



# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

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

INDIRIZZO: SCIENZE REUMATOLOGICHE

CICLO: XXI

**UTILITÀ DELLA TECNICA DENATURING HIGH PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY PER LA DIAGNOSI DI DEFICIT DI MEVALONATO  
CHINASI NELLE FEBBRI PERIODICHE DI SOSPETTA NATURA  
AUTOINFIAMMATORIA**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

**Supervisore :** Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

**Dottorando :** Dott.ssa Alessandra Gava



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Le malattie autoinfiammatorie sistemiche</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Eziopatogenesi delle Malattie Autoinfiammatorie Sistemiche .....	6
1.1.2 Sintesi e secrezione di IL-1 $\beta$ .....	9
1.1.3 Fisiologia della febbre.....	9
<b>1.2 Le “Febbri Periodiche Ereditarie”</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 La Sindrome da Iper IgD o da Deficit di Mevalonato Chinasi</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4 Metodiche per l’analisi di mutazioni puntiformi non note</b> .....	<b>15</b>
1.4.1 Analisi di sequenza.....	15
1.4.2 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms).....	16
1.4.3 DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis).....	17
1.4.4 TTGE (Temporal temperature gradient electrophoresis).....	18
1.4.5 DHPLC (Denaturant High Performance Liquid Chromatography) .....	18
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Pazienti</b> .....	<b>23</b>
<b>3.2 Dosaggio delle IgD nel siero</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3 Estrazione e amplificazione del DNA</b> .....	<b>25</b>
<b>3.4 Analisi mediante DHPLC</b> .....	<b>26</b>
<b>3.5 Determinazione delle sequenze di DNA</b> .....	<b>27</b>
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 Analisi di polimorfismi mediante DHPLC E Sequenziamento Automatico</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2 Valori di IgD nel siero e Correlazione con i polimorfismi del gene mvk</b> .....	<b>31</b>
<b>4.3 Valutazione costo - efficacia dell’analisi in DHPLC</b> .....	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>33</b>
<b>6. CONCLUSIONI</b> .....	<b>39</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>41</b>
<b>APPENDICE</b> .....	<b>49</b>



## RIASSUNTO

### SCOPO DEL LAVORO

La Mevalonate Kinase Deficiency (MKD), già nota come sindrome da Iper IgD (HIDS), è una rara malattia autoinfiammatoria di tipo autosomico recessivo caratterizzata da febbre ricorrente e disturbi muscoloscheletrici. La MKD è dovuta a mutazioni del gene *mvk*, mappato sul cromosoma 12q24, il quale codifica per l'enzima mevalonato chinasi (MK); polimorfismi nel gene *mvk* sono la causa di un'alterata attività enzimatica di MK.

L'individuazione della mutazione genica della mevalonato chinasi ha reso l'indagine genetica indispensabile per la diagnosi, soprattutto in pazienti con valori sierici di IgD normali, tuttavia il sequenziamento dell'intera regione codificante è costoso e la determinazione di mutazioni può essere resa più efficiente utilizzando tecniche di pre-screening in grado di identificare l'esone mutato. In questo studio è stata effettuata un'indagine genetica utilizzando l'analisi in DHPLC come tecnica di pre-screening per identificare le alterazioni nella regione codificante del gene *mvk* in pazienti con sospetta sindrome autoinfiammatoria.

### MATERIALI E METODI:

A partire da gennaio 2007 sono stati presi in esame 19 pazienti (età media 33 anni, range 13 – 61 anni) seguiti presso la Cattedra e UOC di Reumatologia dell'Università di Padova per febbri ricorrenti non imputabili ad infezioni o a malattie autoimmuni e compatibili con sospetta MKD e 10 controlli sani. In ogni paziente è stato effettuato il dosaggio delle IgD nel siero. L'analisi del DNA, estratto da linfociti del sangue periferico, è stata effettuata mediante un protocollo di amplificazione per frammenti di 210-250 bp messo a punto da noi stessi, utilizzando primers specifici per le sequenze dei 10 esoni codificanti del gene *mvk*. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante DHPLC utilizzando il sistema Wave® Fragment Analysis (Transgenomic, Omaha, NE, USA). Le temperature di melting (T<sub>m</sub>) sono state calcolate con Navigator Software 1.7.0 (Transgenomic). Le sequenze degli stessi frammenti amplificati sono state

determinate mediante l'uso di un sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, USA).

### **RISULTATI:**

I valori sierici di IgD erano normali (<100 mg/L) in 14/19 pazienti. Nessun campione di controllo presentava alterazioni dei profili DHPLC e delle sequenze.

Dodici dei 19 pazienti esaminati presentavano almeno un profilo di DHPLC alterato e i dati sono stati confermati con il sequenziamento. Sono state evidenziate le mutazioni S52N (paziente 2-13-15), D170D e c.632-18A>G (paziente 4-5-6-10-12-17-19), S135S (pz 13-16) c.78+61A>G (pz 6-11-19), c.885+24G>A (pz 6-19) già descritte in letteratura e nel database INFEVERS (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers>).

Lo screening con DHPLC ha permesso di ottenere i risultati in minor tempo (10 ore / paziente) e con costi inferiori (40 euro / paziente) rispetto alla tecnica di sequenziamento diretto (tempo: 25 ore / paziente , costi: 150 euro / paziente).

### **CONCLUSIONI:**

Un elevato livello sierico di IgD non rappresenta più un marker per fare diagnosi di MKD, come già riportato in letteratura.

La DHPLC è una tecnica capace di effettuare uno screening rapido e a basso costo nell'analisi di mutazioni in pazienti con sospetta sindrome autoinfiammatoria legata al gene *mvk*.

Tuttavia, essendo una tecnica di analisi indiretta, è necessario considerare che la DHPLC aumenta l'efficienza dell'analisi ma non la sua sensibilità in quanto è in grado di evidenziare un polimorfismo di sequenza ma non la sua posizione.

Sette pazienti della nostra coorte sono risultati portatori delle varianti alleliche D170D e c.632-18A>G; tale evento suggerisce che questi SNP potrebbero essere in linkage disequilibrium e che tali mutazioni potrebbero indurre una diminuzione nell'attività della MK predisponendo quindi alla MKD.

## SUMMARY

### **BACKGROUND:**

Mevalonate Kinase Deficiency (MKD) is a rare autosomic recessive autoinflammatory disorder characterized by recurrent fever and musculoskeletal manifestations. MKD is due to mutations in the gene for mevalonate kinase (MK), located on chromosome 12q24, which cause variable degrees of enzyme deficiency. Although genetic investigation became essential for the diagnosis, especially in patient with normal IgD values in serum, the analysis of the sequence of the whole coding region is expensive: determination of mutations by sequencing can be made more efficient using techniques of pre-screening able to identify the mutated exon.

### **OBJECTIVES:**

In this study we have developed a genetic investigation using Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC), a pre-screening technique which is able to identify polymorphisms of the gene *mvk* in patients with autoinflammatory syndrome suspicion.

### **METHODS:**

Starting from January 2007 we evaluated 10 healthy controls and 19 patients (mean age 33 years, range 13 – 61 years) affected by recurrent fevers and other clinical manifestations usually found in autoinflammatory syndromes and not correlated with infections or autoimmune disease. IgD level was measured in all patients.

Molecular testing was performed in DNA extracted from peripheral blood lymphocytes by standard methods. The 10 coding exons (from 2 to 11) of the *mvk* gene were analysed by means of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) using the Wave® Fragment Analysis system (Transgenomic). Primers for PCR amplifications, amplicon lengths and PCR conditions were designed in our laboratory. Melting temperature (T<sub>m</sub>) were calculated with Navigator Software 1.7.0 (Transgenomic). Sequences of the same

amplified fragments were determined by means of an automatic sequencer ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS).

**RESULTS:**

IgD level was normal in 14 patients.

Healthy controls did not show any alteration of the DHPLC-profiles and of the DNA sequences. Twelve patients had at least one altered DHPLC-profile and these data have been confirmed by sequencing. In particular we detected the mutations S52N (patient 2-13-15), S135S (pt 13-16), D170D, c.632-18A>G(pt 4-5-6-10-12-17-19), c.78+61A>G (pt 6-11-19), c.885+24G>A (pt 6-19) already described in literature and in the database INFEVERS (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers>).

The screening with DHPLC has allowed us to get the results in shorter time (10 hours/patient) and with lower cost (40 euro / patient) in comparison to direct sequencing (time: 25 hours / patient and cost: 150 euro / patient).

**CONCLUSION:**

High serum levels of IgD do not represent an essential marker for diagnosis of MKD, as already reported in literature. DHPLC is a rapid low cost technique in order to screen mutations in patients with MKD suspicion. Nevertheless, being an indirect technique, DHPLC is able to show a polymorphism in the DNA sequence but it is not able to identify the position, and this still remains a limiting factor for the use of the DHPLC as an exclusive technique for genetic analysis.

Twelve patients of our cohort carried at the same time D170D and c.632-18A>G: such event suggests that these SNPs could be in linkage disequilibrium and that such mutations could induce a diminution in the activity of the MK predisposing therefore to the MKD.



## **1. INTRODUZIONE**

La prima descrizione di “malattia periodica” nella letteratura medica risale probabilmente a due secoli fa, nel 1802, quando Heberden [1] descrisse una malattia caratterizzata da dolore periodico a carico di addome, torace e articolazioni.

Nei seguenti 200 anni le conoscenze mediche sulle malattie di questo tipo sono progredite seguendo un percorso ben preciso. Il primo passo importante fu la definizione clinica e la caratterizzazione di tutte le sindromi contraddistinte da febbri periodiche. Quindi il riconoscimento della loro natura ereditaria.

Successivamente tra il 1997 e il 2002 per ciascuna delle più importanti malattie fu possibile individuare il gene responsabile e le mutazioni corrispondenti.

La nuova era, nel presente e nel futuro, punta alla scoperta dei meccanismi fisiopatologici alla base di queste malattie ed in particolare i rapporti fra queste mutazioni geniche e la reazione infiammatoria, inclusa la febbre.

### **1.1 LE MALATTIE AUTOINFIAMMATORIE SISTEMICHE**

Le Malattie Autoinfiammatorie Sistemiche (MAIS) sono un gruppo eterogeneo di affezioni caratterizzate da flogosi recidivante apparentemente primitiva a carico di vari organi o apparati, in particolare articolazioni e cute (Tabella 1) [2,3].

Il termine “autoinfiammatorio” è stato coniato nel 1999 da Daniel L. Kastner [4] per descrivere lo sviluppo apparentemente spontaneo di infiammazione senza la presenza di un titolo elevato di linfociti T self-reattivi o autoanticorpi specifici, tipici delle malattie autoimmuni.

Sebbene tutte queste affezioni abbiano caratteristiche genetiche distinte e peculiari, esse hanno espressioni cliniche comuni e spesso difficilmente distinguibili [5-8].

## **Tabella 1 Malattie Autoinfiammatorie Sistemiche**

---

### **Definite**

Febbre Mediterranea Familiare (FMF)

Mevalonate Kinase Deficiency (MKD) o Iper IgD con febbre periodica (HIDS)

Artrite Piogenica sterile, pioderma gangrenoso, acne (PAPA)

Muckle-Wells syndrome (MWS)

Familial Cold Autoinflammatory Syndrome (FCAS)

Neonatal-onset multi system inflammatory disease (NOMID)

TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS)

Sindrome di Blau

NLRP12-associated periodic syndrome (NAPS12)

### **Possibili**

M. di Behçet

M. di Crohn

M. di Still

M. di Schnitzler

Gotta

---

### 1.1.1 Eziopatogenesi delle Malattie Autoinfiammatorie Sistemiche

L'eziopatogenesi delle MAIS è riconducibile ad una forte componente genetica e in molti casi ad anomalie nel regolamento del sistema dell'immunità innata [9,10].

Mutazioni responsabili della malattia sono state individuate in quasi tutte le MAIS: febbre mediterranea familiare (FMF), la s. da Iper IgD (HIDS), la s. associata al difetto di recettore del fattore di necrosi tumorale (TRAPS) e la s. di Blau [11-16].

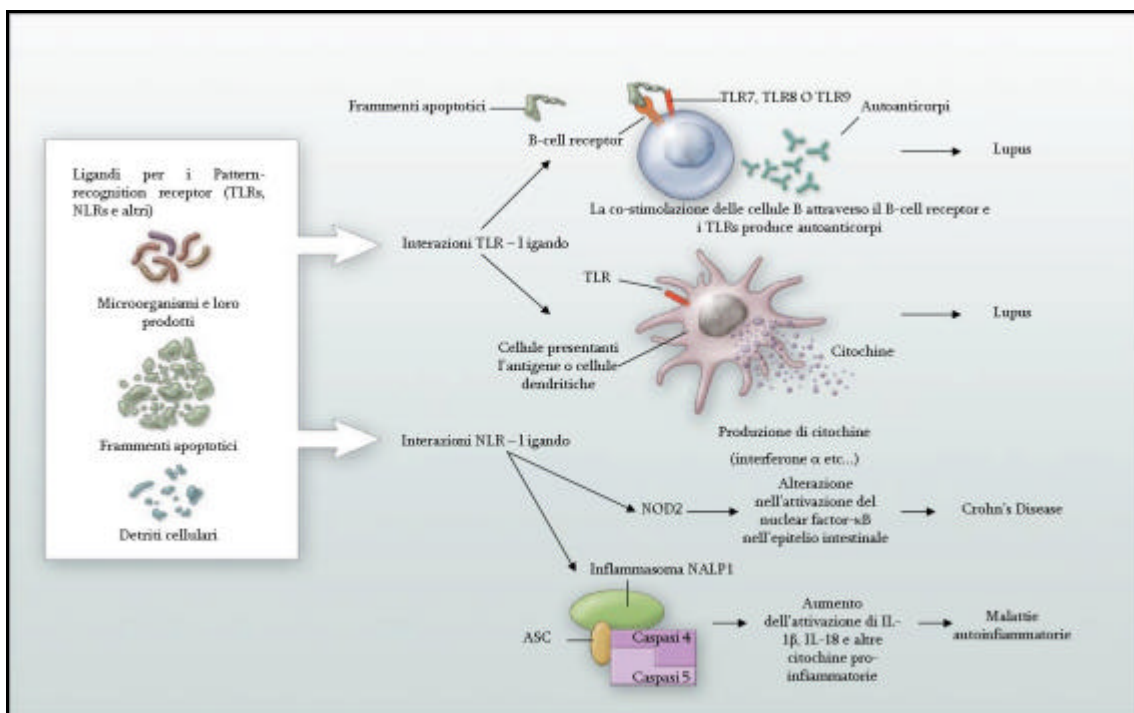
Recentemente è stata scoperta la responsabilità genetica anche per un gruppo di malattie note con la definizione di "criopirinopatie", rispettivamente: la Familial Cold Autoinflammatory Syndrome (FCAS), la Muckle-Wells Syndrome (MWS) e la Chronic Infantile Neurological Cutaneous Articular (CINCA) [17-19].

In questo ultimo gruppo le mutazioni alterano la funzione del complesso denominato "inflammasoma" [20], la cui formazione porta all'attivazione della caspasi-1 che promuove la maturazione delle citochine pro infiammatorie IL-1 $\beta$  ed IL-18 [21-25].

Inoltre è importante ricordare che l'inflammasoma ha un ruolo chiave nelle risposte immuni ed innate verso patogeni.

Il sistema immunitario innato è costituito da un gruppo complesso di recettori (Figura 1) in grado di riconoscere un ampio spettro di segnali di pericolo [26].

Il sistema di recettori include i Toll-like receptors (TLRs) e i Nucleotide-binding domain - leucine-rich repeat family (NLRs): i primi sono localizzati principalmente sulla membrana cellulare e rilevano i patogeni esogeni tramite il riconoscimento di strutture PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) tipiche della membrana batterica; gli ultimi sono dei sensori intracellulari per rilevare segnali di pericolo endogeni come ATP, tossine e proteine intracellulari definite “alarmine” che sono rilasciate da cellule morte successivamente a danneggiamento tissutale[27-29].



**Figura 1 Meccanismi del Sistema dell'Immunità Innata che contribuiscono alle malattie autoimmunitarie e autoinfiammatorie (Gregersen P. NEJM 2007, modificato).**

PAMPs e alarmine sono raggruppati nella definizione di DAMPS (Damage-Associated Molecular Patterns) dal momento che trasmettono un messaggio simile e inducono una risposta infiammatoria nell'organismo ospite, mediante

l'attivazione di diversi pathways molecolari (attivazione di NF $\kappa$ B, secrezione di citochine e apoptosi) [30].

Fino ad oggi sono state scoperte numerose mutazioni nei geni che codificano per le proteine che compongono i NLR e nella maggior parte delle proteine che partecipano più o meno direttamente nella regolazione dell'interleuchina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) [31](Figura 2).

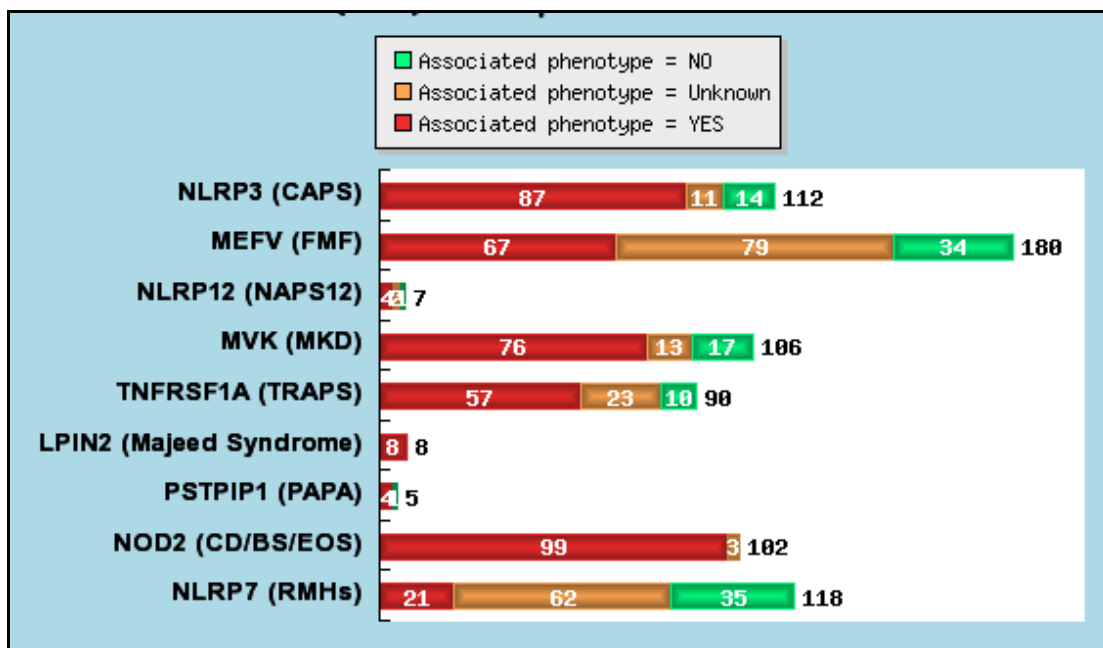


Figura 2 Distribuzione delle 728 varianti nucleotidiche contenute nel database Infervers, divise per gene. Fonte: Infervers: un database on-line per mutazioni di malattie autoinfiammatorie. Diritto d'autore. Disponibile a <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infervers/>.

Mutazioni a carico di ciascuna delle molecole coinvolte nella regolazione dell'IL-1 $\beta$  provocano un aumento o una prolungata secrezione di questa potente citochina pro-infiammatoria e pirogenica.

In base al meccanismo patogenetico coinvolto è possibile suddividere le MAIS in almeno tre gruppi:

- malattie ereditarie dovute a mutazioni nei NLRs o in proteine coinvolte nella regolazione delle citochine;
- malattie con eziologia non ben definita;
- altre condizioni che dipendono dalla contemporanea influenza di fattori genetici e ambientali.

### 1.1.2 Sintesi e secrezione di IL-1 $\beta$

L'IL-1 $\beta$  è un mediatore chiave dell'infiammazione, con un'ampia varietà di effetti a partire dall'induzione della febbre fino ad un aumento dell'adesione endoteliale dei leucociti e l'induzione di riassorbimento osseo [32].

In seguito alla stimolazione dei TLRs con prodotti microbici come LPS [33] l'IL-1 $\beta$  è sintetizzata come un precursore inattivo di 31 kDa (pro-IL1 $\beta$ ) e, per essere trasformata nella sua forma attiva di 17 kDa, deve essere tagliata dalla Caspasi 1 (nota anche come interleukin-converting enzyme). La stessa caspasi 1 è prodotta come precursore inattivo (la pro-caspasi 1) e può essere attivata in seguito alla stimolazione di proteine NOD-LRR e il successivo assemblamento dell'inflammasoma [34].

Dopo essere stata prodotta nella sua forma matura, l'IL-1 $\beta$  deve essere secreta attraverso un sistema speciale di secrezione dal momento che manca di una sequenza leader caratteristica delle proteine secrete.

La maggior parte di IL-1 $\beta$  si trova nel citosol, ma una frazione sembra essere contenuta in lisosomi [35].

Recenti studi hanno evidenziato che il rilascio di IL-1 $\beta$  è mediato dal recettore per l'ATP extracellulare P2X7, il quale controlla l'efflusso del potassio dalle cellule [33][36].

Inoltre è stato ipotizzato che il recettore P2X7 sia coinvolto nello step di maturazione da pro-IL1 $\beta$  a IL-1 $\beta$  attraverso un suo ruolo nell'attivazione finale della caspasi 1 [33].

### 1.1.3 Fisiologia della febbre

La febbre è una risposta adattativa sistemica ad uno stimolo infiammatorio e, durante l'attacco febbrile, la temperatura corporea è altamente regolata [37].

I meccanismi che regolano la febbre sono in gran parte sconosciuti, ma sembra che tutti siano dipendenti dalla PGE<sub>2</sub>: le sostanze che possono indurre la produzione di PGE<sub>2</sub> sono definite "pirogeni" e sono divise in due gruppi [38].

Il primo gruppo comprende tutte le sostanze esogene, come i componenti della parete batterica (LPS) e altri prodotti microbici, che condividono degli specifici pattern molecolari definiti PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) i quali

vengono riconosciuti da una famiglia di recettori specifici del sistema immunitario innato, i Toll-like receptors (TLRs). Esistono anche delle proteine intracellulari che sono in grado di individuare dei patogeni e indurre una risposta infiammatoria: questi includono le proteine NOD – LRR (nucleotide-binding oligomerization domain – leucine rich repeat).

Il secondo gruppo di pirogeni comprende tutte le citochine proinfiammatorie (definite pirogeni endogeni) che sono in grado di produrre un aumento della temperatura corporea molto rapido (pochi minuti). È il caso delle interleuchine IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-6 e il fattore neurotrofico ciliare [38].

La febbre è anche accompagnata da una reazione sistemica chiamata risposta della fase acuta, anch'essa indotta da citochine, e caratterizzata dalla presenza di alcune proteine come la proteina C reattiva e la proteina sierica dell'amiloide di tipo A la cui concentrazione durante l'attacco può aumentare fino a 100 – 1000 volte [39].

L'esatta funzione della maggior parte delle proteine della fase acuta non è ancora chiarita, ma ci sono numerosi ipotesi riguardo il loro coinvolgimento nella risposta immunitaria.

Gli episodi febbrili che si riscontrano nelle febbri periodiche ereditarie sono caratterizzati da una marcata risposta della fase acuta e spesso è addirittura possibile registrare un aumento della concentrazione sierica delle proteine della fase acuta anche nei periodi tra gli attacchi, quando il paziente si sente bene. Questo evento sembra indicare che la cascata infiammatoria è attivata molto più spesso di quanto il paziente riferisce e che non sempre è in grado di innescare un aumento della temperatura corporea e degli altri sintomi caratteristici [40].

## **1.2 LE “FEBBRI PERIODICHE EREDITARIE”**

Fino ad oggi sono state descritte dal punto di vista clinico almeno 8 differenti sindromi che vengono comprese nella definizione di “Febbri Periodiche Ereditarie”. Ciascuna di esse ha delle caratteristiche peculiari che possono essere distinte da un clinico esperto, tuttavia hanno in comune un fenotipo clinico di episodi ricorrenti di febbre e altri sintomi di infiammazione sistemica [6].

Gli attacchi febbrili si presentano molto spesso durante la prima infanzia (MKD), qualche volta nelle prime settimane di vita, ma possono anche manifestarsi durante l'adolescenza (FMF) o addirittura nell'età adulta (specialmente nella TRAPS).

La loro durata può variare da un giorno (FCAS) fino a settimane (TRAPS) e possono presentarsi con una frequenza di qualche giorno oppure solo una o due volte in un anno (FMF, MKD).

I sintomi che accompagnano la febbre si risolvono spontaneamente e in generale si osservano mialgia, artrite e lesioni eritematose.

Nonostante alcuni attacchi febbrili abbiano uno stimolo scontato come l'esposizione al freddo nella FCAS o una vaccinazione nella MKD, nella maggior parte dei casi l'evento scatenante della crisi febbrile rimane sconosciuto.

È stato ipotizzato che in questi pazienti la risposta infiammatoria non sia ben controllata o perché essa risulta troppo sensibile a stimoli lievi oppure perché non è spenta abbastanza rapidamente al momento giusto [40].

Di recente un numero sempre maggiore di patologie, anche non ereditarie, è stato aggiunto a questo gruppo: morbo di Crohn, gotta, m. di Behçet e s. di Schnitzler.

### **1.3 LA SINDROME DA IPER IGD O DA DEFICIT DI MEVALONATO CHINASI**

La Mevalonate Kinase Deficiency (MKD), già nota come sindrome da Iper IgD (HIDS, OMIM 260920), è stata descritta per la prima volta in Olanda nel 1984 da Van De Meer [41]. È un raro disordine infiammatorio di tipo autosomico recessivo caratterizzato da febbre ricorrente che di solito inizia entro il primo anno di vita. L'attacco febbrile si risolve in 3-7 giorni con graduale defervescenza e può essere scatenato da vaccinazioni, infezioni virali, traumi minori, interventi chirurgici o stress. L'attacco si accompagna spesso a cefalea, linfadenopatia laterocervicale, dolori addominali, epatosplenomegalia, artralgie con talvolta artrite delle grandi articolazioni, macule eritematose, papule e porpora. Durante l'eccesso febbrile nella MKD si osserva un importante incremento degli indici di flogosi [42]. Caratteristico della sindrome è un aumento della concentrazione plasmatica delle IgD (> 100 mg/L) o delle IgA; è tuttavia opportuno sottolineare che gli elevati livelli

circolanti di IgD non sono patognomonic, in quanto un incremento delle IgD può non essere osservato oppure si può osservare anche nelle altre forme genetiche di febbri ricorrenti [43].

Durante gli attacchi febbrili i pazienti hanno un incremento dell'escrezione di acido mevalonico nelle urine [44]; questo dato, unitamente alla scarsa sensibilità e specificità della determinazione delle IgD plasmatiche, ha fatto sì che alcuni autori proponessero la sostituzione del termine HIDS con quello di *febbre periodica con deficit incompleto di MK*.

La Mevalonato Chinasi (MK) è un enzima che catalizza la fosforilazione di acido mevalonico a 5-fosfomevalonato nella via metabolica del mevalonato e nella biosintesi di isoprenoidi e di colesterolo. (Figura 3)

La scoperta inattesa che questo enzima potesse essere coinvolto nella patogenesi di MKD, suggerì un nuovo ruolo per questo pathway molecolare nella regolazione della risposta infiammatoria [45].

La via metabolica degli isoprenoidi sintetizza un'ampia varietà di sostanze importanti per il funzionamento cellulare, compreso il colesterolo e i composti non sterolici isoprenici. Due catene isopreniche, la farnesilica e la geranilgeranilica, sono aggiunte ad alcune proteine come importante modifica post-traduzionale per il legame con la membrana cellulare [46,47].

Polimorfismi nella *mvk* che provocano la perdita completa dell'attività dell'enzima erano già note quali responsabili dell'Aciduria mevalonica (MVA, OMIM 251170), una rara malattia metabolica che si presenta, oltre che con le caratteristiche già elencate per la MKD, anche con grave ritardo mentale e dell'accrescimento staturo-ponderale, dismorfismi facciali e progressiva atassia dovuta a degenerazione cerebellare [44].



Reaction:  $ATP + (R)\text{-mevalonate} = ADP + (R)\text{-5-phosphomevalonate}$

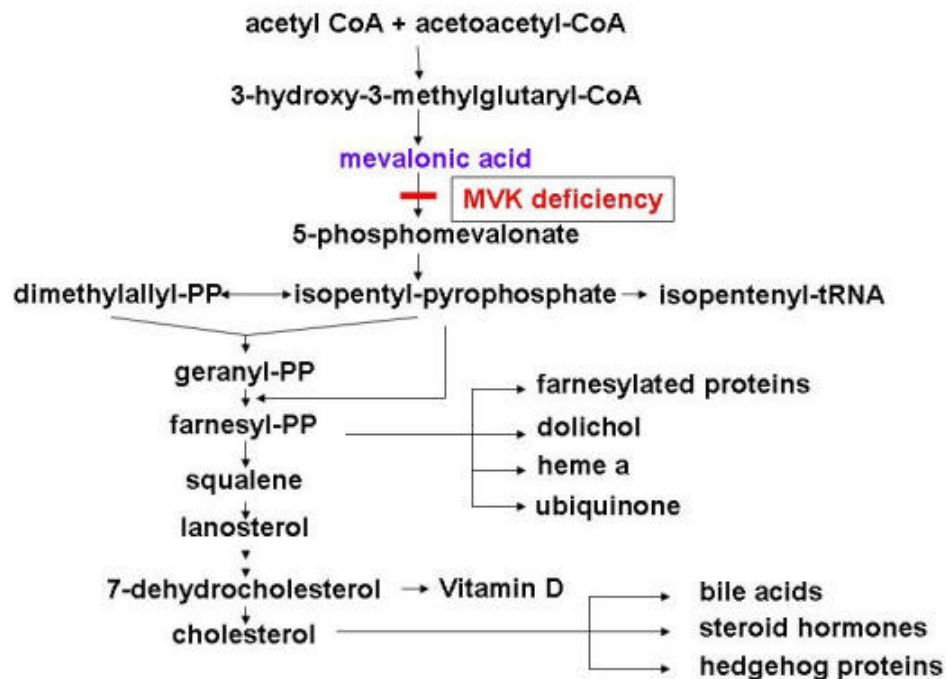
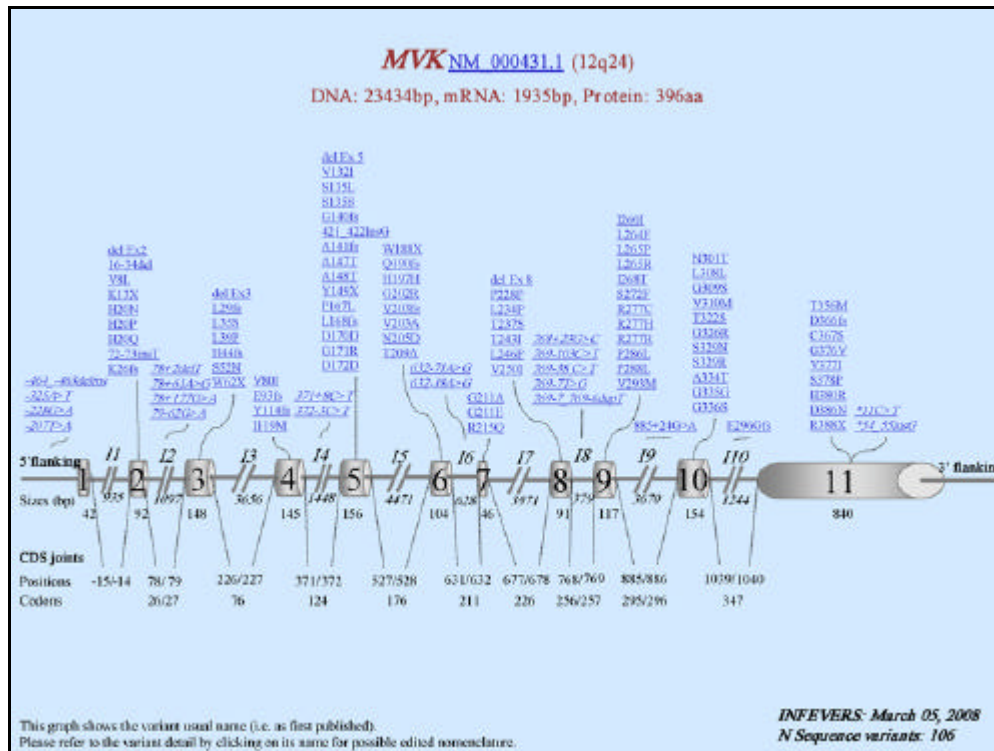


Figura 3 Via metabolica del mevalonato.

Nel 1999 il gruppo di Houten [48] e quello di Drenth [49], utilizzando rispettivamente un approccio funzionale e un mappaggio posizionale, identificarono delle mutazioni associate alla MKD in *mvk*, un gene costituito da undici esoni e mappato sul braccio lungo del cromosoma 12 (12q24). (Figura 4)

Le mutazioni del gene *mvk* finora conosciute sono state raccolte nel database INFEVERS (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers>): la maggior parte di esse sono mutazioni missense e gran parte dei pazienti è eterozigote per almeno due mutazioni diverse [50].

La mutazione prevalente è la V377I (circa l'80% dei pazienti) e causa una lieve riduzione della stabilità e dell'attività catalitica dell'enzima MK. Questa mutazione mostra un effetto fondatore nella popolazione olandese e in parte ne spiega l'elevata prevalenza [51].



**Figura 4** Grafico schematico del gene di *mvk*, completo di esoni ed introni. È rappresentata la distribuzione delle varianti di sequenza lungo tutto il gene. Fonte: Infevers: un database on-line per mutazioni di malattie autoinfiammatorie. Diritto d'autore. Disponibile a <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/>.

Le mutazioni associate alla HIDS risultano in una residua attività enzimatica, pari all'1-8% del normale [48][52][53] e, di grande interesse è stata la scoperta fatta nel 2002 dal gruppo di Houten il quale notò che l'attività dell'enzima MK diminuiva all'aumentare della temperatura, dimostrando che essa era temperatura-dipendente [53]. Pertanto è possibile ipotizzare che l'incremento della temperatura corporea secondario a episodi febbrili infettivi o stress fisico possa scatenare la crisi auto infiammatoria.

Il meccanismo patogenetico che spiega come una deficienza di MK possa causare una sindrome febbrile episodica e periodica di natura infiammatoria non è ancora noto, ma recenti studi hanno provato che gli attacchi infiammatori potrebbero essere imputabili ad una sintesi insufficiente di isoprenoidi che porta ad una attivazione della caspasi-1 nei monociti e ad un massiccio rilascio di IL-1 [54][55].

## 1.4 METODICHE PER L'ANALISI DI MUTAZIONI PUNTIFORMI NON NOTE

Negli ultimi decenni sono stati sviluppati diversi metodi per la determinazione di mutazioni puntiformi non note.

Di seguito una breve descrizione di ciascuna delle tecniche attualmente usate in ricerca e in diagnostica.

### 1.4.1 Analisi di sequenza

Per la determinazione della sequenza nucleotidica esatta di un frammento di DNA si utilizza il sistema, ideato da Sanger nel 1977, che prevede una preparazione preliminare del campione di DNA di cui si vuole ottenere la sequenza, amplificandolo tramite una reazione di Polymerase Chain Reaction (PCR).

Nella miscela di reazione utilizzata per la PCR di sequenza si inseriscono il DNA da sequenziare (corrispondente a un preciso frammento del genoma), la DNA-polimerasi con tutti i componenti necessari per la normale reazione di polimerizzazione, assieme anche a particolari nucleotidi, detti didesossinucleotidi. Analoghi alle quattro basi del DNA, i didesossinucleotidi mancano però del gruppo ossidrilico (OH) nel carbonio in posizione 3' dello scheletro di zucchero legato alla base, necessario per formare il legame con il nucleotide successivo e far procedere la neosintesi della catena di DNA. A questi dideoossinucleotidi è inoltre legato un diverso fluorocromo, ciascuno caratterizzante la base a cui è coniugato. Il rapporto di concentrazione tra i didesossinucleotidi e i normali nucleotidi è tale che l'enzima DNA-polimerasi statisticamente terminerà la catena nascente in tutte le posizioni possibili in cui un didesossinucleotide può essere inserito. La DNA-polimerasi produce cioè una serie di frammenti che condividono tutti la stessa estremità iniziale, ma ciascuno di loro risulterà sfasato di un unico nucleotide nella posizione finale (3'). Si ottiene in questo modo un insieme di molecole copiate dal filamento originario a cominciare dalla prima base, via via più lunghe di un solo nucleotide finale che risulterà fluorescente grazie alla marcatura. Alla fine della reazione, si avrà in altre parole una miscela composta da un numero di molecole di diversa lunghezza pari al numero di nucleotidi che formano il tratto del DNA che si è voluto analizzare. Ciascuno di questi frammenti, poi, non sarà solo

diversificato dal numero delle basi che lo compone, ma anche dal colore che identifica presso quale delle quattro basi si è interrotta la copiatura. I campioni così preparati vengono introdotti nel sequenziatore e qui sottoposti a un'elettroforesi capillare.

La fluorescenza dei vari frammenti di DNA marcati è rivelata man mano che questi si spostano lungo il capillare elettroforetico, che è irradiato da un raggio laser. La fluorescenza emessa è letta mediante una camera charge-coupled device (CCD) ad altissima risoluzione (50  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ) che rivela l'emissione in fluorescenza dei campioni analizzati, offrendo all'utilizzatore - in pochi minuti - l'elettroferogramma con la relativa sequenza. I sequenziatori vengono controllati attraverso specifici programmi che permettono di controllare i parametri elettroforetici e di gestire l'analisi e l'elaborazione dei dati. Questo tipo di sequenziatori automatici, in origine dotati di un unico capillare singolo, arrivano oggi ad alloggiare fino a 96 capillari per l'analisi automatica e contemporanea di migliaia di campioni al giorno.

I metodi di sequenziamento tradizionali richiedevano tempi molto lunghi, sia per la preparazione del campione, sia per la lettura dei risultati, oltre a impiegare sostanze radioattive per riuscire a rilevare la sequenza delle basi. Negli ultimi dieci anni si è assistito a una rivoluzione nel sequenziamento del DNA: i rapidi progressi nel campo della genomica e della ricerca genetica, resi possibili anche dalla stessa automazione di questa tecnica, richiedono ora macchinari sempre più potenti e veloci, ad alta produttività. Al giorno d'oggi, il mercato offre un'ampia scelta di sequenziatori automatici con relativi software di analisi dei dati e, di fatto, il sequenziamento del DNA viene effettuato per lo più con questi apparecchi dotati di sistemi ad alta sensibilità. Si riescono infatti a produrre ottimi risultati anche a partire da bassissime quantità di DNA.

#### 1.4.2 SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphisms*)

Si basa sull'alterazione della conformazione del DNA a singola elica, determinata da una sostituzione nucleotidica, che causa una diversa velocità di migrazione su gel di poliacrilammide del frammento di DNA in cui è avvenuta la mutazione. Il protocollo originario faceva uso di marcatura radioattiva, ma è stata messa a

punto una metodologia basata sul riconoscimento delle bande di migrazione tramite colorazione con argento.

Il DNA a doppia elica è denaturato con calore e formamide e raffreddato rapidamente per evitare la rinaturazione. Il DNA a singola elica assume conformazioni diverse: la migrazione su gel di poliacrilammide non denaturante sarà determinata dalla conformazione piuttosto che dalle dimensioni. Il pattern di conformazioni è sequenza-dipendente: anche una singola sostituzione nucleotidica altera la conformazione.

La SSCP è una tecnica semplice da usare e l'analisi dei dati è agevole; tuttavia è estremamente suscettibile a piccole variazioni nelle condizioni standard.

#### 1.4.3 DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)

È una tecnica basata su una migrazione elettroforetica su gel di poliacrilammide con gradiente di sostanze denaturanti (formamide e urea) di frammenti amplificati di DNA, i quali riducono la loro velocità di migrazione quando raggiungono una concentrazione di denaturante sul gel che corrisponda alla loro temperatura di fusione ( $T_m$ ); la  $T_m$  è strettamente dipendente dalla composizione nucleotidica del DNA e, quindi, la sostituzione di una coppia di basi in un segmento del DNA ne modifica il valore.

Di conseguenza, dopo corsa elettroforetica, "colorazione" con bromuro di etidio e rilevazione agli UV, si osserverà per il frammento recante la mutazione un pattern elettroforetico tanto più differente da quello normale quanto più la sostituzione nucleotidica avrà alterato la  $T_m$  del frammento stesso.

L'incorporazione tramite PCR di "GC-clamp" (sequenza di 40-90 coppie di basi ricche in GC ad altissima  $T_m$ ) ad una estremità del frammento del DNA in esame consente di individuare, usando un unico tipo di gradiente di denaturante, eventuali mutazioni situate in qualunque punto del frammento in esame, anche domini ad alta  $T_m$ ; la "GC-clamp", infatti, costituendo sempre il dominio ad alta temperatura, altera il comportamento di denaturazione del frammento cui è stata unita, rendendolo di conseguenza tutto dominio a bassa temperatura.

Il soggetto eterozigote per una mutazione o polimorfismo presenta quattro bande:

- a) 2 bande più veloci (omoduplex) → alleli normale e mutato;

b) 2 bande più lente (eteroduplex) → alleli ibridi.

#### 1.4.4 TTGE (Temporal temperature gradient electrophoresis)

E' una tecnica derivata dal DGGE; per ottenere la temperatura di fusione del frammento di DNA in esame, impiega un gradiente lineare e temporale di energia termica, anziché un gradiente di denaturante chimico.

#### 1.4.5 DHPLC (Denaturant High Performance Liquid Chromatography)

La DHPLC si basa sui principi della cromatografia liquida a scambio ionico in fase inversa (RP-IP-HPLC). La colonna è costituita di polimeri C18alkilati di polystyrene-divinylbenzene (diametro medio 2.3µm), che permette un'ottima analisi in un ampio campo di variazioni di pH (2-13) e di temperatura (40-80°C). Un reagente a legame ionico carico positivamente, il tri etil-ammonio-acetato (TEAA), permette alle molecole di DNA cariche negativamente di interagire con la matrice idrofobica della colonna. L'utilizzo di un solvente organico (acetonitrile) porta all'eluizione dei frammenti di DNA in maniera lunghezza-dipendente (condizioni non denaturanti) e/o in maniera sequenza-dipendente (condizioni denaturanti). I diversi frammenti sono identificati tramite un UV detector. Il successivo aumento dell'acetonitrile lava la colonna, rimuovendo il DNA e le varie contaminazioni rimasti sulla colonna preparandola così per la successiva analisi.

Durante l'amplificazione genica:

- 1) se il DNA non contiene mutazioni, nella fase di re-annealing si formano solo omoduplex;
- 2) nel caso in cui ci sia una mutazione in eterozigoti, oltre agli omoduplex si generano eteroduplex.

Nel caso dell'omozigote per la stessa mutazione non c'è la possibilità di formare direttamente gli eteroduplex; in tal caso si aggira l'ostacolo miscelando una quantità analoga di campione normale.

Come risultato cromatografico si avranno due situazioni (Figura 5):

- 1) il campione senza mutazione avrà un solo picco;
- 2) il campione con mutazione avrà due picchi dovuti alla formazione di omoduplex e due picchi dovuti alla formazione di eteroduplex.

La DHPLC in condizioni parzialmente denaturanti è capace di identificare singole sostituzioni nucleotidiche o piccole inserzioni/delezioni in regioni amplificate di un gene; si basa sul maggior tempo di ritenzione degli homoduplex rispetto agli eteroduplex all'interno di una miscela di DNA amplificato, denaturato e rinaturato. Necessita di buoni amplificati e di ottime condizioni di temperatura.

E' un metodo di rilevamento indiretto cui deve seguire una caratterizzazione definitiva con un metodo diretto (sequenza).

DHPLC completamente denaturante è capace di separare corte molecole (70-80 bp) di DNA a singolo filamento che differiscono per un singola base e, quindi, può essere applicata per tipizzare campioni con mutazioni/polimorfismi noti; l'unica sostituzione rilevata è C → G.

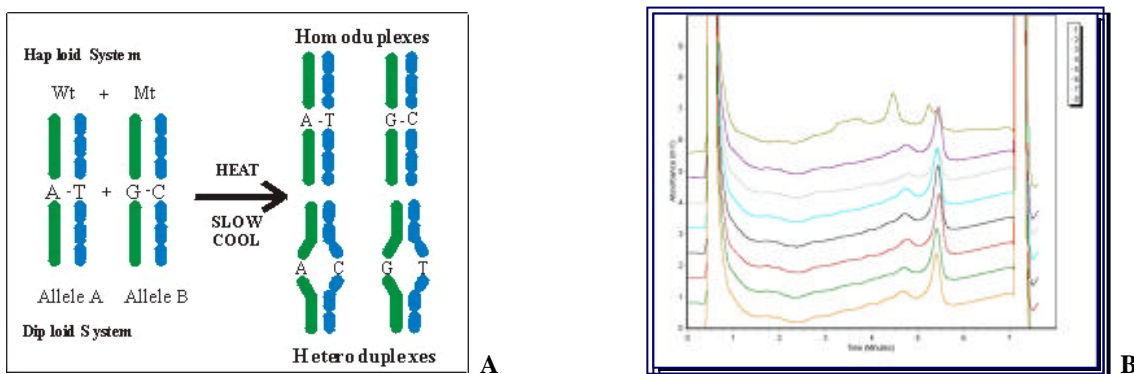


Figura 5 A. Ricombinazione dei filamenti di DNA dopo denaturazione termica, B. cromatogramma di confronto tra un campione mutato e campioni con sequenza wild type.





## 2. SCOPO DELLA TESI

La Mevalonate Kinase Deficiency (MKD), già nota come sindrome da Iper IgD (HIDS), è una rara malattia autoinfiammatoria di tipo autosomico recessivo caratterizzata da febbre ricorrente e disturbi muscoloscheletrici.

Nel 1999 il gruppo di Houten e quello di Drenth, identificarono delle mutazioni associate alla MKD in *mvk*, un gene costituito da undici esoni e mappato sul braccio lungo del cromosoma 12 (12q24), il quale codifica per l'enzima mevalonato chinasi (MK).

L'individuazione della mutazione genica nella mevalonato chinasi ha reso l'indagine genetica indispensabile per la diagnosi, soprattutto in pazienti con valori sierici di IgD normali, tuttavia il sequenziamento dell'intera regione codificante è costoso.

La determinazione di mutazioni può essere resa più efficiente utilizzando tecniche di screening in grado di identificare l'esone mutato.

In questo studio è stata valutata l'utilità della tecnica DHPLC per identificare alterazioni del gene *mvk* per la diagnosi di deficit di mevalonato chinasi in pazienti con febbri periodiche di sospetta natura autoinfiammatoria.



## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 PAZIENTI**

A partire da gennaio 2007 sono stati presi in esame 10 soggetti di controllo sani e 19 pazienti ( 12 donne, 7 uomini) di età compresa tra i 13 e i 61 anni giunti all'osservazione presso la Cattedra e UOC di Reumatologia dell'Università di Padova con caratteristiche cliniche di febbri ricorrenti di origine sconosciuta e con un quadro compatibile con una sindrome da deficit dell'enzima MK o ad altra MAIS. (Tabella 2)

Diciotto pazienti erano di origine italiana mentre 1 paziente (6) era di nazionalità albanese; 1 paziente (4) era figlio di consanguinei (i genitori erano secondi cugini). Il primo attacco febbrile è stato normalmente registrato intorno ai 10-15 anni per quasi tutti i pazienti. Solo nel paziente 15 il primo attacco febbrile è stato registrato e documentato con un ricovero, all'età di 5 anni. In tale occasione gli era stata diagnosticata la m. di Still, il paziente 6 aveva una diagnosi differenziale con m. di Behçet.

Gli attacchi febbrili avevano una durata di circa 3 giorni con una cadenza mensile; nella fase intercritica le condizioni generali dei pazienti erano buone.

Le caratteristiche cliniche di ciascun paziente sono riportate in tabella 2.

Tutti i pazienti hanno letto e sottoscritto il consenso informato per l'esecuzione del prelievo e per l'analisi genetica.

Da ogni paziente e da ogni soggetto sano sono stati prelevati 9 mL di sangue periferico, raccolto in provette contenenti EDTA.

**Tabella 2 Caratteristiche cliniche dei pazienti**

Paziente	Età	Sesso	Origine	Sintomatologia e clinica	Diagnosi differenziale
1	18	F	Italia	Febbre ricorrente, mialgie	
2	19	M	Italia	Febbre ricorrente, mialgie, artralgie, linfadenopatia laterocervicale,	
3	13	F	Italia	Febbre ricorrente, cefalea, dolori addominali	
4	33	F	Italia	Febbre ricorrente, mialgie, artralgie, linfadenopatia laterocervicale, dolore addominale ?	
5	13	F	Italia	Febbre ricorrente, deficit motorio, artralgie	
6	37	M	Albania	Febbre ricorrente, diarrea, mialgie, artralgie, splenomegalia	M. di Behçet
7	33	F	Italia	Febbre ricorrente	
8	61	F	Italia	Febbre ricorrente, eritema, artralgie, mialgie	
9	50	F	Italia	Febbre ricorrente	
10	52	F	Italia	Febbre ricorrente, mialgie, artralgie	
11	14	F	Italia	Febbre ricorrente, astenia, mialgie, dolori addominali, cefalea	
12	28	M	Italia	Febbre ricorrente, linfadenopatia laterocervicale, artralgie.	
13	24	F	Italia	Febbre ricorrente, astenia, artralgie	
14	19	M	Italia	Febbre ricorrente, mialgie, artralgie	
15	20	M	Italia	Febbre ricorrente, miocardio-pericardite, rash maculare ?	M. di Still
16	18	M	Italia	Febbre ricorrente, mialgie, artralgie, linfadenopatia laterocervicale	
17	37	F	Italia	Febbre ricorrente	
18	25	F	Italia	Febbre ricorrente, rash cutaneo	
19	38	M	Italia	Febbre ricorrente, artralgie, mialgie, rash cutaneo,	

? A completamento di quanto riportato in tabella si segnala IgA pari a 4,39 g/L, IgE, 1086 KU/L.

? A completamento di quanto riportato in tabella si segnala IgA > 4 g/L

### 3.2 DOSAGGIO DELLE IGD NEL SIERO

Le immunoglobuline di tipo D (IgD) sono state dosate nel siero di ciascun paziente attraverso un metodo nefelometrico (Dade Behring Marburg, Marburg, Germany) che sfrutta la capacità delle proteine contenute nel siero di formare complessi immuni, in una reazione immunochimica, con anticorpi specifici. Tali complessi

deviano un raggio luminoso passante attraverso il campione e, l'entità della deviazione della luce è proporzionale alla concentrazione della proteina ricercata nel campione. Il risultato viene valutato per confronto con uno standard a concentrazione nota.

### 3.3 ESTRAZIONE E AMPLIFICAZIONE DEL DNA

Il DNA è stato estratto dai leucociti utilizzando il kit commerciale QIAMP DNA-blood midi kit (QIAGEN, Hilden, Germany) e successivamente è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica a 260 nm.

Dai campioni di DNA sono state preparate delle aliquote con una concentrazione pari a 100 ng/μL.

A partire dal DNA estratto sono state amplificate le sequenze dei 10 esoni codificanti del gene *mvk*, utilizzando primer disegnati nel nostro laboratorio e specifici per ciascun esone. ( Tabella 3 )

La reazione di amplificazione è stata effettuata utilizzando 100 ng di DNA genomico, 25 pmoli di ciascun primer, 5 mM di dNTPs, Buffer 1x (Applied Biosystems, USA), 25 mM di MgCl<sub>2</sub>, e 2,5 U di Taq polimerasi (Ampli Taq Gold, Applied Biosystems, USA).

Il protocollo prevede un'iniziale denaturazione a 94°C per 7 minuti, di seguito 15 cicli "touchdown" a 94°C per 30 secondi, 68°C per 30 secondi, 72°C per 45 secondi, 27 cicli a 94°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 1 minuto, e infine uno step di estensione a 72°C per 7 minuti.

Nella PCR touchdown la temperatura di annealing viene progressivamente abbassata in modo che l'annealing dei primer, nei primi cicli di amplificazione, garantisca una migliore specificità. Successivamente l'abbassamento di temperatura permette di aumentare la resa.

Per l'amplificazione dell'esone 9 è stato seguito lo stesso protocollo con l'aggiunta di DMSO al 7% nella reazione di amplificazione per ridurre la formazione di aspecifici.

**Tabella 3. Sequenze dei primer disegnati per amplificare i 10 esoni codificanti del gene *mvk*. La percentuale di aceto nitrile è stata calcolata tenendo conto del fatto che il sistema DHPLC lavora con un gradiente lineare di aceto nitrile del 3% al minuto.**

Esone	Primer	Amplificato PCR (paia di basi)	Temperatura di analisi in DHPLC (°C)	Gradiente di Acetonitrile (Inizio - Fine)
2	2F 5'-tcttctgctggttctgaca-3' 2R 5'-tgcctcagggtgtccttta-3'	239	58.5 60.5	13.65 – 15.9 13.15 – 15.4
3	3 F 5'-tcaccctcaggcttattgct-3' 3 R 5'-tggttctcctccttgact-3'	210	59.3 61.3	12.18 – 15.07 12.18 – 15.07
4	4F 5'-ccctctcaccactgtgt-3' 4R 5'-atctggactcctccccaga-3'	219	61.7 63	3.92 – 16.17 13.42 – 15.67
5	5F 5'- cgggagagtcacgttc ac-3' 5R 5'- gacactggccaggaaggac -3'	221	63.1 65.3	13.95 – 16.2 12.95 – 15.2
6	6F 5'-ccactcctcactgccacag-3' 6R 5'-tgattcgattcctccaaac -3'	250	58.5 60	13.25 – 15.5 13.25 – 15.5
7	7F 5'- gaaccaacccaaagttcaa-3' 7R 5'- cctgcctcctatggtactcc-3'	231	59.8	13.05 – 15.3
8	8F 5'- ccagctcctccatctgagt-3' 8R 5'- gagggagacctgaaaatcc-3'	221	61.2 63.2	13.45 – 15.7 12.95 – 15.2
9	9F 5'- ctcaccagccgttcctct -3' 9R 5'- ttctgagcacagccagattg -3'	233	62.8 63.5	13.07 – 15.32 13.07 – 15.32
10	10F 5'-ccaagtgggaacagatggaa-3' 10R 5'-ctccaggtggaccctcta-3'	249	61.5 65	14.25 – 16.5 13.25 – 15.5
11	11F 5'- agagttgtcaagggtagctg-3' 11R 5'- cagccccagaataatccaga-3'	249	65	13.75 - 16

Tutti i prodotti di PCR sono stati visualizzati su gel d'agarosio contenente il 2% di NuSieve® GTG® (Cambrex Bioscience Rockland, Rockland, ME, USA) e l'1% di Seakem® GTG® (Cambrex Bioscience Rockland) in buffer TAE (Tris-Acetato 40 mM ed EDTA 0.1 mM pH 8.0) per escludere la presenza di contaminazioni nelle miscele di reazione.

### 3.4 ANALISI MEDIANTE DHPLC

Le sequenze amplificate sono state analizzate utilizzando il sistema Wave® 2100 Fragment Analysis (Transgenomic, Omaha, NE, USA).

Per evidenziare eventuali mutazioni in eterozigosi o in omozigosi, l'amplificato di ciascun paziente viene miscelato con il DNA di un controllo di sequenza "wild type" in un rapporto di 1:1 (15 µl amplificato paziente + 15 µl amplificato controllo). Gli etero duplex interagiscono con una minor avidità rispetto agli omoduplex alla fase stazionaria della colonna cromatografica del sistema Wave® e quindi vengono eluiti con un tempo di ritenzione inferiore in gradiente di aceto nitrile. La differenza nel tempo di ritenzione è esaltata in condizioni di parziale denaturazione termica.

La temperatura di analisi (che rimane costante) corrisponde a quella alla quale la doppia elica è denaturata per il 50-70% e viene calcolata con il Navigator Software (versione 1.7.0)

Con questo programma è possibile studiare le sequenze nucleotidiche del DNA amplificato e calcolare a quale temperatura si ottiene una parziale denaturazione della doppia elica, in modo tale da poter differenziare gli omoduplex dagli etero duplex.

La sensibilità nell'individuare polimorfismi è prossima al 100% se l'amplificato non supera le 600 bp ed è composto da un unico "dominio termico".

Nel caso in cui all'interno della sequenza fossero presenti dei domini con diverso contenuto GC e quindi con diverse temperature di melting, sarà necessario scegliere più di una temperatura di analisi in modo da ottenere diversi gradi di denaturazione del DNA.

A questo punto la piastra può essere posizionata direttamente sull'autocampionatore del sistema che provvede a prelevare 10 µl di amplificato PCR e ad iniettarlo nel sistema DHPLC.

I profili DHPLC ottenuti sono stati analizzati e conservati in un database.

### **3.5 DETERMINAZIONE DELLE SEQUENZE DI DNA**

La reazione di sequenza è stata eseguita in 20 µl di volume finale, utilizzando 1 µl di DNA amplificato e precedentemente purificato con filtri a cut off molecolare Microcon (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Nella mix per il sequenziamento si aggiungono 3.2 pmoli di primer, 8 µl di Big Dye terminator Mix (kit ABI PRISM BigDye Terminator v1.1, APPLIED BIOSYSTEM) contenente, oltre

alla polimerasi, dNTPs e ddNTPs (2'-3' dideoossiribonucleotidi trifosfato) ad ognuno dei quali è legato un fluorocromo diverso. Questi ultimi, mancando del gruppo ossidrilico al 3', bloccano l'estensione dei frammenti; i frammenti che si ottengono sono di diversa lunghezza a seconda dell'istante in cui viene inserito il ddNTP. La reazione consiste di 25 cicli di denaturazione a 96°C per 10 secondi, appaiamento a 50°C per 5 secondi, estensione a 60°C per 4 minuti, in un i-Cycler (BIORAD).

I prodotti marcati sono stati successivamente purificati utilizzando il sistema DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) e i DNA recuperati sono stati risospesi in formamide (diluizione DNA : Formamide = 1:4), denaturati a 95°C per 2 minuti e caricati nel sequenziatore.

L'elettroforesi di prodotti marcati è stata ottenuta mediante un sequenziatore automatico ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEM).

Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati mediante il programma Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd) e le sequenze sono state allineate con il programma BLAST disponibile sul sito <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.



---

## 4. RISULTATI

### 4.1 ANALISI DI POLIMORFISMI MEDIANTE DHPLC E SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

Nessuno dei 10 campioni di controllo presentava alterazioni dei profili DHPLC e il sequenziamento del gene *mvk* nei controlli sani non ha mostrato alterazioni rispetto alla sequenza wild-type disponibile in genebank (NM\_000431)

12 dei 19 pazienti esaminati presentavano almeno un profilo di DHPLC alterato.

In particolare, 10 pazienti presentavano un profilo compatibile con una mutazione in eterozigosi, mentre 2 pazienti sono risultati omozigoti rispetto al campione di controllo con sequenza wild type.

I dati ottenuti in DHPLC sono stati confermati con il sequenziamento. (Figura da 6 a 11 – APPENDICE)

Durante l'analisi del gene *mvk* è stato possibile evidenziare un totale di 6 differenti polimorfismi, in particolare negli esoni 3 e 5 e negli introni 2, 6 e 9.

La tabella 4 riporta nel dettaglio il tipo di polimorfismo individuato, la posizione, l'eventuale variazione aminoacidica e se la variazione è stata evidenziata in eterozigosi o in omozigosi.

Tabella 4 Caratteristiche genetiche e valori di IgD dei 19 pazienti esaminati

Paziente	Polimorfismi nel gene <i>mvk</i>	Sostituzione aminoacidica	Esone / Introne	IgD
1	assenti		-----	418 mg/L
2	c.155G>A, omozigosi	S52N	3	< 100 mg/L
3	assenti		-----	< 100 mg/L
4	c.510 C>T, omozigosi c.632-18A>G, omozigosi	D170D	5 IVS6	< 100 mg/L
5	c.510 C>T, eterozigosi c.632-18A>G, eterozigosi	D170D	5 IVS6	< 100 mg/L
6	c.78+61 A>G, eterozigosi c.510 C>T, eterozigosi c.632-18A>G, eterozigosi c.885+24G>A, eterozigosi	D170D	IVS2 5 IVS6 IVS9	< 100 mg/L
7	assenti		-----	< 100 mg/L
8	assenti		-----	< 100 mg/L
9	assenti		-----	< 100 mg/L
10	c.510 C>T, eterozigosi c.632-18A>G, eterozigosi	D170D	5 IVS6	224 mg/L
11	c.78+61 A>G, eterozigosi		IVS2	104 mg/L
12	c.510 C>T, eterozigosi c.632-18A>G, eterozigosi	D170D	5 IVS6	103 mg/L
13	c.155G>A, eterozigosi c.405 G>A, eterozigosi	S52N S135S	3 5	< 100 mg/L
14	assenti		-----	< 100 mg/L
15	c.155G>A, eterozigosi	S52N	3	< 100 mg/L
16	c.405 G>A, eterozigosi	S135S	5	< 100 mg/L
17	c.510 C>T, eterozigosi c.632-18A>G, eterozigosi c.885+24G>A, eterozigosi	D170D	5 IV6 IVS9	< 100 mg/L
18	assenti		-----	221 mg/L
19	c.78+61 A>G, eterozigosi c.510 C>T, eterozigosi c.632-18A>G, eterozigosi c.885+24G>A, eterozigosi	D170D	IVS2 5 IVS6 IVS9	< 100 mg/L

## 4.2 VALORI DI IGD NEL SIERO E CORRELAZIONE CON I POLIMORFISMI DEL GENE MVK

In questo lavoro è stato considerato elevato un livello di IgD che superasse i 100 mg/L nel siero e, nessuno dei controlli sani superava tale valore.

I valori sierici di IgD erano normali (<100 mg/L) in 14 dei 19 pazienti mentre nei rimanenti 5 erano aumentati. In particolare, 1 di questi aveva anche un aumento di IgA (> 400 mg/L) (paziente 10).

In 2 pazienti (4 e 15) è stato registrato un aumento di IgA con IgD normali e in 12 pazienti i valori di IgD e IgA sono risultati nella norma.

La tabella 4 riporta il valore di IgD riscontrato in ogni paziente. La tabella 5 riassume il confronto tra le concentrazioni di IgD nel siero e la presenza di polimorfismi nel gene *mvk*.

**Tabella 5** Concentrazioni di IgD nel siero confrontate con la presenza di polimorfismi nel gene *mvk*. MKD +, presenza di polimorfismi in *mvk*; MKD-, assenza di polimorfismi in *mvk*

	MKD +	MKD -	Totale
IgD > 100 mg/L	3	2	5
IgD < 100 mg/L	9	5	14
Totale	12	7	19

## 4.3 VALUTAZIONE COSTO - EFFICACIA DELL'ANALISI IN DHPLC

Per confrontare le tecniche utilizzate, sono stati valutati anche i costi, intesi come reagenti utilizzati, e il tempo necessario per l'esecuzione dello screening e l'analisi dei dati.

Il confronto è basato sull'analisi dei 10 esoni codificanti del gene *mvk*.

Con la DHPLC sono stati spesi circa 40 euro per paziente con una spesa media di 0.5 euro per iniezione in colonna. Per effettuare la corsa elettroforetica con il sequenziatore automatico si spendono in media 150 euro per paziente e 5 euro per singola corsa.

Il tempo necessario per l'esecuzione di una singola analisi in DHPLC è di 7 minuti contro i 50 minuti per il sequenziatore, per un totale di 10 ore (screening e analisi dei dati) con la DHPLC e 25 ore con il sequenziatore automatico per paziente.

Nella somma totale dei costi e dei tempi necessari per l'analisi delle mutazioni con DHPLC e Sequenziatore non sono compresi i reagenti e il tempo necessari per l'estrazione e l'amplificazione del DNA, dal momento che essi sono due passaggi in comune tra le due tecniche e che quindi comportano la stessa spesa.

I dati sono riassunti in tabella 6.

**Tabella 6 Confronto dei costi e del tempo di analisi con DHPLC e Sequenziatore automatico**

	COSTO ANALISI (solo reagenti)	TEMPO ANALISI
DHPLC	0,5 euro / iniezione	7 minuti / iniezione
	40 euro / paziente	10 ore / paziente
Sequenziamento	5 euro / iniezione	50 minuti / iniezione
	150 euro / paziente	25 ore / paziente

## 5. DISCUSSIONE

Il completamento della sequenza del genoma umano rappresenta un evento destinato a produrre conseguenze importanti sulla medicina e, in generale, sulla salute degli individui. Attualmente il prodotto principale della genetica è costituito dai test genetici, il cui utilizzo ha ricadute applicative in medicina, sia in termini di conoscenze biologiche, che nella diagnosi e prevenzione delle malattie.

Le malattie autoinfiammatorie sistemiche sono un gruppo di affezioni caratterizzate da episodi febbrili recidivanti a carico di vari organi o apparati, in particolare articolazioni e cute

L'eziopatogenesi di tali patologie è riconducibile ad anomalie della risposta immunitaria innata indotta dalla forte componente genetica: tra il 1997 e il 2002 per ciascuna delle più importanti MAIS è stato individuato il gene corrispondente.

Polimorfismi di sequenza responsabili della malattia sono stati ritrovati nella febbre mediterranea familiare (FMF), nella mevalonate kinase deficiency (MKD) già nota come sindrome da iper-IgD (HIDS) e nella sindrome associata al fattore di necrosi tumorale (TRAPS); più recentemente nella Familial Cold Autoinflammatory Syndrome (FCAS), nella Muckle-Wells syndrome (MWS) e nella Chronic Infantile Neurological, Cutaneous, Articular (CINCA). Queste ultime tre patologie sono note anche con la definizione di "criopirinopatie" in quanto sono determinate da mutazioni che alterano la funzione del complesso denominato "inflammosoma".

Tra queste la MKD è dovuta a mutazioni nel gene *mvk* che codifica per l'enzima mevalonato chinasi e, fino a poco tempo fa, era nota con il nome di sindrome da Iper IgD in quanto la maggior parte dei pazienti aveva una concentrazione elevata di IgD nel siero.

Per ciascun paziente della nostra casistica è stato quindi effettuato il dosaggio di IgD: solo 3 dei pazienti con polimorfismi nel gene *mvk* avevano IgD elevate e due pazienti con IgD aumentate non avevano variazioni di sequenza: i nostri dati sono compatibili con quanto già riportato in letteratura, dimostrando che un elevato livello sierico di IgD non rappresenta più un marker per fare diagnosi di MKD.

La scoperta della natura genetica delle MAIS e i successivi studi fatti per chiarire la struttura genomica dei geni coinvolti hanno conferito una crescente importanza all'analisi molecolare intesa come sequenziamento delle regioni codificanti in funzione della ricerca di mutazioni [56].

Tuttavia l'analisi della sequenza dell'intera regione codificante è costosa e richiede molto tempo: la determinazione di mutazioni attraverso il sequenziamento può essere resa più efficiente utilizzando tecniche di screening in grado di identificare l'esone mutato. In particolare nella nostra struttura, oltre ad un sequenziatore automatico, è in uso uno strumento di analisi degli eteroduplex mediante Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). Questa tecnica, in condizioni di parziale denaturazione termica, permette di discriminare all'interno di prodotti di PCR, molecole di DNA eteroduplex rispetto alle molecole omoduplex. In questo lavoro è stato messo a punto un protocollo per l'analisi di polimorfismi non noti, utilizzando la DHPLC per evidenziare la presenza di alterazioni di sequenza nel DNA di 19 pazienti con febbri ricorrenti e una sintomatologia compatibile con una sindrome auto infiammatoria.

In particolare si è deciso di analizzare il gene *mvk*, le cui mutazioni inducono una diminuzione dell'attività enzimatica della mevalonato chinasi e predispongono alla sindrome da deficit di mevalonato chinasi.

Le condizioni sperimentali per l'amplificazione degli esoni del gene *mvk* per l'analisi con DHPLC e con sequenziatore automatico sono state messe a punto utilizzando controlli sani. Per l'esone 9 abbiamo aggiunto una quantità pari al 7% di DMSO per ridurre la formazione di prodotti aspecifici.

Tutti i controlli sono risultati portatori di un genotipo identico alla sequenza wild type presente in genebank (NM\_000431) e analogamente non presentavano profili DHPLC tipici di mutazioni in omozigosi o eterozigosi. La tecnica DHPLC ha quindi una specificità del 100%.

In 12 pazienti è stato rilevato almeno un cromatogramma con picchi di eluizione diversi rispetto al controllo sano e, con il sequenziamento diretto sono stati identificati dei polimorfismi esattamente in corrispondenza dell'esone che appariva mutato in DHPLC.

Sono state così identificate le mutazioni c.78+61A>G (pz 6-11-19), S52N (paziente 2-13-15), S135S (paziente 13-16), D170D e c.632-18A>G (paziente 4-5-6-10-12-17-19), c.885+24G>A (pz 6-19) già descritte in letteratura e nel database INFEVERS (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers>).

I polimorfismi erano principalmente negli esoni 3-5 e nelle regioni corrispondenti agli introni 2, 6 e 8.

È interessante notare che nella nostra casistica tutti i pazienti portatori della mutazione nell'esone 5 (c.510 C>T, D170D) presentavano anche la c.632-18A>G in corrispondenza dell'introne 6.

Inoltre la paziente figlia di consanguinei è risultata omozigote per entrambe le mutazioni e, fenotipicamente, presenta un quadro clinico molto più grave rispetto agli altri pazienti valutati. In questa paziente è stato registrato anche un aumento di IgA e IgE, mentre le IgD erano normali.

I pazienti eterozigoti per D170D e c.632-18A>G hanno caratteristiche cliniche compatibili con una forma lieve di MKD.

Nel 2005 D'Osualdo descrisse la prima casistica italiana di MKD [57] e, tra le mutazioni descritte, trovò che la variante allelica c.632-18A>G aveva una frequenza maggiore nella popolazione con sospetta MKD rispetto ad una popolazione di controllo sana, concludendo che questo polimorfismo potrebbe avere in parte un effetto diretto sullo splicing dell'introne 6 e sulla maturazione del trascritto, e in parte potrebbe essere in linkage disequilibrium con un altro polimorfismo che potrebbe indurre di per se stesso una leggera diminuzione nell'attività di MK, predisponendo quindi ad un fenotipo tipico di una sindrome auto infiammatoria.

Per l'analisi di linkage disequilibrium è stata esaminata la madre del paziente 5 (eterozigote per D170D e c.632-18A>G) e dall'analisi è risultata essere portatore di sequenza wt. Rimangono da analizzare i familiari più prossimi degli altri pazienti, ma al momento nessuno si è reso disponibile.

Secondo quanto riportato in INFEVERS nessuno dei polimorfismi da noi individuati risulta associato, singolarmente, ad un fenotipo tipico di MKD, in parte perché alcuni di essi (S135S, c.78+61A>G) si possono ritrovare anche in una popolazione di controllo.

In letteratura esistono diversi tentativi di studio dell'influenza di mutazioni di *mvk* sull'attività enzimatica di MK [52], soprattutto in relazione all'ipotesi patogenetica secondo la quale la MKD sia dovuta ad un deficit di produzione di isoprenoidi [54]; d'altra parte sono pochi gli studi mirati a definire il rapporto genotipo-fenotipo in pazienti eterozigoti composti per due varianti alleliche di *mvk*. Secondo la Dott.ssa Konè-Paut sono sufficienti 2 polimorfismi di sequenza in eterozigosi per definire la diagnosi di MKD. È necessario però fare una distinzione fra i polimorfismi che possono indurre una forma grave di MKD.

Alcuni cambiano completamente un aminoacido e le sue caratteristiche chimico-fisiche, con una ricaduta importante sulla struttura della proteina MK e quindi sull'attività enzimatica; altri polimorfismi sono responsabili di una forma più lieve di MKD perché alterano la maturazione del trascritto oppure modificano leggermente la stabilità dell'enzima. In determinate circostanze (stress fisico, vaccinazioni) si registra una diminuzione di attività enzimatica con una risposta infiammatoria accentuata. A questo proposito sarebbe interessante valutare se in soggetti con genotipo wt e in individui portatori di almeno due polimorfismi in eterozigosi in *mvk*, la risposta infiammatoria ad uno stimolo comune possa essere diversa e, quindi, sarebbe interessante studiare se tali polimorfismi possono predisporre allo sviluppo, anche nell'età adulta, di sindromi autoinfiammatorie. Inoltre sarebbe interessante avere una popolazione di controllo affetta da febbri ricorrenti di altra natura ad esempio infettiva o autoimmune.

Per caratterizzare le mutazioni D170D e c.632-18A>G abbiamo deciso di studiare l'attività enzimatica di MK, attraverso la misurazione del rilascio di IL-1 $\beta$  da parte di cellule (PBMC) prelevate da sangue periferico di un paziente omozigote e di uno eterozigote per D170D e c.632-18A>G. Non è stato ancora possibile procedere con gli esperimenti perché l'unico paziente omozigote era in gravidanza e presentava una forte anemia.

Nessuno dei pazienti analizzati presentava la sostituzione di una adenina con una guanina in posizione 1129 (c.1129G>A), che comporta la sostituzione di una valina con una isoleucina in corrispondenza del codone 377 (V377I): è possibile spiegare questo dato con il fatto che questa mutazione è prevalente soprattutto



nella popolazione olandese e che in parte sembra essere la causa dell'insorgenza della malattia in età pediatrica.

Di recente è stato pubblicato un articolo [58] nel quale si descrive una casistica di pazienti affetti da m. di Behçet nei quali sono state ricercate mutazioni nei geni correlati con altre sindromi auto infiammatorie (MKD, TRAPS, FMF). Non è stato possibile associare la m. di Behçet con un gene in particolare, però è stata ipotizzata una possibile sovrapposizione con la MKD, data l'elevata frequenza di polimorfismi in *mvk* rispetto ai geni *mefv* e *tnfrsf1A*.

Nella nostra casistica il paziente 6, di origine albanese, era affetto da m. di Behçet: in questo caso abbiamo ottenuto un riscontro con quanto riportato in letteratura perchè il paziente presentava ben 4 polimorfismi in *mvk* e in particolare era eterozigote per D170D e c.632-18A>G.

Interessante è notare che un altro paziente (n.19) è risultato portatore degli stessi polimorfismi del paziente 6 ed aveva una diagnosi differenziale con FMF. Siamo ancora in attesa di risposta per quanto riguarda l'indagine di mutazioni in *mefv* e il quadro clinico del paziente, che è in terapia con colchicina, è attualmente ben controllato.

Un indice di laboratorio utile per definire la diagnosi di MKD è l'aumento della concentrazione di acido mevalonico nelle urine durante le crisi febbrili: tale dato non è stato acquisito in quanto tutti i pazienti che abbiamo analizzato sono giunti alla nostra osservazione nel periodo di assenza di febbre.

La DHPLC è risultata essere una tecnica sensibile e specifica in grado di rilevare variazioni di sequenza rispetto al controllo ed è già stata utilizzata per analizzare variazioni di sequenza in altri geni patologici come ad esempio CFTR (cystic fibrosis trans membrane conductance regulator gene), BRCA1 e BRCA2 [59-61].

In questi casi la DHPLC è risultata più sensibile nell'identificare mutazioni rispetto ad altre tecniche di analisi indiretta (DGGE, SSCP) ed ha dimostrato una sensibilità tra il 95 e il 98% rispetto al sequenziamento diretto.

Va quindi sottolineato che eventuali pazienti che risultassero negativi all'analisi DHPLC ma con una clinica suggestiva di alterazioni al gene *mvk* devono essere rivalutati e, per loro, va effettuato comunque il sequenziamento dell'intera sequenza e/o l'approfondimento di altri geni.

Se si confrontano i costi per l'analisi in DHPLC e con sequenziatore automatico si nota che, se le spese iniziali di strumentazione sono simili, i costi di utilizzo e manutenzione sono nettamente inferiore nella DHPLC. Pertanto questa tecnica è in grado di effettuare un'analisi rapida e a basso costo di mutazioni genomiche.

Lo screening di pazienti con sospetta sindrome auto infiammatoria mediante DHPLC ha permesso di dare un contributo alla diagnosi genetica.

Rimane da approfondire lo studio delle correlazioni tra genotipo e fenotipo in quanto rappresentano la premessa per avviare studi intesi a stabilire la storia naturale, la patogenesi e le strategie di trattamento di tali forme autoinfiammatorie sistemiche.

## 6. CONCLUSIONI

Un elevato livello sierico di IgD non rappresenta più un marker per fare diagnosi di MKD, come già riportato in letteratura.

La DHPLC è una tecnica capace di effettuare uno screening rapido e a basso costo nell'analisi di polimorfismi rendendo estremamente efficiente l'analisi di pazienti con sospetta sindrome autoinfiammatoria.

Tuttavia, essendo una tecnica di analisi indiretta, è necessario considerare che la DHPLC non consente di definire con precisione la posizione e il tipo di polimorfismo, rendendo necessario il sequenziamento.

Dodici pazienti della nostra coorte presentavano almeno un polimorfismo di sequenza.

In particolare sette pazienti sono risultati portatori delle varianti alleliche D170D e c.632-18A>G; tale evento suggerisce che questi SNP potrebbero essere in linkage disequilibrium e che tali mutazioni potrebbero indurre una diminuzione nell'attività della MK predisponendo quindi alla MKD.



## **7. BIBLIOGRAFIA**

1. Heberden W. Commentaries on History and Care of Disease. London: T. Payne, 1802: 151.
2. Hull KM, Shoham N, Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. The expanding spectrum of systemic autoinflammatory disorders and their rheumatic manifestations. *Current opinion in rheumatology* 2003 Jan;15(1):61-69.
3. Touitou I, Kone-Paut I. Autoinflammatory diseases. *Best practice & research. Clinical rheumatology* 2008 Oct;22(5):811-829.
4. 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 Apr 2;97(1):133-144.
5. Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *The New England journal of medicine* 2001 Dec 13;345(24):1748-1757.
6. Galeazzi M, Gasbarrini G, Ghirardello A, Grandemange S, Hoffman HM, Manna R, et al. Autoinflammatory syndromes. *Clinical and experimental rheumatology* 2006 Jan-Feb;24(1 Suppl 40):S79-85.
7. McDermott MF, Aksentijevich I. The autoinflammatory syndromes. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 2002 Dec;2(6):511-516.
8. Stankovic K, Grateau G. Auto inflammatory syndromes: Diagnosis and treatment. *Joint Bone Spine*, 2007 12;74(6):544-550.
9. Ryan JG, Kastner DL. Fevers, genes, and innate immunity. *Current topics in microbiology and immunology* 2008;321:169-184.

10. Bodar EJ, Drenth JP, van der Meer JW, Simon A. Dysregulation of innate immunity: hereditary periodic fever syndromes. *British journal of haematology* 2009 Feb;144(3):279-302.
11. Miceli-Richard C, Lesage S, Rybojad M, Prieur AM, Manouvrier-Hanu S, Hafner R, et al. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nature genetics* 2001 Sep;29(1):19-20.
12. van Duist MM, Albrecht M, Podswiadek M, Giachino D, Lengauer T, Punzi L, et al. A new CARD15 mutation in Blau syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* 2005 Jun;13(6):742-747.
13. Touitou I. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *European journal of human genetics : EJHG* 2001 Jul;9(7):473-483.
14. 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. *American Journal of Human Genetics* 2001 Aug;69(2):301-314.
15. Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, O'Shea JJ, Kastner DL. TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Current opinion in immunology* 2000 Aug;12(4):479-486.
16. Hull KM, Drewe E, Aksentijevich I, Singh HK, Wong K, McDermott EM, et al. The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine* 2002 Sep;81(5):349-368.
17. Aksentijevich I, Nowak M, Mallah M, Chae JJ, Watford WT, Hofmann SR, et al. De novo CIAS1 mutations, cytokine activation, and evidence for genetic heterogeneity in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID): a new member of the expanding family of pyrin-associated autoinflammatory diseases. *Arthritis and Rheumatism* 2002 Dec;46(12):3340-3348.

18. Aksentijevich I, D Putnam C, Remmers EF, Mueller JL, Le J, Kolodner RD, et al. The clinical continuum of cryopyrinopathies: novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. *Arthritis and Rheumatism* 2007 Apr;56(4):1273-1285.
19. Jesus AA, Silva CA, Segundo GR, Aksentijevich I, Fujihira E, Watanabe M, et al. Phenotype-genotype analysis of cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS): description of a rare non-exon 3 and a novel CIAS1 missense mutation. *Journal of clinical immunology* 2008 Mar;28(2):134-138.
20. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006 03/09/print;440(7081):228-232.
21. Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2003 02//print;4(2):95-104.
22. Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007 01//print;7(1):31-40.
23. Dinarello CA. Mutations in cryopyrin: bypassing roadblocks in the caspase 1 inflammasome for interleukin-1beta secretion and disease activity. *Arthritis and Rheumatism* 2007 Sep;56(9):2817-2822.
24. Dinarello CA. A signal for the caspase-1 inflammasome free of TLR. *Immunity* 2007 Apr;26(4):383-385.
25. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory Caspases: Linking an Intracellular Innate Immune System to Autoinflammatory Diseases. *Cell*, 2004 5/28;117(5):561-574.
26. Brydges S, Kastner DL. The systemic autoinflammatory diseases: inborn errors of the innate immune system. *Current topics in microbiology and immunology* 2006;305:127-160.

27. Gay NJ, Gangloff M. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annual Review of Biochemistry* 2007 07/07;76(1):141-165.
28. Gregersen PK. Modern Genetics, Ancient Defenses, and Potential Therapies. *N Engl J Med* 2007 March 22;356(12):1263-1266.
29. Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006 Jul 6;442(7098):39-44.
30. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 2007 Jan;81(1):1-5.
31. McDermott MF. A common pathway in periodic fever syndromes. *Trends in immunology* 2004 Sep;25(9):457-460.
32. Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and experimental rheumatology* 2002 Sep-Oct;20(5 Suppl 27):S1-13.
33. Dinarello CA. The many worlds of reducing interleukin-1. *Arthritis and Rheumatism* 2005 Jul;52(7):1960-1967.
34. Mathews RJ, Sprakes MB, McDermott MF. NOD-like receptors and inflammation. *Arthritis research & therapy* 2008 Nov 25;10(6):228.
35. Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, Rubartelli A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004 Jun 29;101(26):9745-9750.
36. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 2006 Apr 1;176(7):3877-3883.
37. Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and



revisions. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2005 Sep 1;10:2193-2216.

38. Dinarello CA. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *Journal of endotoxin research* 2004;10(4):201-222.

39. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England journal of medicine* 1999 Feb 11;340(6):448-454.

40. Simon A, van der Meer JW. Pathogenesis of familial periodic fever syndromes or hereditary autoinflammatory syndromes. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2007 Jan;292(1):R86-98.

41. Van Der Meer JM, Radl J, Meyer CLM, Vossen J, Van Nieuwkoop J, Lobatto S, et al. HYPERIMMUNOGLOBULINAEMIA D AND PERIODIC FEVER: A NEW SYNDROME. *The Lancet*, 1984 5/19;323(8386):1087-1090.

42. Cuisset L, Drenth JP, Simon A, Vincent MF, van der Velde Visser S, van der Meer JW, et al. Molecular analysis of MVK mutations and enzymatic activity in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* 2001 Apr;9(4):260-266.

43. Ammouri W, Cuisset L, Rouaghe S, Rolland MO, Delpech M, Grateau G, et al. Diagnostic value of serum immunoglobulinaemia D level in patients with a clinical suspicion of hyper IgD syndrome. *Rheumatology (Oxford, England)* 2007 Oct;46(10):1597-1600.

44. Haas D, Hoffmann GF. Mevalonate kinase deficiencies: from mevalonic aciduria to hyperimmunoglobulinemia D syndrome. *Orphanet journal of rare diseases* 2006 Apr 26;1:13.

45. Houten SM, Wanders RJ, Waterham HR. Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency. *Biochimica et biophysica acta* 2000 Dec 15;1529(1-3):19-32.

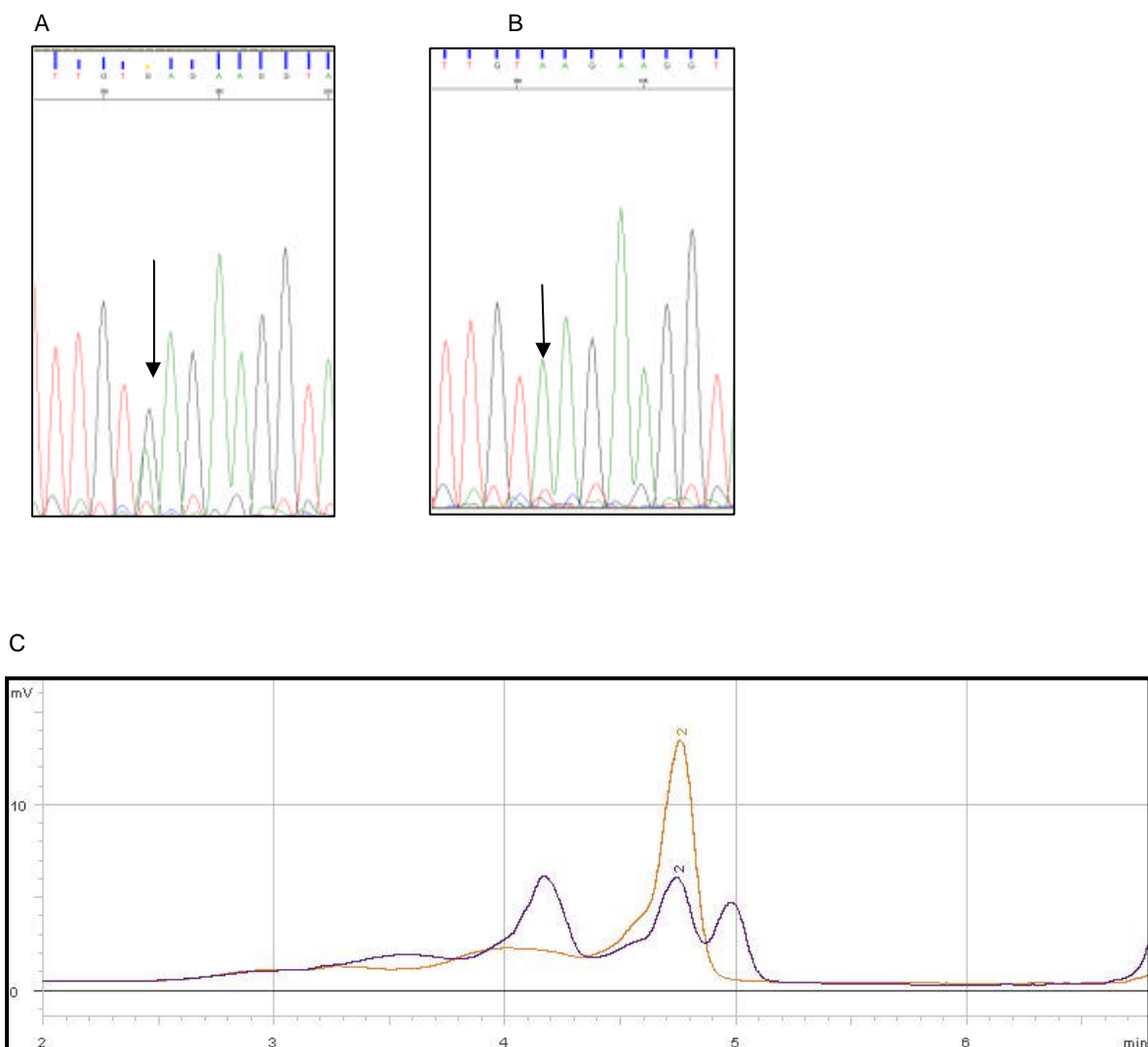
46. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nature reviews.Immunology* 2006 May;6(5):358-370.
47. McTaggart SJ. S-prenylated proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2006 Feb;63(3):255-267.
48. Houten SM, Kuis W, Duran M, de Koning TJ, van Royen-Kerkhof A, Romeijn GJ, et al. Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Nature genetics* 1999 Jun;22(2):175-177.
49. Drenth JP, Cuisset L, Grateau G, Vasseur C, van de Velde-Visser SD, de Jong JG, et al. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group. *Nature genetics* 1999 Jun;22(2):178-181.
50. Milhavet F, Cuisset L, Hoffman HM, Slim R, El-Shanti H, Aksentijevich I, et al. The infevers autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions. *Human mutation* 2008 Jun;29(6):803-808.
51. Simon A, Mariman EC, van der Meer JWM, Drenth JPH. A founder effect in the hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *The American Journal of Medicine* 2003 2/1;114(2):148-152.
52. Mandey SH, Schneiders MS, Koster J, Waterham HR. Mutational spectrum and genotype-phenotype correlations in mevalonate kinase deficiency. *Human mutation* 2006 Aug;27(8):796-802.
53. Houten SM, Frenkel J, Rijkers GT, Wanders RJ, Kuis W, Waterham HR. Temperature dependence of mutant mevalonate kinase activity as a pathogenic factor in hyper-IgD and periodic fever syndrome. *Human molecular genetics* 2002 Dec 1;11(25):3115-3124.

54. Frenkel J, Rijkers GT, Mandey SH, Buurman SW, Houten SM, Wanders RJ, et al. Lack of isoprenoid products raises ex vivo interleukin-1beta secretion in hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Arthritis and Rheumatism* 2002 Oct;46(10):2794-2803.
55. Mandey SH, Kuijk LM, Frenkel J, Waterham HR. A role for geranylgeranylation in interleukin-1beta secretion. *Arthritis and Rheumatism* 2006 Nov;54(11):3690-3695.
56. Simon A, Cuisset L, Vincent MF, van Der Velde-Visser SD, Delpech M, van Der Meer JW, et al. Molecular analysis of the mevalonate kinase gene in a cohort of patients with the hyper-igd and periodic fever syndrome: its application as a diagnostic tool. *Annals of Internal Medicine* 2001 Sep 4;135(5):338-343.
57. D'Oswaldo A, Picco P, Caroli F, Gattorno M, Giacchino R, Fortini P, et al. MVK mutations and associated clinical features in Italian patients affected with autoinflammatory disorders and recurrent fever. *European journal of human genetics : EJHG* 2004 11/10/online;13(3):314-320.
58. Kone-Paut I, Sanchez E, Le Quellec A, Manna R, Touitou I. Autoinflammatory gene mutations in Behcet's disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2007 Jun;66(6):832-834.
59. Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Human genetics* 1999 Jul-Aug;105(1-2):72-78.
60. Gross E, Arnold N, Pfeifer K, Bandick K, Kiechle M. Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. *Human mutation* 2000 Oct;16(4):345-353.
61. Jones AC, Austin J, Hansen N, Hoogendoorn B, Oefner PJ, Cheadle JP, et al. Optimal temperature selection for mutation detection by denaturing HPLC and comparison to single-stranded conformation polymorphism and heteroduplex analysis. *Clinical chemistry* 1999 Aug;45(8):1133-1140.



## APPENDICE

**Figura 6.** Sono riportati i cromatogrammi e gli elettroferogrammi relativi alle mutazioni rilevate in DHPLC e sequenziamento nell'introne 2 di *mvk*. A . c.78+61 A>G introne 2 B. Controllo negativo introne 2 (TTGTAAGAAGT sequenza wild type NM\_000431) C. Sovrapposizione dei cromatogrammi DHPLC dell'introne2 del paziente 6 (Viola) e del controllo wt (rosso). Si evidenzia il polimorfismo in eterozigosi.



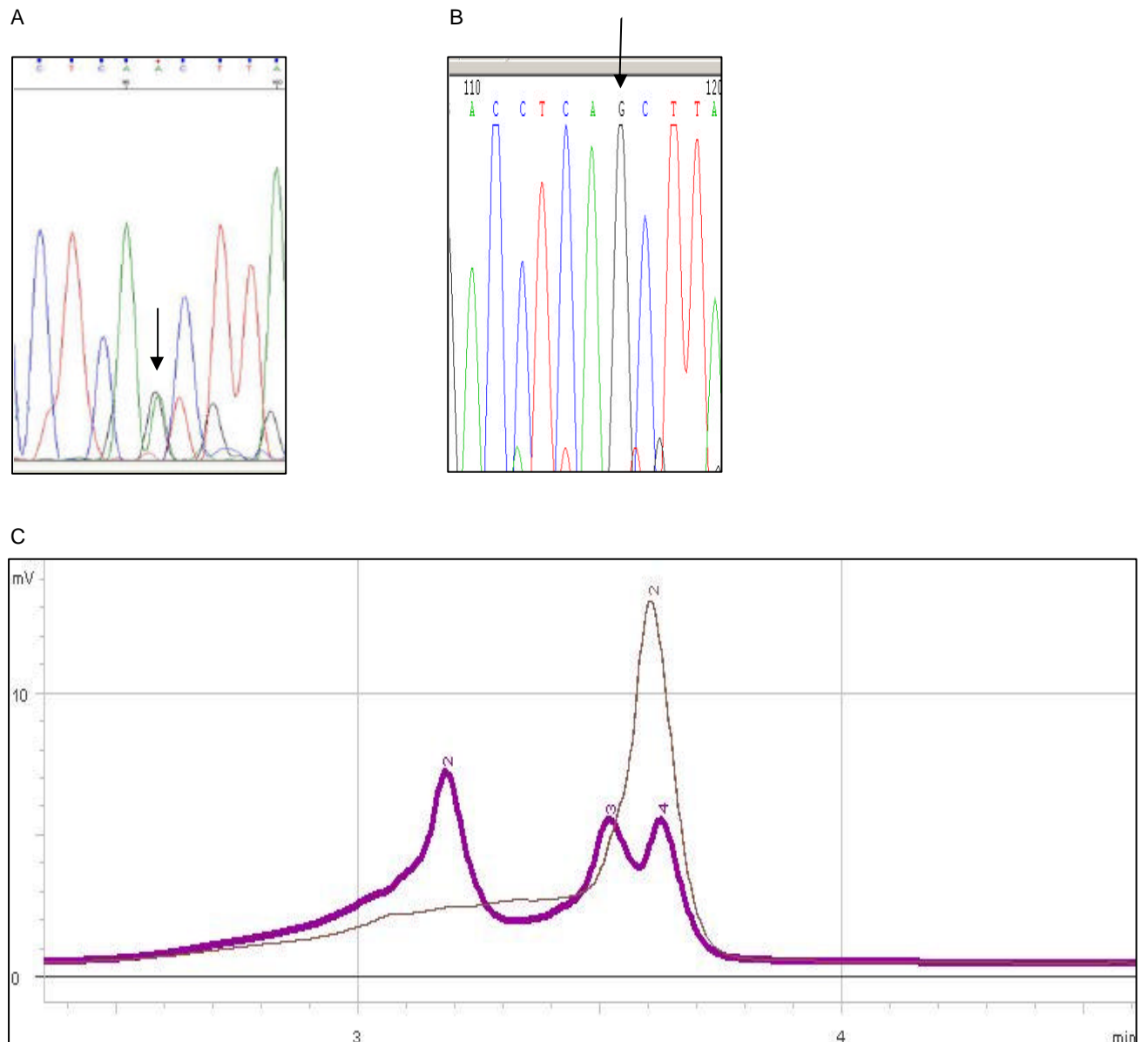
**Figura 7.** Sono riportati i cromatogrammi e gli elettroferogrammi relativi alle mutazioni rilevate in DHPLC e sequenziamento nell'esone 3 di *mvk*.

A . c.155 G>A, S52N, eterozigote

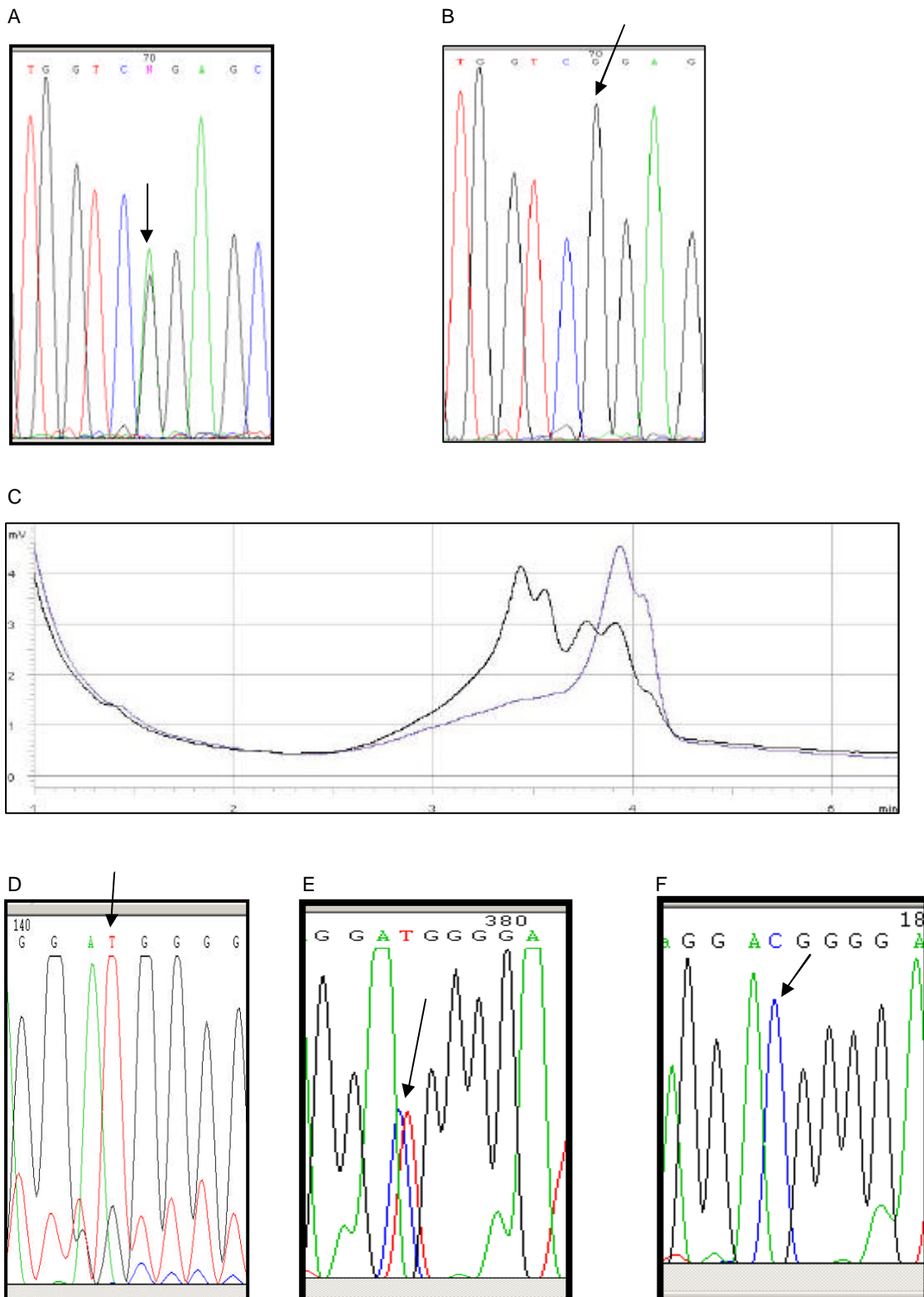
B. Controllo negativo esone 3

(ACCTCAGCTTA sequenza wild type NM\_000431)

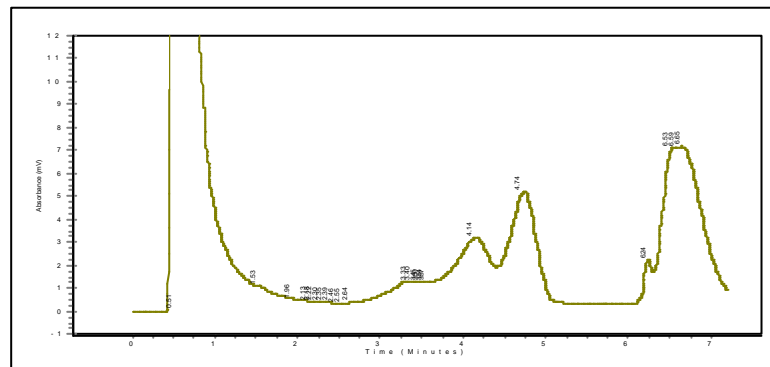
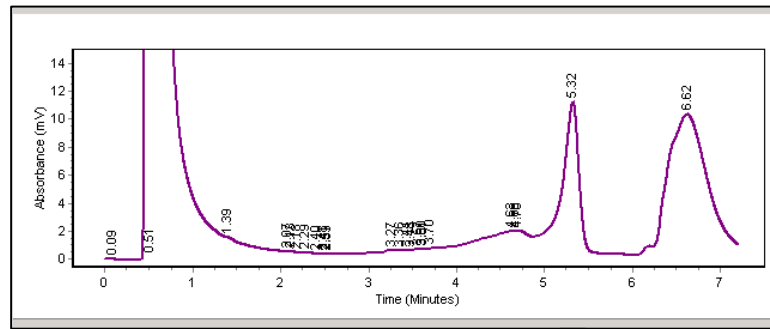
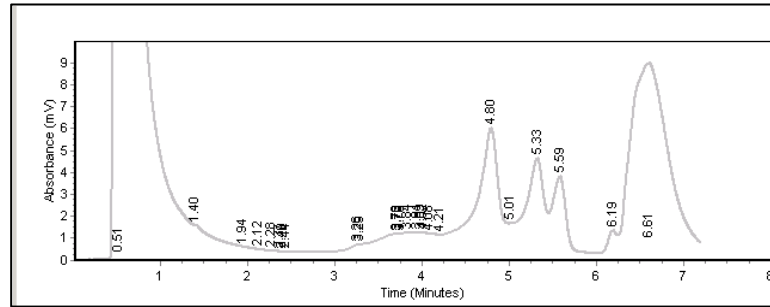
C. Sovrapposizione dei cromatogrammi DHPLC dell'esone 3 del paziente 13 (Viola) e del controllo wt (nero).  
Si evidenzia il polimorfismo in eterozigosi.



**Figura 8.** Sono riportati i cromatogrammi e gli elettroferogrammi relativi alle mutazioni rilevate in DHPLC e sequenziamento nell'esone 5 di *mvk*. A . c. 405 G>A, S135S, ETEROZIGOSI B Controllo negativo esone 5 per confronto con la mutazione S135S (TGGTCGGAG sequenza wild type NM\_000431) C. Sovrapposizione dei cromatogrammi DHPLC dell'esone 5 del paziente 13 (Nero) e del controllo wt (Viola). Si evidenzia il polimorfismo in eterozigosi D c. 510 C>T, D170D, OMOZIGOSI E c. 510 C>T, D170D, ETEROZIGOSI F. Controllo negativo esone 5 per confronto con la mutazione D170D ( AGGACGGG sequenza wild type NM\_000431) G. Cromatogrammi DHPLC dell'esone 5. Controllo wt (Viola), paziente 5 - polimorfismo in eterozigosi (grigio), paziente 4- polimorfismo in omozigosi (Verde)

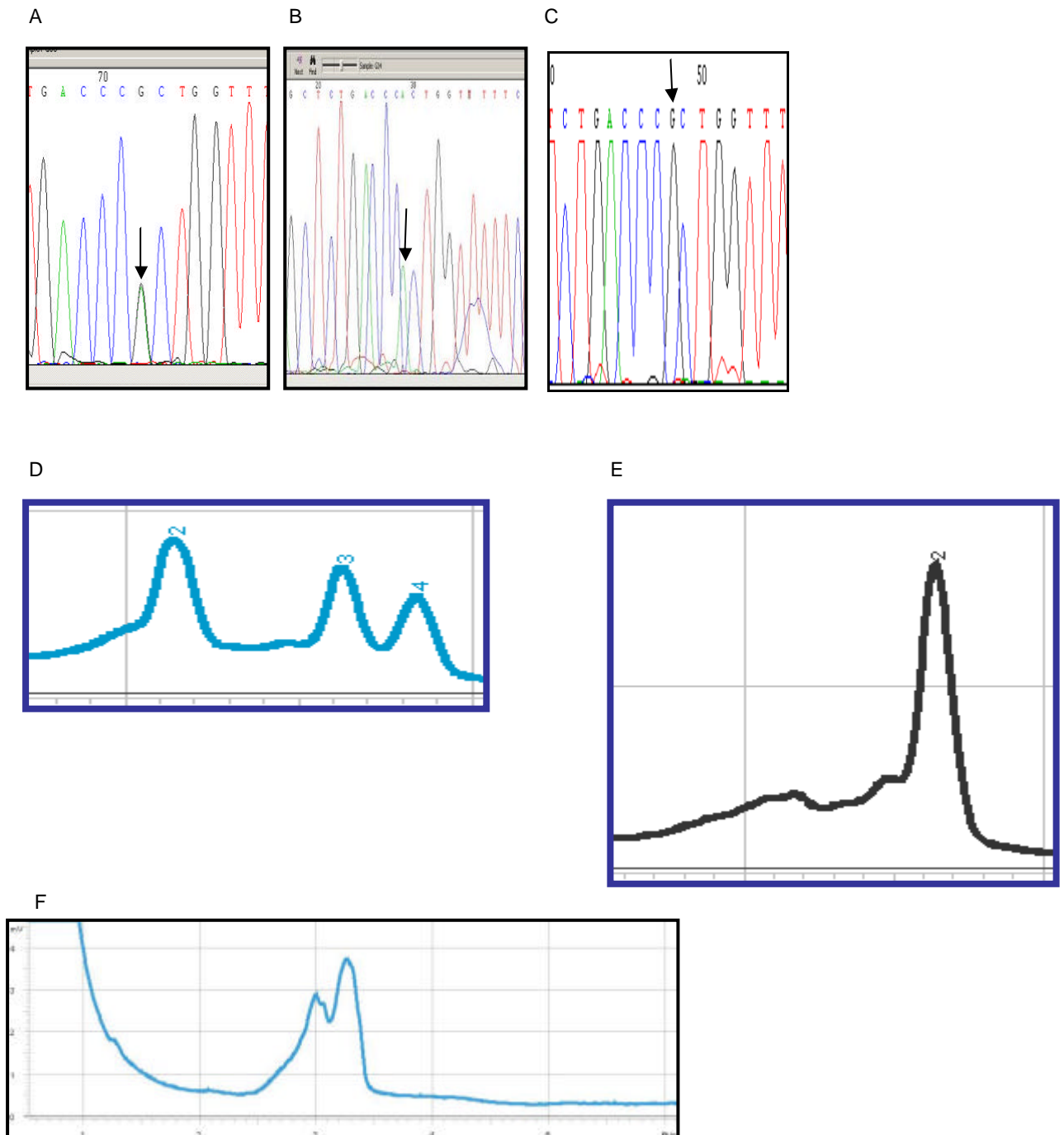


G





**Figura 9.** Sono riportati i cromatogrammi e gli elettroferogrammi relativi alle mutazioni rilevate in DHPLC e sequenziamento nell'introne 6 di *mvk*. **A** . Mutazione in eterozigosi, introne 6 c.632-18A>G **B**. Controllo negativo introne 6 ( GACCCACTGG sequenza wild type NM\_000431) **C**. Mutazione in omozigosi, introne 6 c.632-18A>G. **D**. Cromatogramma DHPLC dell'esone 7, paziente 10, eterozigosi **E**. Cromatogramma DHPLC dell'esone 7 Controllo wt **F**. Cromatogramma DHPLC dell'esone 7, paziente 4, omozigosi.



**Figura 10.** Sono riportati i cromatogrammi e gli elettroferogrammi relativi alle mutazioni rilevate in DHPLC e sequenziamento nell'introne 9 di *mvk*. A . Controllo negativo INTRONE 9 B. 885+24G>A (AACCGGGTTAC sequenza wild type NM\_000431) B introne 9, ETEROZIGOSI C. Sovrapposizione dei cromatogrammi DHPLC dell'esone 9 del paziente 19 (rosso) e del controllo wt (Viola). Si evidenzia il polimorfismo in eterozigosi.

