

# Genetyczne podstawy zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa

## *The genetic basis of ankylosing spondylitis*

Anna Olewicz-Gawlik, Paweł Hrycaj

Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, kierownik Zakładu dr hab. med. Paweł Hrycaj

**Słowa kluczowe:** geny, podatność, zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa.

**Key words:** genes, susceptibility, ankylosing spondylitis.

### Streszczenie

Czynniki genetyczne warunkują ponad 90% całkowitej podatności na wystąpienie zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa (ZZSK), w tym HLA-B27 i pozostałe geny głównego układu zgodności tkankowej odpowiadają za mniej niż 50% całkowitego ryzyka wystąpienia ZZSK. Zainteresowanie badaczy skupiło się zatem na genach spoza głównego układu zgodności tkankowej. Rejony związane z podatnością na ZZSK stwierdzono m.in. na chromosomach 1p, 2q, 3p, 6p (rejon głównego układu zgodności tkankowej), 6q, 9q, 10q, 16q, 17p i 19q. Pomimo użycia najnowocześniejszych dostępnych technologii, nie zidentyfikowano dotychczas wielu genów spoza głównego układu zgodności tkankowej odpowiedzialnych za podatność na ZZSK. Związek z chorobą potwierdzono w przypadku genów rodziny interleukiny 1.

Zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) występuje u 0,2–1,2% populacji ogólnej i należy do najczęstszych chorób reumatycznych [1]. Zmiany zapalne obejmują głównie stawy krzyżowo-biodrowe i kręgosłup, chociaż stawy obwodowe, przyczepy ścięgnowe, błona naczyniowa oka oraz aorta również należą do częstych lokalizacji zmian chorobowych. Pomimo trwających od wielu lat badań, etiopatogeneza choroby nadal jest nieznaną, choć wiadomo, że ważną rolę w jej rozwoju odgrywa dziedziczność. Wyniki badania przeprowadzonego u bliźniąt jedno- i dwujajowych wykazały znaczną odziedziczalność podatności na wystąpienie

### Summary

Genetic factors provide over 90% of the overall susceptibility to ankylosing spondylitis, with less than 50% of the genetic contribution attributed to HLA-B27 and other major histocompatibility complex genes. Therefore the researcher's interest has focused on non-major histocompatibility complex genes. The regions implicated in susceptibility to ankylosing spondylitis have been confirmed on chromosomes: 1p, 2q, 3p, 6p (major histocompatibility complex region), 6q, 9q, 10q, 16q, 17p, 19q. Despite use of modern technologies only few non-major histocompatibility complex genes responsible for the susceptibility to ankylosing spondylitis were identified, most notably in the interleukin-1 gene complex.

ZZSK (97%) [2], a związek choroby z czynnikami genetycznymi podkreśla fakt, iż współczynnik ryzyka wystąpienia ZZSK u rodzeństwa chorego po uwzględnieniu rozpowszechnienia choroby w populacji ogólnej (*sibling recurrence-risk ratio*) wynosi 82 [3]. Od ponad 30 lat znany jest związek między obecnością antygeny zgodności tkankowej HLA-B27 a występowaniem ZZSK, choć nawet w przypadku tak dobrze udokumentowanej zależności mechanizm, w jakim antygen HLA-B27 uczestniczy w patogenezie ZZSK, nie został do końca poznany. Stwierdzenie, że antygen HLA-B27 współdziała z innymi genami, także tymi spoza głównego układu

### Adres do korespondencji:

lek. Anna Olewicz-Gawlik, Zakład Reumatologii i Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, ul. Przybyszewskiego 39, 60-356 Poznań, tel. +48 61 854 72 10, faks +48 61 854 72 12, e-mail: anolegaw@wp.pl

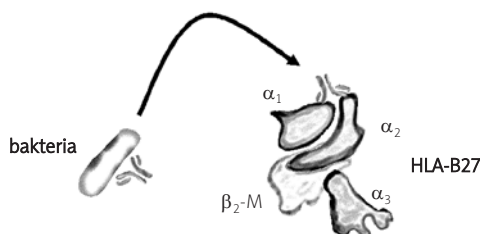
Praca wpłynęła: 13.12.2006 r.

zgodności tkankowej, w warunkowaniu podatności na ZZSK, nie powinno budzić wątpliwości.

### Geny głównego układu zgodności tkankowej związane z zeszywniającym zapaleniem stawów kręgosłupa

Wbrew wcześniejszym poglądom, wyniki badań jednoznacznie wskazują, że geny głównego układu zgodności tkankowej (MHC – *major histocompatibility complex*) odpowiadają za mniej niż 50% całkowitego ryzyka wystąpienia ZZSK [4–6]. Niemniej jednak związek HLA-B27 z ZZSK pozostaje nadal jednym z najsilniejszych spośród znanych chorób. Ponad 95% chorych na ZZSK rasy białej ma antygen HLA-B27, natomiast częstość występowania tego antygeny w populacji ogólnej wynosi ok. 8% [7]. Opisano zaledwie kilka przypadków rodzinnego występowania ZZSK u osób nieposiadających antygeny HLA-B27 [8, 9].

Do tej pory zidentyfikowano 27 podtypów HLA-B27, od HLA-B\*2701 do HLA-B\*2727, których obecność w różnym stopniu wpływa na ryzyko rozwoju choroby; przykładowo u nosicieli HLA-B\*2709 nie zaobserwowano do tej pory ani jednego przypadku ZZSK [10]. Niestety, sposób w jaki B27 przyczynia się do rozwoju ZZSK, nadal pozostaje w sferze hipotez, wśród których najczęściej wymienia się teorię mimikry molekularnej (ryc. 1),



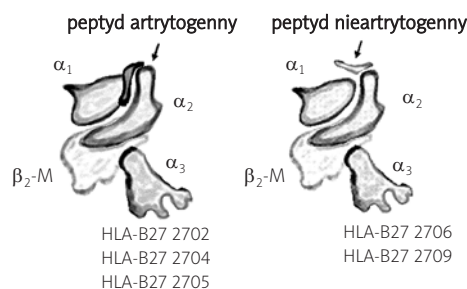
**Ryc. 1.** Teoria mimikry molekularnej zakłada istnienie podobieństwa budowy HLA-B27 do niektórych antygenów bakteryjnych. Przeciwciała powstające w wyniku zakażenia mogłyby reagować krzyżowo z cząsteczkami HLA-B27 obecnymi na powierzchni komórek układu odpornościowego, inicjując nieprawidłową odpowiedź ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  – domeny łańcucha HLA-B27,  $\beta_2$ -M –  $\beta_2$ -mikroglobulina).

**Fig. 1.** Molecular mimicry theory proposes that certain microbial antigens share some similarities with human HLA-B27. Antibodies to these antigens could bind to HLA-B27 molecules present on immune cells thus eliciting aberrant response ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  – domains of HLA-B27 chain,  $\beta_2$ -M –  $\beta_2$ -microglobulin).

teorię peptydu artrytogenego (ryc. 2.) oraz interesującą hipotezę autoprezentacji (ryc. 3.) [11]. Prawdopodobnie znaczenie mają również nieprawidłowości w procesie przetwarzania i łańcuchowania łańcuchów ciężkich HLA-B27 [12] oraz formowanie się homodimerów [13].

Spśród innych genów MHC klasy I najlepiej udokumentowano udział w patogenezie ZZSK antygenów HLA-B60 i HLA-B61 [14]. W badaniu Robinsona i wsp. obecność antygeny B60 u osoby posiadającej HLA-B27 dodatkowo 3-krotnie zwiększała ryzyko względne rozwoju ZZSK [15]. Zwiększenie ryzyka zachorowania w obecności tego antygeny okazało się niezależne od obecności HLA-B27 [14]. Tak jak w przypadku antygeny HLA-B27, nie jest znany mechanizm, który u osób posiadających HLA-B60/B61 warunkuje większą podatność na ZZSK. Istnieją też doniesienia wskazujące na związek antygenów HLA-B7 [16] i HLA-B39 [17] z rozwojem ZZSK u osób nieposiadających antygeny HLA-B27.

W badaniach nad genami regionu MHC klasy II wykazano pewne zależności pomiędzy występowaniem ZZSK a allelami HLA-DRB1 [18]. Rola innych genów związanych z funkcjami MHC klasy II, np. genów dla dużych wielofunkcyjnych proteaz (LMP – *large multi-*



**Ryc. 2.** Teoria peptydu artrytogenego sugeruje istnienie nieodkrytego do tej pory peptydu, którego związek z HLA-B27 i prezentacja limfocytom prowadzi do inicjacji zapalenia. Teoria wyjaśnia, dlaczego wybrane warianty HLA-B27 mogą być związane z podwyższonym ryzykiem rozwoju ZZSK, podczas gdy inne nie są związane z rozwojem choroby ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  – domeny łańcucha HLA-B27,  $\beta_2$ -M –  $\beta_2$ -mikroglobulina).

**Fig. 2.** Arthritogenic peptide theory proposes that hypothetical arthritogenic peptide exists that binds to some HLA-B27 variants and may be presented to immune cells initiating inflammatory response. The theory explains why certain HLA-B27 variants are associated with increased risk of ankylosing spondylitis whereas the other are not linked to the disease ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  – domains of HLA-B27 chain,  $\beta_2$ -M –  $\beta_2$ -microglobulin).

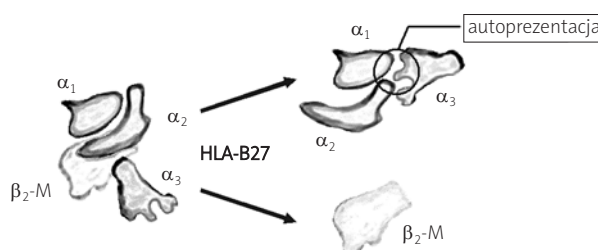
*functional proteases*), których białkowe produkty biorą udział w przetwarzaniu antygeny, lub genów dla białek transportowych związanych z prezentacją antygeny (TAP – *transporter associated with antigen processing*) jest kontrowersyjna. O ile w części populacji nie wykazano związku tych genów z podatnością i występowaniem ZZSK [19, 20], o tyle w innych wykazano pewne zależności, m.in. związek między wiekiem chorych na ZZSK a homozygotycznym genotypem LMP2 R/R [21].

Badania polimorfizmu promotora czynnika martwicy guza (TNF – *tumor necrosis factor*) także ujawniły ciekawe zależności. Dobrze udokumentowany jest związek między polimorfizmem TNF-308 a rozwojem ZZSK [22, 23], natomiast powiązanie allelu TNF-238G z występowaniem ZZSK wydaje się zależne od obecności HLA-B27 [24]. U chorych na ZZSK HLA-B27-dodatnich obserwowano jednak większą podatność na rozwój zmian w narządzie wzroku, jeśli była u nich obecna odmiana polimorficzna TNF-238A [25]. Wykazano także większą produkcję TNF u chorych na ZZSK HLA-B27-dodatnich posiadających allel TNF-308.2 [26].

Podsumowując, wpływ genów kodujących MHC na podatność na wystąpienie ZZSK oraz obraz kliniczny choroby jest oczywisty. Wysoce prawdopodobne wydaje się zaangażowanie innych niż wyżej opisane genów regionu MHC w patogenezę ZZSK. Niemniej jednak sprecyzowanie roli już poznanych genów oraz wskazanie następnych jest trudne, co wynika ze złożoności mechanizmów immunologicznych oraz znacznej nierównowagi sprzężeń genów MHC.

### Geny spoza głównego układu zgodności tkankowej związane z rozwojem zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa

Chociaż związek między nosicielstwem antygeny HLA-B27 a rozwojem ZZSK jest niepodważalny, zaledwie 1–5% osób HLA-B27-dodatnich choruje na ZZSK [27], co niewątpliwie stanowi silny argument potwierdzający udział innych czynników (genetycznych, środowiskowych) w powstawaniu choroby. Istnieje ograniczona liczba doniesień o udziale genów spoza układu MHC w patogenezie ZZSK. Rejony związane z podatnością na ZZSK stwierdzono m.in. na chromosomach 1p, 2q, 3p, 6p (m.in. rejon MHC), 6q, 9q, 10q, 16q, 17p i 19q [5, 6]. Co ciekawe, sugerowany na podstawie badań epidemiologicznych znaczący udział genów zlokalizowanych na chromosomie X nie znalazł potwierdzenia w wynikach badań immunogenetycznych [28]. Za różnice w częstości występowania choroby u obu płci może natomiast częściowo odpowiadać polimorficzne powtórzenie CAG w genie receptora androgenowego. W badaniu na sto-



**Ryc. 3.** Według hipotezy autoprezentacji w cząsteczce HLA-B27 niezwiązanej z  $\beta_2$ -mikroglobuliną ani peptydem dochodzi do przemieszczenia segmentów łączących domeny  $\alpha_2$  i  $\alpha_3$ , co ułatwia rotację kątów „szkieletu” cząsteczki wokół reszt 167–168 i pozwala resztom 169–181 zająć miejsce wiążące cząsteczki. Ta „autoprezentacja” HLA-B27 może zainicjować i podtrzymywać proces zapalny ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  – domeny łańcucha HLA-B27,  $\beta_2$ -M –  $\beta_2$ -mikroglobulina).

**Fig. 3.** According to the autodisplay hypothesis in  $\beta_2$ -microglobulin-free/peptide-free HLA-B27 molecule a transition takes place in the segment linking  $\alpha_2$  and  $\alpha_3$  domains leading to rotation of the molecule backbone angles around 167–168 residues. This allows 169–181 residues to occupy the HLA-B27’s own peptide-binding cleft. This “autodisplay” may stimulate and perpetuate inflammatory process ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  – domains of HLA-B27 chain,  $\beta_2$ -M –  $\beta_2$ -microglobulin).

sunkowo niewielkiej liczbie chorych na ZZSK mężczyzn wykazano mniejszą liczbę powtórzeń CAG w tym genie u osób chorych w porównaniu z grupą kontrolną [29].

Wyniki badań dotyczących roli genów cytokin w patogenezie ZZSK są kontrowersyjne. Spośród cytokin prozapalnych, poza wspomnianym już TNF, największe nadzieje na wykrycie zmian patologicznych wiązano z interleukinami 6 i 1. Chociaż u chorych na ZZSK wykrywa się podwyższone stężenia IL-6, które korelują ze stężeniem surowiczym białka C-reaktywnego (CRP – *C-reactive protein*) [30], to w badaniu przeprowadzonym w grupie 92 chorych na ZZSK nie wykazano związku między polimorfizmem promotora genu dla IL-6 a podatnością na chorobę [31].

Wyniki dotyczące genów rodziny IL-1, znajdujących się na chromosomie 2, także nie są jednoznaczne. Do grupy tej należą m.in. geny dla IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz gen antagonisty receptora IL-1 (IL-1Ra). Dwa odrębne zespoły badaczy wykazały związek między występowaniem ZZSK a polimorfizmem w intronie 2 genu IL-1Ra, charakteryzującym się zmienną liczbą powtórzeń tandemowych, natomiast nie potwierdzono istnienia związku choroby z polimorfizmem genów kodujących IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  [32, 33]. Opisano również częstsze występowanie nie-

których odmian polimorficznych eksonu 6 genu IL-1Ra u chorych na ZZSK [34]. Istnieniu powiązań genu IL-1Ra z ZZSK przeczą jednak wyniki uzyskane przez innych badaczy [35, 36]. Timms i wsp. wykazali natomiast silny związek między ZZSK a polimorfizmem genu dla IL-1 $\beta$  w pozycji -511 [36]. Te wyniki znalazły potwierdzenie także w nowszych doniesieniach [37].

Gen dla czynnika transformującego wzrostu  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) znajduje się na ramieniu długim chromosomu 19, niedaleko *locus* związanego z występowaniem ZZSK [6]. TGF- $\beta$ 1 jest cytokiną regulującą odpowiedź zapalną, a także uczestniczącą w metabolizmie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz proliferacji i różnicowaniu osteoblastów [38]. Pomimo przesłanek teoretycznych wskazujących na potencjalną rolę TGF- $\beta$ 1 w patogenezie ZZSK, nie potwierdzono istnienia związku polimorfizmu genu dla TGF- $\beta$ 1 z podatnością na chorobę [39].

Na chromosomie 19q znajdują się także geny dla receptorów KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*). Receptory te rozpoznają cząsteczki MHC klasy I oraz regulują aktywność komórek NK [40]. W opublikowanej ostatnio pracy Lopez-Larrea i wsp. wykazali częstsze występowanie aktywującego allelu KIR3DS1 u chorych na ZZSK w porównaniu ze zdrowymi nosicielami HLA-B27 [41]. Analogicznie, allel hamujący KIR3DL1 występował u chorych rzadziej niż w grupie kontrolnej. Autorzy wysunęli wniosek, że obecność KIR3DS1 lub KIR3DL1 w połączeniu z genotypami HLA-B\*27s/HLA-Bw4-l80 wpływa na podatność na ZZSK [41].

Badania na mysim modelu ZZSK, posiadającym nonsensowną mutację w eksonie 12 genu dla regulatora transportu nieorganicznych pirofosforanów (gen *ank*), dały początek badaniom nad rolą ludzkiego homologu tego genu, ANKH. Potwierdzono związek między polimorfizmem ANKH a występowaniem ZZSK [42, 43] oraz, co ciekawe, zaobserwowano zależność od płci chorych [43].

Gen CARD15 (NOD2), którego produkt działa jako cytozolowy receptor toll-podobny (TLR – *toll-like receptor*) i uczestniczy w reakcji zapalnej, odgrywa rolę w patogenezie choroby Leśniowskiego-Crohna [44], która – podobnie jak ZZSK – jest zaliczana do grupy seronegatywnych spondyloartropatii. Mimo tego, nie wykazano wpływu polimorfizmu CARD15 na rozwój ZZSK [45]. Nie potwierdziły się także hipotezy sugerujące związek między podatnością i występowaniem ZZSK a polimorfizmami genów dla TLR4 i cząsteczki CD14 [46], tak jak nie wykazano zależności między genem dla metaloproteinazy 3 (MMP-3) a ciężkością/podatnością na ZZSK [47].

## Podsumowanie

Mimo nieustannego postępu prac nad genetycznymi uwarunkowaniami ZZSK, z pewnością nie poznano jeszcze wszystkich genów uczestniczących w patogenezie

choroby. Wiadomo, że poza HLA-B27 także inne geny, zarówno z układu MHC, jak i spoza niego, biorą udział w rozwoju choroby oraz wpływają na ryzyko jej wystąpienia. Biorąc pod uwagę wspomniany już silny udział dziedziczności w powstawaniu ZZSK, zidentyfikowanie genów odpowiedzialnych za rozwój choroby z użyciem coraz nowszych technologii pozwoli nie tylko określić indywidualne ryzyko rozwoju ZZSK, ale również znacznie poprawi możliwości wczesnego rozpoznawania i leczenia choroby.

## Piśmiennictwo

1. Sieper J, Rudwaleit M, Khan MA, Braun J. Concepts and epidemiology of spondyloarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006; 20: 401-417.
2. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1823-1828.
3. Brown MA, Laval SH, Brophy S, Calin A. Recurrence risk modelling of the genetic susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 883-886.
4. Brown MA, Kennedy LG, Darke C, et al. The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 460-465.
5. Zhang G, Luo J, Bruckel J, et al. Genetic studies in familial ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2246-2254.
6. Laval SH, Timms A, Edwards S, et al. Whole-genome screening in ankylosing spondylitis: evidence of non-MHC genetic-susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 918-926.
7. van der Linden SM, Valkenburg HA, de Jongh BM, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 241-249.
8. Rubin LA, Amos CI, Wade JA, et al. Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. Linkage studies with the major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1212-1220.
9. Skomsvoll JF, Ostensen M, Romberg O, et al. HLA-B27 negative ankylosing spondylitis in a father and a son. *Scand J Rheumatol* 1995; 24: 321-322.
10. D'Amato M, Fiorillo MT, Galeazzi M, et al. Frequency of the new HLA-B\*2709 allele in ankylosing spondylitis patients and healthy individuals. *Dis Markers* 1995; 12: 215-217.
11. Luthra-Guptasarma M, Singh B. HLA-B27 lacking associated beta2-microglobulin rearranges to auto-display or cross-display residues 169-181: a novel molecular mechanism for spondyloarthropathies. *FEBS Lett* 2004; 575: 1-8.
12. Tran TM, Satumtira N, Dorris ML, et al. HLA-B27 in transgenic rats forms disulfide-linked heavy chain oligomers and multimers that bind to the chaperone BiP. *J Immunol* 2004; 172: 5110-5119.
13. Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, et al. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure. *J Immunol* 1999; 162: 5045-5048.
14. Wei JC, Tsai WC, Lin HS, et al. HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43: 839-842.

15. Robinson WP, van der Linden SM, Khan MA, et al. HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27+ patients. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1135-1341.
16. Khan MA, Kushner I, Braun WE. A subgroup of ankylosing spondylitis associated with HLA-B7 in American blacks. *Arthritis Rheum* 1978; 21: 528-530.
17. Yamaguchi A, Tsuchiya N, Mitsui H, et al. Association of HLA-B39 with HLA-B27-negative ankylosing spondylitis and pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis in Japanese patients. Evidence for a role of the peptide-anchoring B pocket. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1672-1677.
18. Brown MA, Kennedy LG, Darke C, et al. The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 460-465.
19. Burney RO, Pile KD, Gibson K, et al. Analysis of the MHC class II encoded components of the HLA class I antigen processing pathway in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 58-60.
20. Konno Y, Numaga J, Mochizuki M, et al. TAP polymorphism is not associated with ankylosing spondylitis and complications with acute anterior uveitis in HLA-B27-positive Japanese. *Tissue Antigens* 1998; 52: 478-483.
21. Vargas-Alarcon G, Gamboa R, Zuniga J, et al. Association study of LMP gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthritis. *Hum Immunol* 2004; 65: 1437-1442.
22. Hohler T, Schaper T, Schneider PM, et al. Association of different tumor necrosis factor alpha promoter allele frequencies with ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1489-1492.
23. McGarry F, Walker R, Sturrock R, et al. The -308.1 polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor gene is associated with ankylosing spondylitis independent of HLA-B27. *J Rheumatol* 1999; 26: 1110-1116.
24. Kaijzel EL, Brinkman BM, van Krugten MV, et al. Polymorphism within the tumor necrosis factor alpha (TNF) promoter region in patients with ankylosing spondylitis. *Hum Immunol* 1999; 60: 140-144.
25. El-Shabrawi Y, Wegscheider BJ, Weger M, et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor-alpha promoter region in patients with HLA-B27-associated uveitis: association with susceptibility and clinical manifestations. *Ophthalmology* 2006; 113: 695-700.
26. Rudwaleit M, Siebert S, Yin Z, et al. Low T cell production of TNF alpha and IFN gamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 36-42.
27. van der Linden S, Valkenburg H, Cats A. The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals: a family and population study. *Br J Rheumatol* 1983; 22 (4 Suppl 2): 18-19.
28. Hoyle E, Laval SH, Calin A, et al. The X-chromosome and susceptibility to ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1353-1355.
29. Mori K, Ushiyama T, Inoue K, et al. Polymorphic CAG repeats of the androgen receptor gene in Japanese male patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39: 530-532.
30. Bal A, Unlu E, Bahar G, et al. Comparison of serum IL-1beta, sIL-2R, IL-6, and TNF-alpha levels with disease activity parameters in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2006 Apr 1; [Epub ahead of print].
31. Collado-Escobar MD, Nieto A, Mataran L, et al. Interleukin 6 gene promoter polymorphism is not associated with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2000; 27: 1461-1463.
32. McGarry F, Neilly J, Anderson N, et al. A polymorphism within the interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene is associated with ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40: 1359-1364.
33. van der Paardt M, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 2002; 41: 1419-1423.
34. Maksymowych WP, Reeve JP, Reveille JD, et al. High-throughput single-nucleotide polymorphism analysis of the IL1RN locus in patients with ankylosing spondylitis by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2011-2018.
35. Jin L, Zhang G, Akey JM, et al. Lack of linkage of IL1RN genotypes with ankylosing spondylitis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3047-3048.
36. Timms AE, Crane AM, Sims AM, et al. The interleukin 1 gene cluster contains a major susceptibility locus for ankylosing spondylitis. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 587-595.
37. Maksymowych WP, Rahman P, Reeve JP, et al. Association of the IL1 gene cluster with susceptibility to ankylosing spondylitis: an analysis of three Canadian populations. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 974-985.
38. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, et al. Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr Rev* 1994; 15: 27-39.
39. van der Paardt M, Crusius JB, Garcia-Gonzalez MA, et al. Susceptibility to ankylosing spondylitis: no evidence for the involvement of transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) gene polymorphisms. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 616-619.
40. D'Andrea A, Chang C, Phillips JH, et al. Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J Exp Med* 1996; 184: 789-794.
41. Lopez-Larrea C, Blanco-Gelaz MA, Torre-Alonso JC, et al. Contribution of KIR3DL1/3DS1 to ankylosing spondylitis in human leukocyte antigen-B27 Caucasian populations. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R101.
42. Tsui FW, Tsui HW, Cheng EY, et al. Novel genetic markers in the 5'-flanking region of ANKH are associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 791-797.
43. Tsui HW, Inman RD, Paterson AD, et al. ANKH variants associated with ankylosing spondylitis: gender differences. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R513-R525.
44. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606.
45. van der Paardt M, Crusius JB, de Koning MH, et al. CARD15 gene mutations are not associated with ankylosing spondylitis. *Genes Immun* 2003; 4: 77-78.
46. van der Paardt M, Crusius JB, de Koning MH, et al. No evidence for involvement of the Toll-like receptor 4 (TLR4) A896G and CD14-C260T polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 235-238.
47. Jin L, Weisman M, Zhang G, et al. Lack of association of matrix metalloproteinase 3 (MMP3) genotypes with ankylosing spondylitis susceptibility and severity. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 55-60.