genotype distribution between patients with RA and healthy control subjects, our data show that a TLR10 genetic variant selects a group of patients with a more severe and refractory disease. This variant has been described only in previous work associated with a decreased risk of meningioma [45]. The I473T variant leads to a reduced capacity of TLR10 to inhibit activation of NF $\kappa$ B in response to inflammatory stimuli. This effect may be explained by the amino acid change decreasing the hydrophobicity of an LRR domain, which may alter the interaction with TLR proteins needed for TLR10 signaling [37].

## Conclusions

Overall, our observations identify an allelic variant, I473T, in TLR10 that is significantly associated with more severe disease. Our data also indicate that the TLR10 variant lacks the capacity to inhibit NF $\kappa$ B transcriptional activity in hematopoietic cells and reduces the clinical and biological response to infliximab, which support the association between the I473T variant and disease outcome in patients with RA.

## Abbreviations

ACPA: Antibodies to citrullinated protein antigens; CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2; cDNA: Complementary DNA; CEU: Utah residents with Northern and Western European ancestry from the Centre d'etude du Polymorphisme Humain (CEPH) collection; DAS28: Disease Activity Score in 28 joints; DMARD: Disease-modifying antirheumatic drug; GWAS: Genome-wide association study; HC: Healthy control subjects; HCB: Han Chinese in Beijing; IFX-EULAR: Association with response to infliximab based on European League Against Rheumatism response criteria; IFX-DAS28: Association with change in Disease Activity Score in 28 joints in patients treated with infliximab; JPT: Japanese in Tokyo, Japan; LRR: Leucine-rich repeat; MAF: Minor allele frequency; mRNA: Messenger RNA; NAG: 2-(Acetylamino)-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose; NF $\kappa$ B: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NGS: Next-generation sequencing; nr: No records; PCR: Polymerase chain reaction; pRSV- $\beta$ -gal: Respiratory syncytial virus- $\beta$ -galactosidase plasmid; RA: Rheumatoid arthritis; RF: Rheumatoid factor; SARMI: Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1; SIFT: Sorting

Intolerant from Tolerant; SNP: Single-nucleotide polymorphism; TIR: Toll/interleukin-1 receptor; TIRAP: TIR-related adapter protein; TLR: Toll-like receptor; TM: Transmembrane domain; TNF: Tumor necrosis factor; TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand; TRAM: TRIF-related adapter molecule; TRIF: Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ; TSI: Toscani in Italy; wt: Wild type; YRI: Yoruba in Ibadan, Nigeria

## Acknowledgements

We thank members of the Spanish Immune-Mediated Inflammatory Disease Consortium for helpful discussions.

## Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spanish Ministry of Science and Innovation grant PI11/02012, Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer grant RD12/0036/0022, Sociedad Española de Reumatología grant FER13/13, and Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL) grant APG-03. IV is funded by Programa Ramón y Cajal, Ministerio de Economía y Competitividad, Spain.

## Availability of data and materials

Not applicable.

## Authors' contributions

JLFL and VMT conceptualized and designed the study with input from MLH, IV, and AB. AJ and PM performed the statistical analysis. ST performed the *in vitro* experiments. SM, AFN, and FB abstracted data from the Spanish Immune-Mediated Inflammatory Disease Consortium. JLFL and ST prepared the first draft of the manuscript. All authors contributed to interpretation of the results and were involved in critical review of the data as well as revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

AB, SM, AFN, FB, and VMT are consultants of several pharmaceutical companies. The other authors declare that they have no competing interests.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the research ethics committees from the participating hospitals, the clinical research ethics committee at Hospital Universitario Marques de Valdecilla (Santander, Spain), the clinical research ethics committee at Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain), and the Immune-Mediated Inflammatory Disease Consortium (Spain). Informed consent was obtained from all subjects.

## Author details

<sup>1</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Marques de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Avenida Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain. <sup>2</sup>Unidad de Genética, Hospital Universitario Marques de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Avenida Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain. <sup>3</sup>Rheumatology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, 08035 Barcelona, Spain. <sup>4</sup>Gerencia Atención Primaria, Servicio Cántabro de Salud, 39011 Santander, Spain. <sup>5</sup>Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Universidad de Cantabria-CSIC, 39011 Santander, Spain. <sup>6</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain. <sup>7</sup>Unidad de Reumatología, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, Hospital Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, 29010 Málaga, Spain. <sup>8</sup>Departamento de Reumatología, Hospital Universitario A Coruña, 15006 A Coruña, Spain. <sup>9</sup>Sección de Inmunología, Hospital Universitario Marques de Valdecilla-Instituto de Investigación Valdecilla (IDIVAL), Avenida Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain. <sup>10</sup>Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander, Spain.

Received: 15 April 2016 Accepted: 6 September 2016

Published online: 04 October 2016

## References

- Iwahashi M, Yamamura M, Aita T, Okamoto A, Ueno A, Ogawa N, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on CD16<sup>+</sup> blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(5):1457–67.
- Pierer M, Reithage J, Seibl R, Lauener R, Brentano F, Wagner U, et al. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands. *J Immunol*. 2004;172(2):1256–65.
- Gdor I, Zhu J, Loevsky B, Smolensky E, Friedman N, Sheves M, et al. Investigating excited state dynamics of salixalinanthin and xanthorhodopsin in the near-infrared. *Phys Chem Chem Phys*. 2011;13(9):3782–7.
- Wagner H. Endogenous TLR, ligands and autoimmunity. *Adv Immunol*. 2006;91:159–73.
- Deighton K, Batterham RL, Stensel DJ. Appetite and gut peptide responses to exercise and calorie restriction: the effect of modest energy deficits. *Appetite*. 2014;81:52–9.
- Ulevitch RJ. Therapeutics targeting the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):512–20.
- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):353–64.
- Drexler SK, Foxwell BM. The role of Toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(4):506–18.
- Abu-Soud HM, Wu C, Ghosh DK, Stuehr DJ. Stopped-flow analysis of CO and NO binding to inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 1998;37(11):3777–86.
- Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschuuren IC, et al. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(42):E4478–84.
- Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*. 2005;174(5):2942–50.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Tadesse S, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 2002;168(9):4531–7.
- Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, et al. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*. 2003;171(8):3977–82.
- Mulla MJ, Myrtolli K, Tadesse S, Stanwood NL, Garipey A, Guller S, et al. Cutting-edge report: TLR10 plays a role in mediating bacterial peptidoglycan-induced trophoblast apoptosis. *Am J Reprod Immunol*. 2013;69(5):449–53.
- Guan Y, Ranao DR, Jiang S, Mutha SK, Li X, Baudry J, et al. Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol*. 2010;184(9):5094–103.
- Abhishek A, Butt S, Gadsby K, Zhang W, Deighton CM. Anti-TNF- $\alpha$  agents are less effective for the treatment of rheumatoid arthritis in current smokers. *J Clin Rheumatol*. 2010;16(1):15–8.
- Zhou H, Gu J, Lamont SJ, Gu X. Evolutionary analysis for functional divergence of the Toll-like receptor gene family and altered functional constraints. *J Mol Evol*. 2007;65(2):119–23.
- Kuuliala K, Orpana A, Leirisalo-Repo M, Kautiainen H, Hurme M, Hannonen P, et al. Polymorphism at position +896 of the Toll-like receptor 4 gene interferes with rapid response to treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(9):1241–3.
- Radstake TR, Franke B, Hanssen S, Netea MG, Welsing P, Barrera P, et al. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum*. 2004;50(3):999–1001.
- Etem EO, Elyas H, Ozgocmen S, Yildirim A, Godekmerdan A. The investigation of Toll-like receptor 3, 9 and 10 gene polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int*. 2011;31(10):1369–74.
- Coenen MJ, Enevold C, Barrera P, Schijvenaar MM, Toonen EJ, Scheffer H, et al. Genetic variants in Toll-like receptors are not associated with rheumatoid arthritis susceptibility or anti-tumour necrosis factor treatment outcome. *PLoS One*. 2010;5(12):e14326.
- Requena T, Gazquez I, Moreno A, Batuecas A, Aran I, Soto-Varela A, et al. Allelic variants in TLR10 gene may influence bilateral affection and clinical course of Meniere's disease. *Immunogenetics*. 2013;65(5):345–55.
- Kutikhin AG. Association of polymorphisms in *TLR* genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway with cancer risk. *Hum Immunol*. 2011;72(11):1095–116.
- Stappers MH, Oosting M, Ioana M, Reimnitz P, Mouton JW, Netea MG, et al. Genetic variation in TLR10, an inhibitory Toll-like receptor, influences susceptibility to complicated skin and skin structure infections. *J Infect Dis*. 2015;212(9):1491–9.
- Avila-Pedretti G, Tornero J, Fernandez-Nebro A, Blanco F, Gonzalez-Alvaro I, Canete JD, et al. Variation at *FCGR2A* and functionally related genes is associated with the response to anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122088.
- 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.
- Julia A, Domenech E, Ricart E, Tomosa R, Garcia-Sanchez V, Gisbert JP, et al. A genome-wide association study on a southern European population identifies a new Crohn's disease susceptibility locus at *RBX1-EP300*. *Gut*. 2013;62(10):1440–5.
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754–60.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20(9):1297–303.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*. 2007;81(3):559–75.
- Ng PC, Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3812–4.
- Yue P, Li Z, Mouton J. Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J Mol Biol*. 2005;353(2):459–73.
- Lopez-Lasanta M, Julia A, Maymo J, Fernandez-Gutierrez B, Urena-Garnica I, Blanco FJ, et al. Variation at interleukin-6 receptor gene is associated to joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:242.
- Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem*. 2001;276(4):2551–4.
- Acosta-Colman I, Palau N, Tornero J, Fernandez-Nebro A, Blanco F, Gonzalez-Alvaro I, et al. GWAS replication study confirms the association of *PDE3A-SLCO1C1* with anti-TNF therapy response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2013;14(7):727–34.
- Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014;506(7488):376–81.
- Govindaraj RG, Manavalan B, Lee G, Choi S. Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling. *PLoS One*. 2010;5(9):e12713.
- Dai Y, Rahmani M, Pei XY, Dent P, Grant S. Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl-dependent and -independent mechanisms. *Blood*. 2004;104(2):509–18.
- Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med*. 1977;146(6):1585–602.
- Regan T, Nally K, Carmody R, Houston A, Shanahan F, Macsharry J, et al. Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol*. 2013;191(12):6084–92.
- Zheng B, Li Q, Wei C, Qin J, Shou T, Zhou R, et al. Lack of association of TLR4 gene Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with rheumatoid arthritis in Chinese Han population of Yunnan Province. *Rheumatol Int*. 2010;30(9):1249–52.
- Ma X, Liu Y, Gowen BB, Graviss EA, Clark AG, Musser JM. Full-exon resequencing reveals Toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One*. 2007;2(12):e1318.
- Lazarus R, Raby BA, Lange C, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Vercelli D, et al. *TOLL*-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(6):594–600.
- Alten R, van den Bosch F. Dose optimization of infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2014;17(1):5–18.
- Rajaraman P, Brenner AV, Neta G, Pfeiffer R, Wang SS, Yeager M, et al. Risk of meningioma and common variation in genes related to innate immunity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(5):1356–61.



## **4. DISCUSIÓN**



#### **4. DISCUSIÓN**

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica, especialmente relevante por su alta frecuencia (Carmona et al., 2002) y por las consecuencias socioeconómicas que provoca (Schoels et al., 2010). Se estima que tras 15 años de la aparición de la enfermedad, solo el 40% de los enfermos puede trabajar lo que supone un coste socioeconómico anual por paciente de más de 10.000 Euros (Lajas et al., 2003). Hasta la fecha, la falta de conocimiento exacto de la patogenia de la enfermedad hace que no exista un tratamiento eficaz que permita curarla. Sin embargo se sabe que esta patología comprende un fuerte componente genético (MacGregor et al., 2000). La identificación de genes que puedan influir en la susceptibilidad a padecer AR ha sido por tanto durante los últimos años uno de los principales retos de esta enfermedad. Mediante estudios de ligamiento y estudios de asociación, se han conseguido grandes avances en la identificación de genes potencialmente relevantes para su desarrollo. A excepción de casos puntuales en los que se ha visto una posible asociación, la regulación genética que contribuye al desarrollo de la enfermedad en estos pacientes permanece desconocida (Maksymowych and Brown, 2009).

Como se ha comentado anteriormente en esta Tesis, NFκB es posiblemente el principal modulador de las respuestas inmune e inflamatoria por lo que su papel en la AR, una enfermedad inflamatoria, podría ser clave. Diversos estudios han mostrado asociaciones previas que relacionan esta ruta con el posible desarrollo de la enfermedad (van Loo and Beyaert, 2011). Así, se ha demostrado que existe un aumento en la representación de genes implicados en la señalización de la vía NFκB en

el desarrollo de la AR, incluyendo CD40, TRAF1, TNFAIP3 y Rel, entre otros (Criswell, 2010) (Kurko et al., 2013) (Ruiz-Larranaga et al., 2016). Diversas variantes génicas de los genes reguladores de esta ruta, también se han asociado con enfermedades inflamatorias crónicas o síndromes auto-inflamatorios (Hoffjan et al., 2015) (Jurjus et al., 2016). Además, alteraciones en esta ruta de señalización han sido descritos en varios cánceres y enfermedades autoinmunes (Wang et al., 2014c). Variantes en IKK $\beta$  se asocian con cáncer colorectal (Seufert et al., 2013), linfoma y mieloma múltiple (Kai et al., 2014). En relación con la AR, nuestro grupo ha descrito otras variantes como la presente en el gen CARD8 asociada con una mayor severidad en aquellos pacientes portadores de la mutación (Fontalba et al., 2007). En este contexto, consideramos que el estudio de los genes implicados en la activación de la vía NF $\kappa$ B en el escenario de la AR, podría proporcionar información sobre los mecanismos patogénicos que median esta enfermedad así como dar la posibilidad de identificar nuevos marcadores pronósticos.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral aportan conocimiento acerca de nuevos posibles marcadores de gravedad y arrojan luz sobre los mecanismos reguladores de la ruta NF $\kappa$ B abriendo la posibilidad a desarrollar nuevos tratamientos que actúen de forma selectiva sobre los componentes de esta vía y que puedan por tanto influir en el desarrollo de la enfermedad.

Mediante técnicas de secuenciación de nueva generación, decidimos estudiar los principales genes implicados en la regulación de la vía NF $\kappa$ B en aquellos pacientes que presentaban un peor pronóstico para la AR ya que la probabilidad de encontrar en ellos una mutación

determinante es mayor. Se identificaron un total de 942 variantes génicas presentes en un total de 158 genes.

Dada la cantidad de información obtenida, decidimos seleccionar aquellas variantes que pudieran ser más relevantes a la hora de influir en el desarrollo de la patología mediante dos caminos que dieron lugar a los diferentes artículos que se han presentado en esta Tesis. Por un lado decidimos centrarnos en analizar cuáles de las variantes encontradas daban lugar a un truncamiento de la proteína y con ello a una posible modificación de su función. Consideramos este requisito una característica fundamental a la hora de iniciar nuestra selección ya que aquellos cambios que más probabilidad de afectar a la estructura y la función de la proteína presentan, son los que más interés suscitan a la hora de modificar la actividad NF $\kappa$ B y por tanto la respuesta inflamatoria que se genere en las personas portadoras de la mutación. Esta primera aproximación dio como resultado el primer artículo basado en el gen ASCC1.

Por otro lado, una vez estudiadas las variantes que afectaban más directamente a posibles cambios funcionales, decidimos centrarnos en analizar los genes que mayor relevancia en vista a la evidencia científica tenían en el sistema inmune y en el desarrollo de otras enfermedades inflamatorias incluyendo la propia AR. En este caso, bien por los resultados obtenidos en nuestro laboratorio o por los descritos en otros estudios, nos centrarnos en analizar las distintas variantes que obtuvimos para toda la familia de genes TLRs. Esto dio como resultado la publicación de los artículos 2 y 3 en los que encontramos dos variantes en los genes TLR10 y TLR8 asociadas con el pronóstico de esta enfermedad.



### *ASCC1*

Derivado del estudio de este gen, encontramos tres resultados interesantes descritos previamente en el artículo y que discutiremos a continuación.

Como primer resultado relevante describimos por primera vez el gen ASCC1 como un regulador negativo de la actividad transcripcional de NF $\kappa$ B, lo cual implicaría una menor respuesta inflamatoria. La información acerca de este gen en la literatura es escasa y poco clara. Parece ser que se trata de una subunidad de un complejo proteico que interacciona con factores de transcripción entre los que destaca NF $\kappa$ B, funcionando como un co-activador de la ruta. Sin embargo, tan solo dos artículos tratan de describir este complejo proteico (Jung et al., 2002) (Kim et al., 1999). Con respecto a ASCC1, solo existe un artículo donde se describe e incluso estudia su posible función en la ruta NF $\kappa$ B (Jung et al., 2002). En este artículo, a diferencia de nuestros resultados, se describe ASCC1 como un activador de la vía de señalización NF $\kappa$ B. Esta discrepancia en los resultados obtenidos en ambos casos puede estar basada en diferencias metodológicas a la hora de abordar el estudio.

En el caso del estudio realizado por Jung et al donde describen ASCC1 como un potencial activador, su resultado es fruto de un único experimento en el que mediante luciferasa se analiza la actividad de NF $\kappa$ B en células transfectadas con ASCC1 y con una variante mutada que provocaría la pérdida de función de este gen. Sus resultados muestran un aumento de la actividad transcripcional de NF $\kappa$ B de forma dosis dependiente a medida que aumenta la cantidad de ASCC1 transfectada a

las células. Vistos estos resultados, decidimos inicialmente corroborarlos en nuestro laboratorio y ante las discrepancias encontradas rebatir la información aportada. A continuación discutiremos varios aspectos que podría explicar las diferencias existentes entre ambos estudios así como apoyar los resultados obtenidos en nuestro laboratorio frente a los suyos.

En primer lugar, se lleva a cabo el estudio de la actividad NFκB únicamente bajo activación de la ruta, co-transfectando las células junto con el factor de transcripción p65, conocido activador de la ruta NFκB, como ya describimos anteriormente. Utilizar la sobreexpresión de p65 podría ser uno de los motivos por los que sus resultados parecen indicar un papel activador en ASCC1 ya que parece ser que este gen interacciona estrechamente con otras proteínas formando el complejo proteico descrito anteriormente, siendo dependientes unas de otras así como de los estímulos que las activan. Parece ser que p65 interacciona con estas proteínas, como bien se describe en el propio artículo, por lo que podría estar influyendo en el resultado final mediante la activación del complejo principal, conocido activador de la ruta NFκB, más que con el gen de estudio por separado. En vista a estos datos, para rebatir sus resultados decidimos realizar varios experimentos en los que estudiamos la actividad NFκB. En primer lugar decidimos replicar e intentar el mismo experimento realizado por Jung *et al*, aplicando diferentes concentraciones de ASCC1. En nuestro caso sin embargo, vimos como la actividad transcripcional de NFκB disminuye de forma dosis dependiente a diferencia de lo descrito por Jung *et al*. Por otra parte estudiamos también la actividad luciferasa en células sin estimular y estimuladas con dos de los activadores más conocidos de la ruta NFκB, el LPS y el TNF, obteniendo los mismos resultados que habíamos visto anteriormente.

Además de las técnicas de luciferasa, para apoyar nuestros resultados, estudiamos la expresión de citocinas pro-inflamatorias observando que efectivamente este gen provoca una menor producción de dichas proteínas.

En segundo lugar, cabe mencionar que en este artículo tan solo se realizan experimentos en una única línea celular. Para poder rebatir los datos ya publicados y dar fuerza a nuestros resultados, decidimos llevar a cabo nuestro estudio en cinco líneas celulares de diferentes tipos, incluidas las utilizadas por Jung *et al*, observando en todos los casos como la actividad NFκB parece disminuir en las células transfectadas con ASCC1.

Por último, cabe mencionar con especial atención que al comprobar el tipo de gen con el que estábamos trabajando, vimos la existencia en la actualidad de 4 posibles variantes descritas para el gen ASCC1. En nuestro caso trabajamos con la variante 1 de 2925 pb, mientras que para nuestra sorpresa, en el caso de Jung *et al*, parece que trabajan con la variante 2 del gen de 2644pb pudiendo esta versión acortada del gen estar afectando al dominio KH de la proteína induciendo un cambio conformacional que afecte a su función. Por lo tanto, puede que el hecho de estar trabajando con diferentes variantes que pueden afectar diferencialmente a la estructura y por tanto función de la proteína, sea uno de los motivos de la controversia encontrada entre los resultados obtenidos por ambos laboratorios.

El segundo resultado relevante para la Tesis, obtenido en este gen, lo encontramos al estudiar *in vitro* las consecuencias funcionales de la variante S78\* encontrada. En este caso, como ya comentamos previamente, para estudiar las variantes que pudieran ser más relevantes

para la patología, decidimos centrarnos en aquellas que pudieran afectar la actividad de la proteína. Como resultado de esta selección, vimos una mutación en el gen ASCC1, la variante S78\*. Nuestros resultados indicaron en este caso que la variante S78\* da lugar a una proteína truncada la cual parece perder los dominios funcionales lo que hace que ASCC1 pierda la capacidad de inhibir la actividad transcripcional de NFκB. Al igual que para demostrar la actividad del gen, se llevaron a cabo diversos estudios en los que comprobamos la actividad transcripcional de NFκB mediante luciferasa, la expresión de citocinas pro-inflamatorias tanto intracelulares como en el sobrenadante así como la unión de NFκB al ADN mediante EMSA. En todos los casos vemos como en aquellos modelos portadores de la mutación la capacidad inhibitoria de ASCC1 se perdía, haciendo por tanto que NFκB recuperase su actividad normal pudiendo dar lugar así a un mayor proceso inflamatorio.

Una vez comprobadas las consecuencias funcionales de la mutación decidimos comprobar si efectivamente se asociaba significativamente con la susceptibilidad o con un peor pronóstico en aquellos pacientes con AR. En primer lugar estudiamos la posible novedad del hallazgo ya que existen muy pocos estudios que relacionen a alguno de los componentes del complejo proteico al que pertenece ASCC1 con enfermedades. Hasta la fecha, en lo que a este gen se refiere, tan solo un artículo menciona una posible asociación en una variante de ASCC1, diferente a la encontrada en nuestro caso, en pacientes con adenocarcinoma esofágico y esófago de Barret (Orloff et al., 2011). La novedad por lo tanto de encontrar una variante que asocie este gen por primera vez con una enfermedad inflamatoria, junto con la posible afectación a nivel proteico, hizo que ampliáramos el estudio de este SNP

a una muestra mayor para analizar su posible papel en la AR. Los estudios estadísticos revelaron ausencia de asociación con susceptibilidad. Decidimos estudiar entonces la posible asociación de esta variable con el pronóstico de la enfermedad atendiendo a las características demográficas, actividad de la enfermedad, manifestaciones extra-articulares, autoanticuerpos, daño radiológico, necesidad de prótesis articulares, número de tratamientos recibidos, remisión de la enfermedad y muerte. Vimos entonces que esta variante se asociaba positivamente con un peor pronóstico de la enfermedad estando asociada a pacientes en los que la enfermedad se manifiesta de forma más severa. En concreto, los pacientes con AR portadores de esta mutación necesitan una mayor cantidad de FAMES y más pacientes portadores de este alelo necesitan ser tratados con tratamientos biológicos y con corticoides. Además, también comprobamos que otros dos criterios importantes para el pronóstico como son la remisión clínica y la presencia de ACPA variaban en los pacientes portadores de la mutación en comparación con los que no la presentaban.

A pesar de que el análisis estadístico mostró una asociación significativa en relación al número de FAMES que los pacientes portadores de esta mutación necesitan, el resto de variantes no parecen estar asociadas de forma significativa. Sin embargo, con los datos funcionales encontrados, nosotros creemos que dado que todos los análisis estadísticos parecen indicar la misma tendencia hacia un peor pronóstico y que esta variante según los estudios *in vitro* promueve la inflamación, la falta de significancia puede ser debida a una escasez tanto en el número de muestras como en el tipo de muestra. Este polimorfismo parece ser excepcionalmente raro por lo menos en la población europea, encontrando para nuestra cohorte de estudio que solo el 1,8% presentaban la variante

de estudio, por lo que consideramos que el hecho de obtener solo datos tendenciales debe tenerse en cuenta y más cuando todos ellos parecen inclinarse en una misma dirección ya que obtener significancia en un estudio estadístico de una “n” tan pequeña es muy complicado. Además de este bajo número muestral hay que tener en cuenta que no hemos podido realizar el estudio estadístico en pacientes que fueran homocigotos para la mutación ya que no pudimos encontrar ningún caso en nuestra cohorte, estando basados todos los análisis en pacientes heterocigotos. En función a estos datos, consideramos que este polimorfismo podría presentar una mayor fuerza estadística si se estudiara en una cohorte mayor de pacientes con AR en la que pudiera así mismo compararse tanto portadores heterocigotos para la mutación como homocigotos para ambos tipos genéticos obteniendo datos más claros que den fuerza al valor de esta variante no solo en la patología de la AR si no en otras patologías inflamatorias dado el papel que desempeña a nivel de la ruta NFκB.

Como ya comentamos anteriormente, la segunda aproximación que realizamos en esta Tesis a fin de seleccionar los datos que pudieran ser más importantes fue de acuerdo a la importancia de los genes desde un punto de vista biológico. Decidimos así centrarnos en estudiar la familia de genes TLRs.

Los TLRs constituyen una familia de proteínas transmembrana involucradas en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y ligandos endógenos. Su papel en la respuesta inmune es clave regulando la respuesta inflamatoria innata y la iniciación de la respuesta adaptativa (Takeda et al., 2003). Tras la unión a los PAMP, estos receptores se activan iniciando una cascada de transducción de

señales que termina en la activación de NFκB y la consiguiente producción de citocinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión (Drexler and Foxwell, 2010) (O'Neill and Bowie, 2007). Su activación ha sido implicada en la pérdida de tolerancia hacia lo propio conduciendo al desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Wagner, 2006).

En la AR, diversos estudios han indicado la asociación de múltiples variantes genéticas en estos receptores tanto a nivel de susceptibilidad como en el pronóstico de la enfermedad, sin embargo, los resultados obtenidos son variables (Enevold et al., 2010; Etem et al., 2011; Zheng et al., 2010).

En el trabajo de esta Tesis Doctoral obtuvimos un total de 100 polimorfismos asociados a la región codificante de los diez TLRs estudiados, desde el TLR1 hasta el TLR10. En el TLR1 observamos un total de 13 polimorfismos, habiendo 9 en el TLR2, 4 en el TLR3, 9 en el TLR4, 12 en el TLR5, 12 en el TLR6, 7 en el TLR7, 7 en el TLR8, 11 en el TLR9 y 16 en el TLR10. Dada la cantidad de información decidimos seleccionar aquellos polimorfismos que presentaran una mayor probabilidad de influir en el desarrollo de la enfermedad. Nos centramos en aquellas variantes que presentaban diferencias estadísticamente menores de 0,1 ( $p.\text{valor} \leq 0,1$ ) en la frecuencia del polimorfismo entre la población control y los pacientes con AR. De las 100 variantes iniciales, seleccionamos un total de seis, de las cuales nos centramos en aquellas que presentaban un posible impacto a nivel de la estructura proteica, junto con la posible relevancia de esas variantes en cuanto a la novedad que pudieran presentar en la AR.

Encontramos cuatro polimorfismos en cuatro genes diferentes que cumplieran los requisitos anteriores, la variante N248S en el TLR1, la Q11L en el TLR7, la M1V en el TLR8 y la variante I437T en el TLR10. Al igual que mencionamos anteriormente para ASCC1, decidimos estudiar estas cuatro variantes genéticas en una cohorte más amplia, a fin de confirmar una posible asociación con la AR. El estudio de asociación en esta nueva cohorte mostró que ninguno de los SNPs presenta diferencias significativas entre los pacientes con AR y los controles sanos indicando que ninguno de los casos está implicado en la susceptibilidad a AR. Decidimos estudiar entonces la posible asociación de estas variables con el pronóstico de la enfermedad atendiendo a los mismos parámetros aplicados para ASCC1. En función a estos resultados encontramos dos interesantes variantes presentes en los genes TLR8 y TLR10.

### ***TLR8***

En el caso de la variante M1V en el gen del TLR8, a pesar de mostrar una falta de asociación con susceptibilidad a padecer AR, estudios estadísticos de asociación con el pronóstico de la enfermedad mostraron que la variante está asociada con aquellos grupos de pacientes que presentan una enfermedad menos severa. Nuestros resultados mostraron que la presencia de la variante alélica M1V muestra una correlación tendencial con una menor presencia de autoanticuerpos, una menor necesidad de tratamientos biológicos así como una mayor remisión clínica en los pacientes portadores de esta mutación. Además de estos datos tendenciales, nuestros resultados indican que existe una asociación significativa entre la presencia de la variante y la necesidad de un menor



número de FAMES así como la necesidad de un menor número de tratamientos biológicos por parte de estos pacientes.

Numerosas variantes presentes en el gen TLR8 han sido asociadas con enfermedades autoinmunes como lupus, sin embargo no existe aún ninguna variable del TLR8 que haya sido asociada con la susceptibilidad a padecer AR. Hasta la fecha solo un polimorfismo ha sido asociado con el pronóstico de la AR (Lee et al., 2013).

En esta Tesis se describe por primera la asociación a un mejor pronóstico de la variante M1V en aquellos pacientes con AR portadores de la mutación. Aunque esta variante ya ha sido descrita y estudiada previamente en enfermedades inflamatorias sus resultados no son concluyente en cuando al papel que desempeña. Más de diez artículos han estudiado las posibles consecuencias de esta variante en diferentes enfermedades, viéndose que su papel es especialmente relevante en la tuberculosis donde la presencia de la variante se asocia principalmente con una disminución de la susceptibilidad (Sun et al., 2015) (Dalgic et al., 2011; Davila et al., 2008) y en lupus donde se asocia a un mayor riesgo (Wang et al., 2014a). Sin embargo, los resultados que se obtienen muestran controversia en cuando al posible papel protector o de riesgo de esta variable tanto entre diferentes enfermedades todas ellas inflamatorias como dentro de una misma enfermedad. Nuestros resultados acerca de una asociación a un mejor pronóstico de la variante M1V de TLR8 concuerdan con los de la investigación llevada a cabo por Oh *et al* donde describen como este genotipo confiere protección en paciente con VIH (Oh et al., 2008) ,así como el artículo de Davila *et al*, donde se asocia esta variante a una menor susceptibilidad a padecer tuberculosis (Davila et al., 2008).

Una vez vista su asociación estadística, decidimos estudiar las consecuencias funcionales de esta mutación. Consideramos que probablemente esta variante da lugar a un cambio conformacional de la proteína ya que altera el codón de inicio, convirtiendo el ATG en un GTG y haciendo que la proteína comience en la siguiente metionina, dando lugar a un péptido más corto y un TLR8 truncado que probablemente vea afectado su función normal. Diversos artículos apoyan esta teoría donde afirman que esta diferencia en la longitud podría afectar a la función de la proteína (Choo et al., 2005; Kozak, 1986; Wang et al., 2014b).

En vista a lo descrito previamente, decidimos estudiar el posible papel de esta mutación en la inflamación mediante experimentos *in vitro*. Nuestros resultados muestran como los pacientes portadores de la variante presentan una menor producción de citocinas pro-inflamatorias tras estimulación con su agonista en comparación con los portadores del genotipo *wild type*. Solo dos estudios han investigado el posible papel funcional de esta variante y de nuevo los resultados son variables. A diferencia del nuestro, uno de los estudios parece señalar un papel pro-inflamatorio de la variante indicando una activación de la ruta NFκB tras estimulación con su agonista (Wang et al., 2014b). El otro estudio, sin embargo, describe este receptor como un modulador negativo que da lugar a una disminución de la actividad transcripcional NFκB *in vitro*, mostrando además una menor producción de citocinas pro-inflamatorias (Benito et al., 2004).

En nuestro estudio concluimos que la variante M1V se asocia con un mejor pronóstico de la AR, además creemos que esta variante afecta a la función de la proteína. TLR8 es un conocido activador de la ruta NFκB,

por lo que esta mutación podría afectar a la actividad transcripcional NF $\kappa$ B, explicando así la menor producción de citocinas pro-inflamatorias dando lugar por tanto a una menor respuesta inflamatoria.

### ***TLR10***

En el caso de TLR10, los resultados de este estudio nos permitieron publicar el tercer artículo de esta tesis, en el que se describen tres hallazgos relevantes.

En primer lugar, al igual que anteriormente decidimos estudiar simplemente el papel de este gen en la ruta NF $\kappa$ B. En esta Tesis describimos a TLR10 como un posible inhibidor de la ruta NF $\kappa$ B en líneas hematopoyéticas tras tratarlas con estímulos inflamatorios indicando un posible papel inhibidor de la inflamación. Sin embargo, los estudios descritos previamente muestran cierta controversia al respecto. Hasta la fecha el papel a nivel funcional de este gen ha sido muy poco estudiado siendo el único miembro de la familia de los TLRs sin una función biológica claramente establecida. Algunos artículos describen un posible papel activador en los procesos inflamatorios. A nivel de regulación de la actividad transcripcional de NF $\kappa$ B, solo ha sido investigado en dos artículos y a diferencia de nuestros resultados, afirman que actúa como un receptor pro-inflamatorio activando la señalización NF $\kappa$ B (Hasan et al., 2005; Regan et al., 2013). No obstante, también existen artículos que describen como TLR10 falla al activar la ruta de señalización típica de los receptores tipo Toll (Guan et al., 2010). Apoyando nuestros resultados existen así mismo resultados que, a diferencia de los anteriores, muestran a TLR10 como un modulador con efectos inhibitorios (Stappers et al.,

2015). Además se ha descrito que el bloqueo de TLR10 aumenta la producción de proteínas pro-inflamatorias (Oosting et al., 2014). Otro dato que respalda nuestros resultados es el posible papel apoptótico de este gen ya que NFκB es un factor de transcripción antiapoptótico y por tanto la posible inhibición de su actividad por TLR10 podría explicar este aumento de la apoptosis (Kuuliala et al., 2006). Esta controversia en los resultados entre los datos recogidos anteriormente y los obtenidos en nuestra Tesis puede ser debida a varios motivos.

En primer lugar, TLR10 sigue siendo un TLR cuya estructura además de su función siguen sin estar claras (Hasan et al., 2005; Oosting et al., 2014). Se encuentra en la superficie de las células donde forma un complejo proteico con el TLR1 y el TLR6, sin estar clara la contribución de cada proteína al complejo. Así, esta controversia puede ser resultado de la compleja regulación a la que este gen es sometido, siendo hoy en día el único TLR que no parece activarse por la vía clásica de activación de los TLRs (Guan et al., 2010). Por otro lado, es el único TLR para el que no se conoce aún un ligando específico por lo que la estimulación específica no es posible. Por tanto, la discrepancia en los resultados obtenidos en cuando a la función que desempeña TLR10 a nivel de la activación transcripcional de NFκB entre nuestro laboratorio, donde trabajamos con células hematopoyéticas y los resultados obtenidos en otros laboratorios llevados a cabo en otros tipos celulares, pueden ser fruto de una diferente vía de señalización que pueda ser dependiente de línea celular.

Una vez estudiado el papel de este gen a nivel transcripcional así como su relevancia en la ruta NFκB, estudiamos la posible asociación de

la variante seleccionada con la AR. En este caso, aunque no encontramos diferencias significativas, en los pacientes portadores de la mutación, numerosas variables estudiadas presentaban diferencias con respecto a los pacientes que presentaban el TLR10 *wild type*. Encontramos que todos los pacientes homocigotos para la mutación presentaban un mayor número de manifestaciones extra-articulares así como una mayor presencia tanto de FR como de ACPA en comparación con los homocigotos para el alelo no mutado. Además se observó también una mayor necesidad de cirugía así como un mayor número de pacientes tratados con fármacos biológicos. Estos datos indicaron una clara tendencia hacia un peor pronóstico de la enfermedad en aquellos pacientes portadores de la variante. Pensamos que la falta de significancia en estos resultados podría ser consecuencia de una muestra pequeña por lo que decidimos ampliar el estudio a una cohorte mayor donde corroboramos que este polimorfismo se asociaba de forma fuertemente significativa a un peor pronóstico de la enfermedad. En este caso, vimos que aquellos pacientes portadores de la variante se asociaban positivamente con una mayor presencia de erosiones y además vimos que los pacientes portadores de la mutación tenían una menor respuesta al tratamiento con el fármaco infliximab.

En vista a estos datos estadísticos, decidimos comenzar experimentos *in vitro* a fin de evaluar tanto el efecto funcional de este cambio a nivel de la proteína como la respuesta *in vitro* al tratamiento con infliximab. Nuestros datos mostraron por primera vez que la variante I473T del gen TLR10 modifica la función del gen haciendo que el efecto inhibitorio de la actividad transcripcional NFκB se pierda, estando en estos pacientes aumentada la actividad NFκB así como la producción de citocinas pro-inflamatorias. Este efecto además es corroborado al estudiar

la estructura 3D de la proteína donde se observa la isoleucina en uno de los dominios LRR del TLR10, en el interior de un bolsillo formado por láminas beta. En este caso el SNP provoca un cambio de esta isoleucina, que es un aminoácido apolar, hidrofóbico, a una treonina, que a diferencia del anterior se trata de un aminoácido polar lo que disminuye la hidrofobicidad. Esto puede afectar a interacciones del TLR10 tanto con el ligando como con otras proteínas lo que refuerza los datos que observamos *in vitro* en los que efectivamente la variante provoca una pérdida de función del gen. Estos resultados describen así la primera variante de TLR10 que se asocia con el pronóstico de una enfermedad inflamatoria.

Dada la asociación significativa a una menor respuesta ante el fármaco infliximab, decidimos también probar *in vitro* la actividad transcripcional NFκB al tratar las células con dicho fármaco tras transfectarlas bien con el vector TLR10 *wild type* o bien con la variante. Confirmando los resultados observados en el análisis estadístico, parece que las células portadoras de la variante I473T presentan una menor respuesta al tratamiento. Como ya comentamos el tratamiento de la AR con fármacos inhibidores del TNF como puede ser el infliximab es una de las terapias más utilizadas hoy en día habiéndose descrito que no todos los pacientes responden adecuadamente al tratamiento (Alten and van den Bosch, 2014). Estas diferencias en la respuesta personal a los tratamientos aplicados se han visto en diferentes tipos de fármacos. En el caso del infliximab, no existe una explicación, pudiendo ser la presencia de este polimorfismo una posible causa.

En esta Tesis aportamos así conocimiento a cerca de una variante en el gen TLR10 que puede ser responsable de la menor respuesta ante fármacos biológicos como el infliximab en pacientes con AR. Además este fármaco es ampliamente utilizados en otras patologías inflamatorias como la enfermedad inflamatoria intestinal de Crohn (Pallone and Calabrese, 2016) por lo que hemos iniciado el estudio de este polimorfismo en pacientes con esta patología a fin de determinar si también en este caso se encuentran diferencias significativas que puedan asociar el polimorfismo a una menor respuesta al fármaco o un posible peor pronóstico de la enfermedad en estos pacientes también.

## **5. CONCLUSIONES**





## **5. CONCLUSIONES**

1. Se han identificado un total de 942 variantes génicas en 158 genes reguladores de la ruta NFκB en pacientes con AR.

2. De acuerdo a los criterios de selección, elegimos como relevantes las variantes génicas S78\* del gen ASCC1, I473T del gen TLR10, M1V del gen TLR8, N248S del gen TLR1 y Q11L del gen TLR7. Ninguna de ellas se asoció significativamente con la susceptibilidad a padecer AR.

3. Los estudios funcionales muestran por primera vez el gen ASCC1 como un regulador negativo de la actividad transcripcional de NFκB.

4. La variante S78\* da lugar a una proteína truncada que pierde los dominios funcionales.

5. La variante S78\* del gen ASCC1 está asociada positivamente con un peor pronóstico de la enfermedad. Pacientes con AR portadores de esta mutación necesitan un mayor número de FAMES y más pacientes necesitan ser tratados con tratamientos biológicos y con corticoides.

6. La variante génica M1V en el gen TLR8 está asociada significativamente con un mejor pronóstico de la AR. Los pacientes portadores de la mutación muestran una menor necesidad tanto del número de FAMES como del número de tratamientos biológicos.

7. La presencia de la variante M1V en el gen TLR8 muestra una reducción en la producción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a estimulación.
8. Se describe el gen TLR10 como un inhibidor de la ruta NFκB en líneas hematopoyéticas tras tratarlas con estímulos inflamatorios indicando un posible papel inhibidor de la inflamación.
9. La variante 1473T del gen TLR10 modifica su función haciendo que el efecto inhibidor de la ruta NFκB se pierda, mostrando los pacientes portadores de esta variante una mayor actividad transcripcional.
10. La variante 1473T del gen TLR10 está asociada significativamente con un peor pronóstico de la AR. Pacientes portadores de la mutación se asocian significativamente con una mayor presencia de erosiones así como una menor respuesta al tratamiento con el fármaco infliximab.
11. Estudios *in vitro* de la actividad transcripcional NFκB muestran en células hematopoyéticas una menor respuesta inhibitoria de la ruta NFκB al tratamiento con el fármaco infliximab.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., 3rd, Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., *et al.* (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism* 62, 2569-2581.

Alten, R., and van den Bosch, F. (2014). Dose optimization of infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *International journal of rheumatic diseases* 17, 5-18.

Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., McShane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S., *et al.* (1988). The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 31, 315-324.

Baeuerle, P.A. (1998). IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 95, 729-731.

Bali, D., Gourley, S., Kostyu, D.D., Goel, N., Bruce, I., Bell, A., Walker, D.J., Tran, K., Zhu, D.K., Costello, T.J., *et al.* (1999). Genetic analysis of multiplex rheumatoid arthritis families. *Genes and immunity* 1, 28-36.

Basak, S., Kim, H., Kearns, J.D., Tergaonkar, V., O'Dea, E., Werner, S.L., Benedict, C.A., Ware, C.F., Ghosh, G., Verma, I.M., *et al.* (2007). A fourth I kappa B protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* 128, 369-381.

Beg, A.A., Finco, T.S., Nantermet, P.V., and Baldwin, A.S., Jr. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Molecular and cellular biology* 13, 3301-3310.

Benito, M.J., Murphy, E., Murphy, E.P., van den Berg, W.B., FitzGerald, O., and Bresnihan, B. (2004). Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 50, 1781-1787.

Blanco-Morales, E.A., Bravo-Ferrer Acosta, J.M., Rubio Romero, E., Gil Gonzalez, E., and Gantes Pedraza, M.A. (2011). [Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: almost always or hardly ever?]. *Reumatologia clinica* 7, 407-411.

Bonizzi, G., and Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* 25, 280-288.

Brown, K.D., Claudio, E., and Siebenlist, U. (2008). The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 10, 212.

Carmona, L., Cross, M., Williams, B., Lassere, M., and March, L. (2010). Rheumatoid arthritis. Best practice & research Clinical rheumatology *24*, 733-745.

Carmona, L., Villaverde, V., Hernandez-Garcia, C., Ballina, J., Gabriel, R., and Laffon, A. (2002). The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. Rheumatology (Oxford) *41*, 88-95.

Claudio, E., Brown, K., and Siebenlist, U. (2006). NF-kappaB guides the survival and differentiation of developing lymphocytes. Cell death and differentiation *13*, 697-701.

Combe, B., Landewe, R., Lukas, C., Bolosiu, H.D., Breedveld, F., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J.M., Klareskog, L., *et al.* (2007). EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). Annals of the rheumatic diseases *66*, 34-45.

Criswell, L.A. (2010). Gene discovery in rheumatoid arthritis highlights the CD40/NF-kappaB signaling pathway in disease pathogenesis. Immunological reviews *233*, 55-61.

Chen, F.E., and Ghosh, G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. Oncogene *18*, 6845-6852.

Cheng, P., Zhang, Y., Huang, H., Zhang, W., Yang, Q., Guo, F., and Chen, A. (2015). Association between CCR6 and rheumatoid arthritis:



a meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine* 8, 5388-5396.

Choo, K.H., Tan, T.W., and Ranganathan, S. (2005). SPdb--a signal peptide database. *BMC bioinformatics* 6, 249.

Dalgic, N., Tekin, D., Kayaalti, Z., Cakir, E., Soylemezoglu, T., and Sancar, M. (2011). Relationship between toll-like receptor 8 gene polymorphisms and pediatric pulmonary tuberculosis. *Disease markers* 31, 33-38.

Davila, S., Hibberd, M.L., Hari Dass, R., Wong, H.E., Sahiratmadja, E., Bonnard, C., Alisjahbana, B., Szeszko, J.S., Balabanova, Y., Drobniowski, F., *et al.* (2008). Genetic association and expression studies indicate a role of toll-like receptor 8 in pulmonary tuberculosis. *PLoS genetics* 4, e1000218.

Deighton, C.M., Walker, D.J., Griffiths, I.D., and Roberts, D.F. (1989). The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clinical genetics* 36, 178-182.

Dejardin, E., Droin, N.M., Delhase, M., Haas, E., Cao, Y., Makris, C., Li, Z.W., Karin, M., Ware, C.F., and Green, D.R. (2002). The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17, 525-535.

Dieude, P., and Cornelis, F. (2005). Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 72, 520-526.

Drexler, S.K., and Foxwell, B.M. (2010). The role of toll-like receptors in chronic inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42, 506-518.

Edwards, J.C., and Cambridge, G. (1998). Rheumatoid arthritis: the predictable effect of small immune complexes in which antibody is also antigen. *British journal of rheumatology* 37, 126-130.

Edwards, J.C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M., and Shaw, T. (2004). Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 350, 2572-2581.

Enevold, C., Radstake, T.R., Coenen, M.J., Fransen, J., Toonen, E.J., Bendtzen, K., and van Riel, P.L. (2010). Multiplex screening of 22 single-nucleotide polymorphisms in 7 Toll-like receptors: an association study in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 37, 905-910.

Etem, E.O., Elyas, H., Ozgocmen, S., Yildirim, A., and Godekmerdan, A. (2011). The investigation of toll-like receptor 3, 9 and 10 gene polymorphisms in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology international* 31, 1369-1374.

Fontalba, A., Martinez-Taboada, V., Gutierrez, O., Pipaon, C., Benito, N., Balsa, A., Blanco, R., and Fernandez-Luna, J.L. (2007). Deficiency of the NF-kappaB inhibitor caspase activating and recruitment domain 8 in patients with rheumatoid arthritis is associated with disease severity. *J Immunol* 179, 4867-4873.

Gartlehner, G., Hansen, R.A., Jonas, B.L., Thieda, P., and Lohr, K.N. (2006). The comparative efficacy and safety of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *The Journal of rheumatology* 33, 2398-2408.

Gaujoux-Viala, C., and Gossec, L. (2014). When and for how long should glucocorticoids be used in rheumatoid arthritis? International guidelines and recommendations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1318, 32-40.

Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W., and Banerjee, A. (2006). Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 25, 6781-6799.

Ghosh, S., and Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 *Suppl*, S81-96.

Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* 16, 225-260.

Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680-6684.

Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2004). T-cell regulation in rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology* 16, 212-217.

Guan, Y., Ranao, D.R., Jiang, S., Mutha, S.K., Li, X., Baudry, J., and Tapping, R.I. (2010). Human TLRs 10 and 1 share common

mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* *184*, 5094-5103.

Guzman, M.L., Neering, S.J., Upchurch, D., Grimes, B., Howard, D.S., Rizzieri, D.A., Luger, S.M., and Jordan, C.T. (2001). Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* *98*, 2301-2307.

Hakala, M., Pollanen, R., and Nieminen, P. (1993). The ARA 1987 revised criteria select patients with clinical rheumatoid arthritis from a population based cohort of subjects with chronic rheumatic diseases registered for drug reimbursement. *The Journal of rheumatology* *20*, 1674-1678.

Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., *et al.* (2005). Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* *174*, 2942-2950.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* *18*, 2195-2224.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* *132*, 344-362.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* *26*, 203-234.

Hayden, M.S., West, A.P., and Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-6780.

Hoffjan, S., Okur, A., Epplen, J.T., Wieczorek, S., Chan, A., and Akkad, D.A. (2015). Association of TNFAIP3 and TNFRSF1A variation with multiple sclerosis in a German case-control cohort. *International journal of immunogenetics* 42, 106-110.

Hoffmann, A., Natoli, G., and Ghosh, G. (2006). Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* 25, 6706-6716.

Jung, D.J., Sung, H.S., Goo, Y.W., Lee, H.M., Park, O.K., Jung, S.Y., Lim, J., Kim, H.J., Lee, S.K., Kim, T.S., *et al.* (2002). Novel transcription coactivator complex containing activating signal cointegrator 1. *Molecular and cellular biology* 22, 5203-5211.

Jurjus, A., Eid, A., Al Kattar, S., Zeenny, M.N., Gerges-Geagea, A., Haydar, H., Hilal, A., Oueidat, D., Matar, M., Tawilah, J., *et al.* (2016). Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links. *BBA clinical* 5, 16-24.

Kai, X., Chellappa, V., Donado, C., Reyon, D., Sekigami, Y., Ataca, D., Louissaint, A., Mattoo, H., Joung, J.K., and Pillai, S. (2014). IkkappaB kinase beta (IKBKB) mutations in lymphomas that constitutively activate canonical nuclear factor kappaB (NFkappaB) signaling. *The Journal of biological chemistry* 289, 26960-26972.

Kalla, A.A., and Tikly, M. (2003). Rheumatoid arthritis in the developing world. *Best practice & research Clinical rheumatology* 17, 863-875.

Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annual review of immunology* 18, 621-663.

Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., and Li, Z.W. (2002). NF- $\kappa$ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews Cancer* 2, 301-310.

Kim, H.J., Yi, J.Y., Sung, H.S., Moore, D.D., Jhun, B.H., Lee, Y.C., and Lee, J.W. (1999). Activating signal cointegrator 1, a novel transcription coactivator of nuclear receptors, and its cytosolic localization under conditions of serum deprivation. *Molecular and cellular biology* 19, 6323-6332.

Kim, K.W., Kim, H.R., Kim, B.M., Cho, M.L., and Lee, S.H. (2015). Th17 cytokines regulate osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology* 185, 3011-3024.

Klareskog, L., Catrina, A.I., and Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373, 659-672.

Kochi, Y., Suzuki, A., and Yamamoto, K. (2014). Genetic basis of rheumatoid arthritis: a current review. *Biochemical and biophysical research communications* 452, 254-262.

Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283-292.

Kurko, J., Besenyei, T., Laki, J., Glant, T.T., Mikecz, K., and Szekanecz, Z. (2013). Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology* 45, 170-179.

Kuuliala, K., Kuuliala, A., Koivuniemi, R., Oksanen, S., Hamalainen, M., Moilanen, E., Kautiainen, H., Leirisalo-Repo, M., and Repo, H. (2015). Constitutive STAT3 Phosphorylation in Circulating CD4+ T Lymphocytes Associates with Disease Activity and Treatment Response in Recent-Onset Rheumatoid Arthritis. *PloS one* 10, e0137385.

Kuuliala, K., Orpana, A., Leirisalo-Repo, M., Kautiainen, H., Hurme, M., Hannonen, P., Korpela, M., Mottonen, T., Paimela, L., Puolakka, K., *et al.* (2006). Polymorphism at position +896 of the toll-like receptor 4 gene interferes with rapid response to treatment in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 65, 1241-1243.

Lajas, C., Abasolo, L., Bellajdel, B., Hernandez-Garcia, C., Carmona, L., Vargas, E., Lazaro, P., and Jover, J.A. (2003). Costs and predictors of costs in rheumatoid arthritis: a prevalence-based study. *Arthritis and rheumatism* 49, 64-70.

Lee, Y.H., Bae, S.C., and Song, G.G. (2013). Meta-analysis demonstrates association between TLR polymorphisms and rheumatoid arthritis. *Genetics and molecular research : GMR* 12, 328-334.

Lefevre, S., Knedla, A., Tennie, C., Kampmann, A., Wunrau, C., Dinser, R., Korb, A., Schnaker, E.M., Turner, I.H., Robbins, P.D., *et al.* (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature medicine* 15, 1414-1420.

Ma, C.S., and Deenick, E.K. (2014). Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunology and cell biology* 92, 64-71.

MacGregor, A.J., Snieder, H., Rigby, A.S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K., and Silman, A.J. (2000). Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis and rheumatism* 43, 30-37.

Makarov, S.S. (2001). NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis research* 3, 200-206.

Maksymowych, W.P., and Brown, M.A. (2009). Genetics of ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: where are we at currently, and how do they compare? *Clinical and experimental rheumatology* 27, S20-25.

Marok, R., Winyard, P.G., Coumbe, A., Kus, M.L., Gaffney, K., Blades, S., Mapp, P.I., Morris, C.J., Blake, D.R., Kaltschmidt, C., *et al.* (1996). Activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB in human inflamed synovial tissue. *Arthritis and rheumatism* 39, 583-591.



McInnes, I.B., and Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 365, 2205-2219.

Mellado, M., Martinez-Munoz, L., Cascio, G., Lucas, P., Pablos, J.L., and Rodriguez-Frade, J.M. (2015). T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in immunology* 6, 384.

Milne, C.D., Fleming, H.E., Zhang, Y., and Paige, C.J. (2004). Mechanisms of selection mediated by interleukin-7, the preBCR, and hemokinin-1 during B-cell development. *Immunological reviews* 197, 75-88.

Muller-Ladner, U., Pap, T., Gay, R.E., Neidhart, M., and Gay, S. (2005). Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nature clinical practice Rheumatology* 1, 102-110.

O'Dell, J.R. (2004). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine* 350, 2591-2602.

O'Neill, L.A., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews Immunology* 7, 353-364.

Oeckinghaus, A., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nature immunology* 12, 695-708.

Oh, D.Y., Taube, S., Hamouda, O., Kucherer, C., Poggensee, G., Jessen, H., Eckert, J.K., Neumann, K., Storek, A., Pouliot, M., *et al.*

(2008). A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *The Journal of infectious diseases* *198*, 701-709.

Ohmura, K. (2015). [GWAS of Rheumatoid Arthritis and Drug Discovery]. *Rinsho byori The Japanese journal of clinical pathology* *63*, 485-490.

Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., *et al.* (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* *506*, 376-381.

Oosting, M., Cheng, S.C., Bolscher, J.M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T.S., Verschueren, I.C., Arts, P., Garritsen, A., van Eenennaam, H., Sturm, P., *et al.* (2014). Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, E4478-4484.

Orloff, M., Peterson, C., He, X., Ganapathi, S., Heald, B., Yang, Y.R., Bebek, G., Romigh, T., Song, J.H., Wu, W., *et al.* (2011). Germline mutations in MSR1, ASCC1, and CTHRC1 in patients with Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Jama* *306*, 410-419.

Pacifici, R. (2010). T cells: critical bone regulators in health and disease. *Bone* *47*, 461-471.

Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* *18*, 6853-6866.

Pallone, F., and Calabrese, E. (2016). [IBD: Crohn's disease]. *Recenti progressi in medicina* 107, 292-296.

Pistoia, V., and Corcione, A. (1995). Relationships between B cell cytokine production in secondary lymphoid follicles and apoptosis of germinal center B lymphocytes. *Stem Cells* 13, 487-500.

Ramiro, S., Smolen, J.S., Landewe, R., van der Heijde, D., Dougados, M., Emery, P., de Wit, M., Cutolo, M., Oliver, S., and Gossec, L. (2016). Pharmacological treatment of psoriatic arthritis: a systematic literature review for the 2015 update of the EULAR recommendations for the management of psoriatic arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 75, 490-498.

Raza, K., Falciani, F., Curnow, S.J., Ross, E.J., Lee, C.Y., Akbar, A.N., Lord, J.M., Gordon, C., Buckley, C.D., and Salmon, M. (2005). Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis research & therapy* 7, R784-795.

Regan, T., Nally, K., Carmody, R., Houston, A., Shanahan, F., Macsharry, J., and Brint, E. (2013). Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol* 191, 6084-6092.

Rioux, J.D., and Abbas, A.K. (2005). Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature* 435, 584-589.

Ruiz-Larranaga, O., Uribarri, M., Alcaro, M.C., Escorza-Trevino, S., Del Amo, J., Iriondo, M., Manzano, C., Migliorini, P., Lorand, V., and Estonba, A. (2016). Genetic variants associated with rheumatoid arthritis patients and serotypes in European populations. *Clinical and experimental rheumatology* 34, 236-241.

Sanmarti, R., Garcia-Rodriguez, S., Alvaro-Gracia, J.M., Andreu, J.L., Balsa, A., Caliz, R., Fernandez-Nebro, A., Ferraz-Amaro, I., Gomez-Reino, J.J., Gonzalez-Alvaro, I., *et al.* (2015). 2014 update of the Consensus Statement of the Spanish Society of Rheumatology on the use of biological therapies in rheumatoid arthritis. *Reumatologia clinica* 11, 279-294.

Schmidt-Supprian, M., Courtois, G., Tian, J., Coyle, A.J., Israel, A., Rajewsky, K., and Pasparakis, M. (2003). Mature T cells depend on signaling through the IKK complex. *Immunity* 19, 377-389.

Schoels, M., Wong, J., Scott, D.L., Zink, A., Richards, P., Landewe, R., Smolen, J.S., and Aletaha, D. (2010). Economic aspects of treatment options in rheumatoid arthritis: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 69, 995-1003.

Schulze-Koops, H., and Kalden, J.R. (2001). The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best practice & research Clinical rheumatology* 15, 677-691.

Sen, R., and Baltimore, D. (2006). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986. 46: 705-716. *J Immunol* 177, 7485-7496.

Senfleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C., *et al.* (2001). Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293, 1495-1499.

Seufert, B.L., Poole, E.M., Whitton, J., Xiao, L., Makar, K.W., Campbell, P.T., Kulmacz, R.J., Baron, J.A., Newcomb, P.A., Slattery, M.L., *et al.* (2013). IkappaBKbeta and NFkappaB1, NSAID use and risk of colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *Carcinogenesis* 34, 79-85.

Simmonds, R.E., and Foxwell, B.M. (2008). Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 47, 584-590.

Sivakumar, V., Hammond, K.J., Howells, N., Pfeffer, K., and Weih, F. (2003). Differential requirement for Rel/nuclear factor kappa B family members in natural killer T cell development. *The Journal of experimental medicine* 197, 1613-1621.

Skapenko, A., Leipe, J., Lipsky, P.E., and Schulze-Koops, H. (2005). The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis research & therapy* 7 *Suppl 2*, S4-14.

Stappers, M.H., Oosting, M., Ioana, M., Reimnitz, P., Mouton, J.W., Netea, M.G., Gyssens, I.C., and Joosten, L.A. (2015). Genetic Variation in TLR10, an Inhibitory Toll-Like Receptor, Influences Susceptibility to Complicated Skin and Skin Structure Infections. *The Journal of infectious diseases* 212, 1491-1499.

Stastny, P. (1976). Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation* 57, 1148-1157.

Sun, Q., Zhang, Q., Xiao, H.P., and Bai, C. (2015). Toll-like receptor polymorphisms and tuberculosis susceptibility: A comprehensive meta-analysis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban* 35, 157-168.

Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. (2003). Toll-like receptors. *Annual review of immunology* 21, 335-376.

Takemura, S., Klimiuk, P.A., Braun, A., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2001). T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 167, 4710-4718.

Tas, S.W., Hajji, N., Stenvers, D.J., Firestein, G.S., Vervoordeldonk, M.J., and Tak, P.P. (2006). Reduction of proinflammatory cytokine expression in the synovium by targeting IKKbeta in vivo in a rat model. *Arthritis and rheumatism* 54, 3716-3718.

Thomas, M.D., Kremer, C.S., Ravichandran, K.S., Rajewsky, K., and Bender, T.P. (2005). c-Myb is critical for B cell development and maintenance of follicular B cells. *Immunity* 23, 275-286.

Tobon, G.J., Youinou, P., and Saraux, A. (2010). The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews* 9, A288-292.

Turesson, C. (2013). Extra-articular rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology* 25, 360-366.

van Loo, G., and Beyaert, R. (2011). Negative regulation of NF-kappaB and its involvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 13, 221.

Viatte, S., Plant, D., and Raychaudhuri, S. (2013). Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology* 9, 141-153.

Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N., and Penninger, J.M. (2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in molecular medicine* 12, 17-25.

Wagner, H. (2006). Endogenous TLR ligands and autoimmunity. *Advances in immunology* 91, 159-173.

Wang, C.M., Chang, S.W., Wu, Y.J., Lin, J.C., Ho, H.H., Chou, T.C., Yang, B., Wu, J., and Chen, J.Y. (2014a). Genetic variations in Toll-like receptors (TLRs 3/7/8) are associated with systemic lupus erythematosus in a Taiwanese population. *Scientific reports* 4, 3792.

Wang, C.H., Eng, H.L., Lin, K.H., Liu, H.C., Chang, C.H., and Lin, T.M. (2014b). Functional polymorphisms of TLR8 are associated with hepatitis C virus infection. *Immunology 141*, 540-548.

Wang, J.Q., Jeelall, Y.S., Ferguson, L.L., and Horikawa, K. (2014c). Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Frontiers in immunology 5*, 367.

Xiao, G., Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (2001). NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Molecular cell 7*, 401-409.

Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M., and Karin, M. (1997). The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell 91*, 243-252.

Zheng, B., Li, Q., Wei, C., Qin, J., Shou, T., Zhou, R., Shao, J., Yang, Y., and Xiao, C. (2010). Lack of association of TLR4 gene Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with rheumatoid arthritis in Chinese Han population of Yunnan Province. *Rheumatology international 30*, 1249-1252.



