

LAVORO ORIGINALE

Utilità della tecnica denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) per la diagnosi di deficit di mevalonato chinasi nelle febbri periodiche di sospetta natura autoinfiammatoria*

Utility of denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) for the diagnosis of mevalonate kinase deficiency in periodic fevers of autoinflammatory nature suspicion

A. Gava¹, A. Furlan¹, F. Navaglia², M. Miorin³, M. Razetti², D. Basso², M. Plebani², L. Punzi¹

¹Cattedra e U.O.C. di Reumatologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Padova;

²Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Università-Ospedale di Padova;

³U.O. di Ematologia e Immunologia Clinica, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Padova

SUMMARY

Objectives: We developed a genetic investigation using denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), in order to identify polymorphisms of the gene MVK in patients with autoinflammatory syndrome suspicion.

Methods: We evaluated 19 patients affected by recurrent fevers and other clinical manifestations usually found in autoinflammatory syndromes and not correlated with infections or autoimmune disease and 10 healthy controls. IgD level was measured in all patients. Molecular testing was performed in DNA extracted from PBMC and MVK gene was analysed either with DHPLC or with automatic sequencer. Primers for PCR amplifications, amplicon lengths and PCR conditions were designed in our laboratory.

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 polymorphisms c.78+61A>G, S52N, S135S, D170D, c.632-18A>G, c.885+24G>A already described in the database INFEVERS. With DHPLC we got the results in shorter time (10 hours/patient) and with lower cost (40 euro/patient) in comparison to direct sequencing (25 hours and 150 euro/patient).

Conclusions: High IgD levels 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. Twelve patients 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 polymorphisms could predispose to MKD.

Reumatismo, 2009; 61(3):187-196

*Lavoro premiato al XLV Congresso SIR, Venezia 2008.

INTRODUZIONE

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 (1) ed è un raro disordine autoinfiammatorio 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

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Alessandra Gava
Cattedra e UOC di Reumatologia,
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Università degli Studi di Padova,
Via Giustiniani 2 - 35128 Padova.
E-mail: alessandra.gava@unipd.it

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 (2). 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 patognomonici, in quanto un incremento delle IgD può non essere osservato oppure si può osservare anche nelle altre forme genetiche di febbri ricorrenti (3).

Durante gli attacchi febbrili i pazienti hanno un incremento dell'escrezione di acido mevalonico nelle urine (4); 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 dell'enzima mevalonato chinasi.

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. La scoperta inattesa che questo enzima potesse essere coinvolto nella patogenesi della MKD, suggerì un nuovo ruolo per questo pathway molecolare nella regolazione della risposta infiammatoria (5). Mutazioni in MK che provocano la perdita completa dell'attività dell'enzima erano già note quali responsabili dell'Aciduria mevalonica (MVA, OMIM 251170).

Nel 1999 il gruppo di Houten (6) e quello di Drenth (7), utilizzando rispettivamente un approccio funzionale e un mappaggio posizionale, identificarono delle mutazioni associate alla MKD nel gene MVK, costituito da undici esoni e mappato sul braccio lungo del cromosoma 12 (12q24) (Fig. 1). Le mutazioni finora conosciute sono registrate 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 (8).

La mutazione prevalente è la V377I (presente in 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 (9).

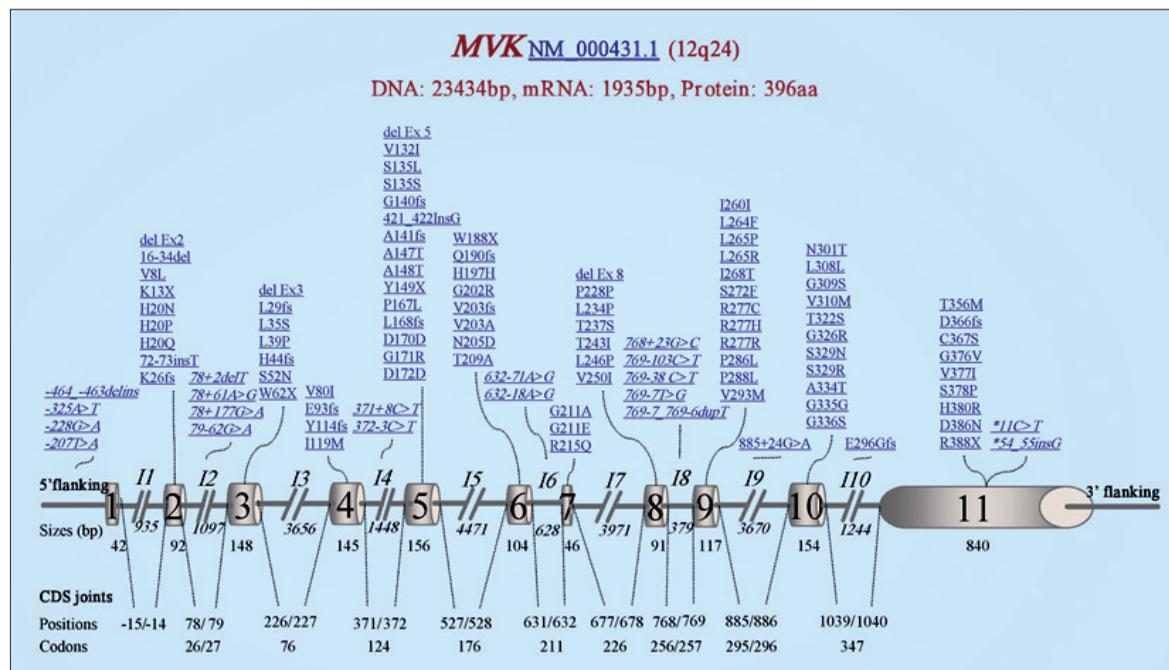


Figura 1 - Grafico schematico del gene MVK, completo di esoni ed introni. È rappresentata la distribuzione delle varianti di sequenza lungo tutto il gene. Fonte: Infevers - database on-line per mutazioni di malattie autoinfiammatorie. Diritto d'autore. Disponibile sul sito <http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/>.

Le mutazioni associate alla HIDS risultano in una residua attività enzimatica, pari all'1-8% del normale (6, 10, 11) 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 (11). Pertanto è possibile ipotizzare che l'incremento della temperatura corporea secondario a episodi febbrili infettivi o stress fisico possa scatenare la crisi autoinfiammatoria.

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 (12, 13). L'individuazione di mutazioni geniche nel gene MVK 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. Negli ultimi

decenni sono stati sviluppati diversi metodi per la determinazione di mutazioni puntiformi non note: DHPLC (Denaturant High Performance Liquid Chromatography), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphisms), DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis), TTGE (Temporal Temperature Gradient Electrophoresis).

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.

MATERIALI E METODI

Pazienti

A partire da gennaio 2007 sono stati presi in esame 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 malattia autoinfiammatoria sistemica (MAIS). Dieci volontari sani sono stati utilizzati come gruppo di controllo.

Tabella I - 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 ¹	
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 ²	
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 ²	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, artalgie, mialgie, rash cutaneo	

¹A completamento di quanto riportato in tabella si segnala IgA pari a 4,39 g/L, IgE, 1086 KU/L.
²A completamento di quanto riportato in tabella si segnala IgA >4 g/L.

Diciotto pazienti erano di origine italiana mentre 1 paziente (n. 6) era di nazionalità albanese; 1 paziente (n. 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 malattia 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 I.

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.

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).

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/ μ L. A partire dal DNA estratto sono state amplificate le sequenze dei 10 esoni codificanti del gene MVK, utilizzando primers disegnati nel nostro laboratorio e specifici per ciascun esone (Tab. II).

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), 2,5 mM di MgCl₂, e 2,5

Tabella II - 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.

<i>Esone</i>	<i>Primer</i>	<i>Amplificato PCR (paia di basi)</i>	<i>Temperatura di analisi in DHPLC (°C)</i>	<i>Gradiente di Acetonitrile (Inizio-Fine)</i>
2	2F 5'-tctcctgctggctgaca-3' 2R 5'-tgcctcagggtgctcttta-3'	239	58.5 60.5	13.65-15.9 13.15-15.4
3	3 F 5'-tcacctcaggcttattgct-3' 3 R 5'-tggtttctcctctgcact-3'	210	59.3 61.3	12.18-15.07 12.18-15.07
4	4F 5'-ccctctcaccactgtgtt-3' 4R 5'-atctggactcttcccaga-3'	219	61.7 63	3.92-16.17 13.42-15.67
5	5F 5'-cgggagagtcagttcac-3' 5R 5'-gacctggccaggtaaggac-3'	221	63.1 65.3	13.95-16.2 12.95-15.2
6	6F 5'-ccactctcactgccacag-3' 6R 5'-tgattcgattctcccaaac-3'	250	58.5 60	13.25-15.5 13.25-15.5
7	7F 5'-gaaccaacccaaagtcaa-3' 7R 5'-cctgcctctatggtactcc-3'	231	59.8	13.05-15.3
8	8F 5'-ccagctcctcatcttgagt-3' 8R 5'-gaggagacctcgaaaatcc-3'	221	61.2 63.2	13.45-15.7 12.95-15.2
9	9F 5'-ctcaccagccgttctct -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'-agagttgtcaagggtgacctg-3' 11R 5'-cagccccagaataatccaga-3'	249	65	13.75-16

U di Taq polimerasi (Ampli Taq Gold, Applied Biosystems, USA).

Il protocollo prevede un'iniziale denaturazione a 94°C per 7 minuti, seguita da 15 cicli "touchdown" (94°C per 30 secondi, 68-60.5°C per 30 secondi, 72°C per 45 secondi) e da 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. 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 prodotti aspecifici.

Analisi mediante DHPLC

Le sequenze amplificate sono state analizzate utilizzando il sistema Wave[®] 2100 Fragment Analysis (Transgenomic, Omaha, NE, USA). I filamenti dei prodotti di amplificazione sono stati denaturati (95°C per 7 minuti) e fatti rinaturare lentamente a temperatura ambiente, in modo che eventuali polimorfismi in eterozigosi formino delle strutture eteroduplex. Infine, 10 µl di amplificato PCR sono stati utilizzati per l'analisi DHPLC.

Per evidenziare eventuali mutazioni in omozigosi, l'amplificato di ciascun paziente è stato miscelato con il DNA di un controllo di sequenza "wild type" in un rapporto di 1:1 prima di essere denaturato.

Gli eteroduplex 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 un software dedicato (Navigator 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 eteroduplex. La sensibilità nell'individuare polimorfismi è massima 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 denaturazione, sarà necessario ripetere l'analisi per ciascuna temperatura.

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

Determinazione delle sequenze di DNA

La reazione di sequenza è stata eseguita in 20 µl di volume finale, utilizzando 1 µl di DNA amplificato precedentemente purificato con filtri a cut off molecolare (Microcon PCR, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA).

Nella miscela per il sequenziamento si aggiungono 3.2 pmoli di primer, 8 µl di Big Dye terminator Mix (ABI PRISM BigDye Terminator v 1.1, APPLIED BIOSYSTEM). 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.

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 (rapporto 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>.

RISULTATI

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 gene bank (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 (Fig. 2).

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 III 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.

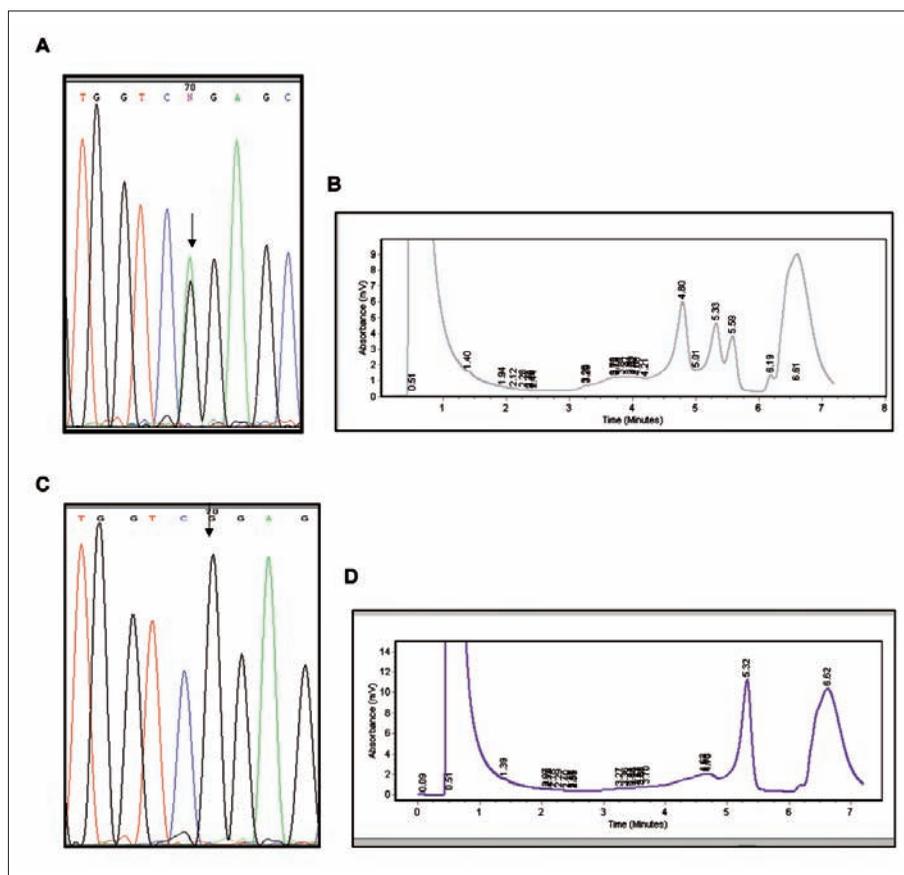


Figura 2 - Sono riportati, a titolo di esempio, i cromatogrammi e gli elettroferogrammi relativi ai polimorfismi rilevati con DHPLC e sequenziatore automatico nell'esone 5 di MVK. A. c.405 G>A (S135S) in eterozigosi B. Cromatogramma DHPLC dell'esone 5, polimorfismo in eterozigosi. C. Controllo negativo esone 5 per confronto con la mutazione S135S (TGGTCG-GAG sequenza wild type NM_000431) D. Cromatogramma DHPLC dell'esone 5 di un controllo wt.

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, uno 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.

In tabella III sono riportati i valori di IgD riscontrati in ogni paziente.

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 elettroforica 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 questi sono due passaggi in comune tra le due tecniche e che quindi comportano la stessa spesa.

DISCUSSIONE

Il completamento della sequenza del genoma umano rappresenta un evento destinato a produrre con-

Tabella III - Caratteristiche genetiche e valori di IgD dei 19 pazienti esaminati.

Paziente	Polimorfismi	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		-	121 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

sequenze 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.

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 sin-

drome 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 e dimostrano 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.

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. L'analisi degli eteroduplex mediante DHPLC permette di discriminare all'interno di prodotti di PCR, molecole di DNA eteroduplex rispetto alle molecole omoduplex.

In questo lavoro, utilizzando la DHPLC, è stato messo a punto un protocollo per l'analisi di polimorfismi del gene MVK in 19 pazienti con febbri ricorrenti e una sintomatologia compatibile con una sindrome auto infiammatoria. 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.

Tutti i controlli sono risultati portatori di un genotipo identico alla sequenza wild type presente in genbank (NM_000431) e analogamente non presentavano profili DHPLC di polimorfismi di sequenza. 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 evidenziati dei polimorfismi esattamente in corrispondenza dell'esone che appariva mutato in DHPLC.

Sono stati così identificati i polimorfismi 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 descritti 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 9.

Secondo quanto riportato in INFEVERS nessuno dei polimorfismi da noi individuati risulta associato singolarmente ad un fenotipo tipico di MKD; tuttavia è possibile discutere i dati ottenuti in base a quanto già presente in letteratura.

Nel 2005 D'Osualdo et al. descrissero la prima casistica italiana di MKD e, tra i polimorfismi descritti, trovarono che la variante allelica c.632-18A>G aveva una frequenza maggiore nella popolazione con sospetta MKD rispetto alla popolazione di controllo sana. Conclusero che questo polimorfismo potesse avere un effetto diretto sullo splicing dell'introne 6 e sulla maturazione del trascritto. Ipotizzarono inoltre che questa variante potesse essere in linkage disequilibrium con un altro

polimorfismo che a sua volta potesse indurre di per sé una leggera diminuzione nell'attività di MK.

È interessante notare che nella nostra casistica tutti i pazienti portatori della variante c.632-18A>G in corrispondenza dell'introne 6, presentavano anche la c.510 C>T (D170D) nell'esone 5; tale evento suggerisce che questi SNP possano essere in linkage disequilibrium e che tali polimorfismi possano indurre una diminuzione nell'attività della MK predisponendo quindi alla MKD.

In particolare i pazienti eterozigoti per D170D e c.632-18A>G avevano caratteristiche cliniche compatibili con una forma lieve di MKD. L'unica paziente omozigote per entrambe le mutazioni presentava un quadro clinico molto più grave rispetto agli altri pazienti valutati. In questo caso è stato registrato anche un aumento di IgA e IgE, mentre le IgD erano normali.

In letteratura esistono diversi tentativi di studio dell'influenza di mutazioni di MVK sull'attività enzimatica di MK soprattutto in relazione all'ipotesi patogenetica secondo la quale la MKD sia dovuta ad un deficit di produzione di isoprenoidi. Pochi sono gli studi mirati a definire il rapporto genotipo-fenotipo in pazienti eterozigoti composti per due varianti alleliche di MVK.

A questo proposito sarebbe interessante valutare se la risposta infiammatoria ad uno stimolo comune possa essere diversa in soggetti con genotipo wt e in individui portatori di almeno due polimorfismi in eterozigosi in MVK; sarebbe quindi interessante studiare se tali polimorfismi possano 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.

Di recente è stato pubblicato un articolo nel quale è stata descritta una casistica di pazienti affetti da m. di Behçet nei quali sono state ricercate mutazioni nei geni correlati con altre sindromi autoinfiammatorie (MKD, TRAPS, FMF). Non è stato possibile associare la m. di Behçet con un gene in particolare; è stata però ipotizzata una possibile sovrapposizione con la MKD data la prevalenza 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.

È interessante notare che un altro paziente (n.19) è risultato portatore degli stessi polimorfismi del paziente 6 ed aveva una diagnosi differenziale con FMF; il quadro clinico del paziente, che è in terapia con colchicina, è attualmente ben controllato. Per quanto riguarda la DHPLC essa è risultata essere una tecnica sensibile e specifica in grado di rilevare variazioni di sequenza rispetto al controllo wt ed è già stata utilizzata in altri studi per analizzare variazioni di sequenza in alcuni geni come ad esempio CFTR (cystic fibrosis trans membrane conductance regulator gene), BRCA1 e BRCA2. 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 con quelli del sequenziatore automatico si nota che, oltre alle spese iniziali di strumentazione, anche i costi di utilizzo e manutenzione sono nettamente inferiori nella DHPLC. Concludendo, 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 auto infiammatoria. 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.

RIASSUNTO

L'individuazione di mutazioni nella mevalonato chinasi ha reso l'indagine genetica indispensabile per la diagnosi di MKD: in questo studio è stata effettuata un'analisi genetica utilizzando la DHPLC per identificare alterazioni del gene MVK. I valori sierici di IgD erano normali (<100 mg/L) in 14/19 pazienti. Nessun campione di controllo presentava alterazioni in DHPLC e nelle sequenze.

Dodici dei 19 pazienti presentavano almeno un profilo di DHPLC alterato, confermato con il sequenziamento. La DHPLC è molto sensibile e capace di effettuare uno screening rapido e a basso costo nell'analisi di mutazioni in pazienti con sospetta sindrome autoinfiammatoria legata al gene MVK.

Parole chiave - Deficit di mevalonato chinasi, DHPLC, malattie autoinfiammatorie sistemiche.

Key words - *Mevalonate kinase deficiency, DHPLC, autoinflammatory syndromes.*

BIBLIOGRAFIA

1. Van Der Meer JM, Radl J, Meyer CLM, Vossen J, Van Nieuwkoop J, Lobatto S, et al. Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever: a new syndrome. *The Lancet* 1984; 323: 1087-90.
2. 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. *Eur J Hum Genet* 2001; 9: 260-6.
3. Ammouri W, Cuisset L, Rouaghe S, Rolland MO, Delpech M, Grateau G, et al. Diagnostic value of serum immunoglobulinemia D level in patients with a clinical suspicion of hyper IgD syndrome. *Rheumatology* 2007; 46: 1597-600.
4. Haas D, Hoffmann GF. Mevalonate kinase deficiencies: From mevalonic aciduria to hyperimmunoglobulinemia D syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 26: 1-13.
5. Houten SM, Wanders RJ, Waterham HR. Biochemical and genetic aspects of mevalonate kinase and its deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 19-32.
6. Houten SM, Kuis W, Duran M, de Koning TJ, van Royen-Kerkhof A, Romeijn GJ, et al. Mutations in MVK, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Nat Genet* 1999; 22: 175-7.
7. Drenth JP, Cuisset L, Grateau G, Vasseur C, van der 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. *Nat Genet.* 1999; 22: 178-81.
8. Milhavel F, Cuisset L, Hoffman HM, Slim R, El-Shanti H, Aksentijevich I, et al. The infervers autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions. *Hum Mutat* 2008; 29: 803-8.
9. 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; 114: 148-52.
10. Mandey SH, Schneiders MS, Koster J, Waterham HR.

- Mutational spectrum and genotype-phenotype correlations in mevalonate kinase deficiency. *Hum Mutat* 2006; 27: 796-802.
11. 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. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 3115-24.
 12. 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 Rheum* 2002; 46: 2794-803.
 13. Mandey SH, Kuijk LM, Frenkel J, Waterham HR. A role for geranylgeranylation in interleukin-1beta secretion. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 3690-5.
 14. Touitou I, Kone-Paut I. Autoinflammatory diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22: 811-29.
 15. Hull KM, Shoham N, Chae JJ, Aksentjevich I, Kastner DL. The expanding spectrum of systemic autoinflammatory disorders and their rheumatic manifestations. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 61-9.
 16. Simon A, Cuisset L, Vincent MF, van Der Velde-Vissers SD, Delpuch 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. *Ann Intern Med* 2001; 135: 338-43.
 17. D'Osualdo 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. *Eur J Hum Genet* 2004; 13: 314-20.
 18. Kone-Paut I, Sanchez E, Le Quellec A, Manna R, Touitou I. Autoinflammatory gene mutations in behcet's disease. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 832-4.
 19. Gross E, Arnold N, Pfeifer K, Bandick K, Kiechle M. Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. *Hum Mutat* 2000; 16: 345-53.
 20. Gross E, Arnold N, Goette J, Schwarz-Boeger U, Kiechle M. A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 1999; 105: 72-8.
 21. 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. *Clin Chem* 1999; 45: 1133-40.