

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali

Indirizzo in Scienze Reumatologiche

Ciclo XXVII

**Correlazioni genotipo-fenotipo in una coorte di pazienti adulti
portatori di mutazioni a carico del gene *TNFRSF1A*.**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'Indirizzo: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Supervisore: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Dottorando: Francesco Caso



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cardiologiche, Toraciche e Vascolari

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI

INDIRIZZO: SCIENZE REUMATOLOGICHE

CICLO XXVII

**Correlazioni genotipo-fenotipo in una coorte di pazienti
adulti portatori di mutazioni a carico del gene
TNFRSF1A.**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'Indirizzo: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Supervisore: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Dottorando: Francesco Caso

INDICE

RIASSUNTO	pag. 5
SUMMARY	pag. 7
LISTA delle ABBREVIAZIONI	pag. 9
1. INTRODUZIONE	pag. 11
1.1 Pattern Recognition Receptors, PRRs	pag. 11
1.2 L'Inflammosoma	pag. 14
1.3 Citochine proinfiammatorie	pag. 16
2. LE MALATTIE AUTOINFIAMMATORIE SISTEMICHE	pag. 19
3. SINDROME PERIODICA ASSOCIATA AL RECETTORE 1 DEL TNF (TRAPS)	pag. 26
3.1 Aspetti clinici	pag. 26
3.2 Genetica e mutazioni del TNFRSF1A. Eziopatogenesi della TRAPS	pag. 28
3.3 Quadro laboratoristico	pag. 31
3.4 Strategie terapeutiche nella TRAPS	pag. 32
4. MiRNA	pag. 34
4.1 Generalità MiRNA	pag. 34
4.2 MiRNA e stati patologici	pag. 35
4.3 I miRNA nelle malattie reumatiche	pag. 37
4.4 MiRNA e TRAPS	pag. 38
5. SCOPO DELLO STUDIO	pag. 40
6. METODI	pag. 41
7. ANALISI STATISTICA	pag. 43
8. RISULTATI	pag. 44
9. CONCLUSIONI	pag. 50
10. BIBLIOGRAFIA	pag. 56
Ringraziamenti	pag. 75

Riassunto

Introduzione: Le malattie autoinfiammatorie sistemiche rappresentano un gruppo di affezioni di recente inquadramento diagnostico, caratterizzate da episodi infiammatori recidivanti a carico di vari apparati, apparentemente primitivi, e patogeneticamente, correlati ad alterazioni dell'assemblaggio e della funzionalità dell'inflammosoma.

Scopo: Analizzare le manifestazioni cliniche ed il loro decorso in una coorte di pazienti adulti con episodi infiammatori ricorrenti sistemici ed i profili di espressione dei microRNA, miR-150-3p e miR-92a-3p.

Metodi: Sono state considerate ed analizzate le caratteristiche cliniche ed il loro decorso in pazienti adulti con episodi infiammatori ricorrenti sistemici, che giungevano alla nostra osservazione. Per l'analisi dei MicroRNA, dopo estrazione e retrotrascrizione dell'RNA, sono stati eseguiti saggi di Real-Time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

Risultati: I risultati hanno mostrato una differenza nell'espressione di alcune manifestazioni cliniche a seconda della presenza o assenza di mutazioni del gene *TNFRSF1A*. In particolare, sono emerse una frequenza più alta di pericardite recidivante, e ricorrenza di episodi febbrili di lunga durata, nel gruppo dei pazienti portatori di mutazioni non strutturali, quando comparati a pazienti geneticamente negativi. I pazienti portatori di mutazioni strutturali del gene *TNFRSF1A* hanno mostrato un fenotipo più severo, quando comparati con pazienti geneticamente negativi e portatori di mutazioni non strutturali. Il decorso all'ultimo follow-up è risultato significativamente eterogeneo e strettamente correlato alla presenza o assenza di mutazioni del gene *TNFRSF1A*. In particolare, è emersa una incrementata refrattarietà alle terapie anti-infiammatorie tradizionali nei pazienti portatori di mutazioni del gene *TNFRSF1A*. L'aumentato livello dei miRNA, miR-150-3p e miR-92a-3p, è stato osservato in pazienti con episodi infiammatori ricorrenti geneticamente negativi e portatori di mutazioni a bassa penetranza, e non nei soggetti controllo.

Conclusioni: In riferimento al quadro clinico, le mutazioni non strutturali del *TNFRSF1A* sembrano essere associate ad un fenotipo le cui caratteristiche

distintive sono rappresentate da una frequenza più alta di pericardite recidivante, ricorrenza di episodi febbrili di lunga durata, ed un quadro infiammatorio che spesso necessita di una terapia mirata con agenti biologici. Il riscontro dell'up-regolazione dei miRNA, miR-150-3p e miR-92a-3p, nei pazienti portatori di mutazioni non strutturali del *TNFRSF1A*, potrebbe sottolineare l'importanza di un loro possibile impiego come biomarkers.

Summary

Introduction: Autoinflammatory diseases represent a group of disorders, characterized by recurrent inflammatory episodes involving different body sites. Pathogenetically, flares causes are related to inflammosome assembly and functionality alterations.

Aim: The aim of the study was to analyze clinical manifestations and their outcome in a cohort of adult patients with recurrent systemic inflammatory episodes and microRNAs (miRNAs), miR-150-3p and miR-92a-3p profiles.

Methods: For this study, clinical characteristics and their outcome in adult Caucasian Italian patients with recurrent systemic inflammatory episodes were considered and analyzed. For miRNAs analysis, after RNA extraction and reverse transcription assays, real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction was performed.

Results: Clinical manifestations resulted strictly dependent by *TNFRSF1A* genotype. In particular, a higher frequency of recurrent pericarditis, and recurrence of febrile episodes, in the group of patients with non-structural *TNFRSF1A* mutations, were shown, when compared to patients genetically negative. Patients carrying structural *TNFRSF1A* mutations showed the most severe phenotype, when compared with patients genetically negative and those carrying non-structural *TNFRSF1A* mutations. At the last follow-up, disease course was significantly heterogeneous and closely related to the presence or absence of *TNFRSF1A* mutations. In particular, patients with *TNFRSF1A* mutations were refractory to conventional anti-inflammatory therapies. Using real-time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction, increased levels of miRNAs miR-150-3p and miR-92a-3p have been observed in patients with non-structural *TNFRSF1A* mutations and genetically negative, and not in healthy control subjects.

Conclusions: Not-structural *TNFRSF1A* mutations seem to be associated with a distinctive phenotype, whose features are represented mainly by a high frequency of recurrent pericarditis, recurrent febrile episodes of long duration, and an inflammatory course that often requires a targeted therapy with biological agents.

The up-regulation of miRNAs, miR-150-3p and miR-92a-3p, in patients with non-structural *TNFRSF1A* mutations, could underline the importance of their use as possible biomarkers.

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

IL-1 β : Interleukin-1 β

MAIS: Malattie Autoinfiammatorie Sistemiche

miRNA: Micro-RNA

PCR: Proteina C-Reattiva

RTqPCR: Real-Time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction

SAA: Siero Amiloide-A

TRAPS: Sindrome periodica associata al recettore del TNF

TNFRSF1A: *TNF-receptor superfamily 1A*

1. INTRODUZIONE

Il sistema immunitario comprende una rete integrata di mediatori biochimici e cellulari impegnati nella difesa dell'organismo da agenti dannosi di natura chimica, infettiva o traumatica. Esso esplica la sua funzione attraverso due differenti tipi di risposte: i) risposta immunitaria innata e ii) immunità acquisita. La risposta immunitaria innata rappresenta la prima fase di difesa da eventi dannosi, in particolare infezioni, e comprende diversi mediatori biochimici e cellulari responsabili dell'infiammazione, mentre l'immunità acquisita è caratterizzata da una risposta più specifica, mediata da anticorpi ed attivazione dei linfociti T. I subset cellulari coinvolti in entrambe le risposte immunitarie presentano specifici recettori di riconoscimento chiamati *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). I ligandi dei PRRs sono rappresentati da molecole di origine endogena, denominate *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), rilasciate in seguito a necrosi cellulare, e da proteine microbiche, denominate *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) (1, 2). I PAMPs rappresentano molecole comuni a diverse specie microbiche ed indispensabili per la loro sopravvivenza; alcuni esempi di PAMPs sono rappresentati da acidi lipoteicoici della parete dei Gram positivi, lipopolisaccaride (LPS) della parete dei Gram negativi, peptidoglicano o alcune sue componenti, l'RNA doppia elica, il beta glucano e il mannano dei funghi (3, 4).

L'attivazione dell'immunità innata, innescata dal riconoscimento cellulare dei ligandi dei PRRs, dà luogo al rilascio di citochine proinfiammatorie e chemochine a loro volta in grado di induzione e perpetuazione della risposta infiammatoria.

1.1 Pattern Recognition Receptors, PRRs

I PRRs comprendono tre sottogruppi: i recettori Toll-like (Toll-like receptor, TLRs) (5), i recettori RIG-1 (RLRs) (6) ed i recettori NOD-like (Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat family, NLRs) (7) (Figura 1.1).

La famiglia dei PRRs è rappresentata dai recettori TLRs, glicoproteine transmembrana di tipo I, espresse su cellule mielomonocitiche, epiteliali ed

endoteliali (8-10). Essi presentano, nella regione extracellulare, un dominio ricco in Leucine (leucine rich-repeat domain, LRR), deputato al riconoscimento del ligando, ed un dominio citoplasmatico, denominato Toll/IL-1 (Toll/IL-1 receptor domain, TIR) deputato al signaling intracellulare (11).

In base alla loro localizzazione cellulare, i TLRs sono distinti in due gruppi: i TLRs di membrana (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 e 11) che legano PAMPs componenti della parete batterica, quali ad esempio lipidi, proteoglicani e carboidrati, ed i TLRs 3, 7 e 8 endosomiali, che riconoscono PAMPs derivati da acidi nucleici virali, come ssRNA e dsRNA (12, 13). La funzione dei TLRs di superficie è quella di regolare l'attivazione della risposta infiammatoria di fase acuta, e di promuovere la flogosi e la fagocitosi, mentre i TLRs antivirali, localizzati nel compartimento endosomiale, determinano la sovra-regolazione del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC), la secrezione di citochine proinfiammatorie quali Interferone (*Interferon*, IFN), il Fattore di Necrosi Tumorale- α (*Tumor Necrosis Factor*, TNF- α) e le Interleuchine (IL) IL-1, IL-6 e IL-12 (14, 15). Quindi, il riconoscimento cellulare dei PAMPs da parte dei TLRs è in grado di attivare una risposta immunitaria innata, caratterizzata dall'attivazione di vie di segnalazione distinte, che conducono alla sintesi di citochine pro-infiammatorie e all'attivazione cellulare (16-18). Tale risposta migliora la fisiologica capacità dell'ospite di ostacolare la proliferazione e la diffusione degli agenti patogeni nel periodo antecedente lo sviluppo dell'immunità antigene-specifica (16-19).

La seconda famiglia di PRRs, è rappresentata dai recettori RLRs, un gruppo di RNA elicasi citoplasmatiche espresse in particolare nei fibroblasti, nelle cellule dendritiche e nei macrofagi (20). A questa famiglia appartengono le proteine RAG-1 e MAD-5, con funzioni di regolazione della produzione di IFN in risposta ad acidi nucleici di origine virale (21).

La terza famiglia di PRRs, anch'essa localizzata nel citoplasma, è rappresentata dai recettori NLRs che, a differenza dei TLRs, riconoscono sia prodotti microbici che accedono all'interno delle cellule (quali ad esempio la flagellina) sia le molecole liberate dall'ospite in corso di stress o danno cellulare (come l'ATP extracellulare) (22-24). Le proteine NLRs (anche definite NALP, NOD-LRR, NACHT-LRR, CATERPILLER) sono caratterizzate, all'estremità C-terminale, da

un dominio LRRs, da un dominio centrale denominato specific nucleotide-binding fold domain (NACHT) e, all'estremità N-terminale da un dominio di interazione proteina-proteina e da un dominio CARD (Caspase Activity Recruitment Domain), deputato al reclutamento e all'attivazione delle caspasi, enzimi implicati nel processo infiammatorio (come la caspasi-1) ed apoptotico (25).

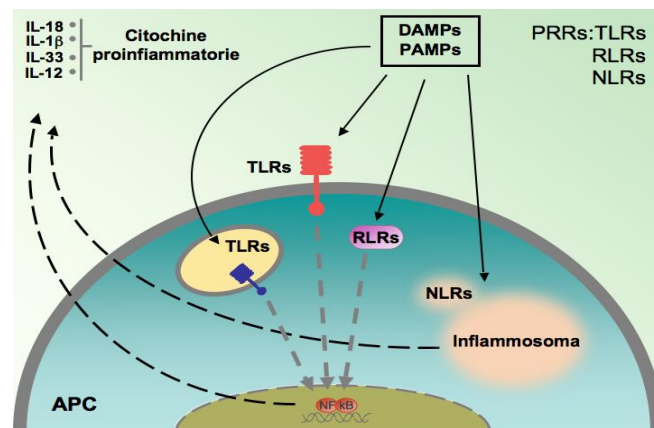


Figura 1.1. L'attivazione dei Recettori PRRs attraverso il legame a stimoli di origine endogena (DAMPs) o esogena (PAMPs) determina la secrezione, da parte delle cellule del sistema immunitario innato, di varie citochine infiammatorie.

Abbreviazioni: PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*; DAMPs, *Damage-Associated Molecular Patterns*; TLRs, *Toll-like receptor*, RLRs, recettori RIG-1, NLRs, recettori NOD-like, NF-κB, *Nuclear Factor kappa B* e APC, cellule presentanti l'antigene.

Il dominio NACHT (anche conosciuto come dominio NOD o NBD) costituisce una NTPasi che idrolizza ATP o GTP (26, 27), con ruolo fondamentale nell'attivazione delle proteine NLRs. Mutazioni del dominio NACHT ne inibiscono la funzione (28, 29). A differenza del dominio NACHT il dominio LRRs è presente in diverse proteine, ed agisce come sito d'interazione proteina-proteina, svolgendo un ruolo cruciale nel riconoscimento di alcune componenti microbiche, inclusi i PAMPs (30). Tuttavia non è noto se il dominio LRRs interagisca con i prodotti microbici in modo diretto o, indiretto, attraverso il coinvolgimento di altre molecole intermedie di segnalazione.

Infine il dominio CARD, presente all'estremità N-terminale delle proteine NLRs, svolge la funzione di reclutamento di effettori a valle implicati nella cascata di

segnalazione. In base ai domini presenti all'estremità N-terminale, le proteine NLRs, comprendono diverse sottoclassi di famiglie di molecole: la sottofamiglia CARD (denominata NLRC o NACHT, LRR, e CARD domain containing protein), la sottofamiglia PYRIN (denominata NLRP o NACHT, LRR e PYD domain containing protein), e la sottofamiglia BIR-like (*Baculoviral Inhibitory Repeat*). Queste proteine sono tutte coinvolte nella regolazione delle vie di segnalazione pro-apoptotiche e pro-infiammatorie (31) (Figura 1.2).

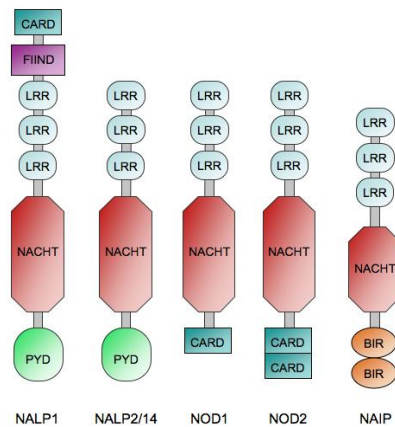


Figura 1.2. Rappresentazione dei domini di struttura di alcune proteine della famiglia NLRs.

Abbreviazioni: CARD, caspase activity recruitment domain; FIIND, function to find domain; LRR, leucine rich-repeat domain; NACHT, domain present in NAIP, CIITA, HET-E e telomerase-associated protein; PYD, pyrin domain; BIR, baculovirus IAP (inhibitor of apoptosis protein) repeat.

1.2 L'Inflammosoma

Il riconoscimento dei PAMPs attraverso i domini LRRs delle proteine NALP determina l'assemblaggio di un complesso multiproteico citoplasmatico di circa 700 kDa, definito "inflammosoma", che svolge un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria. L'inflammosoma è composto da proteine appartenenti alla famiglia NLRs, dall'adattatore molecolare ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e dalla forma attiva della caspasi-1 (32); è responsabile dell'attivazione delle caspasi-1 e -5 ed è in grado di promuovere il taglio proteolitico e la secrezione delle citochine infiammatorie IL-1 β e IL-18 (33).

La specificità della risposta infiammatoria dell'inflammosoma è determinata dalle diverse proteine NALP coinvolte. La famiglia NALP è infatti composta da 14 membri NALP (1-14) caratterizzati dalla presenza a livello N-terminale di un dominio PYD. NALP1 contiene in aggiunta i due domini FIIND (*function to find domain*), e CARD. Le proteine NALP sono coinvolte nell'apoptosi. NALP1 è in grado, infatti, di legare la caspasi-9 e APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*) (34) e tutte sono coinvolte nella modulazione della cascata trasduzionale del Fattore Nucleare NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*, NF- κ B) (35), ma restano non chiariti il processo di attivazione delle proteine NALP e la loro azione di inibizione (36). Fino ad oggi sono stati caratterizzati due tipi di inflammosoma: l'inflammosoma NALP1, nel quale sono presenti la proteina NALP1, la proteina ASC e la caspasi-1 e -5, e l'inflammosoma NALP2/3, costituito dalle proteine NALP2 o 3, dalla proteina ASC, dalla caspasi-1 e dalla proteina CARDINAL (o TUCAN, CARD8, NDDP1). L'adattatore molecolare ASC risulta fondamentale nell'attivazione dell'inflammosoma in quanto costituito da un dominio CARD C-terminale ed uno PYD N-terminale, importanti per le interazioni proteina-proteina necessarie per la propagazione del segnale. Infatti, il dominio PYD di ASC interagisce con il PYD di diversi NALP, mentre CARD recluta il CARD della pro-caspasi-1. Tale legame induce il processamento e l'attivazione della pro-IL-1 β ad IL-1 β nella sua forma attiva (37) (Figura 1.3). Similmente ai recettori TLRs, l'attivazione dell'inflammosoma avviene tramite il riconoscimento di PAMPs da parte delle proteine NALP attraverso i loro domini LRRs (30). L'esatto meccanismo di attivazione dell'inflammosoma rimane sconosciuto. È noto, tuttavia, che l'attivazione del TLR 4 ad opera di patogeni extracellulari determina l'attivazione del dominio PYD della proteina citosolica NALP1 (32).

Recenti studi hanno evidenziato che l'attivazione dell'inflammosoma NALP3 da parte di diversi stimoli, tra cui il muramil dipeptide (MDP) (38), l'RNA di origine batterica (27), l'ATP (39) e l'acido urico (40), risulta fondamentale nell'attivazione della caspasi-1 e la conseguente produzione di IL-1 β e IL-18 (41). Inoltre LPS ed alte concentrazioni di ATP sono in grado di aumentare la sintesi di IL-1 β da parte dei macrofagi (42).

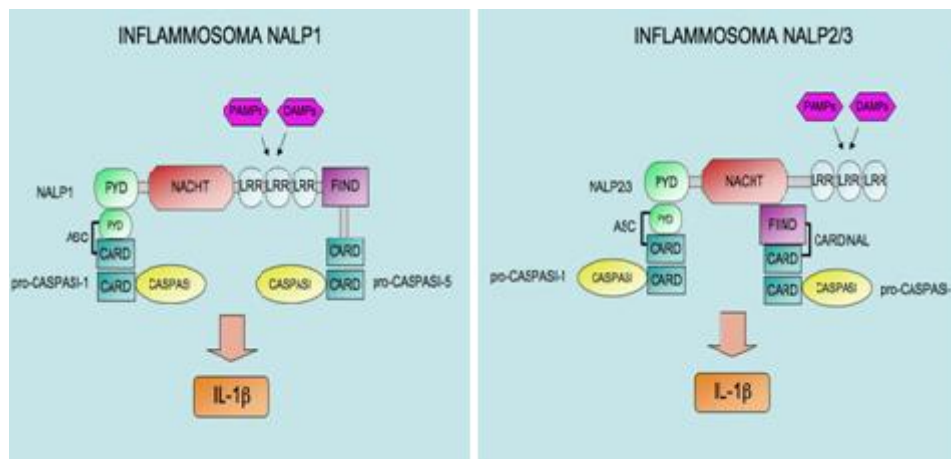


Figura 1.3. Rappresentazione schematica delle proteine coinvolte nell'inflammosoma NALP1 e NALP2/3, complesso multimolecolare noto svolgere un ruolo chiave nella risposta infiammatoria mediante il processamento e la secrezione dell'IL-1 β .

Gli effetti dell'ATP sono mediati dal recettore purinergico P2X7, il quale una volta attivato è in grado di indurre un rapido efflusso di ioni potassio dalle cellule, con conseguente permeabilizzazione della membrana plasmatica ed attivazione della caspasi e dell'inflammosoma NALP3 (40). Il modello NLRs costituisce quindi una seconda linea di difesa verso agenti patogeni che hanno eluso i PRRs localizzati sulla superficie cellulare.

1.3 Citochine proinfiammatorie

Le citochine rappresentano molecole proteiche del peso molecolare di circa 25 kDa sintetizzate nell'organismo da diversi tipi cellulari, in seguito ad uno stimolo in grado di indurre crescita, differenziamento o morte cellulare. Queste molecole possono agire in modo autocrino, sulla stessa cellula secernente, o in modo paracrino, su cellule adiacenti, o in modo endocrino, influenzando l'attività di cellule distanti. In base alla loro attività funzionale, le citochine vengono distinte in cinque principali famiglie: le ematopoietine, che comprendono vari fattori di crescita; le interleuchine e i TNF, importanti regolatori dell'immunità innata ed acquisita; gli IFN e le chemochine. Alcune citochine, definite primarie, sono sintetizzate direttamente dopo l'attivazione di PRRs proinfiammatori da parte di

prodotti microbici, mentre altre, definite secondarie, vengono sintetizzate in seguito a stimolazione da parte delle citochine primarie.

L' IL-1 β è una citochina primaria pro-infiammatoria che svolge un ruolo fondamentale sia nella risposta immunitaria innata che nella risposta infiammatoria. È secreta da vari tipi cellulari tra cui macrofagi, monociti, cellule dendritiche, fibroblasti e cellule endoteliali (43, 44). La sua sintesi si innesca in risposta ad infezioni batteriche, alla presenza di TNF e all'interazione delle cellule che la secernono con linfociti T CD4 positivi (45). L'IL-1 β è coinvolta in numerosi processi biologici, tra cui aumento dell'adesione endoteliale dei leucociti e induzione del riassorbimento osseo (46). Inoltre, in qualità di regolatore della risposta immunitaria e infiammatoria, questa citochina è in grado di indurre l'espressione della ciclossigenasi-2 (COX-2), delle proteine di fase acuta quali la proteina C-reattiva (PCR), la siero amiloide-A sierica (SAA), il fibrinogeno e numerosi inibitori delle proteasi (46-48).

In seguito alla stimolazione dei TLRs da parte di prodotti microbici (49), l'IL-1 β è sintetizzata come precursore inattivo di 31 kDa (pro-IL1 β). Successivamente, la forma attiva di 17 kDa viene rilasciata mediante taglio proteolitico ad opera della caspasi-1 (*interleukin-converting enzyme*) (50). La stessa caspasi-1 è sintetizzata come precursore inattivo (pro-caspasi-1) e può essere attivata in seguito alla stimolazione di proteine NLRs ed il successivo assemblaggio dell'inflammosoma (51).

Recenti studi hanno evidenziato che il rilascio di IL-1 β è mediato dal recettore per l'ATP extracellulare P2X7, capace di controllare l'efflusso del potassio dalle cellule (42, 49). Inoltre, alcuni studi sostengono che il recettore P2X7 sia implicato nel processo di maturazione da pro-IL1 β a IL-1 β attraverso l'attivazione delle caspasi-1 (42).

Il TNF è una delle principali citochine proinfiammatorie coinvolte negli eventi locali e sistemici dell'infiammazione, mediando diversi processi biologici tra cui apoptosi, proliferazione cellulare, modulazione immunitaria, infiammazione, ed autoimmunità (52-57). Il gene che codifica per il TNF- α è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6, su cui sono presenti anche i geni codificanti l'MHC e le linfotossine- α (LT- α , o TNF- β) e - β (LT- β), proteine con elevate proprietà

citotossiche secrete da linfociti che condividono i recettori del TNF e con meccanismi d'azione sovrapponibili a quelli del TNF- α (58).

Il TNF- α è una proteina transmembrana di tipo II sintetizzata principalmente da monociti e macrofagi ma anche da altri tipi cellulari tra cui linfociti, leucociti polimorfonucleati, cellule *Natural Killer* (NK), cheratinociti ed astrociti (59-61). In seguito a stimolazione, il TNF- α induce, in monociti e neutrofili la fagocitosi e l'adesione alle cellule endoteliali, le quali a loro volta evidenziano l'induzione dell'attività pro-coagulante. L'attivazione delle cellule endoteliali con TNF- α determina una riorganizzazione strutturale dell'endotelio, ed una conseguente incrementata permeabilità vascolare. Questo è in parte dovuto alla capacità del TNF- α di stimolare la produzione del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF) (62). Inoltre il TNF- α induce la sintesi di una citochina infiammatoria, l'IL-8, e di altre citochine chemiotattiche come la proteina chemiotattica dei monociti-1 (MCP-1) che determina l'incremento del numero di monociti nel sito di infiammazione (63). Il precursore del TNF- α ha un peso molecolare di 26 KDa, che successivamente viene ridotto a 17 KDa da una metalloproteinasi chiamata *enzima convertente il TNF* (TACE). Il taglio proteolitico da parte dell'enzima rappresenta un passaggio essenziale per il rilascio della citochina (64). Il TNF- α trasmette il proprio segnale attraverso il legame a due diversi recettori di superficie cellulare, il TNFR1 (o TNFR1A, p55/p60-TNFR, CD120a) ed il TNFR2 (o TNFR1B, p75/80-TNFR, CD120b), entrambi appartenenti alla superfamiglia denominata dei recettori per il TNF (*Tumor Necrotic Factor Receptor SuperFamily* (TNFRSF). Questi recettori, attraverso il reclutamento di diverse proteine, promuovono diverse vie di segnalazione capaci di indurre l'attivazione di fattori di trascrizione quali NF- κ B ed AP-1 (*Activator Protein-1*), l'attivazione di protein-chinasiche attivate da mitogeni (MAPKs) ed indurre apoptosi (65).

2. LE MALATTIE AUTOINFIAMMATORIE SISTEMICHE

Le malattie autoinfiammatorie sistemiche (MAIS) sono un gruppo di affezioni di recente inquadramento diagnostico, caratterizzate da episodi infiammatori recidivanti a carico di vari organi od apparati, apparentemente primitivi, in particolare senza evidenza di eziologia infettiva o autoimmune. Il termine “autoinfiammatorio” descrive lo sviluppo apparentemente spontaneo di infiammazione in assenza di un titolo elevato di linfociti T self-reattivi o autoanticorpi specifici, tipici delle malattie autoimmuni (66). Le MAIS sono caratterizzate da risposte aberranti a PAMPs e DAMPs e da una mancata regolazione nella produzione di citochine infiammatorie, quali l’IL-1 β , l’IL-18 ed il TNF- α . L’ipotesi formulata è che, in questi tipi di malattie, la risposta immunitaria innata sia iperattiva oppure cessa in ritardo (67).

Sebbene queste patologie presentino caratteristiche genetiche distinte e peculiari (Tabella 1), sono spesso caratterizzate dalla presenza di manifestazioni cliniche comuni che possono rendere difficoltoso il percorso di diagnostica differenziale. Clinicamente, le MAIS si presentano con episodi infiammatori sistemici di durata estremamente variabile in associazione a febbre, coinvolgimento infiammatorio delle sierose, della cute e della membrana sinoviale, mentre dal punto di vista bioumorale, sono caratterizzate da una abnorme risposta di fase acuta con incremento degli indici di flogosi (PCR, SAA) e marcata leucocitosi neutrofila. La complicanza più temibile delle MAIS è rappresentata dall’amiloidosi, che insorge in circa il 25% dei pazienti, e che conduce ad insufficienza renale cronica (68-70).

Tra le MAIS, si distingue un sottogruppo di patologie monogeniche denominate “febbri periodiche ereditarie”, caratterizzate da un fenotipo clinico comune con episodi ricorrenti di febbre ed altri sintomi di infiammazione sistemica (71). Tale gruppo comprende la febbre Mediterranea familiare (FMF), la sindrome associata al deficit parziale di mevalonato chinasi (*Mevalonate kinase deficiency*, MKD) anche conosciuta come sindrome da ipergammaglobulinemia D (HIDS), la sindrome periodica associata al recettore di tipo 1 del TNF- α (*tumor necrosis factor receptor-1-associated periodic syndrome*, TRAPS), quest’ ultima descritta

nel paragrafo successivo. La FMF è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata prevalentemente da episodi ricorrenti acuti di febbre, polisierosite, artrite e manifestazioni cutanee eritematose erisipeloidi. E' dovuta a mutazioni del gene *MEFV* (MEditerranean FeVer), localizzato all'interno del cromosoma 16 e costituito da 10 esoni codificanti la proteina denominata pirina/marenostrina; le mutazioni del gene *MEFV* individuate fino ad oggi nei pazienti con FMF risultano circa 200, e la più frequente di queste, M694V, correla con un fenotipo ad esordio clinico più precoce. La pirina è espressa prevalentemente in granulociti neutrofili ed eosinofili, monociti, cellule dendritiche, fibroblasti cutanei, peritoneali e della sinovia. Le alterazioni della pirina sono principalmente alla base della disregolazione della funzionalità dell'inflammosoma e dell'alterata inibizione dell' IL-1 con prevalenza dei processi flogistici ed inibizione dei processi apoptotici. Gli attacchi possono essere precipitati o scatenati da agenti "trigger" quali stress ed infezioni. La malattia colpisce più frequentemente, ma non esclusivamente, le popolazioni del Bacino del Mediterraneo.

Circa la metà dei pazienti può presentare un'anamnesi familiare negativa per FMF. Solitamente, l'esordio della FMF avviene tra i 5 e i 15 anni di età e prima dei 20 anni nell' 80% circa dei casi; tuttavia, in una bassa percentuale di pazienti l'insorgenza può avvenire prima dei 5 anni di vita o in età adulta. Il rapporto M/F è 2:1. L'insorgenza è acuta ed è caratterizzata da episodi febbrili ricorrenti della durata di circa 24-72 ore che solitamente regrediscono e si autolimitano spontaneamente nel tempo. Gli episodi febbrili possono associarsi ad una o più delle seguenti manifestazioni: dolore toracico e/o addominale con polisierosite (pleurite, pericardite e peritonite), artromialgie e/o artrite, manifestazioni cutanee eritematose simili all' erisipela (eritema simil-erisipeloide) a carico della cute degli arti inferiori. La frequenza è molto irregolare e varia più frequentemente da un episodio ogni 2-4 settimane ad un episodio ogni 3-4 mesi; la gravità di ogni attacco può essere estremamente variabile. Ogni episodio acuto è associato ad un quadro laboratoristico infiammatorio caratterizzato da leucocitosi neutrofila e meno frequentemente, trombocitemia e/o anemia, un aumento della Velocità di Eritrosedimentazione (VES), della PCR, della SAA.

La diagnosi di FMF rimane prevalentemente clinica e può essere confortata dai test di conferma genetica in grado di evidenziare eventuali mutazioni del gene MEFV, la cui negatività tuttavia non esclude la diagnosi clinica di FMF. I criteri diagnostici più utilizzati sono quelli di Tel-Hashomer (28). Questi sono suddivisi in criteri maggiori: 1) episodi ricorrenti di febbre associati a peritonite, pleurite, pericardite o sinovite; 2) amiloidosi di tipo AA, in assenza di altre patologie predisponenti; 3) buona risposta alla somministrazione giornaliera di Colchicina; criteri minori: 1) episodi febbrili ricorrenti; 2) eritema simil-erisipeloide; 3) storia familiare positiva di FMF in un parente di 1° grado. La presenza di due criteri maggiori o di un criterio maggiore e due minori permette di porre una diagnosi definitiva di FMF; la presenza di un solo criterio maggiore e uno minore può indirizzare verso una probabile diagnosi che può essere sostenuta successivamente attraverso la ricerca di mutazione del gene MEFV (69, 71).

La Sindrome da Deficit di Mevalonato Chinasi (Mevalonate kinase deficiency; MKD) è una malattia genetica su base autosomica recessiva dovuta a mutazioni del gene codificante la mevalonato-kinasi (MK), localizzato sul braccio lungo del cromosoma 12. L'enzima MVK è responsabile della fosforilazione dell'acido mevalonico in acido 5-fosfomevalonico nella via degli isoprenoidi ed è coinvolto nella biosintesi di colesterolo, molecola precursore degli ormoni steroidei e degli isoprenoidi necessari per la prenilazione di proteine target. L'alterata funzionalità di questo enzima si riflette quindi sul metabolismo di queste molecole con conseguente accumulo di acido mevalonico e per attivazione di meccanismi ancora non noti, aumentata secrezione di IL-1 β .

L'esordio della malattia è tipico dell'infanzia e i sintomi principali sono rappresentati da episodi ricorrenti di febbre alta (>38,5 °C), che anche se generalmente irregolari presentano una durata media di 3-7 giorni e si verificano ogni 4-6 settimane. Gli attacchi febbrili sono accompagnati da cefalea, linfadenopatia dolorosa generalizzata ed in particolare cervicale, splenomegalia, aftosi ed ulcerazioni orali e vaginali, artrite e/o artralgie, grave dolore addominale associato a vomito e diarrea e rash cutaneo maculare. Nei periodi intercorrenti tra gli episodi acuti sono presenti intervalli liberi da sintomi. Il coinvolgimento articolare generalmente è rappresentato da artralgie ed una poliartrite simmetrica

che coinvolge principalmente le grandi articolazioni, come ginocchia e caviglie, generalmente senza causare danno articolare permanente.

A differenza di quanto avviene nelle altre MAIS, l'amiloidosi AA è molto rara nella MKD (3 % circa dei casi), nonostante le caratteristiche di ricorrenza e persistenza dell'infiammazione.

Gli esami di laboratorio, in particolare durante gli attacchi acuti, possono mostrare leucocitosi, con aumento di VES e PCR. Le concentrazioni di IgD possono essere aumentate (IgD >100 UI/ml), ma non costantemente e pertanto non risultano patognomiche visto che un loro aumento può verificarsi anche in altre MAIS. Anche la concentrazione urinaria di acido mevalonico può essere modestamente aumentata durante l'attacco acuto e talvolta può essere utile per chiarire la diagnosi.

La terapia con FANS e/o steroidi ad alti dosaggi può mostrare un effetto parziale durante gli attacchi acuti ma risulta inefficace nella remissione completa della malattia. Poco utili sono anche la colchicina o i DMARDs classici. Le statine ed in particolare la simvastatina, sembrerebbero efficaci nel ridurre la durata degli episodi acuti. Il rationale del loro utilizzo si basa sul tentativo di ridurre la produzione di mevalonato, prodotto attraverso il blocco dell'enzima 3-idrossi-3-methylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA) reduttasi. L'impiego di terapie con agenti anti-citochine e soprattutto anti-IL1 è risultato utile in molti casi refrattari ad altri farmaci.

Il fenotipo correlato ad una mutazione genetica capace di causare una quasi completa inattività della MK costituisce la forma più rara di deficit di questo enzima, definita aciduria mevalonica (Mevalonic Aciduria; MA) (69, 71).

Le sindromi febbrili periodiche associate ad alterazioni dei geni codificanti per la criopirina NLRP3 o criopirinopatie (CAPS) sono un gruppo di rare malattie autoinfiammatorie a trasmissione autosomica dominante. Le mutazioni alla base di queste patologie riguardano il gene CIAS1 localizzato sul cromosoma 1, che codifica per la componente dell' inflammasoma, NLRP3 o criopirina, a cui consegue un' attivazione costitutiva dell' inflammasoma con conseguente sovrapproduzione dell' IL-1. Le CAPS interessano per lo più la popolazione infantile e sono rappresentate da tre entità cliniche: la sindrome di Muckle-Wells

(*Muckle-Wells syndrome*, MWS), l'orticaria familiare da freddo (*familial cold urticaria* o *familial cold autoinflammatory syndrome*, FCU/FCAS), e la sindrome NOMID/CINCA (*neonatal onset multisystem inflammatory disease*, NOMID) (*chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome*, CINCA) (69). In tutte e tre le patologie, il rash cutaneo papulare, simil-orticarioide, non pruriginoso e non rispondente ai farmaci anti-istaminici è una manifestazione costante generalmente osservabile in FCAS e MWS in forma migrante e in NOMID in forma fissa e spesso rappresenta il primo segno d'apparizione (69).

La Sindrome di Blau (BS) e la Early Onset Sarcoidosis (EOS) rappresentano malattie autoinfiammatorie granulomatose che insorgono in età pediatrica in soggetti con alterazioni genetiche del gene CARD15/NOD2 (72, 73).

La Sindrome di Blau rappresenta una rara malattia granulomatosa a trasmissione autosomica dominante, causata da mutazioni nella regione codificante il dominio di legame nucleotidico (NBD) del dominio del gene della caspasi (CARD15/NOD2). E' interessante notare che il gene CARD15/NOD2, mappato sulla regione cromosomica 16q12.1-13, responsabile della BS, risulta coinvolto anche nella suscettibilità ad un'altra malattia granulomatosa, il morbo di Crohn (72, 73). La BS è stata osservata fino ad oggi in circa 200 pazienti appartenenti a 63 famiglie. Nella maggior parte dei pazienti, la malattia è caratterizzata da insorgenza in un'età inferiore ai 5 anni di vita con episodi infiammatori granulomatosi ricorrenti prevalentemente a carico di articolazioni, cute, ed occhio (72, 73).

I disturbi ereditari piogeni sono principalmente caratterizzati dalla presenza di ascessi sterili piogeni che colpiscono cute, articolazioni ed ossa; questi sono rappresentati dalla sindrome PAPA (pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum and acne syndrome), dalla sindrome di Majeed e dalla sindrome da deficit dell'antagonista recettoriale dell'interleuchina-1 (deficiency of the interleukin-1receptor antagonist; DIRA). La sindrome PAPA è una malattia a trasmissione autosomica dominante associata con mutazioni del gene della CD2-binding protein 1 (CD2BP1 or PSTPIP1), codificante per il CD2 antigene-binding protein 1 (cromosoma 15), capace di inibire i segnali infiammatori pirina-mediati. Clinicamente è caratterizzata da esordio in età pediatrica di episodi ricorrenti di

artriti piogeniche sterili, a carico di una o più articolazioni. Si associano, inoltre, solitamente, manifestazioni cutanee quali il pioderma gangrenoso, caratterizzato da lesioni ulcerative a livello degli arti inferiori ed acne cistica. L'insorgenza avviene in età infantile. La terapia con concorticosteroidi, anakinra ed anti-TNF α risulta efficace (28,29).

La Sindrome da deficit dell'antagonista recettoriale dell'interleuchina-1 (Deficiency of the interleukin-1receptor antagonist; DIRA) rappresenta una malattia a trasmissione autosomica recessiva del gene codificante l'antagonista del recettore dell'IL-1 (IL1RN). Clinicamente, sin dal primo anno di nascita è caratterizzata da osteomielite multifocale, periostite e pustolosi. Il coinvolgimento osseo è caratterizzato da lesioni osteolitiche, sclerosi della rima articolare, rigonfiamento delle epifisi delle ossa lunghe, addensamento osseo periostale a livello della metafisi prossimale del femore con elevazione periostale della sua diafisi. Il quadro cutaneo è caratterizzato da lesioni pustolose variabili nelle loro dimensioni. Al quadro laboratoristico, si verifica un aumento persistente degli indici di fase acuta (VES e PCR). Il trattamento prevede l'utilizzo dell'antagonista del recettore dell' IL-1, anakinra (66,68).

Tabella 1. Geni, correlate proteine e modalità di trasmissione alla base delle malattie autoinfiammatorie.

	Malattia	Gene	Proteina	Trasmissione
Febbri Periodiche Ereditarie	Febbre Mediterranea Familiare (FMF)	<i>MEFV</i> (16p13)	Pirina	AR
	Sindrome da Deficit di Mevalonato Kinasi (MVKD)	<i>MVK</i> (12q24)	Mevalonato Kinasi	AR
	Sindrome Periodica Associata al Recettore-1 del TNF (TRAPS)	<i>TNFRSF1A</i> (12p13)	TNFRSF1A	AD
CAPS	Sindrome di Muckle-Wells (MWS)	<i>NLRP3/NALP3</i> (1q44)	Criopirina	AD
	Sindrome Cronica Infantile Neurologica Cutanea ed Articolare (CINCA)	<i>NLRP3/NALP3</i> (1q44)	Criopirina	AD
	Orticaria da Freddo Familiare (FCU)	<i>NLRP3/NALP3</i> (1q44)	Criopirina	AD
Malattie Granulomatose	Sindrome di Blau (BS)	<i>CARD15</i> (16q12.1-13)	NOD2 Proteina	AD
	Sarcoidosi ad esordio precoce (EOS)	<i>CARD15</i> (16q12.1-13)	NOD2 Proteina	Sporadica
Malattie Piogeniche	Sindrome piogenica, artrite, pioderma gangrenosum ed acne (PAPA)	<i>CD2BP1/PSTPIP1</i> (15q24-q25.1)	PSTPIP1 (CD2BP1)	AD
	Deficit di antagonista recettoriale dell'interleuchina-1 (DIRA)	<i>IL1RN</i> (2q14)	Antagonista del recettore IL-1 (IL-1Ra)	AR

Abbreviazioni: **AD:** Autosomica Dominante; **AR:** Autosomica Recessiva; **MVK:** mevalonate Kinase; **TNFRSF1A:** TNF -receptor superfamily 1A; **CIAS1:** cold-induced autoinflammatory syndrome 1; **NLRP3:** nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat and pyrin domain containing protein 3; **NALP3:** NACHT domain, leucine-rich repeat (LRR)- and pyrin (PYD)- domains-containing protein; **CD2BP1:** CD2-binding protein 1; **PSTPIP:** proline serine threonine phosphatase-interacting protein; **IL1RN:** interleukin 1 receptor antagonist; **LPIN2:** lipin-2; **CARD:** caspase recruitment domains; **NOD:** nucleotide-binding oligomerization domain-containing.

3. SINDROME PERIODICA ASSOCIATA AL RECETTORE 1 DEL TNF (TRAPS)

3.1 Aspetti clinici

La sindrome periodica associata al recettore del TNF (TRAPS) è stata descritta per la prima volta nel 1982 in una famiglia di origine irlandese ed è perciò nota come “febbre iberniana”, dall’antico nome latino “Hibernia” dell’Irlanda (74, 75).

La sindrome TRAPS è caratterizzata da manifestazioni cliniche eterogenee, presumibilmente a causa dell’ampio spettro di mutazioni riscontrate a carico del gene *TNFRSF1A* (76).

L’età media di esordio della malattia è di circa 3 anni; gli attacchi durano mediamente 21 giorni e ricorrono solitamente ogni 5-6 settimane. Gli attacchi tipici iniziano frequentemente con crampi muscolari, seguiti da febbre variabilmente associata a manifestazioni cutanee, artrite, coinvolgimento addominale, oculare, respiratorio, genitourinario, linfadenopatie e interessamento delle sierose (77) sotto forma di polisierosite. Gli episodi infiammatori ricorrenti si verificano spontaneamente o dopo eventi scatenanti quali infezioni, stress, esercizio fisico e variazioni ormonali. La più comune manifestazione cutanea è l’eritema centrifugo migrante soprastante l’area colpita da mialgia. Le lesioni erisipeloidi, la presenza di placche eritematose e/o di lesioni orticarioidi rappresentano altre possibili manifestazioni cutanee caratterizzate istologicamente da un infiltrato dermico perivascolare linfo-monocitario. Tali lesioni sono dolenti alla palpazione e calde al termotatto e prevalgono a livello degli arti inferiori, superiori e del torace. Le lesioni precoci sono costituite da macule e papule eritematose che possono distribuirsi in gruppi o essere isolate. Queste lesioni progrediscono espandendosi verso la periferia in grandi macchie o placche. Nella sindrome TRAPS spesso è presente dolore muscolare a livello di un solo distretto corporeo, con pattern centrifugo migrante nell’arco di alcuni giorni. Non è riportato l’aumento degli enzimi muscolari. Tali mialgie sono classicamente associate a fascite monocitica (78). Le artralgie sono più comuni della sinovite

franca e in caso di artrite, essa è solitamente non erosiva, asimmetrica, monoarticolare a carico delle grandi articolazioni. Il dolore addominale è un altro aspetto frequente nella TRAPS e rispecchia uno stato infiammatorio a carico della cavità peritoneale e dei muscoli della parete addominale. Il coinvolgimento dell'occhio può manifestarsi con congiuntivite, edema periorbitale, uveite ed irite. L'amiloidosi secondaria è la più grave complicanza a lungo termine della TRAPS e, quando interessa il rene, porta spesso ad un rapido deterioramento della funzione renale che si manifesta con proteinuria ed insufficienza renale (79, 80). I pazienti portatori di mutazioni a carico dei residui di cisteina, noti per essere associati ad una elevata severità di malattia, sono a rischio aumentato di sviluppare l'amiloidosi (79, 81). Infatti, in questi pazienti la sindrome si presenta con un esordio più precoce e un fenotipo clinico più grave, con un più alto numero di episodi febbrili e una maggiore severità degli attacchi infiammatori rispetto ai pazienti portatori di mutazioni a bassa penetranza (R92Q, P46L e D12E) (75, 76, 82). Questi tendono a mostrare un fenotipo clinico più lieve ed un esordio dei sintomi anche più tardivo, mentre la malattia può anche esprimersi in maniera oligosintomatica con un minor rischio di evoluzione verso l'amiloidosi reattiva (75, 83). In questi pazienti inoltre, la sintomatologia può simulare altre malattie autoinfiammatorie: ad esempio la durata degli attacchi infiammatori può ricordare quella tipica della FMF, il che spesso porta a diagnosi errate e ad una gestione impropria del paziente (82, 84-86). La TRAPS ad esordio in età adulta può anche presentarsi in maniera incompleta o con aspetti atipici; ad esempio può talora manifestarsi con pericardite recidivante e/o miocardite come unica manifestazione clinica della malattia (82, 84-91). Tuttavia, se a supporto di quanto appena indicato, recentemente sono state identificate mutazioni a bassa penetranza in circa il 6% dei pazienti affetti da pericardite acuta idiopatica recidivante (IRAP), il valore patogenetico delle mutazioni non strutturali è ancora da definire con certezza. In aggiunta, lo sviluppo di aterosclerosi ad esordio precoce, le trombosi e l'infarto miocardico acuto possono rappresentare ulteriori complicanze cardiovascolari della sindrome TRAPS (92-94).

La diagnosi di TRAPS dovrebbe essere considerata quando: i suddetti sintomi infiammatori ricorrono in episodi che durano più di 3 giorni; in caso di mialgia

circoscritta ad un distretto corporeo localizzato, associato ad eritema centrifugo migrante a carico di tronco e arti; durante gli attacchi si abbia un coinvolgimento oculare; i sintomi rispondano agli steroidi e non alla colchicina; i sintomi si presentino nella famiglia del paziente con un quadro autosomico dominante.

3.2 Genetica e mutazioni del *TNFRSF1A*. Eziopatogenesi della TRAPS

La sindrome TRAPS è una condizione autosomica dominante legata a mutazioni del gene *TNFRSF1A* che codifica per il recettore di 55 kDa del TNF- α (*TNFRSF1A* o TNFR p55) (74, 75) (Figura 1.4). Ricerche genomiche e analisi di linkage nelle famiglie colpite da TRAPS hanno permesso di individuare il gene responsabile di tale sindrome nel locus 12p13 (74), una regione cromosomica che comprende diversi geni: CD4, LAG-3, CD27, C1R, C1S e *TNFRSF1A* (95, 96). Nel corso degli ultimi 15 anni sono state identificate 86 mutazioni a carico del gene *TNFRSF1A*. *TNFRSF1A* è una proteina transmembrana caratterizzata da un dominio extracellulare, costituito dalla ripetizione in tandem di 4 sub-domini ricchi di cisteina (CRD1-4), una regione transmembrana e un dominio di morte intracellulare (death domain, DD). La regione N-terminale del CRD1, chiamata dominio di assemblaggio del preligando (PreLigand Assembly Domain, PLAD), media le interazioni omotipiche del recettore consentendo un legame efficiente con il ligando e quindi la trasduzione del segnale (95). Il dominio extracellulare è caratterizzato dalla presenza di ponti disolfuro intramolecolari che costituiscono il sito di legame per il TNF- α ed inoltre media l'autoassemblaggio del *TNFRSF1A*. I domini CRD2 e CRD3 interagiscono con il TNF- α trimerico, con conseguente reclutamento della proteina adattatrice TRADD mediante il dominio DD citoplasmatico del *TNFRSF1A* (95, 96). TRADD a sua volta recluta altre proteine per dare il via alla cascata di trasduzione del segnale che porta all'attivazione dell'NF- κ B e quindi alla produzione di citochine proinfiammatorie o in alternativa all'attivazione delle caspasi con conseguente apoptosi cellulare (95-97). In seguito al legame con il suo ligando il recettore subisce il taglio della porzione extracellulare (shedding) ad opera di metalloproteasi (ad esempio, ADAM-17), portando alla formazione di un pool solubile del *TNFRSF1A* che lega il TNF- α

circolante. Delle 86 mutazioni ad oggi identificate, 78 sono missenso a singolo nucleotide e sono state riscontrate soprattutto a carico degli esoni 2, 3, 4 e 6. Tra le eccezioni si descrivono una delezione nell'esone 3 e una mutazione sul sito di splicing nell'introne 4. La maggior parte delle mutazioni interessano i residui di cisteina coinvolti nella formazione di ponti disolfuro intramolecolari che determinano la struttura tridimensionale dei domini CRD e in particolare i domini CRD1 e CRD2 corrispondenti alla porzione esterna della proteina matura (95, 96) (Figura 1.4). Altre mutazioni interessano residui che alterano la struttura secondaria del recettore, come le mutazioni che introducono o rimuovono residui di Prolina (P46L, L67P, S86P, R92P), o residui coinvolti nel legame a idrogeno fra i diversi loops del recettore (T50M, I170N). Recentemente è stato riportato che in alcuni pazienti la malattia potrebbe essere legata ad un ridotto signaling del TNFRSF1A, con conseguente riduzione dell'apoptosi ed attivazione del fattore NF- κ B (98). Ciò potrebbe dipendere da mutazioni che interessano i domini extracellulari del recettore che portano ad un cambiamento conformazionale della proteina che ne determinerebbe un'alterazione funzionale (95, 96). Diversi studi in vitro condotti su colture di cellule HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293), stabilmente trasfettate con un vettore plasmidico codificante per il recettore TNFRSF1A mutato, hanno confermato queste ipotesi (75, 98-100). In particolare sono state studiate le mutazioni T50M, C33Y, e C52F le quali hanno evidenziato sia difetti nell'espressione in superficie del recettore, che difetti di shedding. Quest'ultimo fenomeno impedisce il rilascio del TNFRSF1A solubile e quindi il legame al TNF- α circolante determinando così un aumento della risposta infiammatoria (75, 98-100). Bassi livelli di TNFRSF1A solubile ritrovati in alcuni pazienti affetti da TRAPS hanno fatto ipotizzare che sia proprio questo il possibile meccanismo induttore per l'insorgenza della sindrome. Alcune mutazioni associate alla TRAPS, in particolare quelle con alterazioni dei legami disolfuro intramolecolari, sono state collegate a un difetto di smistamento del TNFRSF1A. L'alterata oligomerizzazione dei recettori mutati ne determinerebbe l'accumulo intracellulare nel reticolo endoplasmatico, come dimostrato da esperimenti in vitro confortati anche da modelli molecolari di TNFRSF1A mutati. Tali esperimenti hanno dimostrato come un accumulo intracellulare del TNFRSF1A mutato

renderebbe le cellule sensibili agli effetti di altri stimoli per l'immunità innata, come ad esempio il LPS batterico, con conseguente eccessiva secrezione autocrina di TNF- α . Anche le specie reattive dell'ossigeno (ROS mitocondriali) possono svolgere un ruolo fondamentale nella risposta infiammatoria in cellule altamente responsive come quelle di pazienti portatori di mutazioni del *TNFRSF1A* (101). Recentemente è stato osservato come un'alterata funzione mitocondriale associata ad un aumento della capacità ossidativa mitocondriale e ad un incremento della generazione di ROS, determini una incrementata produzione di citochine proinfiammatorie come risposta ai LPS, determinata da una prolungata attivazione delle protein-chinasi attivate da mitogeno (MAPK) (102). E' ben noto che l'accumulo intracellulare di proteine con alterato ripiegamento, induce nelle cellule, come risposta allo stress cellulare, l'espressione di geni che servono a ripristinare il corretto funzionamento del reticolo endoplasmatico (UPR) (103). Un'altra proteina UPR-associata, chiamata spliced-X-box binding protein 1 (sXBP1), sembrerebbe coinvolta nella patogenesi della sindrome TRAPS (104). Generalmente i pazienti affetti da malattia presentano una aumentata trascrizione di sXBP1 rispetto ai soggetti sani, infatti diversi esperimenti hanno dimostrato un significativo aumento delle trascrizioni di sXBP1 dopo stimolazione dei monociti di individui con TRAPS mediante LPS. La contemporanea somministrazione di antiossidanti riduceva i livelli di sXBP1 del 40%, suggerendo così un'associazione tra stress ossidativo del reticolo endoplasmatico, causa dell'accumulo di TNFR1 mutato, e aumentati livelli di ROS indotti dai LPS attraverso la via XBP1 in cellule altamente responsive. Una possibile ipotesi patogenetica spiegherebbe come un lieve stress del reticolo endoplasmatico porti ad accumulo di TNFR1 mutato provocando lo splicing di XBP1 ma non una completa UPR. La rimozione dell'accumulo proteico intracellulare secondario ad alterato misfolding e oligomerizzazione dei recettori mutati, può essere effettuata da proteasomi, UPR e/o meccanismi di autofagia (105). Recenti osservazioni hanno dimostrato un legame tra l'infiammazione e l'autofagia, quest'ultima sembra rappresentare in condizioni fisiologiche il principale meccanismo responsabile per l'eliminazione dei compartimenti cellulari danneggiati e degli aggregati proteici mutati che si accumulano in circostanze

patologiche. In particolare, la down-regulation dei processi di autofagia innesca nelle cellule le risposte dell'immunità innata che attivano il pathway dell'NF- κ B cui segue una intensificata ipersecrezione di IL-1 β con conseguente infiammazione cronica.

3.3 Quadro laboratoristico

Gli esami di laboratorio mostrano una elevazione aspecifica degli indici di flogosi anche nei periodi intercritici, seppur ad un livello inferiore rispetto a quello durante gli attacchi. Alcuni pazienti possono presentare leucocitosi neutrofila ed una gammopatia policlonale. Tuttavia il parametro di laboratorio più determinante durante la fase di quiescenza della malattia è il riscontro di bassi livelli sierici del recettore solubile del TNF, a dimostrazione del fatto che la malattia è originata da un difettoso shedding del recettore sulle membrane cellulari (81). La misurazione della SAA è un utile ausilio diagnostico: concentrazioni elevate sono associate ad un rischio progressivo di deposito di fibrille di amiloide in vari parenchimi (85). Si è visto che una percentuale variabile ma considerevole di pazienti con TRAPS potrebbe sviluppare amiloidosi renale. L'obiettivo finale della terapia nella TRAPS prevede la normalizzazione degli indici flogosi accompagnata a riduzione della concentrazione di SAA sotto i 10 mg/L. Negli studi sul trattamento della TRAPS, la SAA ha dimostrato di essere un parametro utile nella valutazione dell'attività clinica in risposta alla terapia con gli inibitori del TNF (106-108). Un'altra proteina legante il calcio denominata S100A12 (o calgranulin C), secreta dai granulociti neutrofili che attiva la risposta infiammatoria nelle cellule endoteliali e nei leucociti attraverso il pathway dell'NF- κ B, potrebbe considerarsi un nuovo marcatore affidabile. Essa risulta strettamente correlata con l'attività di malattia e l'efficacia terapeutica in diverse malattie autoinfiammatorie. Negli ultimi anni ha preso piede l'interesse scientifico per i peptidi derivati dai tessuti adiposi. Diversi mediatori biologici meglio conosciuti come adipocitochine (leptina, resistina, adiponectina e visfatina) hanno dimostrato di svolgere un ruolo rilevante nell'infiammazione sistemica (109). In particolare, i livelli sierici di adiponectina (110), valutati nei periodi intercritici sono risultati

significativamente correlati con la presenza di amiloidosi, mentre i livelli sierici di leptina erano correlati con il numero di attacchi febbrili nel corso dell'anno.

3.4 Strategie terapeutiche nella TRAPS

I principali obiettivi della terapia consistono in: 1) controllo dei sintomi, 2) miglioramento della qualità di vita dei pazienti, e 3) prevenzione delle complicanze a lungo termine. Alcuni pazienti beneficiano dei farmaci antinfiammatori non steroidei ad alto dosaggio (FANS), mentre la colchicina o immunomodulatori come il methotrexate, la ciclosporina e la talidomide risultano poco efficaci (76). Gli attacchi infiammatori rispondono spesso alla somministrazione di corticosteroidi ma i pazienti a volte necessitano di dosi crescenti di steroide o della loro assunzione cronica per evitare flares infiammatori (74, 111). Inoltre gli steroidi non sembrano proteggere completamente dal rischio di sviluppare amiloidosi reattiva, in quanto non normalizzano i livelli di SAA (112). Recentemente, grazie all'identificazione di mutazioni del TNFRSF1A come causa genetica della TRAPS, si è impiegato l'utilizzo di un anti-TNF, sebbene nella maggior parte dei pazienti con TRAPS non vi sia un incremento del TNF (113). Tra gli agenti biotecnologici, il farmaco maggiormente utilizzato fino ad oggi è stato etanercept. La somministrazione di Etanercept ha dimostrato di prevenire gli attacchi infiammatori e/o consentire la riduzione della somministrazione di corticosteroidi (114). Nei pazienti resistenti ad etanercept, gli inibitori dell'IL-1 hanno recentemente dimostrato di indurre una migliore e più duratura efficacia nel controllo delle manifestazioni cliniche e nella normalizzazione degli indici di flogosi, nella maggior parte dei pazienti affetti da TRAPS. Anakinra, antagonista recettoriale dell'IL-1 ha dimostrato di prevenire le recidive della malattia nel breve termine e di indurre una pronta e stabile remissione della malattia (79, 115). Inoltre è stata recentemente descritta la sua efficacia e sicurezza a lungo termine nei pazienti con e senza SAA (116). Il trattamento deve mirare ad indurre una normalizzazione persistente dei livelli di SAA. Per tale ragione si raccomanda un attento monitoraggio della SAA in modo da rilevare qualsiasi elevazione patologica che possa verificarsi anche in pazienti

asintomatici, espressione di una infiammazione subclinica. Per quanto concerne le nuove strategie terapeutiche per la TRAPS, recentemente è stato utilizzato con successo canakinumab, un anticorpo monoclonale IgG1 anti-IL-1 β umana. Un recente studio di fase II condotto su venti pazienti con TRAPS ha dimostrato che canakinumab è in grado di determinare un beneficio clinico ed un rapido ed efficace miglioramento dei parametri bioumorali che si mantengono nel tempo con il proseguimento del trattamento terapeutico. In ultimo, poiché i valori di IL-6 possono risultare elevati nei pazienti con TRAPS (113), è stato ipotizzato che tocilizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato che si lega specificamente ai recettori per l'IL-6 potrebbe essere un'opzione terapeutica alternativa (117).

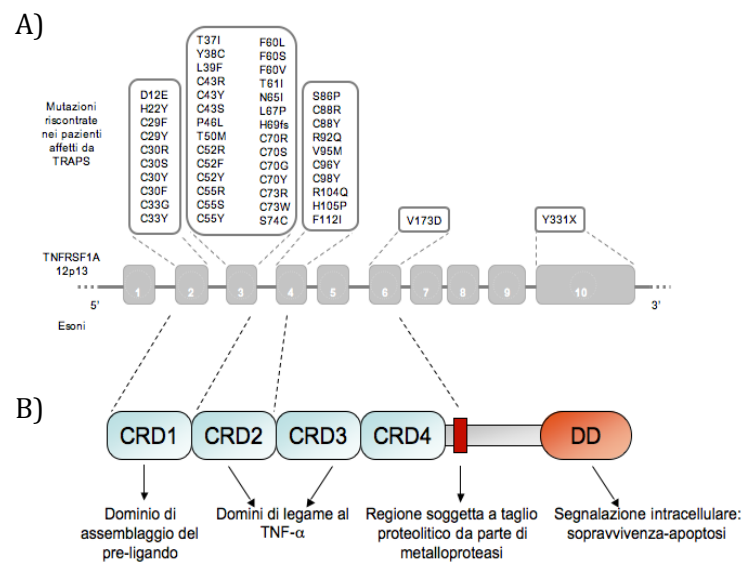


Figura 1.4. Rappresentazione schematica del gene *TNFRSF1A* e delle mutazioni responsabili della sindrome TRAPS (A). Il gene *TNFRSF1A* codifica per il recettore *TNFRSF1A* (B). In condizioni normali il recettore *TNFRSF1A* viene espresso sulla superficie cellulare ed il legame con il TNF- α attiva diverse cascate trasduzionali responsabili della sopravvivenza e/o dell'apoptosi cellulare

4. MiRNA

4.1 Generalità MiRNA

I miRNA rappresentano una classe di RNA a catena corta, di lunghezza compresa tra 18 e 25 nucleotidi, che regolano l'espressione genica in maniera post trascrizionale, attraverso interazioni sequenza-specifiche con siti bersaglio sugli mRNA (118). L'attività dei microRNA rientra dunque tra i meccanismi regolatori epigenetici dell'espressione genica, congiuntamente a metilazione del DNA, modificazioni degli istoni, ed in particolare acetilazione (119, 120). Attraverso una parziale omologia con la regione non codificante 3' terminale (3'UTR) sugli mRNA bersaglio, i miRNA sono in grado di controllare l'espressione genica inibendo la traduzione o riducendo direttamente i livelli di mRNA. Nell'uomo sono attualmente conosciuti circa 800 miRNA (121). I miRNA costituiscono un'ampia classe di molecole regolatrici dei geni e la loro conservazione attraverso le varie specie, indica una pressione selettiva, ed un importante ruolo nello sviluppo, nelle patologie, e nell'evoluzione (122, 123).

I miRNA sono prodotti come trascritti primari di RNA di lunghezza maggiore, detti "pri-miRNA", che sono autocomplementari e possono passare in una struttura a forcina a doppio filamento, generalmente creando imperfetto accoppiamento di basi. I pri-miRNA sono processati in una reazione in 2 fasi. Il primo passaggio è catalizzato nel nucleo da "Drosha", un endonucleasi appartenente alla superfamiglia delle RNAsi III, e dalla proteina ad essa associata DGCR8. Drosha riduce il pri-miRNA ad un frammento precursore di circa 70 pb, il pre-miRNA. Questo clivaggio determina le estremità 5' e 3' del precursore. Dopo l'esportazione dal nucleo al citoplasma, ad opera di "Exportina 5", il secondo passaggio è catalizzato dal "Dicer", e porta alla sintesi di un segmento di 22 pb a doppio filamento, con una corta terminazione, di 2 pb, a singolo filamento. Dicer ha una attività di elicasi N-terminale, in grado di disaccoppiare le regioni a doppio filamento, e due domini nucleasici, anch'essi correlati con la RNAsi III batterica. Questi frammenti di RNA a doppio filamento vengono integrati in un complesso chiamato RISC (RNA-induced silencing complex).

Le proteine della famiglia “Argonaute” (AGO) fanno parte di questo complesso, e sono necessarie per il processamento finale dei segmenti a singolo filamento e il loro legame con le 3'UTR dei loro mRNA bersaglio. L'uomo ha 4 proteine della famiglia degli Ago. RISC ha attività endonucleasica, che cliva il filamento che non sarà utilizzato del miRNA a doppio filamento. Il grado di accoppiamento tra le basi e le sequenze terminali (determinate dal clivaggio di Dicer) del doppio filamento, determinano quale proteina della famiglia Ago dovrà legare il doppio filamento di RNA e quale filamento sarà selezionato come *passenger strand*, per essere degradato. Il complesso RISC è ora in grado di guidare il miRNA maturo al suo mRNA bersaglio (124).

4.2 MiRNA e stati patologici

L'espressione di miRNA caratteristici è stata correlata con il controllo di vari stati patologici e di sviluppo (46), della proliferazione, differenziazione e apoptosi delle cellule, e anche con la trasduzione del segnale e lo sviluppo degli organi (118, 125-134).

Nei tumori, i miRNA possono agire come geni oncosoppressori o oncogeni (135), potendo anche regolare la chemioresistenza (136) e la capacità di metastatizzazione (137). I profili riscontrati di miRNA tessuto-specifici e patologia-specifici, sono spesso più ricchi di informazioni rispetto ai profili degli mRNA. Rispetto agli mRNA e ad altri RNA a catena più lunga, i miRNA sono estremamente stabili (138). La loro stabilità è simile sia nel siero e nel plasma freschi, che in quelli stoccati. Ciò ha permesso l'analisi dei miRNA nei campioni di tessuto conservati (139). Questo fa dei miRNA degli ottimi strumenti per la diagnostica o altre applicazioni cliniche, come ad esempio un loro possibile impiego come bersagli terapeutici (140-142).

Tra i principali quadri associati all'espressione di caratteristici miRNA vi sono:

- Neoplasie: la prima dimostrazione di un nesso tra miRNA circolanti e neoplasie viene da studi pubblicati all'inizio del 2008: in uno studio sul siero di 60 pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) Lawrie et al. hanno trovato un aumento significativo dei livelli di miR-155, miR-21 e miR-210, rispetto ai

controlli (143). In pazienti con carcinoma a cellule squamose della lingua è stata riscontrata una alterazione dei livelli di vari miRNA. Quello con la maggior espressione in questo tessuto tumorale, miR-184, era presente ad alto livello anche nel plasma, dove diminuiva dopo intervento chirurgico nella quasi totalità dei pazienti (144).

Altre neoplasie in cui sono state riscontrate alterazioni dei livelli d'espressione dei miRNA sono il carcinoma a piccole cellule del polmone (miR-25 e miR-223, aumentati di 5 e 3 volte rispettivamente) (145), carcinoma coloretale (livelli aumentati di miR-17-3p, miR-29a e miR-92 nel plasma, che diminuivano 7 giorni dopo la resezione) (146), carcinoma ovarico (10 miRNA ipo o iperespressi) (147-148), carcinoma epatocellulare (miR-500) (149), pancreatici (150), mammari (151) e gastrici (152).

- Patologie cardiache: miR-1 è risultato significativamente aumentato nell'infarto miocardico acuto (IMA), con un ritorno ai valori normali dopo due settimane dall'evento (153). Anche miR-133a e miR-499 risultano aumentati. In seguito a danno miocardico, si ha un innalzamento di miR-208 nelle successive 3-12 ore, prima di un ritorno ai livelli basali; esso compare in circolo ancora prima della troponina, risultando perciò un più sensibile e precoce marker di IMA (154, 155).

- Danno ossidativo epatico: miR-122, miR-29a e miR-29c risultano ridotti di 5 volte a livello epatico, ed aumentati fino a 500 volte nel plasma in caso di eccessiva assunzione di acetaminofene (156).

- SIRS (systemic inflammatory response syndrome) e sepsi: nel primo caso risultano diminuiti miR-146a e miR-126, in caso di sepsi, oltre a questi, è diminuito anche miR-223 (138).

- Gravidanza: alcuni Autori ipotizzano che l'alterata espressione di alcuni miRNA possa essere associata alla pre-eclampsia, e potrebbero quindi essere impiegati come marker per diagnosticare preventivamente questa condizione (138).

- Patologie infiammatorie: la scoperta dei miRNA ha rivelato un livello molecolare nel controllo delle funzioni immunitarie, che va oltre il ruolo regolatorio delle vie di segnale mediate dalle chinasi e dai fattori di trascrizione finora individuati (123).

4.3 I miRNA nelle malattie reumatiche

Recentemente molti studi hanno dimostrato che i miRNA sono importanti regolatori della risposta immune. Tra di essi abbiamo miR-181a, che controlla la sensibilità del recettore delle cellule T (TCR), e può quindi influire sulla selezione timica (157); miR-150, il quale gioca un ruolo chiave nella differenziazione linfocitaria (158, 159);

miR-155, che agisce come regolatore della proliferazione dei linfociti B (160); il miRNA cluster 17-92, la cui espressione porta alla proliferazione incontrollata dei linfociti e ai linfomi (161, 162).

I miRNA agiscono anche nell'immunità innata: miR-146a è un regolatore negativo del segnale di TLR-4 (163), e miR-223 è specificamente espresso al momento della differenziazione indotta dall'acido retinoico della linea cellulare HL-60 nella leucemia promielocitica, ed è stato riscontrato anche un suo coinvolgimento nella differenziazione dei granulociti (164).

Molti studi hanno dimostrato che l'espressione dei miRNA è alterata in alcune patologie autoimmuni sistemiche. Nel Lupus Eritematoso Sistemico (LES) utilizzando l'analisi di microarray, sono stati analizzati i profili d'espressione dei miRNA, nei monociti del sangue periferico di pazienti con LES, e si è visto che, rispetto ai controlli sani, vi era una ridotta espressione di 7 miRNA, mentre altri 9 erano iperespressi (165). Uno studio effettuato su biopsie di reni con nefrite lupica, ha rilevato 66 miRNA con espressione alterata (36 iperespressi, 30 con espressione ridotta) (166). Molti miRNA quindi sono coinvolti nella patogenesi del LES, e da alcuni studi sembra che in futuro potranno essere utilizzati anche nella sua terapia: è stato visto ad esempio che la ridotta espressione di miR-125a contribuisce all'elevata espressione della chemochina infiammatoria RANTES nel Lupus. Introducendo miR-125a nei linfociti T lupici, si aveva una riduzione dell'espressione di RANTES (167). Nei pazienti con Sindrome di Sjögren, è stato visto che miR-574 e miR-768-3p risultano iperespressi nelle cellule epiteliali delle ghiandole salivari e possono essere utilizzati per predire l'evoluzione della malattia (120). E' possibile inoltre suddividere i pazienti in sottopopolazioni, in base al grado di infiammazione ghiandolare, valutando i profili dei miRNA

espressi dalle ghiandole stesse. Nella Sclerosi sistemica (SSc) è stato recentemente dimostrato un ruolo di regolazione post-trascrizionale dei miRNA sui geni che inducono la fibrosi. Da sottolineare il ruolo del miRNA cluster 29, e in particolare di miR-29a, sulla regolazione dell'espressione del collagene a livello post-trascrizionale, sia su colture di fibroblasti, che su modelli animali in vivo (168). Nell'artrite reumatoide, è stata riscontrata una importante iperespressione di miR-155 e miR-146a nei fibroblasti sinoviali dei pazienti con AR rispetto a quelli con osteoartrosi (OA) ed ai controlli. Stankzyc et al.(169) hanno dimostrato che l'espressione di miR-155 nei fibroblasti sinoviali di pazienti con AR può essere anche indotta da TNF- α , IL-1 β , LPS, poly (I-C) e lipoproteine batteriche. Nakasa et al. (170) hanno confermato l'aumentata espressione di miR-146a nei tessuti sinoviali dei pazienti con AR rispetto a quelli con OA ed a controlli sani, tramite ibridizzazione in situ e immunohistochimica dei campioni tissutali. Gli autori hanno, inoltre, concluso che l'espressione di tale miR può essere indotta dalla stimolazione con TNF- α e IL-1 β . Recentemente, è stato riscontrato un significativo incremento delle concentrazioni di miR-146a, miR-155, miR-132 e miR-16, nelle cellule mononucleate del sangue periferico di pazienti con AR rispetto a controlli sani e malati (tra 1,8 e 2,6 volte >), e ciò induce a pensare che i miRNA siano coinvolti a vari livelli nella patogenesi dell'AR (171, 172).

4.4 MiRNA e TRAPS

In un recente studio (173), Lucherini et al. hanno evidenziato come i livelli sierici di miRNA possano essere utilizzati come potenziali biomarker di malattia nella TRAPS. Sono stati misurati i livelli di espressione di miRNA circolanti mediante microarray Agilent in 29 campioni di siero ottenuti da 15 pazienti TRAPS portatori di mutazioni ad alta penetranza e da 8 donatori sani. Mediante l'utilizzo del software GeneSpring GX è stato possibile identificare i miRNA differenzialmente espressi e clinicamente rilevanti tra i quali: miR-134, miR-17-5p, miR-498, miR-451a, miR-572, miR-92a-3p risultavano in grado di discriminare i pazienti TRAPS dai donatori sani.

Inoltre, al fine di valutare una possibile modulazione dei miRNA nei pazienti TRAPS portatori di mutazioni strutturali, era stato esaminato l'effetto del trattamento con l'antagonista recettoriale dell'IL-1 anakinra sul profilo dei miRNA circolanti, confrontando i pazienti trattati con quelli non trattati (173).

Risultavano, così, 4 miRNA la cui espressione era significativamente alterata dopo il trattamento con anakinra nei pazienti TRAPS portatori di mutazioni strutturali. In particolare, l'espressione di ulteriori quattro miRNA (miR-150-3p, miR-92a-3p, miR-22-3p, miR-30d-5p) è stata riscontrata alterata in maniera significativa nei pazienti TRAPS non trattati rispetto ai soggetti in terapia con anakinra (173).

E' interessante notare che i livelli sierici di miR-150-3p e miR-92a-3p, ridotti nei pazienti TRAPS non trattati rispetto ai controlli sani, ritornavano a livelli comparabili con i controlli durante il trattamento con anakinra (173).

Inoltre, l'espressione di altri specifici miRNA circolanti correlava in maniera statisticamente significativa con valori aumentati di SAA (miR-377-5p) e con il numero di episodi febbrili/anno all'esordio della malattia (miR-92b).

Tra i miRNA risultati alterati nei pazienti con TRAPS, miR-150, miR-92 e miR-17 rappresentano dei regolatori importanti nella differenziazione delle linee cellulari del sistema immunitario innato mentre i livelli sierici di miR-150 sono stati recentemente inversamente correlati con i livelli plasmatici di TNF- α in pazienti con sepsi (179). Il loro ruolo nei pazienti con TRAPS deve però essere ancora chiarito.

Un crescente numero di studi ha identificato nel profilo di espressione dei miRNA circolanti uno strumento diagnostico e prognostico di grande interesse. In pazienti con patologie TRAPS-like, caratterizzate da sintomi compatibili con la TRAPS ma senza mutazioni a carico del gene *TNFRSF1A* (172), il profilo di espressione dei miRNA circolanti potrebbe essere utile anche come indicatore diagnostico, aprendo peraltro la strada ad una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che sottostanno a questo fenotipo così complesso.

5. SCOPO DELLO STUDIO

La gran parte delle mutazioni del gene *TNFRSF1A* responsabili della TRAPS si verifica a livello dei primi due domini N-terminali extracellulari ricchi di residui di cisteina del TNFRS1A, fondamentali nell'assemblaggio della struttura tridimensionale del recettore del TNF. Queste mutazioni rappresentano varianti strutturali, definite ad alta penetranza ovvero chiaramente associate ad un fenotipo ad insorgenza precoce, caratterizzato da numerosi episodi febbrili ed infiammatori sistemici, con elevato rischio di sviluppare amiloidosi. In letteratura, inoltre, sono riportate anche mutazioni non strutturali, definite a bassa penetranza, associate ad un fenotipo le cui caratteristiche rimangono tuttavia ancora non chiaramente definite (82-84). Alcune delle caratteristiche del fenotipo riscontrato in pazienti portatori di mutazioni non strutturali, inoltre, possono essere anche riscontrate in pazienti con episodi infiammatori ricorrenti sistemici, geneticamente negativi per mutazioni del gene *TNFRSF1A*. Inoltre, le varianti non strutturali sono spesso etichettate come polimorfismi, in quanto riscontrate anche in popolazioni sane. L'obiettivo dello studio consiste nell'analizzare le singole manifestazioni cliniche ed il loro decorso in una coorte di pazienti adulti con episodi infiammatori ricorrenti sistemici portatori di mutazioni non strutturali e strutturali del gene del *TNFRSF1A*, e geneticamente negativi.

Inoltre, poiché recenti dati di letteratura (173) hanno evidenziato una significativa riduzione dei livelli di espressione di miR-92a e -150-3p in pazienti TRAPS non trattati, mentre dopo terapia con anakinra tali livelli si ristabilivano ai livelli riscontrati nei donatori sani (173) altro obiettivo dello studio è stato quello di valutare i livelli di espressione di tali microRNA (miR-92a-3p e miR-150-3p) in pazienti con episodi infiammatori ricorrenti sia portatori di mutazioni non strutturali del gene del *TNFRSF1A* che geneticamente negativi.

6. METODI

Per questo studio, sono state considerate le caratteristiche di 109 pazienti adulti con episodi infiammatori ricorrenti sistemici. Tutti erano Caucasici di origine Italiana, e afferenti ai Centri di Riferimento Italiani dedicati allo Studio delle Malattie Autoinfiammatorie delle Università di Padova, Siena, e Pavia. Dopo consenso informato, tutti i pazienti erano testati per il gene *TNFRSF1A* (esoni 1-6), e per geni responsabili di altre malattie autoinfiammatorie monogeniche, quali il gene *MEFV* (Mediterranean Fever), responsabile di Febbre Mediterranea Familiare (FMF), il gene (Mevalonato Kinasi) *MVK* (esoni 1-12), responsabile della Sindrome da Deficit di Mevalonato Chinasi, il gene Nucleotide Leucine Repeat *NLRP3* (esone 3), responsabile di Criopirinopatie ed il gene *NLRP12* (esone 3), responsabile di NLRP12-autoinflammatory disorder. Nessuno dei pazienti rispettava l' applicazione dei Criteri di Livneh per la diagnosi di FMF o risultava essere portatore di mutazioni patogenetiche dei geni *MEFV*, *MVK*, *NLRP3* e *NLRP12*.

In base alle caratteristiche del gene *TNFRSF1A*, i pazienti venivano distinti in tre gruppi, denominati gruppo 1 (pazienti portatori di mutazioni non strutturali); gruppo 2 (pazienti non portatori di mutazioni); gruppo 3 (pazienti portatori di mutazioni strutturali). In particolare, il gruppo 1 era costituito da trentasei pazienti (19 uomini e 17 donne) portatori di mutazioni non strutturali in eterozigosi del gene *TNFRSF1A*, di cui venticinque (69,4%) risultavano positivi per R92Q, sei (16,67%) per P46L, due (5,56%) per D12E, due (5,56%) per V95M, ed uno (2,78%) per R104Q. Il gruppo 2 era composto da sessanta pazienti (28 uomini e 32 donne) geneticamente negativi per mutazioni dei geni del *TNFRSF1A*. Il gruppo 3 era composto da tredici pazienti (6 uomini e 7 donne) portatori di una mutazione strutturale del gene *TNFRSF1A*: otto pazienti presentavano una mutazione a livello del nucleotide codificante la cisteina, tre pazienti risultavano portatori della mutazione T50M, un paziente della mutazione S59P ed un paziente della delezione di 9-residui a livello dell' esone 6 (L167_G175del).

Per l'analisi dei MicroRNA, sono stati raccolti 6 campioni di siero ottenuti da tre pazienti affetti da TRAPS (2 maschi e 1 femmine) portatori di mutazioni non

strutturali (R92Q) e tre pazienti geneticamente negativi e 3 campioni di siero ottenuti da tre controlli sani.

Tre pazienti portatori di mutazioni a bassa penetranza e tre pazienti geneticamente negativi fornivano un campione in periodi di riacutizzazione e in assenza di trattamento, per un totale di sei campioni raccolti.

I pazienti e i controlli sani erano tutti caucasici di origine italiana e tutti fornivano consenso.

Per l'estrazione e la retrotrascrizione dell'RNA, il sangue veniva centrifugato subito dopo il prelievo e il siero era immediatamente congelato a -80° C in attesa dell'esecuzione delle analisi. Le molecole di RNA comprendenti i microRNA sono state estratte da 200 µl di siero utilizzando il miRNeasy Mini Kit (cat. No. 217004 Qiagen) secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice con minime variazioni.

In particolare, sono stati aggiunti 2.5 µl di miRNA sintetici 5 nM cel-miR-39, immediatamente dopo il QIAzol Lysis Reagent (Qiagen).

La retrotrascrizione a partire dall'RNA totale per l'analisi dei miRNA, miR-92A-3P, miR-150-3P e cel-miR-39, è stata effettuata mediante l'uso del TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Applied Biosystems, Italy). Per l'analisi dell'espressione dei miRNA, i saggi di RTqPCR (Real-Time quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction) sono stati eseguiti mediante l'utilizzo di Taq Man MicroRNA Assay Kits (Applied Biosystems Foster City, CA). Come controllo di riferimento è stato considerato miRNASyn-cel-miR-39-3p miScript miRNA (Applied Biosystems Foster City, CA). I kit sono stati utilizzati seguendo le indicazioni della ditta fornitrice.

Per le reazioni è stato impiegato lo strumento CFX96 Real-Time system (Bio-Rad Laboratories, Waltham, MA), nelle seguenti condizioni: 10 min a 95°C per l'attivazione dell'enzima, 15 sec a 95°C per 40 cicli e 1 min a 60°C. I risultati sono stati elaborati ed analizzati utilizzando Bio-Rad CFX Software Manager 1.5 (Bio-Rad, Waltham, MA). Per l'analisi quantitativa dei miRNA-92 e -150, sono state utilizzate sonde gene-specifiche TaqMan fluorescenti (ID: 000431, ID: 002637, rispettivamente) (Applied Biosystems Foster City, CA).

7. ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche demografiche e cliniche al tempo di screening molecolare e ad ogni visita di follow-up sono state studiate attraverso analisi statistica descrittiva ed espresse come medie \pm Deviazione Standard (DS), mediane (range interquartile) o numeri (in percentuale). Sono state poi eseguite analisi di confronto tra le caratteristiche fenotipiche dei tre gruppi al tempo di esordio, mediante ANOVA o test di Kruskal-Wallis per variabili quantitative ed il Test χ^2 per variabili qualitative.

Per le variabili che raggiungevano una significatività globale, il confronto attraverso test di contingenza era eseguito attraverso medie di Fisher-exact o Mann-Whitney U test, con correzione di Bonferroni. La normalità era valutata attraverso l'utilizzo del test di Anderson-Darling. Il confronto tra i due gruppi per ogni singola variabile era effettuato attraverso il test t di Student, e la frequenza dei sintomi attraverso tabelle di contingenza e test χ^2 .

Per l'analisi e la comparazione statistica tra i livelli di espressione dei miRNA circolanti è stato utilizzato il test t di Student.

8. RISULTATI

I risultati mostravano che l'età media di insorgenza e la durata media di malattia erano rispettivamente di 26.58 ± 14.98 e 12.69 ± 11.28 anni nei pazienti del gruppo 1, di 30.65 ± 18.19 anni e 7.63 ± 8.07 anni nei pazienti del gruppo 2 e 14 ± 17.33 e 33.38 ± 13.65 anni nei pazienti del gruppo 3. Nell'analisi di confronto dell'età media di insorgenza, emergeva una differenza statisticamente significativa ($p=0.015$) nel confronto tra il gruppo 3 e il gruppo 1 e 2. Non risultavano altre differenze significative nel confronto tra gruppo 1 e gruppo 2. L'analisi della durata media di malattia evidenziava una differenza significativa ($p<0.001$), nel confronto tra gruppo 1 e gruppo 2, gruppo 3 e gruppo 1, e gruppo 3 e gruppo 2.

Un'anamnesi familiare positiva per episodi infiammatori ricorrenti risultava significativamente più frequente ($p<0.001$) nei pazienti del gruppo 3 (n:8; 61%) piuttosto che nei pazienti del gruppo 1 (n:2; 6%) e del gruppo 2 (n:9; 15%). Nell'analisi dei numeri di episodi di riacutizzazione all'anno, una differenza statisticamente significativa ($p:0.046$), emergeva nel confronto tra i pazienti del gruppo 3 che mostravano un più basso numero di episodi (4.54 ± 2.37 episodi all'anno) rispetto ai pazienti del gruppo 1 (7.02 ± 3.87 episodi all'anno) e del gruppo 2 (13.97 ± 20.94 episodi all'anno). La significatività statistica era mantenuta anche nel confronto tra gruppo 1 ed il gruppo 2 ($p:0.046$).

Sia nel gruppo 1 che nel gruppo 3, il 69 % dei pazienti presentava all'esordio episodi infiammatori con durata media superiore a sette giorni rispetto ai pazienti del gruppo 2 (38%). Una differenza significativa risultava dal confronto del gruppo 1 verso il gruppo 2, e del gruppo 3 ed il gruppo 2 ($p=0.005$).

La presenza di febbre era osservata in tutti i sessanta pazienti del gruppo 2, mentre era riscontrata in trentacinque pazienti (97%) del gruppo 1 e dodici pazienti del gruppo 3 (92%). Nei pazienti febbrili, i valori di temperatura corporea superiori a 38° C erano riscontrati più comunemente nel gruppo 3 (n:11; 84%), piuttosto che nel gruppo 1 (n:31; 86%) e nel gruppo 2 (n:43; 72%).

Nell'analisi di confronto tra i tre gruppi, sia per la variabile presenza di febbre che per la variabile valori di temperatura corporea $\geq 38^{\circ}\text{C}$, non risultava alcuna differenza significativa (rispettivamente $p:0.15$; $p:0.26$).

La pericardite risultava essere una manifestazione più frequente nei pazienti del gruppo 1 (n:12; 33%); nel gruppo 2 era riscontrata in cinque pazienti (8%) e nel gruppo 3 in un solo paziente (8%). Per questa variabile, emergeva una differenza statisticamente significativa nell' analisi di confronto tra il gruppo 1 ed il gruppo 2 ($p:0.004$), mentre non risultavano altre differenze nei rimanenti confronti.

La pleurite risultava più frequente nel gruppo 1 (n:5; 14%) piuttosto che nel gruppo 2 (n:6; 10%) e nel gruppo 3 (n:1; 8%). Per la pleurite, non risultava alcuna differenza significativa ($p=0.004$) nel confronto tra i tre gruppi. Il dolore toracico risultava più frequentemente osservato nei pazienti del gruppo 1 (n:18; 50%) piuttosto che nei pazienti del gruppo 2 (n:25; 42%) e del gruppo 3 (n:2; 15%). Per questa caratteristica, nel confronto tra i tre gruppi, non risultava esservi una differenza statisticamente significativa in nessuna delle combinazioni di analisi ($p:0.09$).

Il dolore addominale era più frequentemente osservato nei pazienti del gruppo 3 (n:9; 25%) piuttosto che nei pazienti del gruppo 1 (n:20; 33%) e del gruppo 2 (n:12; 92%). Per questa variabile, emergeva una differenza statisticamente significativa nell' analisi di confronto tra il gruppo 3 ed il gruppo 1 ($p<0,001$) e tra il gruppo 3 ed il gruppo 2 ($p<0,001$).

Le mialgie erano più comuni nel gruppo 3 (n:12; 92%), piuttosto che nel gruppo 1 (n:20; 55%) e 2 (n:35; 58%), con differenza statisticamente significativa nell' analisi di confronto tra il gruppo 3 ed il gruppo 1 ($p:0.049$). Anche le artralgie risultavano più comuni nel gruppo 3 (n:12; 92%), piuttosto che nel gruppo 1 (n:20; 55%) e 2 (n:37; 62%), non risultando alcuna differenza significativa nelle analisi di confronto tra i diversi gruppi ($p:0.06$). I pazienti del gruppo 2 presentavano più frequentemente artrite (n:9; 15%), mentre questa caratteristica era riportata in più bassa frequenza negli altri pazienti e rispettivamente in quattro pazienti (11%) del gruppo 1, e in un solo paziente del gruppo 3 (8%). Tuttavia, non emergevano valori di significatività nelle analisi di confronto tra i tre gruppi ($p:0.72$).

La faringite asettica risultava più frequente nei pazienti geneticamente negativi (n:36; 60%) che nel gruppo 1 (n:4; 11%) e nel gruppo 3 (n:2; 15%), emergendo differenza significativa ($p \leq 0.001$) nell'analisi di confronto tra gruppo 2 e i rimanenti due gruppi.

Il coinvolgimento oculare risultava più frequente nel gruppo 3 (n:7; 54%), piuttosto che nel gruppo 2 (n:26; 43%) e nel gruppo 3 (n:7; 19%). Per questa variabile, non emergeva alcuna differenza significativa in nessuna delle analisi di confronto tra i tre gruppi ($p:0.033$).

Rispetto agli altri due gruppi, i pazienti del gruppo 2 presentavano più frequentemente le seguenti manifestazioni cliniche, aftosi orale (n:18; 30%), rash cutaneo (n:22; 37%) linfadenopatia (n:20; 33%) e cefalea (n:31; 52%); queste manifestazioni cliniche erano riportate in più basse frequenze nei gruppi 1 e 3; in particolare, l'aftosi orale era riscontrata in nove pazienti (25%) del gruppo 1, e nessuno dei pazienti del gruppo 3 riferiva questa manifestazione clinica dal tempo di esordio dei flares. Nel gruppo 1, rash cutaneo e linfadenopatia erano riportate entrambe in sette pazienti (19%), mentre la cefalea rappresentava un sintomo relativamente frequente, essendo riportata in quindici pazienti (42%).

Nel gruppo 3, il rash cutaneo era una manifestazione riscontrabile in soli due casi (15%) e la linfadenopatia in tre casi (23%). La cefalea rappresentava un sintomo relativamente frequente essendo riportata in cinque casi (38%). Nelle analisi di confronto tra i 3 gruppi, non emergevano differenze statisticamente significative, sia per le variabili mucocutanee [aftosi orale ($p:0.08$); rash cutaneo ($p:0.10$)], sia per la variabile linfadenopatia ($p:0.31$), che per la variabile cefalea ($p:0.52$).

Il decorso degli episodi infiammatori sistemici risultava più frequentemente cronico nei pazienti del gruppo 3 (n:12; 92%) che nel gruppo 1 (n:10; 28%) e nel gruppo 2 (n:20; 33%). L'analisi di confronto tra gruppi evidenziava una significatività statistica nella comparazione tra il gruppo 3 ed il gruppo 1 ($p=0.001$) e tra il gruppo 3 ed il gruppo 2 ($p=0.001$). I pazienti del gruppo 3 presentavano una più alta frequenza di andamento cronico (n:12; 92%), associato con un relativo basso numero di attacchi acuti ai primi mesi di esordio. Contrariamente, nel gruppo 1 e nel gruppo 2 gli episodi infiammatori presentavano un andamento cronico rispettivamente in dieci (28%) e venti

pazienti (33%). Per questa variabile, emergeva una differenza statisticamente significativa sia nell' analisi di confronto tra il gruppo 3 e ed il gruppo 1 ($p=0.001$), che tra il gruppo 3 ed il gruppo 2 ($p=0.001$).

L'amiloidosi, come complicanza secondaria a lungo termine di infiammazione risultava essere una manifestazione esclusiva di sei pazienti del gruppo 3. Per questa variabile, emergeva una differenza statisticamente significativa ($p\leq 0.001$) nell' analisi di confronto tra il gruppo 3 e ed il gruppo 1, e tra il gruppo 3 e ed il gruppo 2. I pazienti del gruppo 1 presentavano un più alto livello della concentrazione di SAA (47; 8-110 mg/dl), che raggiungeva una differenza statisticamente significativa quando comparata con i pazienti del gruppo 2 (10.1; 0-46 mg/dl); i pazienti del gruppo 3 mostravano un valore più alto di SAA (172; 3-1510 mg/dl) rispetto a quello di entrambi i gruppi ($p<0.001$); anche i valori di PCR risultavano più alti nel gruppo 3 (3; 0.1-15.5 mg/dl) rispetto a quelli del gruppo 2 (0.3; 0.01-6.0 mg/dl) ($p<0.001$) e del gruppo 1 (0.55; 0.01-1.0 mg/dl). Tuttavia nelle analisi di confronto non risultavano significatività.

All'ultimo follow-up, la remissione era considerata completa se vi era assenza di sintomi e segni di infiammazione senza evidenza di infiammazione subclinica con range di PCR e SAA nella norma, parziale se vi era riduzione della frequenza degli episodi febbrili o se risultava aumento di PCR e SAA in assenza di risoluzione dei sintomi e di altre cause eventualmente correlabili al loro aumento, o assente se nessuna delle condizioni precedenti era soddisfatta.

In relazione alle terapie, i pazienti con mutazioni strutturali presentavano una più alta richiesta di terapia steroidea ad alto dosaggio (>15 mg prednisolone eq. giornalieri) e somministrata in modo continuo, e all'ultimo follow-up undici dei tredici (84.61%) pazienti risultavano essere in terapia con farmaci biologici. Dieci di essi ottenevano una completa risposta mentre in un paziente in terapia con canakinumab era necessario l'introduzione di steroide ad alto dosaggio a causa di flare.

I pazienti con mutazioni a bassa penetranza sembravano beneficiare da somministrazioni di steroidi "on demand" con breve periodo di somministrazioni, dato all' insorgenza dei sintomi, anche se sedici dei trentasei pazienti all' ultimo follow-up necessitavano di un trattamento continuo.

Non risultavano differenze statisticamente significative tra i pazienti portatori di mutazioni a bassa penetranza e pazienti geneticamente negativi, nell'utilizzo di FANS, colchicina e corticosteroidi. I farmaci anti-IL-1 o anti-TNF erano utilizzati in sette (19%) pazienti del gruppo 1. Un completo controllo di tutte le manifestazioni cliniche e laboratoristiche era raggiunta in tutti i casi. Tra questi pazienti, tre erano trattati con l'antagonista ricombinante recettoriale dell'IL-1 anakinra (100 mg/giorno sottocute), due con l'anticorpo chimerico monoclonale del TNF infliximab (3-5 mg/kg i.v. mensile) e due con la proteina umana ricombinante del Fc del recettore del TNF receptor (p75), etanercept (50 mg settimanali sottocute). Uno dei pazienti era in terapia con canakinumab (150 mg una volta a settimana ogni 8 settimane) ed in completa remissione.

Nel gruppo 2, i farmaci biologici, etanercept in un caso e adalimumab in un altro, erano somministrati a due pazienti con scarso controllo della sintomatologia all'ultimo follow-up.

Infine sono stati valutati i livelli di espressione dei miRNA, miR150-3p e miR92a-3p, in campioni ottenuti da pazienti TRAPS geneticamente negativi, portatori di mutazioni a bassa penetranza e donatori sani. Mediante RT-PCR è stato osservato un aumentato livello dei miR92a-3p e miR150-3p sia in pazienti TRAPS geneticamente negativi sia portatori di mutazioni a bassa penetranza rispetto ai donatori sani (Figura 2). Una differenza statisticamente significativa è stata infatti rilevata nel confronto tra questi due gruppi di pazienti ed i donatori sani (Figura 2).

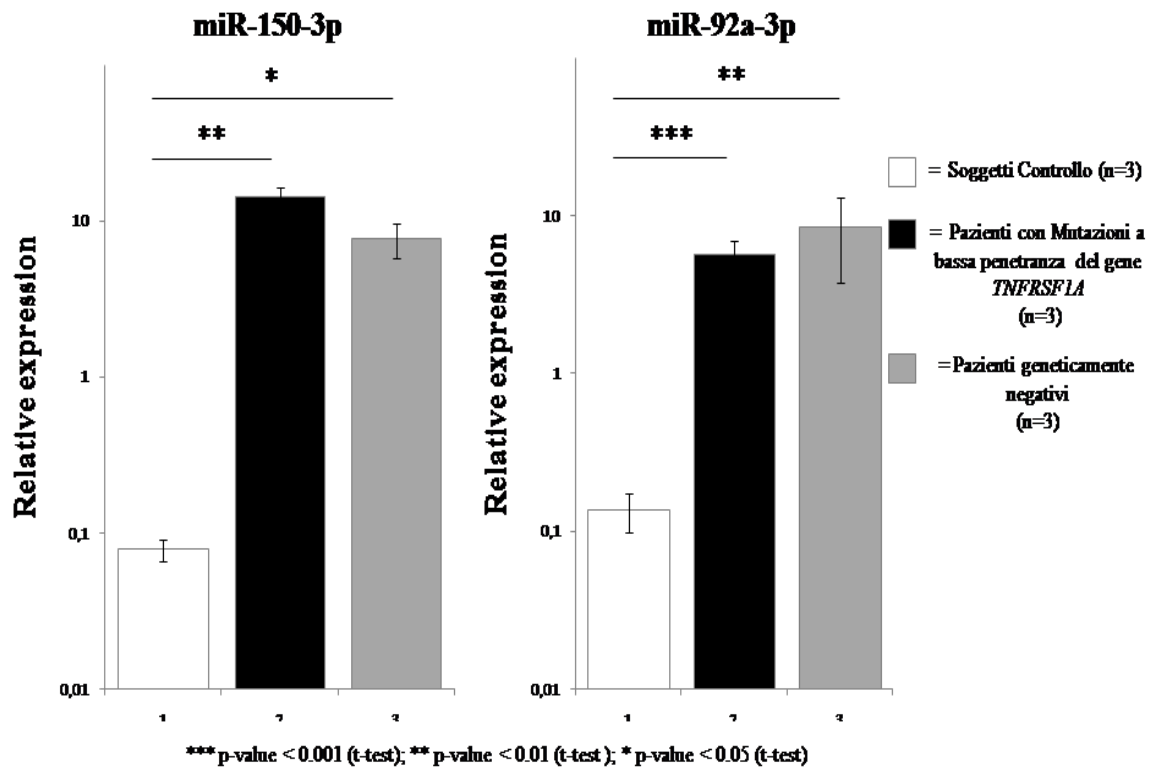


Figura 2. Quantificazione attraverso Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) dei livelli di miRNA miR-92a-3p and miR-150-3p espressi a livello del siero dei Controlli Sani (n:3; colonne bianche), dei pazienti eterozigoti per mutazioni del gene *TNFRSF1A* (n:3; colonne nere) e dei pazienti geneticamente negativi (n:3; colonne grigie). L'espressione relativa dei livelli di miRNA target erano normalizzati attraverso cel-miR-39.

9. CONCLUSIONI

In questo studio, sono state considerate ed analizzate le principali manifestazioni cliniche ed il loro decorso fino all'ultima visita di follow-up in una coorte di pazienti con episodi infiammatori ricorrenti geneticamente negativi per mutazioni dei geni coinvolti nell'autoinfiammazione e portatori delle varianti strutturali e non- del gene *TNFRSF1A*. Il principale obiettivo dello studio si proponeva di analizzare e caratterizzare l'andamento nel lungo termine delle manifestazioni cliniche infiammatorie e degli indici di flogosi.

Nonostante nel confronto tra i tre gruppi non sia emersa la presenza di differenze statisticamente significative nella distribuzione delle principali manifestazioni cliniche associate ad un chiaro fenotipo TRAPS, i soggetti portatori di varianti non strutturali presentavano delle caratteristiche fenotipiche ben precise.

In particolare, dal punto di vista anamnestico, i pazienti con mutazioni non strutturali presentavano una più bassa frequenza di storia familiare positiva per attacchi infiammatori ricorrenti, un esordio più tardivo della sintomatologia infiammatoria, meno spesso associato a decorso cronico, caratterizzato da assenza di amiloidosi secondaria all'ultimo follow-up. Inoltre, sebbene i pazienti portatori di varianti non strutturali presentassero un numero maggiore di episodi all'anno, il periodo di remissione dei sintomi tra gli attacchi risultava essere associato a livelli di PCR significativamente inferiori rispetto agli altri due gruppi. Nel nostro studio, i dati riguardanti le strategie di trattamento hanno mostrato notevoli differenze nel confronto tra pazienti con varianti strutturali e non-, e pazienti geneticamente negativi. In particolare, nel confronto tra questi due ultimi gruppi, emergeva un maggiore impiego di terapie con farmaci biologici nei pazienti con mutazioni non strutturali, a sostegno delle differenze di severità tra i due fenotipi.

I risultati di questo studio confermano i dati riportati in precedenza dal nostro gruppo (84) e risultano in linea con le recenti osservazioni derivanti della coorte di pazienti TRAPS costituita da circa centosessanta pazienti del registro europeo (174).

I dati del nostro studio sembrano inoltre confermare che anche soggetti adulti con varianti non strutturali presentano un fenotipo ed un andamento delle

manifestazioni cliniche nel tempo simile a quello dei soggetti pediatrici portatori delle stesse mutazioni (175). Inoltre, anche l'uso maggiore di FANS e corticosteroidi, e una richiesta relativamente più bassa di farmaci biologici nei pazienti con mutazioni non strutturali rispetto ai pazienti con mutazioni strutturali è sovrapponibile ai dati della popolazione pediatrica (175). E' interessante notare la sovrapponibilità dei nostri dati riguardanti la caratteristica faringite e la popolazione pediatrica con mutazioni non strutturali del *TNFRSF1A*. Infatti, il gruppo di pazienti adulti geneticamente negativi, osservati nel nostro studio e confrontati con il gruppo geneticamente positivo mostrava all'anamnesi una più alta frequenza delle recidive di faringite durante l'infanzia, ricordando un fenotipo PFAPA "periodic fever/ aphthosis/pharyngitis/cervical adenitis".

I dati del nostro studio mostrano, inoltre, che i soggetti portatori di varianti non strutturali mostrano rispetto ai pazienti geneticamente negativi, una più lunga durata di malattia, un minor numero di attacchi all'anno ed un più alto e significativo tasso di pericardite. In relazione alla pericardite, la sua frequenza è stata riscontrata con una percentuale variabile ma anche molto alta (27%) in pazienti TRAPS e talvolta, descritta anche come possibile unica manifestazione clinica in pazienti portatori di mutazioni non strutturali del gene *TNFRSF1A* (82, 86, 88, 89, 91). In particolare, mutazioni genetiche non strutturali del gene *TNFRSF1A* possono essere riscontrate in circa il 6% dei casi non selezionati di Pericardite Acuta Ricorrente Idiopatica e spesso accreditate come sua possibile causa, correlando con refrattarietà alla colchicina (86, 88, 91).

Per quanto riguarda l'allele R92Q, questo è molto comune nei pazienti di origine mediterranea, e la sua frequenza in individui sani italiani è stata riportata intorno a valori del 2,2% (176). Nonostante l'alta frequenza dell'allele R92Q nella popolazione sana, la maggiore frequenza tra i pazienti con febbri periodiche suggerisce che l'allele potrebbe rappresentare una variante a bassa penetranza piuttosto che un polimorfismo benigno (177). In alcuni pazienti portatori di questo allele, una malattia infiammatoria ricorrente associata ad un decorso più mite ed oligosintomatico era già stata riportata e descritta (76, 83). Recentemente, è stato suggerito di considerare l'allele R92Q come una variante a significato sconosciuto il cui effettivo contributo patogenetico necessita di essere interpretato nell'ambito

di un contesto clinico appropriato (69, 70). Ciò nonostante è ancora aperto e dibattuto il ruolo di questa variante e la capacità di agire come possibile fattore genetico in grado di influenzare la comparsa di un fenotipo infiammatorio (178, 179).

La variante P46L è stata riportata in pazienti con fenotipo simil TRAPS a frequenza variabile dal 2% (177) al 15 % (83) rispettivamente in due piccole casistiche. In diverse popolazioni di controllo, la variante P46L è presente ad una frequenza di circa l'1% (83). Tuttavia, in alcune popolazioni africane, la variante P46L sembra essere considerevolmente più frequente (10%), suggerendo in tali popolazioni il suo ruolo di polimorfismo piuttosto che di vera mutazione (76, 83). Nel complesso, l'alta frequenza di R92Q e P46L riportate in letteratura in alcune popolazioni non consente una loro certa definizione di varianti patogenetiche nello sviluppo di infiammazione (83).

La mutazione D12E è caratterizzata da un transizione della T in G nell'esone 2 che sostituisce un acido aspartico per un acido glutammico in posizione 12; le sue implicazioni funzionali sono attualmente in studio e questa mutazione sembrerebbe in primo luogo determinare un fenotipo meno grave di malattia con una durata più breve degli episodi ricorrenti febbrili (176). Questa variante è stata tuttavia descritta solo a carico di un paziente portatore di una mutazione addizionale M680I in omozigosi del gene *MEFV* (180), e in un paziente caucasico, con un fenotipo TRAPS (181).

La mutazione V95M, risulta essere caratterizzata dalla sostituzione di una G in A a livello dell'esone 4, che si traduce nella sostituzione del residuo aminoacidico valina in metionina a livello della posizione aminoacidica 95. Fino ad ora, una mutazione in eterozigosi per le variante V95M è stata riportata solo in tre casi, uno dei quali caucasico con episodi ricorrenti di pericardite come unica manifestazione clinica (182-184).

La variante R104Q è caratterizzata da transizione di G ad A a livello dell'esone 4, con la conseguente sostituzione di un'arginina a glutamina in posizione aminoacidica 104. Recentemente, in uno studio su 100 pazienti giapponesi con lupus eritematoso sistemico, il riscontro in due di questi, ha suggerito il potenziale e possibile ruolo di R104Q di mutazione a bassa penetranza piuttosto che di

polimorfismo (185). Tuttavia, anche per la variante R104Q le implicazioni funzionali rimangono attualmente sconosciute.

In conclusione, i dati rilevanti di questo studio confermano che le varianti non strutturali del gene *TNFRSF1A* possano coincidere con un fenotipo infiammatorio ricorrente a decorso oligosintomatico e con esordio tardivo. Queste varianti possono presentarsi in pazienti adulti con un quadro clinico caratterizzato da decorso oligosintomatico relativamente meno severo ed episodi di febbre mancando tuttavia delle manifestazioni tipiche del fenotipo TRAPS, legato alle varianti ad alta penetranza. Queste mutazioni sembrano essere associate ad un fenotipo TRAPS, le cui caratteristiche distintive sono rappresentate da una frequenza più alta di pericardite recidivante, ricorrenza di episodi febbrili di lunga durata, ed un quadro infiammatorio severo, con ridotto rischio di amiloidosi, che necessita di una terapia mirata con agenti biologici. Per questo motivo, in particolare la presenza di pericardite e fenomeni febbrili protratti nel tempo dovrebbe indirizzare verso il sospetto diagnostico di TRAPS anche in assenza di una storia familiare positiva.

I dati riguardanti che i livelli circolanti dei miRNA dimostrano l' up-regolazione dei due miRNA, miR-92a-3p and miR-150-3p, nei pazienti con fenotipo in pazienti eterozigoti per mutazioni del gene *TNFRSF1A* rispetto ai controlli sani e pazienti TRAPS geneticamente negativi.

Recenti osservazioni di letteratura hanno evidenziato il ruolo chiave dei miRNA nella regolazione dell'immunità innata ed adattiva, nello sviluppo e differenziazione delle cellule immunitarie (172, 173). Alterazioni del profilo di diversi miRNA sono state evidenziate anche in patologie infiammatorie, e in corso di TRAPS correlando in modo variabile con attività e decorso dei processi patologici (166, 173, 186, 187).

I miRNA sono oggi considerati potenziali biomarkers, e il loro utilizzo nel monitoraggio dell'attività di malattia e della risposta al trattamento farmacologico è stato recentemente ipotizzato anche in ambito reumatologico (187). Ad oggi, inoltre, non è stata esclusa l'ipotesi di un possibile ruolo dei miRNA come potenziali target per nuove strategie terapeutiche, mirate alla loro attivazione o inibizione specifica (172).

Quindi, ad oggi le alterazioni dei profili di espressione sierici e plasmatici dei miRNA sono stati riscontrati in diverse patologie (143, 188, 189) e le alterazioni dei livelli circolanti di queste molecole sono state correlate con un potenziale e prognostico in diverse condizioni patologiche (190). Tuttavia, l'esatto meccanismo con cui i miRNA entrano nel siero è ancora sconosciuto e non è ancora chiaro se queste molecole posseggano una precisa funzione biologica o se rappresentino solo dei marcatori di laboratorio; un recente studio mette in evidenza lo stoccaggio dei miRNA all'interno di micro vescicole e la loro secrezione con meccanismo attivo (138).

Un numero sempre maggiore di studi ha identificato nel profilo di espressione dei miRNA circolanti uno strumento diagnostico e prognostico di grande interesse anche in fenotipi autoinfiammatori. In pazienti con patologie TRAPS-like, caratterizzate da sintomi compatibili con Sindrome TRAPS ma senza mutazioni a carico del gene TNFRSF1A (191), il profilo di espressione dei miRNA circolanti è risultato utile come indicatore diagnostico, aprendo peraltro la strada ad una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che sottostanno a questo fenotipo così complesso.

Recentemente Lucherini et al. hanno dimostrato alterati livelli di espressione dei miRNA in pazienti affetti da TRAPS e portatori di mutazioni ad alta penetranza (173). Inoltre, alcuni di questi correlavano con l'attività di malattia ed in particolare i livelli sierici di miR-150-3p e miR-92a-3p risultavano ridotti nei pazienti TRAPS non trattati rispetto ai controlli, e il trattamento con anakinra ristabiliva i livelli di miRNA dei pazienti TRAPS su quelli dei donatori sani (173). Rispetto al dato osservato da Lucherini et al. nelle alte penetranze, i dati ottenuti dall'analisi dei miRNA in questo studio hanno evidenziato un trend opposto, up-regolato, dei miR-150-3p e miR-92a-3p nei pazienti portatori di basse penetranze. Il diverso profilo dei miR-150-3p e miR-92a-3p potrebbe rappresentare l'espressione di vie patogenetiche intermedie diverse e correlabili al genotipo. Tuttavia, l'esiguità della popolazione arruolata ci induce a considerare l'estensione dello studio in una coorte più ampia di pazienti.

I nostri dati mostrano inoltre che i valori sierici dei miR-150-3p e miR-92a-3p potrebbero essere impiegati in futuro nel monitoraggio della risposta al

trattamento nei pazienti con sindrome TRAPS portatori di mutazioni a bassa penetranza; questo, tuttavia, necessita la migliore comprensione delle differenze di espressione tra i pazienti portatori di mutazioni a bassa e alta penetranza e geneticamente negativi. Una migliore conoscenza sia dell' espressione che del ruolo dei miR-150-3p e miR-92a-3p in corso di TRAPS potrebbe essere utile nell' indirizzare lo studio di nuovi approcci terapeutici (138, 192-196).

Sebbene sia necessario condurre ulteriori studi, i livelli sierici dei miRNA sembrano rappresentare un modello di riferimento nella TRAPS e ulteriori studi potrebbero essere utili al fine di comprendere un loro potenziale ruolo di biomarkers di malattia e di indici di risposta al trattamento farmacologico.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
2. Sansonetti PJ. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat Immunol* 2006; 7: 1237-1242.
3. Franchi L, et al. Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* 2008; 10: 1-8.
4. Shaw MH, Reimer T, Kim YG, Nunez G: NOD-like receptors (NLRs). bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 377-382.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
6. Yoneyama M, et al: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol* 2004; 5: 730-737.
7. Strober W, et al: Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol* 2006; 6: 9-20.
8. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G: 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: 4531-4537.
9. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ: Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med* 2001; 194: 863-869.
10. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, Van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A: Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol* 2000; 164: 5998-6004.
11. Akira S: Toll receptor families: structure and function. *Semin. Immunol* 2004; 16: 1-2.

12. Uematsu S, Akira S: Toll-like receptors and type I interferons. *J Biol Chem* 2007; 282: 15319–15323.
13. Takeda K, Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14.
14. Iwasaki A, Medzhitov R: Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995.
15. Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376.
16. Medzhitov R, Janeway CA Jr: Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1998; 91: 295-8.
17. Klinman DM, Yi A, Beaucage SL, Conover G, Krieg AM: CpG motifs expressed by bacterial DNA rapidly induced lymphocytes to secrete IL-6, IL-12 and IFN- gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2879-83.
18. Krieg AM, Yi A, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-8.
19. Elkins KL, Rhinehart-Jones TR, Stibitz S, Conover JS, Klinman DM: Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 1999; 162: 2291-8.
20. Pichlmair, A Reis, Sousa C: Innate recognition of viruses. *Immunity* 2007; 27: 370-383.
21. Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005; 23: 19-28.
22. Sutterwala FS, Flavell RA: NLRC4/IPAF: a CARD carrying member of the NLR family. *Clin Immunol* 2009; 130: 2-6.
23. Martinon F: Detection of immune danger signals by NALP3. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 507-511.
24. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A: Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* 2006; 7: 569-575.

25. Inohara N, Nunez G: Cell death and immunity: NODs: intra- cellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol* 2003; 3: 371-382.
26. Koonin E V, Aravind L: The NACHT family a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem. Sci* 2000; 25: 223-224.
27. Ammelburg M, Frickey T, Lupas A N: Classification of AAA proteins. *J. Struct. Biol* 2006; 156: 2-11.
28. Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast M M, Tromp G, Williams C J, Inohara N, Nuñez G: Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J* 2004; 23: 1587-1597.
29. Duncan J A, Bergstralh D T, Wang Y, Willingham S B, Ye Z, Zimmermann A G, Ting J P: Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007; 104: 8041-8046.
30. Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, Kanneganti TD, Ozoren N, Jagirdar R, Inohara N, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, et al: Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* 2006; 7: 576-582.
31. Wilmanski JM, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS: NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 13-30.
32. Martinon F, Burns K, Tschopp J: The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; 10: 417-426.
33. Dowds TA, et al: Cryopyrin-induced interleukin 1beta secretion in monocytic cells: enhanced activity of disease-associated mutants and requirement for ASC. *J Biol Chem* 2004; 279: 21924-21928.
34. Hlaing T, Guo R, Dilley KA, Loussia JM, Morrish TA, Shi MM, Vincenz C, Ward PA: Molecular cloning and characterization of DEFCAP-L and -S, two isoforms of a novel member of the mammalian Ced-4 family of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 2001; 276: 9230-9238.

35. Manji GA, Wang L, Geddes BJ, Brown M, Merriam S, Al-Garawi A, Mak S, Lora J, Briskin M, Jurman M, Cao J, DiStefano PS, Bertin J: PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF- kappa B. *J Biol Chem* 2002; 277: 11570-11575.
36. Fiorentino L, Stehlik C, Oliveira V, Ariza ME, Godzik A, Reed JC: A novel PAAD-containing protein that modulates NF-kappa B induction by cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2002; 277: 35333-35340.
37. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G: Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009;227: 106-28.
38. Martinon F, Agostini L, Meylan E, Tschopp J.: Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr. Biol* 2004; 14: 1929-1934.
39. Kanneganti T D, et al: Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006; 440: 233-236.
40. Mariathasan S, et al: Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440: 228-232.
41. Martinon F, et al: Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440: 237-241.
42. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F: The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 2006; 176: 3877-3883.
43. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, et al: Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 5227-31.
44. Watanabe H, Gaide O, Petrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, Kummer JA, Tschopp J, French LE: Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2007; 127:1956–1963.
45. Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-147.

46. Dinarello CA: The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and experimental rheumatology* 2002; 20: S1-13.
47. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB: Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995; 95: 1669-75.
48. Pang L, Knox AJ: Effect of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the induction of cyclooxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 579-87.
49. Dinarello CA: The many worlds of reducing interleukin-1. *Arthritis and Rheumatism* 2005; 52: 1960-1967.
50. Thornberry NA, Bull HG, Taub D, Wilson KE, Gimenez-Gallego G, Rosegay A, et al.: Mechanism-based inactivation of alanine racemase by 3-halovinylglycines. *J Biol Chem* 1991; 266: 21657-65.
51. Mathews RJ, Sprakes MB, McDermott MF: NOD-like receptors and inflammation. *Arthritis research & therapy* 2008; 10: 228.
52. Bazzoni F, Beutler B: The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334: 1717-1725.
53. Gommerman JL, Browning JL: Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 642-655.
54. Schottelius AJG, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK: Biology of tumor necrosis factor-alpha implications for psoriasis. *Exp Dermatol* 2004; 13: 193-222.
55. Hehlhans T, Pfeffer K: The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005; 115: 1-20.
56. Kollias G: TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34: 3-6.
57. Aloisi F, Pujol-Borrell R: Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 205-217.
58. Browning JL, Ngam-ek A, Lawton P, DeMarinis J, Tizard R, Chow EP, Hession C, O'Brine-Greco B, Foley SF, Ware CF: Lymphotoxin, a novel member

of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* 1993; 72: 847.

59. Beutler B, Cerami A: The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 625.

60. Ware CF, Crowe PD, Grayson MH, Androlewicz MJ, Browning JL: Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol* 1992; 148: 3881.

61. Vassalli P: The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol* 1992; 10: 411.

62. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997; 389: 610-614.

63. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in autoimmune diseases, in Aggarwal BB, Puri RK. *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy*. Boston, Blackwell Science 1994; 85-194.

64. Black RA, White JM: ADAMs: Focus on the protease domain. *Curr Op Cell Biol* 1998; 10: 654-659.

65. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P: Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10: 45-65.

66. Caso F, Rigante D, Vitale A, Lucherini OM, Costa L, Attenu M, et al. Monogenic autoinflammatory syndromes: state of the art on genetic, clinical, and therapeutic issues. *Int J Rheumatol*. 2013;2013:513782.

67. Joost PH, Van Der Meer JW: The inflammasome: a linebacker of innate defense. *N.Egl J Med* 2006; 355: 730-2.

68. Galeazzi M, Gasbarrini G, Ghirardello A, Grandemange S, Hoffman HM, Manna R, et al: Autoinflammatory syndromes. *Clinical and experimental rheumatology* 2006; 24: S79-85.

69. Caso F, Cantarini L, Lucherini OM, Sfriso P, Fioretti M, Costa L, et al. Working the endless puzzle of hereditary autoinflammatory disorders. *ModRheumatol*. 2014;24:381-9.

70. Stankovic K, Grateau G: Autoinflammatory syndromes: Diagnosis and treatment. *Joint Bone Spine* 2007; 74: 544-550.

- 71.** Hull KM, Shoham N, Chae JJ, Aksentijevich, Kastner DL: The expanding spectrum of systemic autoinflammatory disorders and their rheumatic manifestations. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 61-9.
- 72.** Sfriso P, Caso F, Tognon S, Galozzi P, Gava A, Punzi L. Blau syndrome, clinical and genetic aspects. *Autoimmun Rev.* 2012 Nov;12(1):44-51.
- 73.** Caso F, Costa L, Rigante D, Vitale A, Cimaz R, Lucherini OM, et al. Caveats and truths in genetic, clinical, autoimmune and autoinflammatory issues in Blau syndrome and early onset sarcoidosis. *Autoimmun Rev.* 2014;13:1220-1229.
- 74.** McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, et al: Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 1999; 97: 133-44.
- 75.** Aksentijevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, Oh HH, et al. The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum Genet* 2001; 69:301-14.
- 76.** Rigante D, Lopalco G, Vitale A, Lucherini OM, De Clemente C, Caso F, et al. Key facts and hot spots on tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Clin Rheumatol.* 2014 Sep;33(9):1197-207.
- 77.** Cantarini L, Lucherini OM, Cimaz R, Brizi MG, Galeazzi M. Serosal involvement in adult-onset autoinflammatory disorders. *Respiration.* 2010;80(3):260-1.
- 78.** Hull KM, Wong K, Wood GM, Chu WS, Kastner DL. Monocytic fasciitis: a newly recognized clinical feature of tumor necrosis factor receptor dysfunction. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2189-94.
- 79.** Obici L, Merlini G. Amyloidosis in autoinflammatory syndromes. *Autoimmun Rev* 2012;12:14-7.
- 80.** Obici L, Raimondi S, Lavatelli F, Bellotti V, Merlini G. Susceptibility to AA amyloidosis in rheumatic diseases: a critical overview. *Arthritis Rheum* 2009 15;61:1435-40

- 81.** Aganna E, Hammond L, Hawkins PN, Aldea A, McKee SA, van Amstel HK, et al. Heterogeneity among patients with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome phenotypes. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2632-44.
- 82.** Dodé C, André M, Bienvenu T, Hausfater P, Pêcheux C, Bienvenu J, et al; French Hereditary Recurrent Inflammatory Disorder Study Group. The enlarging clinical, genetic, and population spectrum of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2181-8.
- 83.** Ravet N, Rouaghe S, Dodé C, Bienvenu J, Stirnemann J, Lévy P, et al. Clinical significance of P46L and R92Q substitutions in the tumor necrosis factor superfamily 1A gene. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1158-62.
- 84.** Cantarini L, Rigante D, Merlini G, Vitale A, Caso F, Lucherini OM, et al. The expanding spectrum of low-penetrance TNFRSF1A gene variants in adults presenting with recurrent inflammatory attacks: clinical manifestations and long-term follow-up. *Semin Arthritis Rheum*. 2014;43:818-23.
- 85.** Cantarini L, Iacononi F, Lucherini OM, Obici L, Brizi MG, Cimaz R, et al. Validation of a diagnostic score for the diagnosis of autoinflammatory diseases in adults. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; 24:695-702.
- 86.** Muscari I, Iacononi F, Cantarini L, Lucherini OM, Simonini G, Brizi MG, et al. The diagnostic evaluation of patients with potential adult-onset autoinflammatory disorders: our experience and review of the literature. *Autoimmun Rev* 2012; 12:10-3.
- 87.** Cantarini L, Imazio M, Brucato A, Lucherini OM, Galeazzi M. Innate versus acquired immune response in the pathogenesis of recurrent idiopathic pericarditis. *Autoimmun Rev* 2010;9:436-40.
- 88.** Cantarini L, Lucherini OM, Baldari CT, Laghi Pasini F, Galeazzi M. Familial clustering of recurrent pericarditis may disclose tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28:405-7.
- 89.** Cantarini L, Lucherini OM, Cimaz R, Baldari CT, Laghi Pasini F, Galeazzi M. Sacroileitis and pericarditis: atypical presentation of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome and response to etanercept therapy. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28:290-1.

- 90.** Trost S, Rosé CD. Myocarditis and sacroiliitis: 2 previously unrecognized manifestations of tumor necrosis factor receptor associated periodic syndrome. *J Rheumatol* 2005; 32: 175-7.
- 91.** Cantarini L, Lucherini OM, Brucato A, Barone L, Cumetti D, Iaconi F, et al. Clues to detect tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) among patients with idiopathic recurrent acute pericarditis: results of a multicentre study. *Clin Res Cardiol* 2012; 101:525-31.
- 92.** Chia S, Qadan M, Newton R, Ludlam CA, Fox KA, Newby DE. Intra-arterial tumor necrosis factor-alpha impairs endothelium-dependent vasodilatation and stimulates local tissue plasminogen activator release in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:695-701.
- 93.** Stojanov S, DeJaco C, Lohse P, Huss K, Duftner C, Belohradsky BH, et al. Clinical and functional characterisation of a novel TNFRSF1A c.605T>A/V173D cleavage site mutation associated with tumour necrosis factor receptor-associated periodic fever syndrome (TRAPS), cardiovascular complications and excellent response to etanercept treatment. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1292-8.
- 94.** Rigante D, Cantarini L, Imazio M, Lucherini OM, Sacco E, Galeazzi M, et al. Autoinflammatory diseases and cardiovascular manifestations. *Ann Med*. 2011;43(5):341-6.
- 95.** Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993;73:431-45.
- 96.** Naismith JH, Devine TQ, Brandhuber BJ, Sprang SR. Crystallographic evidence for dimerization of unliganded tumor necrosis factor receptor. *J Biol Chem* 1995;270:13303-7.
- 97.** Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11:372-7.
- 98.** Porteu F, Nathan C. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J Exp Med* 1990;172:599-607.
- 99.** Rebelo SL, Bainbridge SE, Amel-Kashipaz MR, Radford PM, Powell RJ, Todd I, Tighe PJ: Modeling of Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily 1A mutants associated with Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Periodic

Syndrome indicates misfolding consistent with abnormal function. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2674-87.

100. Huggins ML, Radford PM, McIntosh RS, Bainbridge SE, Dickinson P, Draper-Morgan KA, Tighe PJ, Powell RJ, Todd I: Shedding of mutant tumor necrosis factor receptor superfamily 1A associated with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: differences between cell types. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2651-9.

101. Ariel C. Bulua, et al., Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS), *JEM VOL.* 208, March 14, 2011.

102. Simon A, Park H, Maddipati R, Lobito AA, Bulua AC, Jackson AJ, *et al*: Concerted action of wild-type and mutant TNF receptors enhances inflammation in TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:9801-6.

103. Pahl HL, Baeuerle PA: The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem Sci* 1997; 22:63-7.

104. Dickie LJ, Aziz AM, Savic S, Lucherini OM, Cantarini L, Geiler J, *et al*: Involvement of X-box binding protein 1 and reactive oxygen species pathways in the pathogenesis of tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Ann Rheum Dis* 2012; 71:2035-43.

105. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, *et al*: Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011; 12:222-30.

106. Grateau G. Clinical and genetic aspects of the hereditary periodic fever syndromes. *Rheumatology*. 2004;43:410 – 5.

107. Gillmore JD, Lovat LB, Persey MR, Pepys MB, Hawkins PN. Amyloid load and clinical outcome in AA amyloidosis in relation to circulating concentration of serum amyloid A protein. *Lancet*. 2001;358:24 – 9.

108. Aganna E, Hawkins PN, Ozen S, Pettersson T, Bybee A, McKee SA, et al. Allelic variants in genes associated with hereditary periodic fever syndromes as

susceptibility factor for reactive systemic AA amyloidosis. *Genes Immun.* 2004;5:289 – 93.

109. Cantarini L, et al., Leptin, adiponectin, resistin, visfatin serum levels and idiopathic recurrent pericarditis: biomarkers of disease activity? A preliminary report. *Clin Exp Rheumatol.* 2013 Mar-Apr;31(2):207-12.

110. Cantarini L, et al., Serum leptin, resistin, visfatin and adiponectin levels in tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). *Clin Exp Rheumatol.* 2012 May-Jun.

111. Cantarini L, Rigante D, Lucherini OM, Cimaz R, Laghi Pasini F, Baldari CT, et al. Role of etanercept in the treatment of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: personal experience and review of the literature. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010;23:701 – 7.

112. Rigante D, Capoluongo E: The plodding diagnosis of monogenic autoinflammatory diseases in childhood: from the clinical scenery to laboratory investigation. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:783-91.

113. Nowlan M., Drewe E, Bulsara H, Esposito N, Robins RA, Tighe PJ, et al. Systemic cytokine levels and the effects of etanercept in TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) involving a C33Y mutation in TNFRSF1A. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:31– 7.

114. Drewe E, McDermott EM, Powell PT, Isaacs JD, Powell RJ: Prospective study of anti-tumour necrosis factor receptor superfamily 1B fusion protein, and case study of anti-tumour necrosis factor receptor superfamily 1A fusion protein, in tumour necrosis factor receptor associated periodic syndrome (TRAPS): clinical and laboratory findings in a series of seven patients. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42:235-9.

115. Bulua AC, Mogul DB, Aksentijevich I, Singh H, He DY, Muenz LR, et al: Efficacy of etanercept in the tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: a prospective, open-label, dose-escalation study. *Arthritis Rheum* 2012; 64:908-13.

116. Obici L, Meini A, Cattalini M, Chicca S, Galliani M, Donadei S, et al: Favourable and sustained response to anakinra in tumour necrosis factor receptor-

associated periodic syndrome (TRAPS) with or without AA amyloidosis. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:1511-2.

117. Vaitla PM, Radford PM, Tighe PJ, Powell RJ, McDermott EM, Todd I, *et al*: Role of interleukin-6 in a patient with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: assessment of outcomes following treatment with the anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody tocilizumab. *Arthritis Rheum* 2011; 63:1151-5.

118. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97.

119. Grolleau-Julius A, Ray D, Yung RL. The role of epigenetics in aging and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2010;39:42-50.

120. Lu Q, Renaudineau Y, Cha S, Ilei G, Brooks WH, Selmi C, Tzioufas A, Pers JO, Bombardieri S, *et al*. Epigenetics in autoimmune disorders: highlights of the 10th Sjögren's syndrome symposium. *Autoimmun Rev* 2010;9:627-30.

121. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer . *Annu Rev Pathol* 2009 ;4 :199-227.

122. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, *et al*. Dicer is essential for mice development. *Nat Genet* 2003;35:215-7.

123. Sonkoly E, Stahle M, Pivarcas A. MicroRNAs and immunity: Novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 2008;18:131-140.

124. Lewin's Genes 10: Lewin B, Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. 10^o Edizione. Jones Bartlett Learning.2009 pp. 869-77.

125. Ke XS, Liu CM, Liu DP, Liang CC. MicroRNAs: key participants in gene regulatory networks. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:516-23.

126. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004;5:522-31.

127. Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F, Plasterk RH, Wilson SW. MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous sistem. *Genome Biol* 2007;8:R173.

- 128.** Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PloS Biol* 2007;5:e203.
- 129.** Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 2006;11:441-50.
- 130.** Huppi K, Volfovsky N, Mackiewicz M, Runfola T, Jones TL, Martin SE, et al. MicroRNAs and genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2007;17:65-73.
- 131.** McManus MT. MicroRNAs and cancer. *Semin Cancer Biol* 2003;13:253-8.
- 132.** Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005;132:4653-62.
- 133.** Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-8.
- 134.** Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:563-8.
- 135.** Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;60:167-79.
- 136.** Ma J, Dong C, Ji C. MicroRNA and drug resistance. *Cancer Gene Ther* 2010;17:523-31.
- 137.** Hurst DR, Edmonds MD, Welch DR. Metastamir: the field of metastasis-regulatory microRNA is spreading. *Cancer Res* 2009;69:7495-8.
- 138.** Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol/Hematol* (2010), doi:10.1016/critrevonc.2010.11.004
- 139.** Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, et al. Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by microRNA expression profiling. *J Mol Diagn* 2008;10:415-423.
- 140.** Esau CC, Monia BP. Therapeutic potential for microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:101-14.
- 141.** Czech MP. MicroRNAs as therapeutic targets. *N Engl J Med* 2006;354:1194-5.
- 142.** Krutzfeld J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNA in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438:685-9.

- 143.** Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:672-75.
- 144.** Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. *Clin Cancer Res* 2008;14:2588-92.
- 145.** Hu Z, Chen X, Zhao Y et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1721-26.
- 146.** Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010;127(1):118-26.
- 147.** Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signature of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008;110:13-21.
- 148.** Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009;112:55-59.
- 149.** Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, et al. MicroRNA 500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers* 2009;14:529-538.
- 150.** Ho AS, Huang X, Cao H, et al. Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer. *Transl Oncol* 2010;3:109-13.
- 151.** Zhu W, Quin W, Atasoy U, Sauter ER. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* 2009;2:89.
- 152.** Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2010;102:1174-79.
- 153.** Ai J, Zhang R, Li Y, et al. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:73-77.
- 154.** Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2010;56(7):1183-5.

- 155.** Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 2010;31:659-66.
- 156.** Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW, et al. Plasma microRNAs as sensitive and specific biomarkers as tissue injury. *Clin Chem* 2009;55:1977-83.
- 157.** Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, et al. MiR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007;129:147-61.
- 158.** Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 2007;131:146-59.
- 159.** Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. MiR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7080-5.
- 160.** Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science* 2007;316:604-8.
- 161.** Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 2008;9:405-14.
- 162.** Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintaut L, Meissner A, Erkeland SJ, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping function of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 2008;132:875-86.
- 163.** Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kB-dependent induction of microRNA MiR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12481-6.
- 164.** Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, et al. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005;123:819-31.
- 165.** Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, Xu ZM, Yin YB. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 2007;16:939-46.

- 166.** Dai Y, Sui W, Lan H, Yan Q, Huang H, Huang Y. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatol Int* 2009;29:749-54.
- 167.** Zhao X, Tang Y, Qu B, Cui H, Wang S, Wang L, Luo X, Huang X, Li J, Chen S, Shen N. MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2010 Nov;62(11):3425-35.
- 168.** Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay RE, Michel BA, Distler JH, Gay S, Distler O. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010;62:1733-43.
- 169.** Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of microRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1001-9.
- 170.** Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2008;58:1284-92.
- 171.** Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R101.
- 172.** Ceribelli A, Yao B, Dominguez-Gutierrez PR, Nahid MA, Satoh M, Chan EK. MicroRNAs in systemic rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther*. 2011 Jul;13(4):229.
- 173.** Lucherini OM, Obici L, Ferracin M, Fulci V, McDermott MF, Merlini G, Muscari I, Magnotti F, Dickie LJ, Galeazzi M, Negrini M, Baldari CT, Cimaz R, Cantarini L. First report of circulating microRNAs in tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). *PLoS One*. 2013;8:e73443.
- 174.** Lachmann HJ, Papa R, Gerhold K, Obici L, Touitou I, Cantarini L, et al; Paediatric Rheumatology International Trials Organisation (PRINTO), the EUROTRAPS and the Eurofever Project. The phenotype of TNF receptor-associated autoinflammatory syndrome (TRAPS) at presentation: a series of 158

cases from the Eurofever/EUROTRAPS international registry. *Ann Rheum Dis.* 2014 Dec;73(12):2160-7.

175. Pelagatti MA, Meini A, Caorsi R, Cattalini M, Federici S, Zulian F, Calcagno G, Tommasini A, Bossi G, Sormani MP, Caroli F, Plebani A, Ceccherini I, Martini A, Gattorno M. Long-term clinical profile of children with the low-penetrance R92Q mutation of the TNFRSF1A gene. *Arthritis Rheum.* 2011 Apr;63(4):1141-50.

176. D'Oswaldo A, Ferlito F, Prigione I, Obici L, Meini A, Zulian F, Pontillo A, Corona F, Barcellona R, Di Duca M, Santamaria G, Traverso F, Picco P, Baldi M, Plebani A, Ravazzolo R, Ceccherini I, Martini A, Gattorno M. Neutrophils from patients with TNFRSF1A mutations display resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis: pathogenetic and clinical implications. *ArthritisRheum.* 2006 Mar;54(3):998-1008.

177. Aksentijevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, Oh HH, Goldbach-Mansky R, Dean J, Athreya B, Reginato AJ, Henrickson M, Pons-Estel B, O'Shea JJ, Kastner DL. The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum Genet.* 2001 Aug;69(2):301-14.

178. Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, Lidar M, Shinar Y, Bar-Joseph I, Reznik-Wolf H, Langevitz P, Livneh A, Pras E. Role of the R92Q TNFRSF1A mutation in patients with familial Mediterranean fever. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2010Sep;62(9):1294-8.

179. Kümpfel T, Hoffmann LA, Pellkofer H, Pöllmann W, Feneberg W, Hohlfeld R, Lohse P. Multiple sclerosis and the TNFRSF1A R92Q mutation: clinical characteristics of 21 cases. *Neurology.* 2008 Nov 25;71(22):1812-20.

180. Gattorno M, Sormani MP, D'Oswaldo A, Pelagatti MA, Caroli F, Federici S, Cecconi M, Solari N, Meini A, Zulian F, Obici L, Breda L, Martino S, Tommasini A, Bossi G, Govers A, Touitou I, Woo P, Frenkel J, Koné-Paut I, Baldi M, Ceccherini I, Martini A. A diagnostic score for molecular analysis of hereditary autoinflammatory syndromes with periodic fever in children. *Arthritis Rheum.* 2008 Jun;58(6):1823-32.

- 181.** Cantarini L, Lucherini OM, Galeazzi M, Fanti F, Simonini G, Baldari CT, et al. Tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome caused by a rare mutation in the TNFRSF1A gene, and with excellent response to etanercept treatment. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27:890–1.
- 182.** Cantarini L, Lucherini OM, Cimaz R, Galeazzi M. Recurrent pericarditis caused by a rare mutation in the TNFRSF1A gene and with excellent response to anakinra treatment. *Clin Exp Rheumatol* 2010;28:802.
- 183.** Rack A, Stojanov S, Belohradsky BH, Lohse P. A new low-penetrance TNFRSF1A mutation causing atypical periodic fever. *Pediatr Int.* 2006 Apr;48(2):169-71.
- 184.** Cantarini L, Lucherini OM, Vitale A, Sabadini L, Brizi MG, Frediani B, et al. Expanding spectrum of TNFRSF1A gene mutations among patients with idiopathic recurrent acute pericarditis: report of two cases and review of the literature. *Intern Med J* 2013;43:725–7.
- 185.** Horiuchi T, Tsukamoto H, Mitoma H, Miyagawa H, Tamimoto Y, Yoshizawa S, Harada M, Hayashi K, Hashimura C, Oribe M, Okamura S. Novel mutations in TNFRSF1A in patients with typical tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome and with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Int J Mol Med.* 2004;14:813-8.
- 186.** Contreras J, Rao DS. MicroRNAs in inflammation and immune responses. *Leukemia.* 2012;26: 404–413.
- 187.** Carissimi C, Fulci V, Macino G. MicroRNAs: novel regulators of immunity. 2009; *Autoimmun Rev* 8: 520–524.
- 188.** Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 1065–1075.
- 189.** Intine RV, Sarras MP Jr (2012) Metabolic memory and chronic diabetes complications: potential role for epigenetic mechanisms. *Curr Diab Rep.* 2012;12: 551–559.
- 190.** Jakob P, Doerries C, Briand S, Mocharla P, Kra ¨nkel N, et al. Loss of AngiomiR-126 and 130a in Angiogenic Early Outgrowth Cells From Patients

With Chronic Heart Failure: Role for Impaired In Vivo Neovascularization and Cardiac Repair Capacity. *Circulation*. 2012;126: 2962–2975.

191. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*.2010;39: 133–144.

192. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, et al. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One* .2009;4: e7405.

193. Cantarini L, Lucherini OM, Cimaz R, Rigante D, Baldari CT, et al. Typical and severe tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome in the absence of mutations in the TNFRSF1A gene: a case series. *Rheumatol Int*.2012; 32: 4015–4018.

194. Jackson AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics: approaching the unique complexities. *Nucleic Acid Ther*.2012; 22: 213–225.

195. Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer*.2012; 12: 613–626.

196. Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Combating hepatitis C virus by targeting microRNA-122 using locked nucleic acids. *Curr Gene Ther*.2012;12: 301– 306.

Ringraziamenti

Il mio ringraziamento più sentito va al Professore Leonardo Punzi, mia guida e punto di riferimento umano e scientifico in questi anni trascorsi presso l'Unità Operativa di Reumatologia dell'Università di Padova. A Lui sono particolarmente grato per avermi dato la possibilità di dedicarmi alle Malattie Autoinfiammatorie, trasmettendomi la sua grande passione per la clinica e la ricerca.

Con Lui, voglio ringraziare tutti i docenti, colleghi e personale dell'Università di Padova che in questi anni mi hanno accompagnato, mettendo a disposizione la loro esperienza e professionalità. Un ringraziamento va al Gruppo di Ricerca dedicato allo studio delle Malattie Autoinfiammatorie della Reumatologia dell'Università di Padova, Dr. Paolo Sfriso, Dr. Alessandra Gava, Dr. Eliana Greco e Dr. Paola Galozzi. Un grande grazie a Paola, Elena ed Alberto per aver condiviso questa esperienza di dottorato.

Un grazie di cuore al Prof. Mauro Galeazzi per avermi accolto con grande affetto nell'Unità di Reumatologia di Siena per un periodo del mio percorso di Dottorato e con Lui per tutto il supporto scientifico ringrazio il Dr. Orso Maria Lucherini e tutti i colleghi della Reumatologia di Siena.

Un grazie speciale al Dottor Luca Cantarini, guida, amico, e collega, su cui ho sempre potuto contare, anche nei periodi più impegnativi, e da cui ho imparato tanto. Senza il Suo aiuto, e quello dei colleghi di Padova, Siena, Pavia, Firenze e Roma, l'elaborazione di questo lungo ed impegnativo studio, non sarebbe stato possibile.

Infine, ringrazio i miei genitori, Maria, Paolo e Luisa per essermi stati sempre vicini.