

# La genetica delle malattie autoinfiammatorie: genetica e diagnostica molecolare

## Seconda parte

Francesca Orlando<sup>1</sup>, Germana Nardini<sup>2</sup>,  
Daniele De Brasi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Pediatria, AORN Santobono Pausilipon, Napoli

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli Studi di Napoli Federico II

Le conoscenze in ambito genetico delle malattie autoinfiammatorie sono progressivamente aumentate nell'ultimo decennio. Dalla comprensione dei meccanismi genetici di poche malattie note inizialmente (febbre mediterranea familiare, sindrome periodica associata al recettore 1 del fattore di necrosi tumorale, deficit di mevalonato chinasi, criopirinopatie), si è giunti all'identificazione di almeno 40 geni associati a tali condizioni, e più di 100 geni sono attualmente testati con le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione. Infatti, mentre le raccomandazioni iniziali per la diagnosi genetica delle malattie autoinfiammatorie erano limitate a una strategia di diagnosi "gene per gene", basata sul metodo Sanger per pochi prototipi di febbri ricorrenti, più recentemente l'avvento del sequenziamento di nuova generazione ha permesso l'identificazione di varianti a carico dei geni coinvolti in maniera più semplice e rapida, aumentando di fatto la capacità diagnostica genetica. Il rilevamento di un sempre maggior numero di varianti genetiche ha però reso l'interpretazione dei risultati più complicata e spesso una diagnosi molecolare non viene raggiunta. Tuttavia altri meccanismi genetici, quali mosaicismi somatici, modificazioni epigenetiche, ereditarietà digenica, consentono di spiegare alcune situazioni in cui una causa genetica non sia stata ancora definita. In conclusione, ulteriori meccanismi genetici e non genetici saranno identificati nel prossimo futuro per spiegare le basi delle malattie autoinfiammatorie, specie in quella parte di pazienti in cui una causa genetica non è stata ancora chiarita.

*Knowledge in the genetic field of autoinflammatory diseases has progressively increased over the last decade. Starting from the genetic knowledge on a few initially known diseases (Familial Mediterranean Fever, Periodic Syndrome Associated with Tumor Necrosis Factor Receptor 1, Mevalonate Kinase Deficiency, Cryopyrinopathies), at least 40 genes associated with these conditions have been identified, and more than 100 genes are currently being tested with Next Generation Sequencing (NGS) technologies. Indeed, starting recommendations for the genetic diagnosis of autoinflammatory diseases were limited to a gene-by-gene diagnosis strategy, based on the Sanger*

*method, and restricted to a few prototypic recurrent fevers. More recently, improvement of genetic technologies, in particular NGS, allowed identification of genetic variants among involved genes in an easier and more rapid way. Detection of more and more genetic variants made interpretation of results more complicated, and often a genetic diagnosis is not achieved. On the other hand, other mechanisms, namely somatic mosaicism, epigenetic modifications, digenic inheritance, allow to explain some not genetically defined cases. Eventually, further genetic and non-genetic mechanisms will be probably identified in near future to explain underlying basis of autoinflammatory diseases, especially in a still large part of patients without a clearcut genetic basis.*

### Aspetti genetici delle AIDs

La conoscenza degli aspetti genetici delle malattie autoinfiammatorie (AIDs) muove i suoi primi passi negli anni Novanta, allorché l'attenzione fu focalizzata su famiglie con due fenotipi infiammatori, la febbre mediterranea familiare (FMF), a segregazione recessiva, e la febbre iberniana familiare (FHF), a segregazione dominante. L'utilizzo di un approccio di positional cloning consentì a un consorzio internazionale l'identificazione nel 1997 di due mutazioni missenso patogene in una famiglia FMF a carico di un gene nominato *MEFV*. L'anno successivo, lo studio di una famiglia su cinque generazioni affetta da una forma febbrile periodica a ereditarietà autosomica dominante (rinominata poi TRAPS: tumor necrosis factor receptor-1 associated periodic syndrome) permise l'identificazione di mutazioni in eterozigosi a carico del gene *TNFRSF1*. A partire dal secolo successivo, è iniziata una nuova era per la ricerca medica e genetica delle AIDs, grazie soprattutto all'implementazione delle biotecnologie di nuova generazione, in particolare all'avvento dell'NGS. Grazie a esse le conoscenze genetiche delle AIDs hanno raggiunto livelli elevati, con l'identificazione a oggi di almeno 40 geni certamente causativi di AIDs.

A oggi è noto che, tranne in pochi casi, le AIDs rappresentano, dal punto di vista genetico, un gruppo di malattie monogeniche a ereditarietà mendeliana, i cui geni responsabili codificano per molecole distribuite nei diversi pathways infiammatori e che interagiscono variamente con il sistema immunitario. Il sistema immunitario innato si basa sull'identificazione di segnali di allarme da parte di recettori di riconoscimento dei profili molecolari (PRR), come i recettori legati alla membrana (Toll-like-receptors, TLR) e i sensori intracellulari (nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors, NLRs, e retinoico acid-inducibile gene 1 receptor (RIG)-like receptors, RLRs). Le mutazioni dei geni che codificano per tali recettori determinano una disregolazione immunitaria che causa un fenotipo autoinfiammatorio, come delineato di seguito [1]:

1. *Mutazioni GOF (Gain-of-Function) in geni che codificano per i PRR (pattern recognition receptors), denominati "sensori" che riconoscono e/o rispondono a segnali di pericolo microbici o intracellulari, o mutazioni nei loro adattatori, che portano a un aumento della produzione di mediatori infiammatori: NLRP3, MEFV, NLRC4 e NLRP1, collegati ad aumento della produzione di IL-1; TMEM173/STING, collegati ad aumento di produzione di interferone di tipo I (IFN); NLRC4 che portano a un'elevata produzione di IL-18, fondamentale per lo sviluppo della sindrome da attivazione macrofagica (MAS); CARD14 con attivazione del fattore nucleare kappa B (NF-κB).*
2. *Mutazioni LOF (Loss-of-Function) nelle molecole che controllano il pathway di omeostasi cellulare che risultano in un alterato adattamento e stress cellulare: componenti del proteasoma (PSMB8, PSMB9, PSMA3, PSMB4, POMP); molecole che regolano la funzione mitocondriale (TRNT1)*

e la produzione/segnalazione di stress ossidativo (*LACCI*); regolatori del traffico intracellulare (*MVK*, *TNFRSF1A*); molecole implicate nell'autofagia (*NOD2*) e differenziazione cellulare (*ADA2*); molecole implicate nel metabolismo/degradazione dei nucleotidi (*TREX1*, *ADAR*).

3. **Mutazioni LOF che risultano in regolazione negativa della risposta immunitaria:** regolatori negativi della funzione dei recettori delle citochine (*IL1RN*, *IL36RN*) o perdita di una citochina antinfiammatoria o della sua funzione (*IL10*); difetti di deubiquitinazione, che aumentano il signaling di NF- $\kappa$ B (*OTULIN*); perdita della funzione cellulare dei natural killer (NK).
4. **Aumento del signaling attraverso recettori che controllano la funzione delle cellule dell'immunità innata,** che porta a una aumentata risposta ai segnali immuni (*PLAID/APLAID*). Siccome le anomalie di signaling influenzano le cellule immunitarie sia innate che adattative, i pazienti con mutazioni a carico di queste ultime molecole spesso presentano caratteristiche cliniche sovrapposte di autoinfiammazione, immunodeficienze lievi e/o autoimmunità.

Dal punto di vista ereditario, si tratta, come detto, per lo più di malattie monogeniche a ereditarietà autosomica dominante (AD) e autosomica recessiva (AR). Ma anche altri modelli di trasmissione sono stati dimostrati, quali forme a "mosaico somatico" (come in alcune criopirinopatie da mutazioni del gene *NLRP3*), eredità digenica (come nella sindrome CANDLE), ovvero patologie in cui alterazioni epigenetiche sono state dimostrate partecipare alla determinazione del fenotipo clinico (FMF, criopirinopatie e alcuni disordini autoinfiammatori complessi) [2]. Di seguito sono riportati gli aspetti genetici delle AIDs di maggiore rilievo, nonché alcuni aspetti peculiari di ereditarietà.

La febbre mediterranea familiare (FMF, OMIM # 249100 e # 134610) è il più comune disturbo autoinfiammatorio monogenico, data l'alta frequenza di mutazioni a carico del gene re-

sponsabile (*MEFV*, OMIM \* 608107) nel bacino del mediterraneo orientale, con una prevalenza di portatori in tale popolazione pari a 1/6-1/10. È evidente che una così alta prevalenza del portatore debba essere determinata da un fattore esterno, ambientale, che causi una pressione selettiva sulla popolazione, determinando un vantaggio del portatore della mutazione rispetto al resto della popolazione. Infatti, alcuni studi, dimostrando un'attivazione dell'inflammasoma caspasi 1 pirina-mediato in risposta all'infezione da *Clostridium difficile*, e poi, più recentemente, all'infezione da *Yersinia pestis*, hanno permesso di chiarire tale meccanismo. La peste, infatti, è stata in passato una patologia molto frequente nelle popolazioni dell'area mediterranea orientale, crocevia delle popolazioni provenienti dall'Asia portatrici dell'agente infettivo della peste, e tali studi hanno dimostrato come lo stato di portatore di mutazione di *MEFV* rappresentasse un fattore protettivo nei confronti della malattia [3]. Il gene *MEFV* è localizzato nella regione cromosomica 16p13.3, codifica per la proteina pirina/marenostrina, ampiamente espressa nei neutrofili, negli eosinofili e nei monociti dopo l'attivazione citochinica, e agisce come un sensore dell'immunità innata, innescando la produzione di mediatori infiammatori durante processi infettivi. La FMF è classicamente considerata una malattia a trasmissione autosomica recessiva, dato che nella maggior parte dei pazienti vengono identificate due mutazioni a carico del gene *MEFV*, in una condizione di omozigosi o eterozigosi composta. Tuttavia, data l'esistenza di famiglie con chiara trasmissione autosomica dominante e pazienti affetti con solo una mutazione rilevabile (fino al 30% dei casi), la FMF dovrebbe in realtà essere considerata come una malattia a trasmissione autosomica dominante a bassa penetranza con un possibile "effetto dose" nei pazienti portatori di una singola mutazione a bassa penetranza, rispetto a quelli con due mutazioni ad alta penetranza, in cui la malattia si manifesta in tutti i soggetti. Il contributo di geni modificatori, quali alcuni polimorfismi del gene A della sieroaamiloi-

### Box 1. Glossario

**Positional cloning.** Si tratta di una tecnica di laboratorio utilizzata per localizzare la posizione di un gene associato alla malattia lungo il cromosoma. Questo approccio funziona anche quando sono disponibili poche o nessuna informazione sulle basi biochimiche della malattia.

**Gain-of-function (GOF).** Tipo di mutazione in cui il prodotto genico alterato possiede una nuova funzione molecolare o un nuovo modello di espressione genica, con aumento/acquisto di funzione. Le mutazioni GOF sono quasi sempre dominanti o semidominanti.

**Loss-of-function (LOF).** Un tipo di mutazione in cui il prodotto genico alterato manca della funzione molecolare del gene wild-type, ovvero la sua funzione è ridotta. Queste mutazioni sono tipicamente ereditate in modo recessivo. Sinonimi: mutazione ipomorfa, mutazione nulla.

**Omozigote.** Lo stato di un locus diploide in cui alleli identici sono presenti in entrambe le copie di quel locus.

**Eterozigote.** Lo stato di un locus diploide in cui alleli diversi sono presenti nelle due copie di quel locus (di solito uno è normale e l'altro è anormale).

**Doppio eterozigote.** La presenza di due diversi alleli mutati in due loci genetici separati.

**Eterozigote composto.** La presenza di due alleli recessivi per lo stesso locus genetico, ma diversi l'uno dall'altro.

**Mutazioni in cis e in trans.** Le mutazioni/varianti in cis indicano la presenza di entrambe le mutazioni/varianti sullo stesso allele di un gene, in un individuo. Le mutazioni/varianti in trans indicano la presenza di una delle due mutazioni/varianti su un allele di un gene e l'altra sull'altro allele dello stesso gene, in un individuo. La determinazione della fase delle mutazioni/varianti è stabilita mediante studio della segregazione parentale, ovvero il modo in cui le mutazioni/varianti sono presenti nei genitori: entrambi nello stesso genitore (cis) o ciascuna in un genitore (trans). Ciò è fondamentale per interpretare il contributo delle due mutazioni/varianti nelle condizioni autosomiche recessive (che risultano patogenetiche per lo più se ereditate in trans).

**Penetranza incompleta/ridotta (bassa penetranza).** La penetranza si riferisce alla probabilità che una condizione clinica si verifichi quando è presente un particolare genotipo: penetranza incompleta/ridotta (bassa penetranza) indica che non tutti gli individui portatori di un determinato genotipo esprimano la malattia.

**Ereditarietà digenica.** L'ereditarietà digenica si riferisce alla presenza di mutazioni patogenetiche in due geni diversi, codificanti però proteine dello stesso pathway, interagenti, e causanti la malattia.

**Mosaicismo.** Presenza di due o più linee cellulari con diversa composizione genetica o cromosomica, all'interno di un singolo individuo o tessuto, allorché la mutazione si verifica in fase post-zigotica. È detto "somatico" se si manifesta nelle cellule somatiche di un individuo, "germinale" se si manifesta nei gameti. In tal caso può essere responsabile di mutazioni *de novo* nella prole.

**Reverse phenotyping.** Processo mediante il quale la rivalutazione dei dati genetici consente di modificare o adattare la diagnosi clinica, consentendo un diverso approccio diagnostico e/o terapeutico.

de (SAA), sembra ulteriormente variare l'espressione di malattia [4-6]. Alcune specifiche mutazioni (H478Y, T577S, T577A, T577N, M694del, M694I, E148Q e L110P) sono state identificate come causative di forme di FMF dominante in pazienti di diverse popolazioni. D'altra parte, è stato dimostrato che anche fattori ambientali possono avere un effetto sull'espressione fenotipica della malattia. Si è visto, per esempio, che il luogo di residenza di popolazioni provenienti dalla stessa area geografica sembra avere un effetto non trascurabile sul fenotipo, così come le differenze di composizione del microbiota. Un altro approccio interessante che riguarda la diversa espressione di malattia nella FMF è quello degli studi epigenetici. È stato infatti riportato che un aumento di metilazione del DNA del gene *MEFV* porta a una ridotta espressione dello stesso gene nei leucociti di pazienti affetti da FMF. È stato inoltre dimostrato che alcuni microRNA (miRNA) maturi presentano una diversa espressione in soggetti affetti rispetto alla popolazione generale, alcuni dei quali implicati nell'immunità innata. A oggi, più di 380 varianti del gene *MEFV* sono state identificate e sono riportate sul database Infervers [<https://infervers.umai-montpellier.fr/web/index.php>]. Di queste, 62 sono classificate come patogenetiche o verosimilmente patogenetiche, 135 benigne o verosimilmente benigne, 113 di significato incerto (VUS), il resto di significato indeterminato. La maggior parte delle mutazioni del gene *MEFV* è localizzata nell'esone 10, e in minor numero nell'esone 2. Uno dei problemi principali nella diagnostica della FMF è il riscontro nei pazienti di numerose VUS (circa il 30% delle varianti riscontrate), il che complica la diagnosi da parte del clinico. Si tratta per esempio di varianti genetiche associate a un tipico fenotipo autoinfiammatorio, ma prive di dati significativi sulla segregazione familiare, oppure di varianti rare/nuove, associate alla forma recessiva, riportate in pazienti con quadro clinico di sindrome autoinfiammatoria multifatoriale, ovvero di varianti a effetto sub-patogeno, quale la p.(E148G). Queste varianti potrebbero in realtà costituire semplicemente fattori di rischio infiammatorio generico o specifico di FMF, la cui espressione clinica dipende da ulteriori fattori genetici/ambientali. È di facile intuizione che una diagnosi certa di FMF, così come di altre AIDs, risulta indispensabile soprattutto per gli aspetti terapeutici, per cui sono necessari criteri clinici sufficienti, al di là della definizione genotipica, per iniziare il trattamento specifico [6-8].

Le sindromi periodiche associate alla criopirina (CAPS), attualmente nominate malattie autoinfiammatorie *NLRP3*-associate (*NLRP3*-AIDs), che includono la sindrome familiare da orticaria da freddo (FCAS), OMIM # 120100, la sindrome di Muckle-Wells (OMIM # 191900) e la sindrome CINCA (sindrome infantile neurologica cutanea articolare cronica, nota anche come malattia infiammatoria multisistemica a esordio neonatale, NOMID, OMIM # 607115), sono malattie autoinfiammatorie estremamente rare, a ereditarietà di tipo autosomico dominante. Sono dovute mutazioni del gene *NLRP3* (OMIM \* 606416), localizzato sul braccio lungo del cromosoma 1 (1q44), che agiscono secondo un meccanismo di GOF, causando una iperattività costitutiva dell'inflammasoma, con attivazione della caspasi-1 e un rilascio eccessivo non controllato di IL-1 $\beta$ . Dal punto di vista clinico, le CAPS costituiscono uno spettro di condizioni con crescente severità dalla FCAS alla sindrome di Muckle-Wells, fino alla NOMID/CINCA. A oggi, un totale di 177 varianti del gene *NLRP3* sono state incluse nel database Infervers, la maggior parte delle quali si trova negli esoni 3 e 4 e nell'introne 4 [9]. Nonostante nelle CAPS sia descritta una correlazione genotipo-fenotipo, sono riportati diversi casi di soggetti affetti con la stessa mutazione e fenotipi diversi. Inoltre, alcune mutazioni di *NLRP3* sono state descritte in soggetti sani con nessun segno di CAPS, come le varianti V198M e Q703K. In conclusione, come nelle altre AIDs, i polimorfismi funzionali possono essere considerati mutazioni

a bassa penetranza, in grado di influenzare in alcuni casi l'attività del prodotto genico e determinare espressioni variabili di malattia. La presenza di fenotipi altamente eterogenei in pazienti con genotipi identici, ovvero di un consistente numero di casi (fino al 40% di pazienti NOMID/CINCA) considerati "orfani genetici" (cioè pazienti senza identificazione di una mutazione associata), dimostrano la necessità di migliorare le conoscenze dei meccanismi fisiopatologici sottostanti, inclusa l'implicazione di fattori ambientali. In alcuni di questi casi, è stata infatti dimostrata l'esistenza di un mosaicismismo somatico, limitata al compartimento mieloide, mentre prove di una disregolazione epigenetica stanno iniziando a emergere da studi recenti. In particolare è stato dimostrato che alcuni miRNA sono significativamente down-regolati in alcune lesioni cutanee di pazienti affetti da NOMID/CINCA, mentre altri miRNA appaiono up-regolati. Altre evidenze dimostrano che l'attivazione di monociti e macrofagi da parte di stimoli infiammatori, quale la IL-1 $\beta$ , determina una demetilazione di diverse molecole correlate all'inflammasoma nei pazienti con CAPS non trattati, e che il trattamento con anti-IL-1 $\beta$  determina un ripristino del corretto pattern di metilazione [8,10].

La sindrome periodica associata al recettore 1 del fattore di necrosi tumorale (*TRAPS*, OMIM # 142680), nota in passato come febbre familiare iberniana (FHF), è una malattia molto rara inizialmente descritta in famiglie di origine irlandese e scozzese. La diagnosi clinica deve essere confermata dall'individuazione di mutazioni a carico del gene *TNFRSF1A* (OMIM \* 191190), localizzato in 12p13.31. La maggior parte delle varianti di sequenza identificate nei pazienti con TRAPS si trovano negli esoni 2-4 [<https://infervers.umai-montpellier.fr/web/index.php>]. Le sostituzioni missenso che interrompono i legami disolfuro cisteina-cisteina, strutturalmente importanti nel dominio extracellulare, e altre mutazioni, quali la T50M, sono note come varianti strutturali, data la loro capacità di alterare la struttura recettoriale tridimensionale. Queste mutazioni sono associate a fenotipi più severi e a insorgenza più precoce. Viceversa, due varianti frequenti, la R92Q (nomenclatura comune per identificare la variante p.Arg121Gln, situata nell'esone 4) e la P46L (nota anche come p.Pro75Leu, situata nell'esone 3) sono note causare un fenotipo variabile di TRAPS. La sostituzione P46L è stata riscontrata fino al 20% in individui clinicamente asintomatici in alcune popolazioni dell'Africa occidentale, il che suggerisce che questa rappresenti un polimorfismo piuttosto che una variante causativa di malattia, mentre la sostituzione R92Q, relativamente comune nella popolazione caucasica, rappresenta una variante a bassa penetranza, che sembra determinare un fenotipo lieve di malattia con una prognosi a lungo termine migliore. Pertanto queste varianti che possono essere osservate in familiari asintomatici di individui affetti, ma anche in individui sani, sono state recentemente classificate come varianti a bassa penetranza [10-12].

Il deficit di *mevalonato chinasi* (*MKD*, OMIM # 260920), precedentemente chiamato sindrome da iperimmunoglobulina d (HIDS), è stato descritto per la prima volta nel 1984, per il riscontro di livelli di IgD sierici aumentati in alcuni pazienti, il che ha permesso l'individuazione di questa condizione ereditaria a trasmissione autosomica recessiva. Il gene mutato è *MVK* (*mevalonato chinasi*, OMIM \* 251170) che mappa in 12q24.11 e codifica per un enzima della via del colesterolo, la mevalonato chinasi, la cui carenza parziale è alla base del fenotipo *MKD*, mentre la carenza completa è causa di una malattia pediatrica, l'aciduria mevalonica, che determina oltre a sintomi di ritardo di crescita e di sviluppo e patologia d'organo, anche attacchi infiammatori tipici di HIDS. La maggior parte dei pazienti con aciduria mevalonica presenta almeno un allele con la variante V377I o I268T a carico del gene *MVK* [13].

Un discorso a parte merita la Febbre periodica, Stomatite aftosa, Faringite, Adenite (PFAPA), che rappresenta di fatto la sindrome da febbre periodica più comune nei bambini, al di fuori delle regioni con un'alta prevalenza di FMF. Il riscontro di clustering familiari di PFAPA ha spinto a ipotizzare una sua eziologia genetica e a ricercare mutazioni o varianti a carico di geni possibilmente responsabili, ipotizzando che la PFAPA potesse essere un disturbo monogenico, come altre febbri periodiche. Peraltro, è stato dimostrato che l'83% dei pazienti con MKD, il 57% dei pazienti con TRAPS e l'8% dei pazienti con FMF soddisfacevano i criteri clinici per PFAPA, e che in pazienti con PFAPA veniva riscontrata un'alta frequenza di varianti *MEFV* (27%). D'altro canto, è stato rilevato che tra i pazienti che non rispondevano o rispondevano parzialmente alla tonsillectomia, circa il 50% avevano mutazioni di *MEFV*. Lo step successivo è stato il sequenziamento dell'intero esoma, che tuttavia non è riuscito a identificare varianti rare e ad alta penetranza di un singolo o più geni specifici in famiglie con PFAPA. Si è quindi cercato di identificare varianti geniche di suscettibilità, che potessero cioè aumentare il rischio di un individuo di sviluppare una PFAPA: anche questo tentativo è risultato infruttuoso. Pertanto, a oggi, la PFAPA è considerata un disordine multifattoriale le cui basi genetiche appaiono spesso complesse, e in cui ciascuna mutazione a carico di un singolo gene, qualora identificata, può contribuire a conferire una parte di rischio individuale di sviluppare malattia. Si tratta per lo più di varianti geniche a bassa penetranza, specie a carico di geni correlati all'inflammasoma, accompagnate da fattori epigenetici e ambientali. A questo proposito, recentemente, al fine di identificare le mutazioni a rischio per PFAPA, è stata esaminata una coorte di 231 individui di origine europea affetti da PFAPA per sette mutazioni a rischio, precedentemente associate ad altri 2 disturbi infiammatori caratterizzati da ulcere orali, la malattia di Behçet e l'afiosi ricorrente con ulcere (RAU). In tali pazienti sono state riscontrate alcune varianti a carico dei geni *IL12A*, *IL10*, *STAT4*, e *CCR1-CCR3*, fortemente associate anche a PFAPA, suggerendo che gli individui affetti da PFAPA hanno una aumentata attivazione linfocitaria CD4+ Th1 e Th17, in particolare durante le riacutizzazioni di malattia, con una aumentata produzione di IL12. La variante di rischio di *IL12A* è associata a un'elevata produzione da parte dei monociti di IL-12, confermando il processo di attivazione della cascata infiammatoria. Anche la variante a rischio per PFAPA di *STAT4* (che codifica per una proteina di segnale a valle del recettore di IL-12) è risultata essere associata a elevati livelli di espressione della proteina. Viceversa, per il gene *IL-10*, che codifica per una citochina antinfiammatoria, la variante genetica a rischio di PFAPA è associata a una diminuzione dell'espressione genica della proteina, così come la variante correlata al locus *CCR1-CCR3*. Anche l'HLA, fortemente correlato al rischio per la malattia di Behçet e altre malattie reumatologiche, sembra essere un fattore di rischio per PFAPA. Infatti, alcuni alleli HLA di classe I e II sono stati significativamente associati a PFAPA, diversi tuttavia da quelli della malattia di Behçet o della RAU [14-15]. Le SURF (sindromi da febbre ricorrente indifferenziata) sono un gruppo di AIDs caratterizzate da episodi autolimitanti di infiammazione sistemica, senza individuazione di una base genetica specifica, che non soddisfano i criteri di Febbri ricorrenti ereditarie (HRF) o PFAPA. Una recente review sistematica della letteratura ha analizzato, oltre agli aspetti clinici dei pazienti SURF, anche i risultati dei test genetici effettuati. In particolare, sono state riportate un totale di più di 1100 varianti, con un range di presenza di variante di 0,2-6,5 per paziente. Il tasso mediano di rilevamento di una variante patogena o probabilmente patogena in un paziente AIDs indefinito era del 20%. Il numero di pazienti AIDs indefiniti restava piuttosto alto anche mediante un approccio NGS o di sequenziamento dell'esoma (WES) (73% in uno studio). Nessuno

studio che utilizzi un approccio di sequenziamento dell'intero genoma (WGS) in pazienti AIDs non definiti è stato a oggi pubblicato [16].

Tra i modelli di trasmissione ereditaria riscontrati nelle AIDs, l'ereditarietà digenica è certamente un meccanismo di nuova implicazione e di estremo interesse. Per ereditarietà digenica si intende la presenza di mutazioni/varianti patogenetiche in due geni codificanti per proteine interagenti dello stesso pathway, come causa di una malattia. Grazie al sequenziamento di nuova generazione ad alta efficienza sono state identificate numerose VUS potenzialmente implicate in questo tipo di trasmissione. La sindrome CANDLE (chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature detta anche PRAASI, OMIM # 256040) è una malattia autoinfiammatoria caratterizzata dalla comparsa di febbre ricorrente nei primi mesi di vita, insieme a caratteristiche lesioni cutanee, lipodistrofia e manifestazioni di infiammazione multisistemica. Mutazioni in diversi geni che codificano per le subunità proteiche del sistema proteasoma-immunoproteasoma ne sono la causa, determinando disfunzione del sistema. In particolare, mutazioni in omozigosi o doppia eterozigosi a carico del gene *PSMB8* (che mappa in 6p21.32), che codifica per la subunità  $\beta 5$  dell'immunoproteasoma, sono state identificate in molti pazienti CANDLE, causando una forma per lo più severa di malattia. Altri geni coinvolti sono *PSMB4*, *PSMA3*, *PSMB9*, *POMP*. Mutazioni in combinazione in due geni diversi quali *PSMA3/PSMB8*, *PSMB9/PSMB4* o *PSMB8/PSMB4* sono state identificate, configurando un'eredità digenica, con effetto fenotipico variabile [17].

Il contributo dell'epigenetica nell'espressione fenotipica di malattia nelle AIDs è stato dimostrato in alcune condizioni, ed è verosimile una sua sempre maggiore implicazione nell'interpretazione di fenotipi di malattia, specie in quelle ancora prive di geni responsabili identificati. L'epigenetica è genericamente definita come un cambiamento mitoticamente ereditabile, che influenza l'espressione dei geni senza modificare la sequenza del DNA del genoma. È noto che, a causa delle loro connessioni a monte con i fattori di trascrizione e le vie di signaling, i fattori epigenetici mediano interazioni tra ambiente (segnali extracellulari) e genoma. I principali meccanismi epigenetici comprendono la metilazione del DNA, gli RNA non codificanti (ncRNA), le modificazioni istoniche e il rimodellamento della cromatina. Questi vari meccanismi epigenetici sono stati dimostrati nelle diverse AIDs [Tabella 1]. In alcuni disturbi monogenici, come la FMF, studi che confrontano pazienti con ascendenza comune che vivono in aree geografiche diverse, quali la Turchia o la Germania, hanno permesso la determinazione dell'impatto dell'ambiente sulla gravità delle FMF, determinando un contributo ambientale del 12% nella determinazione del fenotipo. Inoltre è stato riportato che l'aumento di metilazione del DNA del gene *MEFV* porta a una sua ridotta espressione nei leucociti periferici di pazienti FMF rispetto a controlli sani. Anche nel caso di altri disturbi monogenici autoinfiammatori, sta iniziando a emergere da recenti studi l'evidenza di una disregolazione epigenetica. L'analisi di biopsie cutanee di pazienti NOMID/CINCA, che mettono a confronto lesioni cutanee di affetti sia con pelle non lesionale che con pelle di soggetti non affetti, è suggestiva di una disregolazione epigenetica, in particolare a carico di geni che codificano per proteine istoniche ed enzimi che modificano gli istoni. Inoltre, alcuni miRNA sono risultati significativamente down-regolati nelle lesioni, mentre altri sono risultati up-regolati. Di estremo interesse è quello che è stato recentemente descritto sull'attivazione dei monociti e macrofagi da parte di stimoli infiammatori, come le citochine GM-CSF e IL-1 $\beta$ . Ulteriori indagini sullo stato di metilazione dei geni inflammasoma-correlati in pazienti CAPS e FMF hanno dimostrato che la demetilazione di tali geni è esacerbata nei pazien-

**Tabella 1. Disordini autoinfiammatori ed evidenze del contributo epigenetico nella malattia**

Gene mutato	Malattia	Citochina effettrice	Dati sulla regolazione epigenetica
<b>Febbri periodiche ereditarie monogeniche</b>			
MEFV	FMF	IL-1 $\beta$	Sì
TNFRSF1A	TRAPS	IL-1 $\beta$	No
MVK	MKD	IL-1 $\beta$	No
NLRP3	CAPS FCAS S. Muckle-Wells NOMID/CINCA	IL-1 $\beta$	Sì
NLRC4	NLRC4-MAS	IL-1 $\beta$ /IL-18	No
PSTPIP1	PAPA	IL-1 $\beta$	No
NLRP12	FCAS2	IL-1 $\beta$	No
<b>Difetti degli antagonisti</b>			
IL1RN	DIRA	IL-1 $\beta$	No
IL36RN	DITRA	IL-36	No
<b>Disordini autoinfiammatori complessi</b>			
	Behçet	IL-6/IL-1 $\beta$	Sì
	CMO/CRMO	IL-10/IL-1 $\beta$	Sì
	Crohn	IL-19/IL-3/IL-27	Sì

CAPS, Cryopyrin-associated periodic syndromes; FCAS, Familial cold autoinflammatory syndrome, NOMID/CINCA, neonatal-onset multisystem inflammatory disease; CMO/CRMO, chronic recurrent multifocal osteomyelitis.

ti con CAPS non trattate e che la normale metilazione veniva ripristinata dal trattamento con anti-IL-1 $\beta$ . Nel caso della CRMO, una AIDs che colpisce l'osso, è stato descritto uno squilibrio tra segnali proinfiammatori e segnali regolatori. In particolare è stato dimostrato che la diminuzione dell'espressione di *IL10* sia da attribuire a una disregolazione epigenetica, con un aumento dell'infiammazione all'interno dell'osso. Sembra inoltre che la ridotta espressione di *IL10* si verifichi attraverso una alterazione del rimodellamento della cromatina a livello del promotore prossimale di *IL10*. Ciò suggerisce che la regolazione epigenetica contribuisca allo squilibrio proinfiammatorio complessivo nella CRMO e alla sua fisiopatologia [8,18].

**La diagnosi genetica delle AIDs**

Per la diagnosi delle forme monogeniche di AIDs, una precisa definizione clinica dei pazienti è fondamentale, così come l'identificazione di varianti altamente penetranti in singoli geni. Dato che una diagnosi attendibile di AID è fondamentale per l'accesso precoce al trattamento specifico, e dato che le manifestazioni delle diverse malattie possono sovrapporsi, la diagnosi è altamente dipendente dai test genetici. A tale scopo sono stati redatti registri per i pazienti con AIDs (Eurofever) e per varianti dei geni AIDs (Infervers) [https://infervers.umai-montpellier.fr/web/index.php]. Tuttavia, dato che le cause genetiche delle AIDs rimangono spesso poco chiare, test genetici limitati a un piccolo numero di geni sono di fatto insufficienti per aumentarne il tasso di diagnosi. La resa diagnostica complessiva dei test genetici è infatti ancora attualmente poco soddisfacente. In un recente studio essa è stimata intorno al 20,8%, mentre

**Box 2. Punti chiave e cosa abbiamo imparato**

- Le basi genetiche delle AIDs sono sempre meglio conosciute, grazie alle nuove tecnologie biomediche, in particolare alle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS).
- L'analisi simultanea dei diversi geni associati alle AIDs consente attualmente un'accurata diagnosi genetica, anche se a oggi molti pazienti non hanno ancora una definizione genotipica.
- La mancata definizione genotipica non consente un approccio terapeutico mirato, che viene tuttavia effettuato sulla base del quadro clinico.
- Meccanismi diversi da quelli genetici classici, quali mosaicismi somatici, variazioni epigenetiche, ereditarietà digenica, consentono di spiegare situazioni in cui una causa genetica non sia stata ancora definita.
- L'interpretazione dei test genetici è complessa e richiede una stretta collaborazione tra il clinico e il genetista.

nel 43,2% sono state identificate VUS che potrebbero diventare clinicamente rilevanti in futuro. Una resa positiva più elevata è stata riportata in studi con una scelta più selettiva nella coorte di pazienti. Per esempio, una resa diagnostica del 36% è stata osservata in coorti con un alto tasso di consanguineità. L'utilizzo del WES per il singolo individuo o per il WES in trio (che cioè include l'analisi dei genitori) è stato utilizzato in alcuni studi con un rendimento diagnostico mediamente più elevato rispetto all'utilizzo di pannelli genetici, mentre altri studi non hanno riscontrato lo stesso miglioramento di resa diagnostica. Nella scelta della tipologia dei test vanno naturalmente considerati anche i costi dell'analisi, che nel WES in trio sono più che raddoppiati rispetto al test in singolo [19].

In una recente review sono state analizzate le principali problematiche riguardo i test genetici nelle AIDs e forniti una serie di suggerimenti operativi. Tra questi, l'interazione tra clinico e laboratorio di genetica è indispensabile per un risultato diagnostico ottimale, anche attraverso l'inoltro di dati clinici e il confronto sull'esito dei test genetici in relazione al quadro clinico del paziente. Questo può determinare talora un processo di reverse phenotyping che consenta di arrivare a una diagnosi clinica diversa se rivalutata sulla base dei dati genetici, con possibili implicazioni terapeutiche. Il confronto tra clinico e genetista permette inoltre di stabilire la necessità di una riconsiderazione dei dati genetici ovvero un prosieguo dell'iter diagnostico mediante indagini genetiche ulteriori. Un aspetto importante da definire è l'opportunità di eseguire o meno il test genetico nelle diverse situazioni cliniche. Per esempio, in caso di diagnosi predittiva in pazienti asintomatici nel contesto di una situazione familiare di malattia, l'esecuzione di test genetici è indicata, poiché sia il background genetico che quello ambientale possono modificare l'espressività del genotipo familiare. Per malattie con rischio di danni irreversibili (gravi NLRP3-AIDs a rischio di lesioni del SNC o amiloidosi, o DADA2, con rischio di ictus), il test predittivo di individui asintomatici può essere giustificato e dovrebbe essere discusso in un team multidisciplinare di esperti, dato che il follow-up delle persone a rischio può evitare l'insorgenza di complicazioni gravi o potenzialmente letali. Riguardo la diagnosi prenatale/preimpianto, questa non è raccomandata in famiglie senza storia di AIDs gravi o individuazione di varianti/mutazioni certamente responsabili del fenotipo clinico, visto che i dati genetici possono risultare inconcludenti in caso di genotipi a penetranza ridotta o nuove VUS. Riguardo la strategia diagnostica, le tecnologie usualmente utilizzate sono il sequenziamento in Sanger e/o in NGS di un gene specifico, quando nel paziente sono presenti i criteri clinici di diagnosi di una certa condizione o la positività di un test biochimico/biomarcatore di malattia, ov-

vero lo studio di pannelli genetici mediante NGS o l'esecuzione del WES, nel caso di fenotipi meno chiari o con manifestazione clinica non caratteristica. L'esito dei test di sequenziamento va interpretato secondo le linee guida attuali [20-21].

### Conclusioni

Le AIDs costituiscono un gruppo di disordini per lo più a ereditarietà mendeliana, le cui basi genetiche sono progressivamente sempre meglio conosciute. Tuttavia, ancora oggi un numero consistente di pazienti non ha ricevuto di fatto una diagnosi genetica precisa. Per di più, il rilevamento di un sempre maggior numero di varianti a carico dei geni analizzati ha reso l'interpretazione dei risultati più complicata, nonostante l'utilizzo di strumenti informatici avanzati di analisi. Fortunatamente, ulteriori conoscenze degli aspetti genetici e funzionali delle AIDs, come per esempio quelle nell'ambito dell'epigenetica e dell'interazione con l'ambiente, stanno progressivamente e ulteriormente allargando il grado di comprensione delle AIDs e potrebbero costituire in tempi brevi la nuova strada per migliorare gli aspetti diagnostici, mediante l'individuazione di nuovi marcatori di malattia, e terapeutici, utilizzando nuovi approcci di trattamento che tengano in considerazione anche questi nuovi aspetti di conoscenza. ■

### Bibliografia

1. Goldbach-Mansky R, de Jesus AA. Classification of Genetically Defined Autoinflammatory Diseases. In Hashkes P, Laxer R, Simon A (eds). *Textbook of Autoinflammation*. Springer, 2019.
2. Aksentijevich I, Soriano A, Hernández-Rodríguez J. Editorial: Autoinflammatory Diseases: From Genes to Bedside. *Front Immunol*. 2020 Jun 19;11:1177.
3. Park YH, Remmers EF, Lee W, et al. Ancient familial Mediterranean fever mutations in human pyrin and resistance to *Yersinia* pestis. *Nat Immunol*. 2020 Aug;21(8):857-867.
4. Nigrovic PA, Lee PY, Hoffman HM. Monogenic autoinflammatory disorders: Conceptual overview, phenotype, and clinical approach. *J Allergy Clin Immunol*. 2020 Nov;146(5):925-937.
5. Ozen S. Update in familial Mediterranean fever. *Curr Opin Rheumatol*. 2021 Sep 1;33(5):398-402.
6. Egeli BH, Ugurlu S. Familial Mediterranean Fever: Clinical State Of The Art. *QJM*. 2020 Oct 20;hcaa291.
7. Özen S, Batu ED, Demir S. Familial Mediterranean Fever: Recent Developments in Pathogenesis and New Recommendations for Management. *Front Immunol*. 2017 Mar 23;8:253.
8. Álvarez-Errico D, Vento-Tormo R, Ballestar E. Genetic and Epigenetic Determinants in Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2017 Mar 22;8:318.
9. de Torre-Minguela C, Mesa Del Castillo P, Pelegrín P. The NLRP3 and Pyrin Inflammasomes: Implications in the Pathophysiology of Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol*. 2017 Jan 27;8:43.
10. Martorana D, Bonatti F, Mozzoni P, et al. Monogenic Autoinflammatory Diseases with Mendelian Inheritance: Genes, Mutations, and Genotype/Phenotype Correlations. *Front Immunol*. 2017 Apr 3;8:344.
11. Georgin-Lavialle S, Fayand A, Rodrigues F, et al. Autoinflammatory diseases: State of the art. *Presse Med*. 2019 Feb;48(1 Pt 2):e25-e48.
12. Ruiz-Ortiz E, Iglesias E, Soriano A, et al. Disease Phenotype and Outcome Depending on the Age at Disease Onset in Patients Carrying the R92Q Low-Penetrance Variant in TNFRSF1A Gene. *Front Immunol*. 2017 Mar 27;8:299.
13. Rigante D. A systematic approach to autoinflammatory syndromes: a spelling booklet for the beginner. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017 Jun;13(6):571-597.
14. Asna Ashari K, Rezaei N. PFAPA (periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis) syndrome: an overview of genetic background. *Clin Rheumatol*. 2021 Nov;40(11):4437-4444.
15. Wang A, Manthiram K, Dedeoglu F, Licameli GR. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) syndrome: A review. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2021 Jun 27;7(3):166-173.
16. Papa R, Penco F, Volpi S, et al. Syndrome of Undifferentiated Recurrent Fever (SURF): An Emerging Group of Autoinflammatory Recurrent Fevers. *J Clin Med*. 2021 May 3;10(9):1963.
17. Torrelo A. CANDLE Syndrome As a Paradigm of Proteasome-Related Autoinflammation. *Front Immunol*. 2017 Aug 9;8:927.
18. Surace AEA, Hedrich CM. The Role of Epigenetics in Autoimmune/Inflammatory Disease. *Front Immunol*. 2019 Jul 4;10:1525.
19. Poker Y, von Hardenberg S, Hofmann W, et al. Genetics in inborn errors of immunity: pediatric autoinflammatory phenotypes and the underlying genetic causes in 125 families. 1 February 2022. <https://www.researchsquare.com/article/rs-1296021/v1>
20. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-424.
21. Shinar Y, Ceccherini I, Rowczenio D, et al. IAIDss/EMQN Best Practice Guidelines for the Genetic Diagnosis of Monogenic Autoinflammatory Diseases in the Next-Generation Sequencing Era. *Clin Chem*. 2020 Apr 1;66(4):525-536.