Varianti alleliche del gene per la lectina legante il mannosio (MBL): un vantaggio o uno svantaggio per la longevità?

Rossella Tomaiuolo[1,2], Anna Ruocco[1,2], Chiara Salapete[1,2], Ciriaco Carru[3], Angelo Zinellu[3], Chiara Bellia[4], Giulia Bivona[4], Marcello Ciaccio[4], Giuseppe Castaldo[1,2], Luca Deiana[3]

[1]CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli

[2]Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli

[3]Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, Sassari

[4]Cattedra di Biochimica Clinica, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi, Palermo

ABSTRACT

Mannose-binding lectin (MBL) genic variants: advantage or disadvantage for longevity? MBL is a triple helical protein produced by liver and secreted in blood, where it forms polymers that bind bacteria and activate the lectin-complement pathway, promote opsonophagocytosis, and induce interleukin (IL)-8. Three genetic variants in exon 1 (R52C, G54D and G57E) impair the polymerization of the protein and strongly reduce its activity, and three mutations within promoter (-550G>C; -221G>C; +4C>T) downregulate MBL expression. On the basis of MBL gene mutations, haplotypes have been described associated to null, intermediate or high protein activity. Null haplotypes are related to recurrent infections, act as negative modifier factor in cystic fibrosis causing a more severe liver involvement, and reduce the downregulation of IL-1β, increasing the risk of gastric cancer in subjects bearing Helicobacter pylori. Despite such negative effects, we identified MBL mutations in 65% of subjects from the general population of Southern Italy. Accordingly, some studies have excluded a role of MBL gene variants in human disease. To further cast ligth on the effect of MBL gene variants, we studied a large population of ultracentenarians from Sardinia hypothesizing that a high MBL activity (and thus a reduced occurrence of mutations) would be an advantage for longevity. Elderly subjects have indeed a lower occurrence of MBL null haplotype, but also a lower occurrence of high activity ones. We suggest that null MBL activity may be a disadvantage for longevity because it exposes to fatal infections. The high activity of the protein seems on turn to be disadvantageous possibly because it exposes to a higher risk of autoimmunity.

FUNZIONI DELLA LECTINA LEGANTE IL MANNOSIO (MBL)

La “mannose-binding lectin” (MBL) è una proteina prodotta dal fegato che appartiene alla famiglia delle collectine, proteine caratterizzate dalla struttura simil-collagene e dall’attività lectinica, che consiste nella capacità di legare i carboidrati presenti sulla parete cellulare di alcuni agenti patogeni (virus, batteri, funghi, protozoi) (1). MBL è presente in circolo come una miscela di dimeri, trimeri, tetrameri, pentameri ed esameri di una subunità base di 75 kDa, costituita da 3 catene polipeptidiche identiche, con una coda di strutture simil-collagene a tripla elica e una testa di tre domini lectinici (omotrimero). In particolare, si distinguono 4 domini funzionali: 1) dominio N-terminale ricco in cisteine, essenziale per l’oligomerizzazione della proteina, 2) dominio simil-collagene, responsabile della formazione di una lunga “coda” nella molecola, 3) la regione “collo” ad α-elica, 4) la “testa” globulare posta all’estremo C-terminale, che lega particolari residui oligosaccaridici (mannosio, N-acetilglucosammina o fucosio) e le molecole esposte sulle cellule in apoptosi (ad es., gli acidi nucleici e le metalloproteinasi) (2). Le subunità omotrimeriche, che oligomerizzano per formare strutture complesse, sono responsabili dell’attivazione del complemento (3).

MBL ha un ruolo cruciale nell’immunità innata, in quanto attiva il complemento (attivazione MBL-mediata, via di attivazione del complemento distinta da quella classica e da quella alternativa) (4). Questa funzione viene svolta da MBL in associazione alle “MBL-associated serine proteases” (MASP 1 e 2), che scindono rispettivamente le frazioni C4-C2 e C3-C2 del complemento, quando MBL si lega ai gruppi mannosici terminali dei carboidrati presenti sulla membrana dei patogeni (5, 6). Il “pathway” delle lectine ha una capacità 4 volte maggiore di convertire C3 in C5 rispetto al “pathway” classico e quindi di favorire la produzione di prodotti pro-infiammatori C3a, C4a e C5a richiesti nella risposta immune innata alle infezioni (7). Inoltre, MBL ha la funzione di opsonina, legandosi, tramite l’estremo N-terminale, al recettore per le collectine situato sui fagociti e interagendo, attraverso le sue teste globulari, con le glicoproteine (residui oligosaccaridici di N-acetil glucosammina, mannosio e fucosio, ma non galattosio e acido salicilico) della parete dei patogeni, mediante un legame calcio-dipendente (8). MBL, infine, modula il processo infiammatorio per la sua capacità di inibire il rilascio di citochine proinfiammatorie, come “tumor necrosis factor” (TNF)-α, interleuchina (IL)-1β e IL-6, da parte dei monociti e favorisce la “clearance” delle cellule apoptotiche legandosi ad esse e facilitandone l’“uptake” nei macrofagi (9).

GENETICA DELLA MBL

Il gene che codifica per la MBL umana (cr10 q11,2-q21) (MBL2), è lungo 6,32 Kb ed è costituito da 4 esoni (10). Il sequenziamento diretto delle regioni codificanti del gene MBL2 ha rivelato la presenza di tre polimorfismi localizzati nel promotore e tre nell'esone 1 (Figura 1) (11). I tre "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) nel promotore si trovano in posizione -550, -221 e +4. Il polimorfismo in posizione -550 porta a una sostituzione nucleotidica di una G in C (allele H/L). Lo SNP in posizione -221 corrisponde alla sostituzione di una G che diviene C (allele X/Y) e risulta essere il più rilevante dei tre perché causa una drastica riduzione dell'espressione del gene. Infine, in posizione +4, nella regione 5' non tradotta dell'esone 1, si trova la sostituzione di una C in T (allele P/Q) (11). Gli SNPs identificati nell'esone 1, oltre a creare una variazione nella sequenza nucleotidica del gene, variano la sequenza primaria della proteina, trattandosi di mutazioni missenso. Nel codone 52 vi è la sostituzione di una C in T che porta alla codifica di un arginina al posto di una cisteina (R52C); nel codone 54 la sostituzione di una G con una A porta alla codifica di un acido aspartico al posto di una glicina (G54D). Infine, la sostituzione di una G in A nel codone 57 porta a un cambio tra una glicina e un acido glutammico (G57E) (11).

La presenza di mutazioni nell'esone 1 porta alla formazione di peptidi che perdono in parte la loro capacità di polimerizzare e che hanno una più bassa affinità per la superficie batterica e minore capacità di attivare il complemento. In particolare, l'effetto delle mutazioni si traduce in alterazioni strutturali del dominio simil-collagene e del dominio N-terminale, che impediscono l'assemblaggio dei monomeri in polimeri stabili e funzionali nonché l'interazione della MBL stessa con le MASP (11).

La combinazione delle varianti alleliche permette di costruire diversi aplotipi funzionali di cui sette sono i più frequenti: HYPA e LYQA sono gli aplotipi a cui si associano concentrazioni elevate di MBL in circolo; a LXPA e LYPA si associano concentrazioni intermedie, mentre ad HYPD, LYPB e LYQC concentrazioni basse (Figura 2) (12).

La prevalenza di mutazioni nel gene MBL2 risulta essere almeno doppia in soggetti ospedalizzati, sia in età pediatrica che adulta, per patologie infettive acute rispetto a soggetti ricoverati a causa di altre malattie (13). Inoltre, in soggetti con mutazioni nel gene MBL2 è stata riscontrata una maggiore morbidità per malattie autoimmuni (ad es. lupus eritematoso sistemico) (14) e per malattie multisistemiche, come la fibrosi cistica (CF) (15), dove la risposta immunitaria risulta in parte compromessa. Tuttavia, le varianti alleliche di MBL2 potrebbero essere protettive verso alcune infezioni parassitarie (16).

MBL2 COME GENE MODULATORE DELLA FIBROSI CISTICA

La CF è la più frequente malattia genetica autosomica recessiva ad esito letale (1:2500 nuovi nati) nella popolazione caucasica; dipende da mutazioni nel gene "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR), che codifica per un canale di membrana ubiquitario, coinvolto nella regolazione degli scambi di sodio e cloro. L'espressione clinica della malattia è molto eterogenea: alcuni pazienti muoiono in giovane età per complicanze respiratorie severe, altri raggiungono l'età adulta in condizioni generali buone. Dopo la scoperta del gene, l'eterogeneità clinica della malattia fu correlata al tipo di mutazione (correlazione genotipo-fenotipo), ma una serie di studi successivi hanno dimostrato che soltanto il fenotipo pancreatico dipende strettamente dal tipo di mutazione. In particolare, l'espressione epatica è molto variabile nella CF e soltanto un terzo dei pazienti sviluppa una malattia epatica severa. Molti studi hanno dimostrato che il fenotipo epatico non dipende dal genotipo CFTR; ad esempio,

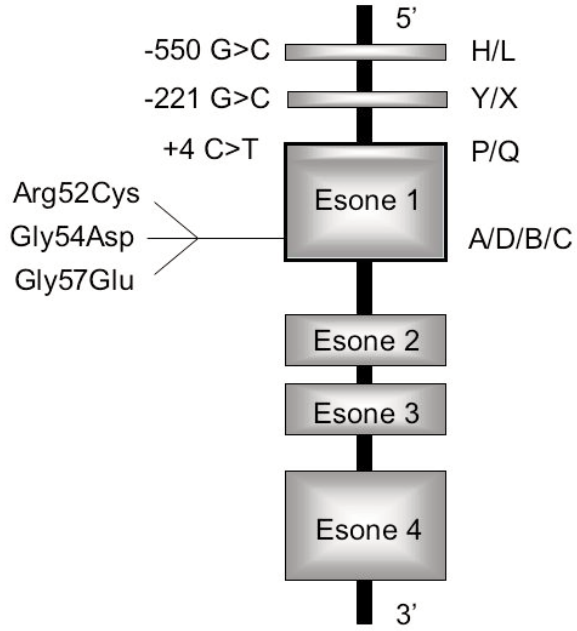


Figura 1
Rappresentazione schematica del gene MBL2.
Sulla sinistra sono riportate le varianti alleliche più frequenti e sulla destra gli aplotipi corrispondenti.

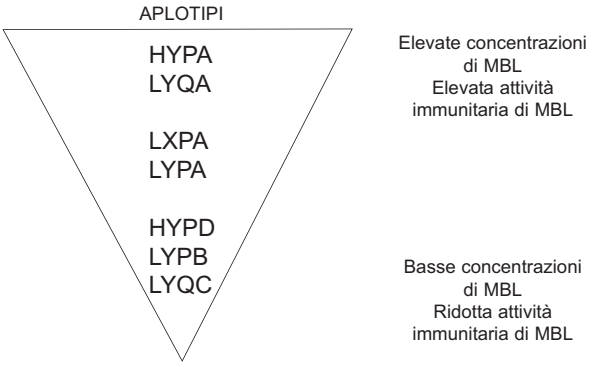


Figura 2
Variazioni della concentrazione sierica di lectina legante il mannosio (MBL) in rapporto agli aplotipi derivati dalle diverse varianti alleliche del gene MBL2.

il nostro gruppo ha descritto un paziente omozigote per la rara mutazione G542X, che mostrava una severissima espressione epatica della malattia, a differenza di 6 pazienti con lo stesso genotipo descritto in precedenza (17). Successivamente, abbiamo dimostrato che l'espressione epatica della CF è eterogenea anche in coppie di fratelli affetti, escludendo quindi il ruolo di fattori ambientali e suggerendo che l'espressione della malattia possa dipendere da geni modulatori del fenotipo, ereditati indipendentemente dal gene-malattia (18, 19).

Il gene MBL2 è da ritenersi un gene modulatore della CF, in grado cioè di modificarne l'espressività, la penetranza o la gravità del quadro sintomatologico. In generale, si tende a pensare che questi geni siano varianti alleliche comuni, con modesto impatto funzionale quando considerati nell'organismo sano, ma che possono agire come modulatori in particolari condizioni. Ad esempio, MBL2 contribuisce a contrastare le infezioni respiratorie da batteri opportunisti, concorrendo a mantenere una buona funzionalità polmonare (20, 21). In un nostro recente studio è stata riscontrata una frequenza più alta dell'aplotipo HYPD, correlato a bassi livelli di espressione di MBL, in pazienti CF con espressione epatica severa della malattia, rispetto a quelli che non presentano danno epatico (22). Il dato risulta ancora più significativo se confrontato con la popolazione sana di controllo (22).

MBL E NEOPLASIE DELLO STOMACO

Il tumore gastrico è una delle neoplasie più frequenti nei paesi industrializzati; tra i fattori causali è incluso l'Helicobacter pylori che si riscontra in oltre 80% dei tumori. Tuttavia, soltanto un'esigua percentuale di pazienti con infezione sviluppa la neoplasia. Fattori di virulenza legati al batterio oppure fattori di difesa legati all'individuo modulano il rischio di sviluppare la neoplasia nei soggetti infetti. El Omar et al. (23) hanno riportato che polimorfismi del gene della IL-1 (un potente inibitore della secrezione acida gastrica) si associano ad un aumentato rischio di tumore gastrico nei pazienti con infezione da Helicobacter pylori. Poiché la produzione di IL-1β è contro-regolata da MBL, abbiamo studiato le varianti geniche di MBL2 in soggetti con tumore gastrico e in una popolazione di controllo, dimostrando che l'aplotipo defettivo HYPD di MBL2 è un fattore di rischio rilevante ("odds risk", 2,5) per lo sviluppo di tumore nei pazienti con infezione da Helicobacter pylori (24). Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che forme ipofunzionanti di MBL non sono in grado di contrastare il decorso dell'infezione da Helicobacter pylori oppure non riescono a contro-regolare la produzione di IL-1β (al contrario della forma pienamente attiva di MBL), per cui le elevate concentrazioni di IL-1β favoriscono l'instaurarsi di una ipercloridria cronica e un persistente stato di infiammazione, che si traduce in una alterazione dell'epitelio gastrico, fattore predisponente all'insorgenza di carcinoma (24, 25).

MBL E ULTRACENTENARI

Dallo studio precedentemente citato sui tumori gastrici è emerso che anche nella popolazione di controllo oltre il 60% degli alleli di MBL2 presentava mutazioni (24). Se gli alleli mutanti sono mantenuti nella popolazione generale con una frequenza tanto elevata è plausibile che essi conferiscano qualche vantaggio selettivo. Abbiamo quindi studiato le varianti geniche di MBL2 in un gruppo di soggetti che hanno raggiunto il traguardo dei cent'anni in condizioni di buona salute e che presumibilmente sono portatori (per MBL e per altre proteine) degli alleli più vantaggiosi. D'altra parte, l'infiammazione sembra essere un fattore di rischio anche nel processo di invecchiamento, caratterizzato da cambiamenti nella struttura e nella funzione di cellule e tessuti. Esperimenti condotti su fibroblasti senescenti dimostrano come queste cellule assumano caratteristiche fenotipiche specifiche, che includono l'ipersecrezione di citochine infiammatorie (26) e l'esposizione di particolari molecole sulla membrana plasmatica [l'insieme di queste molecole è noto come fenotipo secretorio associato a senescenza (SASP)] (27). Si tratta per lo più di molecole pro-infiammatorie (IL-1, IL-6 e IL-8), di proteasi e di glicoproteine di membrana, tutte in grado di reclutare le cellule del sistema immunitario e di attivare il complemento. Inoltre, sembra che le cellule invecchiando modifichino, sia qualitativamente che quantitativamente, l'esposizione di alcuni zuccheri sulla propria membrana cellulare, come la N-acetil-β-D-galattosamina, che risulta aumentata sulla superfice cellulare delle cellule senescenti (28). Considerate le funzioni di MBL, è quindi plausibile ipotizzare un suo ruolo nella modulazione dei processi di invecchiamento cellulare.

Abbiamo analizzato una popolazione di origine sarda composta da più di 400 soggetti appartenenti a differenti fasce d'età. Questa popolazione era stata precedentemente selezionata e caratterizzata nell'ambito del progetto A.K.e.A. (acronimo di "A Kent'Annos" che nel dialetto sardo significa a cent'anni), che si propone l'obiettivo di svelare le basi genetiche della longevità partendo dall'analisi sistemica dei soggetti centenari ed ultracentenari e delle loro famiglie (29). L'analisi molecolare di MBL2, effettuata mediante sequenziamento diretto, ha portato all'individuazione dei diversi aplotipi, che presentavano una differente frequenza nelle varie fasce d'età analizzate (Tabella 1). Negli ultracentenari l'allele HYPD è molto raro. D'altra parte questo allele si associa a ridotta attività della proteina, a rischio di neoplasia dello stomaco e di infezioni ricorrenti, ed è quindi ragionevole pensare che sia un fattore sfavorevole per il raggiungimento del traguardo dei cent'anni. Tuttavia, il risultato più interessante è che nel gruppo degli ultracentenari rispetto agli altri due gruppi di età vi è una frequenza più bassa dell'allele a massima funzionalità (HYPA) e una frequenza più alta dell'aplotipo a funzionalità intermedia (LYPA), suggerendo quindi che l'allele a massima funzionalità non sembra conferire vantaggio. Concentrazioni intermedie di MBL in circolo (associate all'aplotipo LYPA) potrebbero essere preferibili rispetto a concentrazioni più alte (associate all'aplotipo HYPA) in quanto potrebbero rendere questi individui meno suscettibili a patologie autoimmuni severe (30) oppure l'eccesso di attività

Tabella 1
Frequenze alleliche di alcuni aplotipi del gene MBL2 nelle popolazioni campana e sarda

	n	HYPA	LYPA	HYPD
Popolazione campana	1106	36,3%	4,7%	4,4%
Popolazione sarda				
≥100 anni	128	17,2%	23,4%	0,8%
80-99 anni	116	23,0%	20,9%	3,8%
<79 anni	176	21,0%	11,9%	3,1%

del sistema immune potrebbe favorire l'accelerarsi del normale processo di invecchiamento cellulare, e quindi sarebbero favoriti quegli aplotipi per i quali le concentrazioni di MBL nel siero sono intermedie anziché elevate.

Questi risultati, per quanto preliminari e da confermare su popolazioni più ampie, suggeriscono che MBL2, oltre ad una serie di funzioni immunitarie, potrebbe in qualche modo essere correlato anche all'invecchiamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. Mol Immunol 2003;40:423-9.
2. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, et al. Mannose-binding lectin and its genetic variants. Genes Immun 2006;7:85-94.
3. Kurata H, Cheng HM, Kozutsumi Y, et al. Role of the collagen-like domain of the human serum mannan-binding protein in the activation of complement and the secretion of this lectin. Biochem Biophys Res Commun 1993;191:1204-10.
4. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. Transfus Med 2002;12:335-51.
5. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, et al. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. Immunity 2001;15:127-35.
6. Gadjeva M, Thiel S, Jensenius JC. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response. Curr Opin Immunol 2001;13:74-8.
7. Rawal N, Rajagopalan R, Salvi VP. Activation of complement component C5: comparison of C5 convertases of the lectin pathway and the classical patway of complement. J Biol Chem 2008;283:7853-63.
8. Jack DL, Turner MW. Anti-microbial activities of mannose-binding lectin. Biochem Soc Trans 2003;31:753-7.
9. Ogden CA, de Cathelineau A, Hoffmann PR, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. J Exp Med 2001;194:781-95.
10. Sastry K, Herman GA, Day L, et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. J Exp Med 1989;170:1175-89.
11. Peter G. Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. Biochem Soc Trans 2008;36:1461-6.
12. Verdu P, Barreiro LB, Patin E, et al. Evolutionary insights into the high worldwide prevalence of MBL2 deficiency alleles. Hum Mol Genet 2006;15:2650-8.
13. Kilpatrick DC. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. Biochim Biophys Acta 2002;1572:401-13.
14. Lee YH, Witte T, Mormot T, et al. The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2005;52:3974-96.
15. Garred P, Pressler T, Madsen HO, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. J Clin Invest 1999;104:431-7.
16. Worthley DL, Bardy PG, Mullighan CG. Mannose-binding lectin: biology and clinical implication. Intern Med J 2005;35:548-53.
17. Castaldo G, Rippa E, Salvatore D, et al. Severe liver impairment in a cystic fibrosis-affected child homozygous for the G542X mutation. Am J Med Genet 1997;69:155-8.
18. Castaldo G, Fuccio A, Salvatore D, et al. Liver expression in cystic fibrosis could be modulated by genetic factors different from the cystic fibrosis transmembrane regulator genotype. Am J Med Genet 2001;98:294-7.
19. Salvatore F, Scudiero O, Castaldo G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis: the role of modifier genes. Am J Med Genet 2002;111:88-95.
20. Acton JD, Wilmott RW. Phenotype of CF and the effects of modifier genes. Ped Resp Rev 2001;2:332-9.
21. Cutting GR. Modifier genetics: cystic fibrosis. Annu Rev Genom Human Genet 2005:6:237-60.
22. Tomaiuolo R, Degiorgio D, Coviello DA, et al. An MBL2 haplotype and ABCB4 variants modulate the risck of liver disease in cystic fibrosis patients: A multicentric study. Digest Liver Dis 2009;41:817-22.
23. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. Gastroenterol 2003;124:1193-201.
24. Scudiero O, Nardone G, Omodei D, et al. A mannose-binding lectin-defective haplotype is a risk factor for gastric cancer. Clin Chem 2006;52:1625-7.
25. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. Clin Infect Dis 2003;37:1496-505.
26. Campisi J, Yaswen P. Aging and cancer cell biology, 2009. Aging Cell 2009;8:221-5.
27. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, et al. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. Proc Natl Acad Sci USA 2001:98:12072-7.
28. Kobata A. Glycobiology in the field of aging research--introduction to glycogerontology. Biochimie 2003;85:13-24.
29. Caselli G, Lipsi RM. Survival differences among the oldest old in Sardinia: who, what, where, and why? Demographic Research 2006;14:267-94.
30. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Soria N, et al. Mannose-binding lectin-low genotypes are associated with milder systemic and immunological disease expression in primary Sjögren's syndrome. Rheumatology 2009;48:65-9.