



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Biologia e Patologia Molecolare

Ciclo XXII

**GENOTIPIZZAZIONE DI MARCATORI DI SUSCETTIBILITA’  
MEDIANTE STUDIO CASO-CONTROLLO NELLE  
VASCULITI ANCA-ASSOCIATE E NELLA FIBROSI  
RETROPERITONEALE IDIOPATICA**

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Giancarlo Gazzola**

**Tutor:**

**Chiar.mo Prof. Giancarlo Gazzola**

**Dottorando:**

**Dott. Davide Martorana**

*A CHI MI HA AIUTATO,  
GRAZIE*

## **INDICE:**

<b>1. Riassunto</b>	pag. 4
<b>2. Introduzione</b>	pag. 5
2.1 Sindrome di Churg-Strauss	pag. 9
2.2 Granulomatosi di Wegener	pag. 13
2.3 Poliangite Microscopica	pag. 16
2.4 Fibrosi Retroperitoneale Idiomatica	pag. 20
2.5 Scopo del lavoro	pag. 23
<b>3. Pazienti, Materiali e metodi</b>	pag. 25
3.1 Pazienti	pag. 25
3.2 Materiali e Metodi	pag. 26
<b>4. Risultati</b>	pag. 35
<b>5. Discussione</b>	pag. 46
<b>6. Bibliografia</b>	pag. 62

## **1. RIASSUNTO**

Le vasculiti sono un gruppo eterogeneo di malattie autoimmuni che hanno in comune fenomeni flogistici e necrotici a carico delle pareti dei vasi, con conseguente ischemia e necrosi dei tessuti a valle. Possono essere primarie o secondarie e sistemiche o limitate ad un organo.

Nel presente studio sono state considerate 3 vasculiti dei piccoli vasi, definite ANCA-associate (Antineutrophil Cytoplasmic Antibody), in quanto presentano anticorpi anticitoplasma del nucleo dei neutrofili : Granulomatosi di Wegener (WG), Sindrome di Churg-Strauss (CSS) e Poliangeite microscopica (MPA). Oltre a queste tre è stata considerata anche la Fibrosi Retroperitoneale Idiopatica (IRF), patologia che per alcune caratteristiche è assimilabile alle vasculiti dei grandi vasi.

I pazienti (tutti di origine Italiana) sono stati reclutati in gran parte dalla U.O. Nefrologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, e i restanti da altre Aziende Ospedaliere e strutture Universitarie che hanno collaborato nello studio. I progetti sono stati approvati dal Comitato Etico Unico per la provincia di Parma.

La valutazione è stata basata sulle metodiche di discriminazione allelica mediante varie tecniche, fra le quali PCR Real-Time e sequenziamento del DNA. Le frequenze alleliche dei pazienti e dei controlli sono risultate essere tutte in equilibrio di Hardy-Weinberg. Gli studi caso-controllo sono stati analizzati mediante analisi statistica.

Gli studi sono iniziati nel 2005 ed hanno portato all'identificazione di diversi marcatori genetici associati alle patologie indagate, pubblicati su riviste internazionali peer-review.

Oltre a progetti nazionali, sono stati effettuati (e sono in corso tuttora) studi multicentrici europei volti ad indagare varianti di suscettibilità in tutto il genoma.

## **2. INTRODUZIONE**

Le vasculiti sono un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate da un processo infiammatorio che interessa la parete dei vasi sanguigni, che conduce ad alterazioni del flusso ematico e danneggia l'integrità del vaso. I vasi coinvolti possono essere di diverso tipo o calibro con conseguenze su uno o più organi o apparati. Le sindromi cliniche che ne derivano sono per lo più conseguenza dell'ischemia tissutale, del danno vasale e dell'infiammazione sistemica che portano a febbre, anoressia e calo ponderale ([www.sepriva.it](http://www.sepriva.it)).

In assenza di test specifici di laboratorio i primi tentativi di classificazione furono basati fondamentalmente sulle dimensioni dei vasi interessati. Nel 1990, dopo uno studio durato 10 anni, l'American College of Rheumatology propose i suoi criteri classificativi per le vasculiti primitive. In tale studio le vasculiti secondarie ad altre malattie (Lupus Eritematoso Sistemico, Artrite Reumatoide, Crioglobulinemia) non furono considerate, poiché esse erano, sia da un punto di vista clinico sia per le caratteristiche sierologiche, facilmente distinguibili dal gruppo delle vasculiti idiopatiche (Jennette et al., 1994).

Un anno dopo, alla Chapel Hill consensus conference (CHCC) (Hunder et al., 1990), usando criteri istopatologici basati sulle dimensioni dei vasi interessati, le vasculiti vennero riclassificate. Il risultato più evidente di questo lavoro fu l'identificazione di una nuova entità chiamata Poliangeite Microscopica (MPA). Come la Panarterite Nodosa (PAN) essa può interessare i vasi di piccolo e medio calibro ma, a differenza di quest'ultima, può coinvolgere anche le arteriole.

Inoltre, come la granulomatosi di Wegener (WG), la MPA può interessare polmoni e rene e condividere alcuni particolari markers sierologici: gli ANCA (Basu et al.) (Kallenberg, Brouwer, Weening, & Tervaert, 1994).

Gli ANCA, identificati da Davies nel 1982 in pazienti con glomerulonefrite necrotizzante segmentaria (Savigne, Yeung, Gallicchio, & Davies, 1989), rappresentarono un'importante passo in avanti nella comprensione della patogenesi delle vasculiti. Dal 1985 al 1989 una serie di studi documentarono che questi anticorpi erano diretti verso la proteinasi-3 contenuta nei granuli azzurrofilari dei neutrofilari, conferivano alle cellule una diffusa colorazione citoplasmatica (C-ANCA), erano estremamente sensibili (80-90%) e relativamente specifici (98%) per la WG (Hagen et al., 1996).

Il siero di pazienti con altre vasculiti può contenere ANCA ma, in genere, in un pattern perinucleare (P-ANCA). Infatti, il 50% dei casi di MPA sono C-ANCA positivi, mentre il rimanente è positivo per i P-ANCA. La specificità antigenica di questi ultimi è costituita dalla mieloperossidasi, un altro enzima contenuto all'interno dei granuli dei neutrofilari (Cohen et al., 1995).

Poiché i P-ANCA possono essere positivi in numerose altre patologie anche non vasculitiche come la colite ulcerosa, l'artrite reumatoide, la malattia di Crohn, l'epatite autoimmune, il valore predittivo positivo di questo pattern è più basso di quello dei C-ANCA.

La distinzione tra vasculiti primitive e secondarie nasce dal fatto che queste ultime sono coesistenti a malattie ben caratterizzate da un punto di vista patogenico e sierologico mentre le prime non hanno alcuna di queste caratteristiche (Cooper, Ben-Smith, Savage, & Winer, 2000).

In conformità a questa definizione rimangono numerosi dubbi sul fatto che alcune vasculiti fino ad ora considerate primitive come la WG non debbano invece, alla luce della caratterizzazione degli ANCA, essere classificate come secondarie. In ogni modo, nella maggioranza dei casi, un test specifico per la diagnosi di vasculite manca e la

diagnosi deve tuttora essere basata sulla dimensione dei vasi interessati e sulla presenza di quadri clinici e di laboratorio assolutamente non specifici.

### **Classificazione:**

Nel 1992, nel corso della Chapel Hill Consensus Conference (Jennette et al., 1994) è stata proposta la classificazione:

#### **Vasculiti dei piccoli vasi**

- Granulomatosi di Wegener (WG)
- Sindrome di Churg-Strauss (CSS)
- Poliangeite Microscopica (MPA)
- Porpora di Schonlein-Henoch
- Vasculite Crioglobulinemica
- Vasculite cutanea leucocitoclastica

#### **Vasculiti dei medi vasi**

- Panarterite Nodosa
- Malattia di Kawasaki
- Vasculite isolata del SNC

#### **Vasculiti dei grandi vasi**

- Arterite giganto-cellulare (arterite temporale)
- Arterite di Takayasu
- Fibrosi Retroperitoneale Idiopatica? (Vaglio, Pipitone, & Salvarani)

Tale classificazione era incentrata sulla dimensione dei vasi prevalentemente colpiti dal processo infiammatorio e includeva solo le sindromi a nosografia meglio definita, escludendo dunque le forme di incerto inquadramento, con manifestazioni da sovrapposizione e ovviamente le forme secondarie. Fu inoltre riconosciuta la MPA come nuova entità distinta dalle altre forme già note (Saleh & Stone, 2005). La classificazione della CHCC ha avuto il merito di fornire al clinico le linee guida generali (quando sospettare e dove effettuare la biopsia) nell'approccio diagnostico ai singoli quadri morbosi.

### **I sintomi**

La diagnosi di vasculite dovrebbe essere considerata in quei pazienti che si presentano con sintomi "sistemici" associati ad alterazioni di uno o più organi. I sintomi più comuni, per quanto privi di sensibilità e specificità, comprendono: facile affaticabilità, astenia, febbre, artralgie, dolori addominali, ipertensione, insufficienza renale (con sedimento urinario attivo) e alterazioni neurologiche (Saleh & Stone, 2005).

Considerata l'aspecificità delle manifestazioni cliniche e la possibilità di queste di simulare numerose altre malattie, la diagnosi di vasculite è spesso formulata con ritardo. A causa dell'enorme variabilità e aspecificità dei sintomi non è inoltre possibile formulare un metodo di valutazione univoco per tutti i pazienti sospettati di avere una vasculite. Solo l'anamnesi, l'esame obiettivo, i test di laboratorio insieme a procedure specifiche per ogni singola forma sospettata (ove presenti) permettono di formulare una diagnosi precisa (Fries et al., 1990).

Dal punto di vista genetico le vasculiti sono malattie poligeniche e multifattoriali, in cui una componente genetica è modulata da fattori ambientali; in particolare, i fattori genetici riguardano soprattutto polimorfismi genetici a singolo nucleotide (SNPs) che

mappano in geni legati all'immunità, tra cui il prevalente è l'Human Leukocyte Antigens (HLA), ma anche altri geni sono stati identificati (Arning et al., ; Carr, Clatworthy et al., 2009; Carr, Niederer et al., 2009; Hellmich, Epplen, & Gross, 2004; Monach & Merkel, ; Niederer et al., ; Willcocks, Lyons, Rees, & Smith).

## **2.1 SINDROME DI CHURG-STRAUSS**

La sindrome di Churg-Strauss (CSS) è definita come una vasculite necrotizzante dei piccoli e medi vasi, associata ad infiltrati tissutali extravascolari, granulomatosi ed eosinofili, coinvolgenti le vie aeree e caratterizzata da asma ed eosinofilia (> 10%) (Masi et al., 1990).

Quattro o più dei seguenti criteri classificativi, scelti dall'American College of Rheumatology nel 1990, permettono di distinguere la CSS dalle altre forme di vasculite con una sensibilità dell'85% ed una specificità del 99.7% (Cohen et al., 1995):

- asma
- eosinofilia
- anamnesi positiva per allergie eccetto che per le forme connesse ai farmaci
- mononeuropatie, mononeuriti multiple o polineuriti
- infiltrati polmonari migranti
- coinvolgimento dei seni paranasali
- infiltrati eosinofili extravascolari alla biopsia (questo quadro non è discriminante rispetto alle altre vasculiti)

I rash cutanei ed il coinvolgimento cardiaco non sono compresi in quanto hanno scarso valore discriminante. L'incidenza annua è di 3,3/milione (4,3/milione/anno per i maschi e 2,3/milione/anno per le femmine) (Manger et al., 1985), pari a quella della MPA ma

inferiore a quella della WG. L'età media di diagnosi di CSS è di 48 anni (+/- 14.6) (Manger et al., 1985), anche se la malattia in realtà esordisce molti anni prima.

L'evento iniziale nella patogenesi della malattia sembra essere l'attivazione di linfociti Th2 specifici per un allergene che, entrato attraverso la superficie mucosa, viene loro presentato in forma processata. I Th2 liberando IL-4 favoriscono la produzione di IgE specifiche in grado a loro volta di attivare eosinofili e mastociti. È tuttavia ancora da accertare il rapporto fra reazione di ipersensibilità immediata di tipo I e la formazione dei granulomi extravascolari e delle lesioni vasculitiche (Gross, 1997).

Altri meccanismi chiamati in causa possono essere:

- deposizione di immunocomplessi circolanti contenenti IgE (Manger et al., 1985)
- processi immunitari mediati dagli ANCA (Schmitt et al., 1998)

Nel caso particolare del danno neurologico, è stato visto che alcuni dei prodotti di degranolazione degli eosinofili (proteina cationica eosinofila, neurotossina eosinofila) sono dotati di neurotossicità diretta (Kallenberg, 2007).

La malattia può manifestarsi in modo graduale nel corso di molti anni, passando attraverso tre fasi, anche se l'evoluzione dall'una all'altra non sembra avvenire sempre in modo costante e secondo l'ordine classico qui riportato:

**a) Fase prodromica:** malattia allergica (rinite allergica, poliposi nasale, asma)

**b) Fase eosinofila:** decorre con andamento intermittente per alcuni anni: eosinofilia, infiltrati tissutali eosinofili (polmonite eosinofila cronica, gastroenterite eosinofila)

**c) Fase vasculitica:** la maggiore rapidità dello sviluppo di questa fase è associata ad una prognosi peggiore; la frequenza e la gravità degli attacchi asmatici in questa fase si attenuano notevolmente; le manifestazioni principali sono (Schmitt et al., 1998):

- Sistemiche: febbre, calo ponderale, astenia (70-100%)

- Respiratorie: infiltrati polmonari transitori e a chiazze (38-77%); versamento pleurico (25-50%)
- Cutanee: porpora palpabile, rash maculo-papulare, lesioni emorragiche, noduli cutanei e sottocutanei sulle braccia e cuoio capelluto (2-20 mm di diametro) (51-70%)
- Neurologiche (62%): mononeuriti multiple e polineuropatie inabilitanti, di lunga durata e spesso con remissione incompleta (53-75%); infrequente coinvolgimento dei nervi cranici (soprattutto neurite ottica ischemica); infarti ed emorragie cerebrali
- Cardiache (15-85%): pericardite, cardiomiopatie, infarto del miocardio, fino a insufficienza cardiaca da miocardite eosinofila granulomatosa fulminante (rappresentano la prima causa di morte nei pazienti con CSS)
- Gastrointestinali (37-62%): masse ostruttive gastrointestinali per la presenza di infiltrati sottomucosi, diarrea ed enterorragie da coinvolgimento della mucosa, peritonite eosinofila con ascite, vasculite mesenterica
- Muscolo-articolari (50%): mialgie; artralgie migranti, artriti (28-51%).
- Renali (16-49%): glomerulonefrite focale segmentale con aspetto necrotizzante e semilune, nefriti interstiziali (Sinico et al., 2006).

Tra le vasculiti necrotizzanti, la CSS ha migliore prognosi e maggiore sensibilità alla terapia steroidea.

La diagnosi di CSS si basa sulla clinica, sull'istologia e su esami di laboratorio come:

- eosinofilia
- PCR (proteina C-reattiva)
- ANCA (59%): c-ANCA (10-33%); p-ANCA anti-MPO (50-60%) (Sinico et al., 2005)

- AECA (anticorpi anti-endotelio) (70%)
- IgE elevate (75%)
- trombomodulina solubile
- recettore solubile per l'IL-2
- leucocitosi, anemia normocromica normocitica, iperglobulinemia, VES (velocità di eritrosedimentazione) elevata, immunocomplessi circolanti, lieve positività per il fattore reumatoide.

Studi di prevalenza degli ANCA e di osservazione dei quadri patologici, permettono di dividere i pazienti di CSS in due sottogruppi a seconda della loro positività ad anticorpi anticitoplasma dei neutrofilo (Kallenberg, 2005) (Muller Kobold, van der Geld, Limburg, Tervaert, & Kallenberg, 1999):

1. Il sottogruppo ANCA positivo presenta anche vasculite necrotizzante ai piccoli vasi.
2. Il sottogruppo ANCA negativo invece è caratterizzato da un'elevata incidenza di infiltrazione eosinofila ai polmoni, cuore e tratto gastrointestinale.

## **Genetica del CSS**

Negli ultimi anni sono state dimostrate chiare correlazioni fra la CSS e fattori genetici; la maggior parte di questi riguarda l'HLA, in particolare il gene DRB1\*04 (Wieczorek, Hellmich, Gross, & Epplen, 2008; Wieczorek, Holle, & Epplen), DRB4 (Vaglio et al., 2007), l'Interleuchina 5 (Horai et al.), l'Interleuchina 10 (Wieczorek, Holle, Bremer et al.), IRF5 (Wieczorek, Hellmich, Arning et al., 2008).

## **2.2 GRANULOMATOSI DI WEGENER:**

Descritta per la prima volta nel 1936, la granulomatosi di Wegener è una vasculite granulomatosa necrotizzante delle vie aeree con glomerulonefrite e vasculite sistemica dei piccoli e medi vasi. Gli organi classicamente coinvolti dalla malattia sono il tratto respiratorio superiore (seni paranasali, naso, orecchio e trachea), i polmoni e il rene. Altri organi frequentemente interessati dalla malattia sono l'occhio, la cute e i nervi periferici. Vi sono forme acute, fulminanti, forme subacute e casi subdoli in cui una sintomatologia è presente anni prima della diagnosi. Sono colpiti entrambe i sessi con eguale frequenza; l'età media di insorgenza è la quinta decade anche se la sindrome è stata descritta in quasi tutte le età (Pavone et al., 2006).

L'eziologia è sconosciuta; la presenza di ipergammaglobulinemia, autoanticorpi circolanti, ANCA e la rapida e completa risposta alla terapia con farmaci citotossici suggeriscono l'ipotesi di una patogenesi di tipo immunologico (Rao et al., 1995).

Il quadro istologico della WG è riassumibile nelle seguenti tre componenti (Savage, Harper, Cockwell, Adu, & Howie, 2000):

- vasculite
- necrosi
- background infiammatorio.

Le aree più frequentemente interessate, oltre alle vie respiratorie, sono i reni e la cute. Nei reni la lesione più frequentemente descritta (80%) è una glomerulonefrite necrotizzante focale o diffusa. Nella cute le tre manifestazioni istologiche di più frequente riscontro sono:

- vasculite leucocitoclastica
- presenza di granulomi necrotizzanti

➤ vasculite granulomatosa

Le biopsie eseguite nel tratto respiratorio superiore mostrano quasi costantemente aspetti infiammatori aspecifici (Pavone et al., 2006).

Le manifestazioni a carico del tratto respiratorio superiore, presenti all'esordio della malattia nel 90% dei casi, sono rappresentate da rinite siero-purulenta od ematica, sinusite, ulcerazioni della mucosa orale e nasale, perforazione del setto nasale con conseguente deformazione "a sella" del naso, otite media per chiusura della tuba di Eustachio e secondaria ipoacusia di trasmissione. Manifestazioni del coinvolgimento del tratto respiratorio inferiore sono la tosse, l'emottisi, la pleurite, la dispnea anche rapidamente progressiva; infiltrati e/o noduli polmonari sono riscontrati nel 45% dei casi all'esordio della sintomatologia.

Le manifestazioni renali (presenti nel 15% dei casi all'esordio) variano da un esame routinario dell'urina alterato con ematuria, proteinuria e cilindri di globuli rossi ad insufficienza renale rapidamente progressiva (Jennette et al., 1994).

La diagnosi di WG si basa sulla dimostrazione di vasculite granulomatosa necrotizzante in campioni biotici appropriati ottenuti da pazienti che presentano sintomi e/o segni di interessamento del tratto aereo superiore e inferiore associati alla presenza di glomerulonefrite. Campioni di parenchima polmonare, preferibilmente ottenuti mediante biopsia chirurgica, offrono le maggiori possibilità diagnostiche, poiché rivelano la presenza di vasculite granulomatosa in un'elevata percentuale di casi. Biopsie ottenute dal tratto respiratorio superiore mostrano infiammazione granulomatosa con necrosi, ma possono non evidenziare la presenza di vasculite. La biopsia renale conferma la presenza di glomerulonefrite (Schapira, Kapner, & Szporn, 1986).

Anche se specificità e sensibilità di un titolo positivo per i c-ANCA in corso di WG sono molto alte, il riscontro di tale positività dovrebbe comunque essere considerato un dato aggiuntivo, di conforto alla diagnosi e non dovrebbe sostituire la diagnosi istologica (Langford et al., 1996).

Nella sua presentazione tipica, il complesso sintomatologico della WG ne rende abbastanza semplice la differenziazione dalle altre malattie; al contrario, se tutti gli aspetti tipici non sono presenti fin dall'esordio, è necessario differenziarla dalle altre vasculiti, dalla sindrome di Goodpasture, da neoplasie delle vie aeree, da malattie granulomatose infettive e non (Pavone et al., 2006).

La malattia, se non trattata, ha una prognosi estremamente grave, con una mortalità superiore all'80% entro 6 mesi. Il farmaco d'elezione è la ciclofosfamide. Un aumento dei livelli sierici di c-ANCA può essere sintomo di una ripresa di malattia. Circa il 50% dei soggetti va incontro a ripresa di malattia nel momento in cui si tenta di ridurre o interrompere la terapia (Muller Kobold et al., 1999) (Jayne et al., 2003).

## **Genetica della WG**

Non sono documentati casi familiari e la ricerca di fattori genetici predisponenti non ha dato risultati sicuri, anche se alcune casistiche hanno evidenziato una modesta correlazione con alcuni geni HLA, come DR1, DR2, DR9, B7, DQw7, B50 (Griffith & Pusey, 1997).

Fattori genetici finora associati a WG sono geni codificanti per l' $\alpha$ -1 antitripsina ( $\alpha$ -1 protease inhibitor), potente inibitore di proteasi quali la PR3 e l'elastasi, ed importante quindi nel limitare il potenziale distruttivo di questi enzimi (Muller Kobold et al., 1999) (Griffith & Pusey, 1997) (Csernok, Trabandt, & Gross, 1997) (van der Geld et al., 2002); numerosi altri fattori sono stati legati alla WG, ma nessuno in modo altamente

significativo (il maggiore è PTPN22) (Heckmann et al., 2008; Jagiello, Aries et al., 2005; Jagiello et al., 2004; Jagiello, Gross, & Epplen, 2005; Jagiello, Klein et al., 2005; Jagiello, Wiczorek et al., 2005; Wiczorek, Holle, Muller et al., ; Wiczorek, Knaup, Gross, & Epplen, 2009)

### **2.3 POLIANGITE MICROSCOPICA**

La poliangite microscopica (MPA) è una vasculite sistemica necrotizzante. Inizialmente considerata una variante della Panarterite Nodosa (PAN), la MPA è attualmente considerata un'entità nosologica autonoma, con aspetti clinici e istopatologici caratteristici.

La CHCC definì la MPA come “una vasculite necrotizzante sistemica non granulomatosa, con scarsi depositi di immunoglobuline ad interessamento elettivo dei vasi di calibro microscopico (arteriole, capillari, venule), ma con possibile coinvolgimento anche delle arterie di piccolo calibro (corrispondenti alle piccole arterie che si connettono direttamente alle arteriole) e medio calibro” (Jennette et al., 1994).

Secondo i dati raccolti nel Regno Unito tra il 1988 ed il 1994 dalla Norwich Health Authority tra le micropoliarteriti, l'incidenza della MPA è del tutto simile a quella della CSS (2,4/milione/anno) mentre entrambe sono inferiori a quella della WG (8,5/milione/anno) (Guillevin et al., 1999).

L'eziologia non è nota. Si ipotizza, nella patogenesi, la compartecipazione di vari meccanismi nell'ambito dei quali gli ANCA sembrano assumere un ruolo centrale (Kallenberg, 2007).

La fase conclamata della malattia può essere preceduta di mesi o anni (fino a 2 anni) dall'insorgenza di sintomi sistemici (artralgie, malessere, febbre, calo ponderale),

associati ad incremento degli indici aspecifici di flogosi ed anemia (Lhote, Cohen, & Guillevin, 1998). Il quadro clinico classico è quello di una sindrome renale-polmonare. Talvolta la malattia può presentarsi con l'interessamento di un singolo organo, in particolare del rene (vasculite limitata al rene); in queste forme l'eventuale positività per gli ANCA depone per una malattia sistemica sottostante, che col tempo evolverà verso un quadro conclamato di WG, o più spesso di MPA.

Attualmente non è ritenuto possibile porre una diagnosi di certezza di MPA sulla base dei soli parametri clinici; il riscontro di una sindrome renale-polmonare, in presenza di sintomi costituzionali e rialzo degli indici aspecifici di flogosi deve comunque far porre il sospetto di MPA; inoltre è comune l'affermazione che, in pazienti in cui si sospetti una neoplasia, non evidenziabile con indagini strumentali, si debba pensare ad una vasculite sistemica. Si ricorre perciò ad analisi laboratoristico-strumentali.

Gli indici aspecifici di flogosi, tra cui i più importanti sono la VES e la PCR, sono incrementati; l'eosinofilia è presente nel 14% dei casi, il fattore reumatoide nel 39-50% e gli anticorpi anti-nucleo nel 21- 33%; le frazioni complementari C3 e C4 sono per lo più normali o elevate; l'HBsAg è negativo in quasi tutti i pazienti (Muller Kobold et al., 1999). Il coinvolgimento renale è presente in più del 90% dei casi (Kallenberg, 2007).

Caratteristico della malattia è il riscontro di ANCA: per lo più sono p-ANCA (a fluorescenza perinucleare) con specificità anti-MPO (45-65 %); tuttavia la positività dei c-ANCA (a fluorescenza citoplasmatica), con specificità anti-PR3, non permette di escludere la diagnosi di MPA e può essere presente nel 10-15% dei casi. Il livello degli ANCA è correlato alle fasi di attività della malattia, per cui un incremento del loro titolo in un paziente in remissione dovrebbe indurre il sospetto di recidiva di malattia a breve termine (Savige et al., 1995).

Con Rx e TAC ad alta risoluzione del torace, è possibile il riscontro di opacità polmonari da coinvolgimento alveolare e infiltrazione polmonare diffusa; in alcuni casi si può avere versamento pleurico.

La classificazione di CHCC pone l'accento sull'esame istologico di biopsie renali e/o cutanee per quanto riguarda la possibilità di distinguere, nell'ambito di un quadro accertato di vasculite sistemica, la MPA dalle altre forme di vasculite.

Nell'ambito delle vasculiti la diagnosi differenziale deve essere posta con la PAN e la MPA deve essere distinta soprattutto dalle altre forme ANCA-associate come WG e CSS:

- **MPA**: gli ANCA, con specificità anti-MPO, sono utili nella diagnosi differenziale tra la MPA e la PAN; la maggior parte dei pazienti con lesioni caratteristiche della PAN, microaneurismi e/o stenosi multiple, ha gli ANCA negativi, mentre vi è una certa correlazione tra la positività degli ANCA e la presenza di danno renale da glomerulonefrite (Muller Kobold et al., 1999). Gli anti-MPO hanno però una specificità per MPA minore di quella degli anti-PR3 per la WG, in quanto possono ritrovarsi in altre vasculiti così come in altre malattie infiammatorie. La positività per HBsAg è a favore della PAN perché quasi sempre le vasculiti associate all'HBV hanno le caratteristiche della PAN (Jennette et al., 1994).
- **WG**: entrambe le vasculiti si possono presentare con una sindrome renale-polmonare in cui si ha un coinvolgimento dei piccoli vasi con glomerulonefrite necrotizzante extracapillare. La presenza di granulomi all'istologia, in particolare nelle vie aeree superiori ed inferiori e a livello renale, è caratteristica della WG e dovrebbe escludere la diagnosi di MPA. I c-ANCA hanno un'alta sensibilità (80%) e specificità (97%) per la WG in cui i p-ANCA sono

raramente positivi (1%); comunque i c-ANCA si possono riscontrare anche in un certo numero di casi di MPA (10 %). Nella pratica clinica la positività per i p-ANCA consente di escludere una WG, mentre la presenza di c-ANCA non esclude con la stessa certezza la MPA.

- **CSS**: questa terza forma di vasculite necrotizzante dei piccoli vasi ANCA-associata, è facilmente distinguibile dalla MPA e dalla WG per la caratteristica sintomatologia asmatica associata ad altre manifestazioni atopiche, insorgenti in età adulta, per l'elevata frequenza di eosinofilia e di infiltrati eosinofili a livello delle lesioni tessutali e per la presenza di processi flogistici granulomatosi.

### **Genetica della MPA**

Per quanto riguarda la MPA, sono stati dimostrati essere associati un numero inferiore di fattori genetici rispetto a CSS e WG, che peraltro riguardano soprattutto la popolazione giapponese, di background nettamente differente da quello della popolazione Caucasica: DRB1\*09 (Tsuchiya, Kobayashi, Hashimoto, Ozaki, & Tokunaga, 2006; Tsuchiya et al., 2003), LILRA2 (Mamegano et al., 2008).

## **2.4 FIBROSI RETROPERITONEALE IDIOPATICA**

La fibrosi retroperitoneale Idiopatica (IRF) si può definire come una malattia del connettivo ed è caratterizzata dallo sviluppo di un tessuto fibro-infiammatorio a livello retroperitoneale (Vaglio, Salvarani, & Buzio, 2006). Non è tuttora classificabile come vasculite vera e propria, ma è tuttavia frequentemente associata a vasculiti, come ad esempio la WG o la MPA (Vaglio, 2009) (Izzedine, Servais, Launay-Vacher, & Deray, 2002).

La IRF è nel 75% dei casi idiopatica (IRF), nel rimanente 25% secondaria ad infezioni, emorragie, radioterapia, interventi chirurgici, farmaci (e.g. derivati dell'ergot, beta-bloccanti, dopamino-agonisti, idralazina), neoplasie e malattie ematologiche (e.g. malattia di Erdheim-Chester) (Gilkeson & Allen, 1996). Esistono anche forme di IRF che si manifestano in associazione a malattie autoimmuni sistemiche (sclerodermia, lupus eritematoso sistemico, spondilite anchilosante, morbo di Crohn, etc) ed a vasculiti sistemiche (panarterite nodosa, granulomatosi di Wegener, poliangite microscopica, etc).

L'esordio delle malattie associate può essere sincrono o metacrono con la IRF (Guillevin et al., 1996). La forma idiopatica può essere limitata al solo retroperitoneo oppure coinvolgere più distretti ed in questi casi la patologia è definita come "fibrosclerosi multifocale" (Laitt, Hubscher, Buckels, Darby, & Elias, 1992).

La IRF insieme agli aneurismi infiammatori dell'aorta addominale (IAAA) e alla fibrosi retroperitoneale perianeurismatica (IRFA) viene inclusa nel contesto di quella entità anatomo-patologica introdotta da Parums e nota come Periaortite Cronica (CP) (Parums, Chadwick, & Mitchinson, 1986) (Kuwana, Wakino, Yoshida, & Homma, 1992) (Martorana et al., 2006).

In termini istopatologici le tre forme si caratterizzano, solitamente, per la presenza di: aterosclerosi aortica avanzata, assottigliamento della tonaca media dell'aorta (per fenomeni elastolitici e perdita di cellule muscolari lisce) e soprattutto per un'intensa flogosi dell'avventizia costituita in prevalenza da cellule mononucleate, per un grado variabile di fibrosi avventiziale e periaortica (Vivas et al., 2000).

Tuttavia, la IRF si caratterizza per la presenza del tessuto fibro-infiammatorio che coinvolge le strutture adiacenti in assenza di dilatazione dell'aorta (Vivas et al., 2000).

La IRF è una malattia rara, con incidenza annua stimata intorno a 1:100000/abitanti, colpisce più comunemente tra i 40 e i 60 anni e più frequentemente il sesso maschile (rapporto M: F = 2:1) (Vaglio, Salvarani et al., 2006).

La patogenesi della malattia è sconosciuta, sebbene siano state avanzate nel corso degli anni varie ipotesi. Alcuni Autori (Kuwana et al., 1992) sostenevano che la IRF potesse essere conseguenza di una estensione emorragica nel retroperitoneo secondario a fissurazione dei vasi ivi localizzati, ovvero il risultato di una stasi o di uno stravasamento linfatico; entrambe queste ipotesi sono state poi negate da studi successivi.

Una delle teorie più accreditate è quella che afferma che la IRF è riconducibile ad una reazione autoimmune locale rivolta verso alcuni componenti delle placche ateromatose quali le LDL-ossidate ed il ceroide, polimero insolubile costituito da lipidi ossidati e proteine. Si ritiene che questi componenti siano sempre presenti nelle placche ateromatose, ma nei casi in cui si danneggia la media (assottigliamento, fissurazione) i macrofagi, presenti a livello avventiziale, possano processarli e presentarli quali antigeni innescando una reazione immune sia di tipo umorale che cellulosa-mediata (Kuwana et al., 1992) (Vaglio et al.).

Un'altra ipotesi sostiene inoltre che la IRF, più che una risposta autoimmune locale, sia la manifestazione locale di un disordine autoimmune sistemico e che un processo

vasculitico dei piccoli e medi vasi della parete aortica e/o del retroperitoneo possa essere coinvolto nella patogenesi della malattia. Il processo vasculitico, estendendosi in senso centrifugo, potrebbe portare alla comparsa di IRF promuovendo la flogosi avventiziale e la reazione fibro-infiammatoria del retroperitoneo circostante (Vaglio, Greco et al., 2006).

In alcuni casi, inoltre, il processo vasculitico, estendendosi in modo centripeto potrebbe favorire fenomeni aterosclerotici, assottigliamento della tonaca media e dilatazione aneurismatica dell'aorta. D'altro canto, l'ipotesi "vasculitica" come trigger patogenetico è sostenuta dal frequente riscontro di vasculite dei vasa vasorum e dei piccoli vasi retroperitoneali così come dalla possibile associazione tra IRF e sindromi vasculitiche sistemiche.

Le indagini di laboratorio e strumentali non permettono di formulare sempre e con certezza la diagnosi, perciò, nei casi più dubbi, si ricorre alla biopsia (sotto guida ecografia o durante intervento chirurgico) (Vaglio, Salvarani et al., 2006).

La IRF è una malattia caratterizzata da una pesante prognosi se non diagnosticata per tempo o se non trattata adeguatamente. Ciò deriva dalla possibilità che il processo fibrotico ha, crescendo, di avviluppare le strutture presenti nel retroperitoneo o di svilupparsi in altri distretti dell'organismo configurando il quadro della fibrosclerosi multifocale. Le più frequenti cause di exitus risultano essere le complicanze dell'insufficienza renale post-ostruttiva. Meno comune è l'exitus per altre cause.

La prognosi è estremamente favorevole nei pazienti che si sottopongono a trattamento chirurgico e/o medico, soprattutto nei pazienti sottoposti a terapia farmacologica. L'obiettivo della terapia è la riduzione o la scomparsa della massa fibrotica retroperitoneale che può comportare un miglioramento clinico globale ed una riduzione o risoluzione dei fenomeni ostruttivi a carico delle strutture coinvolte; inoltre, dato il

carattere cronico-recidivante della IRF, ulteriore obiettivo della terapia è ridurre la frequenza di recidiva (Marinoni et al., 1998).

## **Genetica della IRF**

Data l'estrema rarità della patologia, la genetica della IRF è ancora poco indagata, per cui i geni associati sono pochi; tra questi spiccano l'HLA-DRB1\*03 (Martorana et al., 2006), MDM2 (Weaver et al., 2009) e l'HLA-B\*27 (Willscher, Novicki, & Cwazka, 1978).

## **2.5 SCOPO DEL LAVORO**

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato valutare l'eventuale associazione tra varianti genetiche e la suscettibilità alle vasculiti ANCA-associate e la IRF, sulla base di precedenti studi effettuati su patologie autoimmuni-infiammatorie affini alle patologie indagate (Rioux & Abbas, 2005).

La metodica utilizzata è stata la genotipizzazione di marcatori polimorfici del DNA mediante studio di associazione caso-controllo, per valutare e confrontare le frequenze alleliche del marcatore in pazienti e controlli.

Obiettivo principale degli studi:

- individuazione di marcatori genetici associati con le vasculiti ANCA-associate e la IRF, fornendo nuove conoscenze sull'eziologia delle malattie complesse.

Obiettivi secondari:

- creazione di un database sulla base di una possibile nuova classificazione delle vasculiti ANCA-associate e della IRF
- creazione di un database pubblico per la disseminazione dei risultati.

Come marcatori del DNA sono stati studiati in larga parte i Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNPs), che consistono in variazioni a livello di una sequenza di [acidi nucleici](#) che si presenta tra individui della stessa specie, caratterizzata da una differenza a carico di un singolo [nucleotide](#). Gli SNPs costituiscono il 90% di tutte le variazioni genetiche umane. SNPs con minor frequenza allelica pari a circa  $\geq 1\%$  sono presenti ogni circa 100-300 [paia di basi](#) lungo l'intero [genoma](#). Lo studio degli SNPs è molto utile poiché variazioni anche di singoli nucleotidi possono influenzare lo sviluppo delle [patologie](#) o la risposta ai [patogeni](#), agli agenti [chimici](#) ed ai [farmaci](#). Per tale motivo gli SNPs possono avere una grande importanza nello sviluppo di nuovi farmaci e nella [diagnostica](#), in quanto consentono di conoscere l'effetto che può avere un farmaco su un individuo ancor prima della somministrazione, attraverso uno screening degli SNPs presenti nel gene responsabile della metabolizzazione del farmaco stesso. Poiché gli SNPs sono ereditati di generazione in generazione, essi vengono molto utilizzati negli studi genetici ("The International HapMap Project," 2003).

Oltre agli SNPs, scopo dello studio è stato quello di indagare i geni HLA, del sistema Maggiore di Istocompatibilità (MHC), che ha un ruolo fondamentale nel processo infiammatorio-autoimmune (Simons, 1978) (Larsen & Alper, 2004).

### **3. PAZIENTI, MATERIALI E METODI:**

#### **3.1 PAZIENTI**

Per effettuare uno studio genetico in malattie piuttosto rare come quelle indagate, si è reso necessario effettuare un progetto multicentrico; centro responsabile del reclutamento campioni è stata l'UO di Nefrologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma (Prof. Buzio, Dr. Vaglio, D.ssa Palmisano, Dr. Alberici, D.ssa Maritati, Dr. Vanenti). I centri periferici sono perlopiù italiani, con l'aggiunta di un centro tedesco:

- Azienda Ospedaliera Ospedale San Carlo Borromeo: Dr. Renato Sinico
- Azienda Ospedaliera S. Gerardo di Monza: Prof. Alberto Pesci
- Università degli Studi Milano-Bicocca: D.ssa Gabriella Moroni
- Azienda Ospedaliera Spedali Civili Di Brescia: D.ssa Gina Gregorini
- Azienda Ospedaliero Universitaria-Ospedali Riuniti-Ancona: Prof. Paolo Fraticelli
- Azienda Ospedaliera di Perugia: D.ssa Rachele Brugnano
- Arcispedale Santa Maria Nuova-Reggio Emilia: Dr. Carlo Salvarani, Dr. Nicolò Pipitone, Dr. Bruno Tumiati
- Azienda Ospedaliera di Torino: Dr. Giuseppe Guida
- Azienda Ospedaliera di Piacenza: D.ssa Laura Pavone
- University of Erlangen (Germania): Dr. Jochen Zwerina

La numerosità del campione varia a seconda dello studio, ma complessivamente è stata:

- IRF: 222 pazienti italiani
- MPA: 102 pazienti italiani, 5 tedeschi

- CSS: 102 pazienti italiani, 32 tedeschi
- WG: 144 pazienti italiani, 33 tedeschi.

Controlli sani: Negli anni, sono stati reclutati circa 1000 soggetti, privi di malattie infiammatorie-autoimmuni, da utilizzare come controlli sani da comparare ai pazienti affetti dalle malattie indagate nello studio.

## **3.2 MATERIALI E METODI**

### **Raccolta campioni**

Tutti i centri partecipanti hanno inviato le provette di sangue periferico in EDTA (circa 5ml ognuno) all'Unità di Genetica Molecolare dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma (Dr. Davide Martorana-Prof. Tauro Maria Neri) per lo stoccaggio dei campioni in azoto liquido, fino al processamento mediante estrazione di DNA genomico.

Tutti gli studi effettuati sono stati approvati dal Comitato Etico Unico per la Provincia di Parma.

### **Estrazione DNA genomico**

Il DNA è stato estratto da 200 µl di sangue intero, utilizzando il kit commerciale Qiagen (Inc., Valencia, CA, USA).

### **Misura della concentrazione del DNA**

Di ogni campione di DNA è stata misurata la concentrazione mediante Nanodrop (NP1000, Thermo Lab); si tratta di uno spettrofotometro, che consente la misurazione

della concentrazione degli acidi nucleidi e proteine a partire da volumi molto piccoli di campione, (minimo 1µl ) e senza l'utilizzo di cuvette.

### **Real-Time Polymerase Chain Reaction, metodo TaqMan**

La PCR Real-Time è una metodica che si basa sull'utilizzo di un termociclature e di un sistema di rilevamento della fluorescenza, introducendo la possibilità di monitorare costantemente, in “tempo reale”, l'andamento della reazione.

La possibilità di visualizzare l'accumulo del prodotto di amplificazione in “real time” è reso possibile dalla marcatura di sonde con molecole fluorescenti.

E' possibile utilizzare diversi metodi per la rivelazione specifica degli amplificati; nel nostro caso è stato utilizzato un saggio real-time basato sul metodo più diffuso nei laboratori, il metodo *TaqMan*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Il saggio si basa sulla presenza nella miscela di reazione di PCR di un oligonucleotide (sonda) non estendibile, che ibrida specificamente con una regione del DNA target compresa tra le due sequenze dei primers. La sonda è marcata con due molecole fluorescenti:

- il *Reporter*, una molecola modificata posta all'estremità 5' (In genere si tratta di Fluoresceina)
- il *Quencher*, una rodamina modificata posta all'estremità 3', la cui fluorescenza è efficientemente misurabile solo quando la sonda è integra.

Durante la reazione di amplificazione, ad ogni ciclo, l'enzima Taq polimerasi non solo duplica il bersaglio, ma con la sua attività 5'-3'esonucleasica degrada anche la sonda ad esso ibridata, separando i due fluorocromi e rendendo così pienamente rilevabile l'emissione del reporter. Dato che una copia di DNA duplicata durante la PCR è accompagnata dalla liberazione di una molecola di reporter, la fluorescenza relativa che

si accumula nel campione è in ogni momento proporzionale alla quantità di DNA amplificato.

La reazione è stata condotta su strumento *ABI PRISM 7700* (Applied Biosystems) dotato della capacità di funzionare contemporaneamente sia da termociclatore sia da fluorimetro. L'ABI PRISM 7700 è interfacciato ad un software, *Sequence Detection System* (SDS), in grado di acquisire lo spettro di emissione del campione per tutta la durata della reazione di PCR e in seguito converte la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. Il ciclo di PCR in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter dovuto allo specifico evento di amplificazione è definito ciclo soglia (Ct) della reazione.

Il saggio Taqman® quantifica il DNA bersaglio al ciclo soglia quando la reazione di PCR è in fase esponenziale, condizione essenziale per eseguire una corretta quantificazione.

Il saggio eseguito per la discriminazione allelica con Real Time viene definito saggio di SNP Genotyping e consiste in un saggio di genotipizzazione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP).

### **PCR end-point**

Primers specifici sono stati disegnati mediante apposito software (Primer Express, Applied Biosystems) ed acquistati dalla ditta Invitrogen.

I campioni sono stati amplificati su termociclatori GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

### **Elettroforesi su gel di agarosio**

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% in TBE (Tris Borato EDTA) e fotografati con Polaroid Camera (G Polaroid U.K.).

### **Purificazione dei prodotti di PCR**

La purificazione dei prodotti di PCR viene effettuata prima di sequenziare i prodotti di PCR; essa avviene grazie all'utilizzo di un robot BECKMAN (Biomek 2000), mediante purificazione con biglie magnetiche (Agencourt Ampure, Beckman Coulter). L'automazione garantisce una maggiore purezza dei prodotti eliminando interferenze relative all'operatore.

### **Reazione di sequenziamento di Sanger**

La reazione di sequenza è stata allestita utilizzando la Terminator Ready reaction Mix (4  $\mu$ l), i primer forward e reverse (1+1  $\mu$ l alla concentrazione di 3,2 pmol/ $\mu$ l) ed il DNA template (3  $\mu$ l). La reazione di sequenza è stata eseguita su termociclatori GeneAmp PCR System 9700 programmati come segue: 25 cicli con denaturazione a 96° C per 10 secondi, annealing a 50° C per 5 secondi, estensione a 60° C per 4 minuti.

### **Purificazione dei prodotti di sequenza**

Scopo della purificazione è quello di eliminare eventuali aspecifici e prodotti non legati e concentrare maggiormente il campione. La purificazione avviene mediante precipitazione (in etanolo) e centrifugazione. Per la purificazione dei prodotti di sequenza è stata preparata una mix contenente per ciascun campione: 2  $\mu$ l di Stop Solution A; 2  $\mu$ l di Stop Solution B; 1  $\mu$ l di Carrier (KIT "GENEDIA" SEQ-PREP). Per

ogni campione sono stati dispensati 5  $\mu$ l della mix e successivamente purificati tramite centrifugazioni mediante utilizzo di una Wash Solution contenente etanolo.

Dopo aver eliminato il surnatante, il pellet è stato risospeso in SLS (Sample Loading Solution, presente all'interno del Kit) e aggiunta una goccia di olio minerale che impedisce l'evaporazione del campione.

### **Sequenziamento diretto**

Il sequenziamento automatico del DNA genomico segue il principio del sequenziamento enzimatico secondo Ranger (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1977).

L'analisi di sequenza è stata effettuata utilizzando un sequenziatore automatico CEQ<sup>TM</sup> 2000XL DNA Analysis System (Beckman Coulter).

Successivamente, i dati grezzi sono stati analizzati mediante software CEQ<sup>TM</sup> 2000XL DNA Analysis System per rimuovere ambiguità secondo il codice standard IUB, e con il software dedicato SeqMan (DNA Star) per l'allineamento.

### **Analisi statistica**

Gli studi caso-controllo sono un tipo di studio in cui si confrontano 2 popolazioni soggette a 2 trattamenti diversi; nel nostro caso una comprende i pazienti affetti da vasculite, l'altra i controlli sani; vengono anche definite indagini retrospettive. Nello specifico, si identificano i soggetti che hanno subito l'evento di interesse (casi) e si valuta il numero di persone esposte al fattore di rischio (nel caso dello studio di associazione con gli SNP, come fattore di rischio viene intesa la presenza di una patologia) e si identificano quei soggetti che non hanno subito l'evento (controlli sani), ma che sono sotto tutti gli aspetti omogenei ai casi (motivo per cui è necessario applicare la legge di Hardy-Weinberg per valutare l'equilibrio).

Gli obiettivi sono due:

- Valutare l'associazione tra fattori di rischio e malattia
- Stimare il rischio relativo attraverso il calcolo dell'odds ratio

Un tipo di schema di studio caso controllo è rappresentato nella tabella 1:

GRUPPI	PAZIENTI (presenza di vasculite)	CONTROLLI (assenza di vasculite)
PREDISPOSIZIONE AL FATTORE DI RISCHIO (eterozigosità o omozigosità)	A	B
NON ESPOSIZIONE AL FATTORE DI RISCHIO (eterozigosità o omozigosità)	C	D
TOTALE	A + C	B + D

Tabella 1: Schema di studio caso-controllo

I vantaggi degli studi caso-controllo sono:

- la rapidità
- il costo non eccessivo
- non si deve attendere il presentarsi di eventi come in altri studi
- sono gli unici studi possibili nelle malattie a bassa incidenza.

Nello studio caso-controllo non è possibile la valutazione del rischio relativo, ciò nonostante l'utilizzo di dati retrospettivi è possibile ottenere una "stima del rischio relativo" denominata Odds Ratio (OR).

$$OR = (A*D)/(B*C)$$

Per comparare i due gruppi fra loro, prima di tutto si deve verificare che le due popolazioni siano realmente comparabili, vale a dire che non si siano verificati errori non casuali in grado di inficiare la corretta genotipizzazione; fatto questo, si ricorre alla statistica mediante test del chi-quadro secondo Pearson (Halperin, Nehrke, Hulicka, & Morganti, 1976).

### **Equilibrio di Hardy-Weinberg**

La prima verifica eseguita con i risultati ottenuti dalla discriminazione allelica è l'applicazione della legge di Hardy-Weinberg, in modo da confrontare le frequenze alleliche ottenute dei genotipi in esame con la loro frequenza attesa, allo scopo di determinare se la popolazione esaminata è in una fase di equilibrio, o vi sono fattori non casuali che intervengono.

La legge afferma che in una popolazione infinitamente grande, ad incrocio casuale, sulla quale non agiscono mutazione, migrazione e selezione naturale, le frequenze

alleliche non variano col tempo e finchè l'incrocio è casuale, le frequenze genotipiche si stabilizzano sulle proporzioni  $p^2$  (frequenza degli AA),  $2pq$  (frequenza degli Aa) e  $q^2$ , (frequenza degli aa), dove  $p$  è la frequenza allelica di A e  $q$  la frequenza allelica dell'allele a. La somma delle frequenze genotipiche deve essere uguale ad 1 cioè:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

La legge descrive la variazione delle frequenze alleliche in una popolazione mediante la trasmissione di generazione in generazione in assenza di processi evolutivi.

Nel caso siano rispettate le condizioni di partenza, ci si attende che gli alleli si combinino nei diversi genotipi sulla base delle semplici leggi di probabilità e la popolazione si trovi in equilibrio di Hardy-Weinberg, in questo modo le frequenze geniche possono essere previste a partire da quelle alleliche.

Affinché la legge di Hardy-Weinberg abbia valore, sulla popolazione non devono agire mutazioni, migrazioni e selezione naturale, cioè il pool genetico non deve subire né aggiunte né perdite di alleli.

Per stabilire se i genotipi di una popolazione sono in accordo con le proporzioni di Hardy-Weinberg, la prima fase è quella di calcolare le frequenze alleliche dalle frequenze genotipiche ottenute con la discriminazione allelica. Dopo aver ottenuto le frequenze alleliche, è possibile calcolare le frequenze genotipiche attese ( $p^2$ ,  $2pq$ ,  $q^2$ ) e confrontarle con quelle effettivamente osservate mediante un test del  $\chi^2$ . Il test per valutare l'equilibrio di Hardy-Weinberg è calcolato mediante foglio elettronico Excel (Microsoft).

Il test del  $\chi^2$  fornisce la probabilità che la differenza tra quanto osservato sperimentalmente e quanto atteso secondo la legge di Hardy-Weinberg sia o meno dovuto al caso.

Il test chi quadro è stato calcolato mediante software:

<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/twooby2.htm>

## 4. RISULTATI:

I risultati verranno di seguito illustrati per ogni singolo studio.

### **Ricerca determinanti genetici del sistema maggiore di istocompatibilità nella Periaortite Cronica.**

Questo studio è stato pubblicato nel 2006 con due articoli (Martorana et al., 2006) (Vaglio, Greco et al., 2006); sono stati testati 35 pazienti con Periaortite Cronica e 350 controlli sani; l'analisi è stata effettuata per i geni HLA principalmente implicati nella risposta immunitaria. Nelle seguenti tabelle 2 e 3 sono mostrati i risultati dello studio risultati statisticamente significativi:

Allele	Patients	Controls	$\chi^2$	<i>P</i>	<i>P</i> <sub>corr</sub>	OR	95% CI
A*01	15/70 (21.43)	90/700 (12.85)	3.97	0.0463	0.5088	1.848	1.00–3.41
B*08	12/70 (17.14)	44/700 (6.28)	11.12	0.0008	0.0269†	3.085	1.54–6.16
DRB1*03	17/70 (24.28)	64/700 (9.14)	15.50	0.000084	0.0012†	3.187	1.74–5.83
TNFA(-238)A	7/70 (10)	89/700 (12.71)	0.43	0.512	0.762	0.763	0.34–1.72
TNFA(-308)A	14/70 (20)	115/700 (16.43)	0.58	0.445	0.692	1.272	0.68–2.36

\* Values are the number/total times 2 (percentage) unless otherwise indicated. *P*<sub>corr</sub> = corrected *P*; OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval.  
† Significant values.

**Tabella 2:** Genotipizzazioni dei geni HLA (da Arthritis Care & Research, Vol. 55, No. 1, February 15, 2006, pp 126–130)

Patient characteristics	HLA-DRB1*03-positive (17 patients)	HLA-DRB1*03-negative (18 patients)	<i>P</i>
Sex, male/female	10/7	10/8	1.0
Age at disease onset, median (range) years	60 (9–75)	55 (37–72)	0.21
Nonaneurysmatic/aneurysmatic CP	11/6	15/3	0.26
Constitutional symptoms, no. (%)†	15 (88)	12 (67)	0.23
Ureteral involvement, no. (%)	15 (88)	14 (78)	0.66
ESR at disease onset, median (range) mm/hour	59 (38–124)	50 (10–114)	0.20
CRP level at disease onset, median (range) mg/liter‡	41 (15–182)	15 (4–105)	0.045§
Autoimmune thyroiditis, no. (%)	7 (41)	4 (22)	0.29
Other autoimmune/inflammatory diseases	1 rheumatoid arthritis, 1 undifferentiated arthritis, 1 autoimmune thrombocytopenia	1 rheumatoid arthritis, 1 undifferentiated arthritis, 1 membranous glomerulonephritis	
Positive antinuclear antibodies, no. (%)	8 (47)	6 (33)	0.50
Patients positive for other autoantibodies¶	6 (35)	5 (28)	0.72

\* CP = chronic periaortitis; ESR = erythrocyte sedimentation rate; CRP = C-reactive protein.

† Fatigue, anorexia, weight loss, fever, diffuse myalgias, and arthralgias.

‡ Normal value <5.

§ After correction for multiple tests, the *P* value for this comparison was 0.369.

¶ Antismooth muscle, antineutrophil cytoplasmic antibodies, and rheumatoid factor.

**Tabella 3:** comparazione dei dati clinici nei pazienti suddivisi per presenza/assenza di HLA-DRB1\*03 (da *Arthritis Care & Research*, Vol. 55, No. 1, February 15, 2006, pp 126–130)

## Ricerca determinanti genetici del sistema maggiore di istocompatibilità nella CSS

In questo studio, pubblicato nel 2007 (Vaglio et al., 2007), sono stati testati 48 pazienti con Churg-Strauss e 350 controlli sani; l'analisi è stata effettuata per i geni HLA principalmente implicati nella risposta immunitaria. Nelle seguenti tabelle 4, 5, 6 e nella figura 1 sono mostrati i risultati dello studio:

No. male/no. female	18/30
Age, median (range) years	48 (18–78)
Asthma	48 (100)
Peripheral neuropathy	32 (66.7)
Constitutional symptoms†	30 (62.5)
Sinusitis	27 (56.2)
Lung involvement	24 (50.0)
Renal involvement	22 (45.8)
Skin involvement	21 (43.7)
Gastrointestinal involvement	13 (27.1)
Cardiac involvement	7 (14.6)
CNS involvement	3 (6.2)
Eosinophilia, median (range) cells/mm <sup>3</sup>	2,913 (63–28,815)
ANCA positivity‡	21 (47.7)

\* Except where indicated otherwise, values are the number (%) of patients. CSS = Churg-Strauss syndrome; CNS = central nervous system; ANCA = antineutrophil cytoplasmic antibody.

† Fatigue, fever, anorexia, weight loss, diffuse myalgias, and arthralgias.

‡ Data available on 44 patients.

**Tabella 4** : Dati demografici, clinici e caratteristiche di laboratorio dei 48 pazienti CSS (da ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 56, No. 9, September 2007, pp 3159–3166)

Allele/gene	Patients	Controls	$\chi^2$	<i>P</i>	<i>P</i> <sub>corr</sub>	OR	95% CI
DRB1*04	10/96 (10.4)	44/700 (6.3)	2.278	0.1312	–	1.74	0.84–3.57
DRB1*07	26/96 (27.1)	93/700 (13.3)	12.64	0.0003	0.0042	2.42	1.47–3.99
DRB1*09	1/96 (1.0)	4/700 (0.6)	0.299	0.5844	–	3.78	0.20–16.56
DRB1*13	3/96 (3.1)	87/700 (12.4)	7.287	0.0069	0.0966	0.23	0.07–0.73
DRB4	37/96 (38.5)	141/700 (20.1)	16.461	0.00058	0.000232	2.49	1.58–3.09
DRB3	34/96 (35.4)	353/700 (50.4)	7.616	0.0057	0.0228	0.54	0.35–0.84

\* Values are the number positive/2× number of subjects (%). CSS = Churg-Strauss syndrome; *P*<sub>corr</sub> = corrected *P* (after Bonferroni adjustment for multiple testing); OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval.

**Tabella 5** : Analisi statisticamente significative del confronto pazienti CSS-controlli (da ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 56, No. 9, September 2007, pp 3159–3166)

	DRB4-positive (n = 31)	DRB4-negative (n = 17)
Mononeuritis multiplex	13 (41.9)	4 (23.5)
Constitutional symptoms†	24 (77.4)‡	6 (35.3)
Sinusitis	20 (64.5)	7 (41.2)
Lung involvement (all kinds)	14 (45.2)	10 (58.8)
Alveolar hemorrhage	4 (12.9)	0 (0.0)
Kidney involvement (all kinds)	16 (51.6)	6 (35.3)
RPGN	2 (6.5)	1 (5.9)
Purpura	6 (19.4)	0 (0.0)
Gastrointestinal involvement	6 (19.4)	7 (41.2)
Cardiac involvement	5 (16.1)	2 (11.8)
Eosinophilia, median (range) cells/mm <sup>3</sup>	3,168 (291–28,815)	2,399 (63–22,903)
ANCA positivity§	17 (58.6)	4 (26.7)

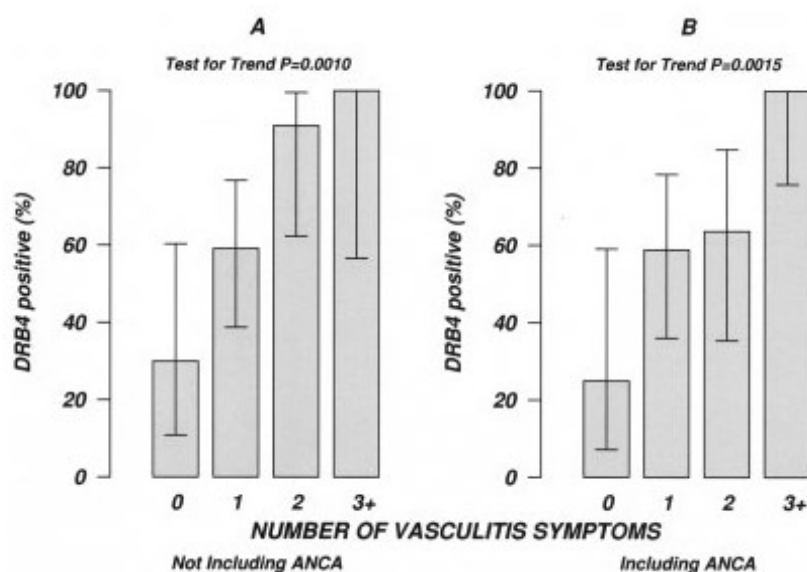
\* Except where indicated otherwise, values are the number (%) of patients. CSS = Churg-Strauss syndrome; RPGN = rapidly progressive glomerulonephritis; ANCA = antineutrophil cytoplasmic antibody.

† Fatigue, fever, anorexia, weight loss, diffuse myalgias, and arthralgias.

‡  $P = 0.006$  versus DRB4-negative patients, by Fisher's exact test.

§ Data available on 44 patients.

**Tabella 6** : Comparazione fra principali caratteristiche cliniche e di laboratorio dei pazienti CSS HLA-DRB4 positivi e negativi (da ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 56, No. 9, September 2007, pp 3159–3166)



**Figura 1**: Proporzioe dei pazienti CSS HLA-DRB4 positivi, in accordo con il numero di sintomi vasculitici identificanti il subset di pazienti CSS ANCA-positivi con porpora, alveolite emorragica, mononeurite multipla, glomerulonefrite rapidamente progressiva e sintomi costituzionali. In A, l'ANCA positività non è inclusa nei sintomi vasculitici, in B è inclusa. I valori sono stati determinati mediante test chi-quadro. (da ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol. 56, No. 9, September 2007, pp 3159–3166)

## **Ricerca di correlazione fra Periaortite Cronica e CC chemokine receptor 5 polymorphism.**

Questo studio, che verrà pubblicato nel 2011 (Rheumatology, in press, Luigi Boiardi, Augusto Vaglio, Davide Nicoli, Enrico Farnetti, Alessandra Palmisano, Nicolo' Pipitone, Federica Maritati, Bruno Casali, Davide Martorana, Gabriella Moroni, Beniamina Gallelli, Carlo Buzio and Carlo Salvarani: CC chemokine receptor 5 polymorphism in chronic periaortitis) è stato effettuato in collaborazione con l'Unità di Reumatologia dell'Arcispedale Santa Maria Nuova di Reggio Emilia; i risultati sono mostrati nelle tabelle 7, 8 e 9. In totale, sono stati testati 100 pazienti con CP e 180 controlli sani.

Age at disease onset, mean (s.d.), years	58 (12)
Male/female	66.0/34.0
Idiopathic retroperitoneal fibrosis	82/100 (82.0)
Inflammatory abdominal aortic aneurysms	18/100 (18.0)
Retroperitoneal fibrosis localization	
Periaortic-iliac	41/100 (41)
Periaortic-iliac+pericaval	51/100 (51)
Atypical localization	8/100 (8.0)
Thoracic vessel or mediastinal involvement	21/57 (36.8)
Presence of atherosclerotic disease (at diagnosis or during the follow-up)	26/99 (26.3)
Systemic symptoms and/or signs <sup>c</sup>	74/98 (75.5)
Abdominal/lumbar pain	84/99 (84.8)
Constipation	29/97 (29.9)
Testicular symptoms	38/64 (59.4)
Deep vein thrombosis	16/98 (16.3)
Ureteral obstruction	76/100 (76.0)
Unilateral	28/100 (28.0)
Bilateral	48/100 (48.0)
Acute renal failure	47/100 (47.0)
Retroperitoneal biopsy	54/100 (54.0)
Associated autoimmune/inflammatory diseases	40/93 (43.0)
Autoimmune thyroiditis	20/86 (23.3)
ANA positivity	32/95 (33.7)
Other positive autoantibodies	45/94 (47.9)
Duration of follow-up, mean (s.d.), months	42.5 (38.7)
ESR at diagnosis, mean (s.d.), mm/h	68 (32)
CRP at diagnosis, mean (s.d.), mg/l	41.4 (43.6)

<sup>a</sup>Except where indicated otherwise, values are the percentage of patients. <sup>b</sup>Some findings were not available for all 100 patients. Atherosclerotic disease: presence of at least one of the following conditions: coronary artery disease, cerebrovascular disease, PAD; CRP (normal <5 mg/l); <sup>c</sup>Fever, anorexia, and weight loss.

**Tabella 7:** Caratteristiche cliniche e demografiche dei 100 pazienti con CP (da Rheumatology, in press)

	Total CP (n=100) A	IAAA (n=18) B	IRF (n=82) C	Controls (n=180) D	P-value	OR (95% CI)
Allele						
Δ32	15/200 (7.5)	8/36 (22.2)	7/164 (4.3)	10/360 (2.8)	A vs D=0.017	2.8 (1.2, 6.4)
CCR5	185/200 (92.5)	28/36 (73.8)	157/164 (95.7)	350/360 (97.2)	B vs D=0.0001	10.0 (3.7, 27.3)
					C vs D=0.427	1.6 (0.6, 4.2)
					B vs C=0.001	6.4 (2.1, 19.1)
Genotype						
Δ32/Δ32	0/100	0/18	0/82	0/180	A vs D=0.014	
CCR5/Δ32	15/100 (15.0)	8/18 (44.4)	7/82 (8.5)	10/180 (5.6)	B vs D=0.0001	
CCR5/CCR5	85/100 (85.0)	10/18 (55.6)	75/82 (91.5)	170/180 (94.4)	C vs D=0.419	
Carriage rate					B vs C=0.001	
Δ32/Δ32 + CCR5/Δ32	15/100 (15.0)	8/18 (44.4)	7/82 (8.5)	10/180 (5.6)	A vs D=0.014	3.0 (1.3, 7.0)
					B vs D=0.0001	13.6 (4.4, 42.0)
					C vs D=0.419	1.6 (0.6, 4.3)
CCR5/CCR5	85/100 (85.0)	10/18 (55.6)	75/82 (91.5)	170/180 (94.4)	B vs C=0.001	8.6 (2.6, 28.7)

Values are the number/total number examined, %.

**Tabella 8:** Frequenze alleliche, genotipiche e frequenza dell'eterozigote del polimorfismo CCR5Δ32 in pazienti con CP, ulteriormente suddivisa nei due subsets (IRF e IAAA: inflammatory abdominal aortic aneurysms) (da Rheumatology, in press)

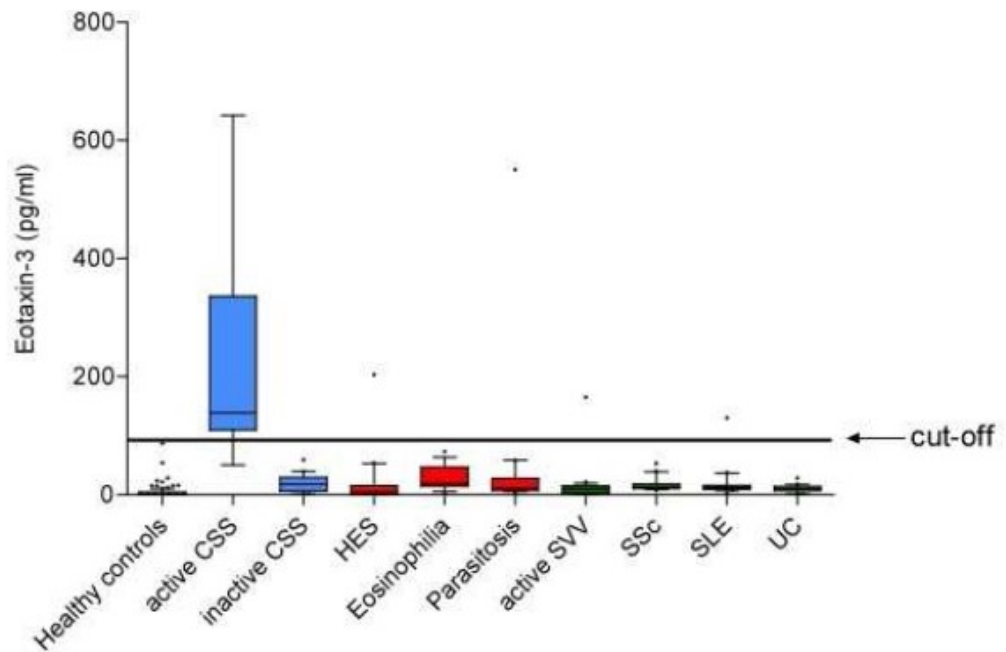
	IAAA without ATS (n=9) A	IAAA with ATS (n=9) B	Controls (n=180) C	P-value	OR (95% CI)
Allele					
Δ32	6/18 (33.3)	2/18 (11.1)	10/360 (2.8)	A vs C= 0.0001	17.5 (5.5, 56.1)
CCR5	12/18 (66.7)	16/18 (88.9)	350/360 (97.2)	B vs C= 0.107 A vs B= 0.228	4.4 (0.9, 21.6) 4.0 (0.7, 23.4)
Genotype					
Δ32/Δ32	0/9	0/9	0/180	A vs C= 0.00001	
CCR5/Δ32	6/9 (66.7)	2/9 (22.2)	10/180 (5.6)	B vs C= 0.104	
CCR5/CCR5	3/9 (33.3)	7/9 (77.8)	170/180 (94.4)	A vs B= 0.153	
Carriage rate					
Δ32/Δ32 + CCR5Δ32	6/9 (66.7)	2/9 (22.2)	10/180 (5.6)	A vs C= 0.00001 B vs C= 0.104	34.0 (7.4, 156.3) 4.9 (0.9, 26.5)
CCR5/CCR5	3/9 (33.3)	7/9 (77.8)	170/180 (94.4)	A vs B= 0.153	7.0 (0.9, 56.9)

Values are the number/total number examined, %. ATS: established atherosclerotic disease (cardiovascular, cerebrovascular PAD).

**Tabella 9:** Frequenze alleliche, genotipiche e frequenza degli eterozigoti del polimorfismo CCR5Δ32 in pazienti con inflammatory abdominal aortic aneurysms (IAAA), con e senza evidenza di malattia aterosclerotica (da Rheumatology, in press).

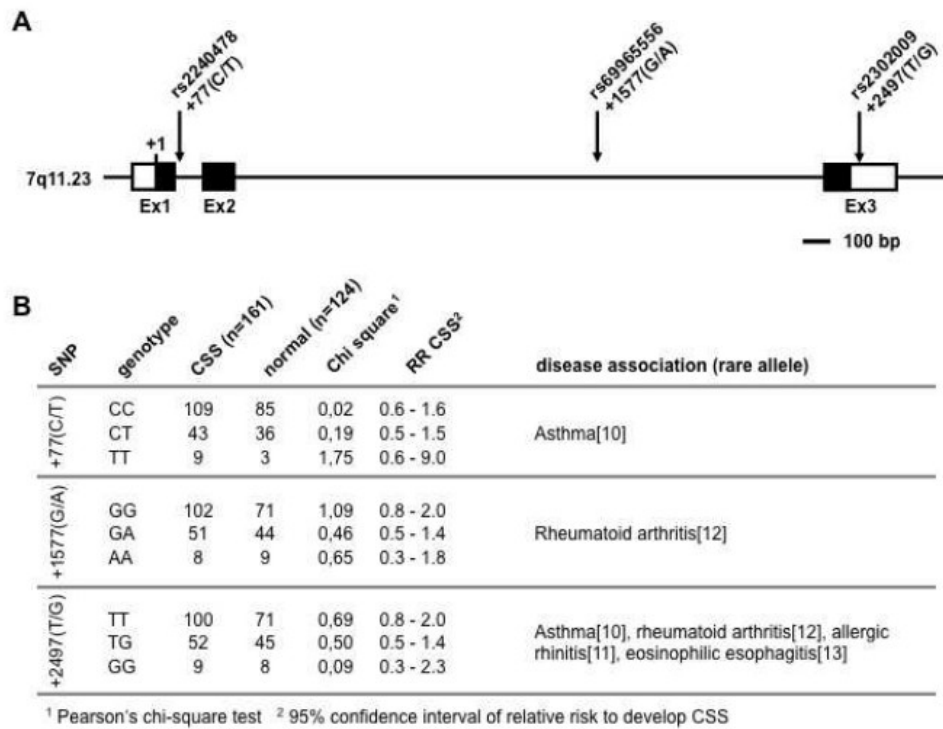
### Ricerca di correlazione fra Eotassina-3 e CSS.

Questo studio nasce dalla collaborazione con il Dr. Jochen Zwerina dell'Università di Erlangen (Germania), con il quale è nata una proficua collaborazione per lo studio delle vasculiti. Lo studio è stato effettuato unendo le casistiche italiane e tedesche di pazienti CSS, e porterà alla pubblicazione di un articolo nel 2011 (Jochen Zwerina, Christian Bach, Davide Martorana, Maria Jatzwauk, Guido Hegasy, Frank Moosig, Jan Bremer, Stefan Wiczorek, Alexander Moschen, Herbert Tilg, Thomas Neumann, Bernd Spriewald, Georg Schett and Augusto Vaglio: Eotaxin-3 in Churg-Strauss Syndrome: A clinical and immunogenetic study. Rheumatology, in press). I risultati sono mostrati nelle figure 2, 3 e tabella 10.



**Figura 2:** Eotassina-3 come marker diagnostico nella CSS.

(A): Livelli sierici di eotassina-3 in pazienti CSS e controlli. I livelli di eotassina-3 sono nettamente aumentati ( $P < 0.0001$ ) in pazienti CSS rispetto a pazienti con sindrome ipereosinofila (HES), malattia parassitica con eosinofilia, eosinofilia associata ad altre malattie, vasculiti dei piccoli vasi (SVV), Lupus eritematoso sistemico (SLE), Sclerosi sistemica (SSc) e colite ulcerativa (UC) (Rheumatology, in press)



**Figura 3:** Associazione di SNPs nel gene eosinofina-3 con CSS.

(A): Rappresentazione schematica della struttura esone-introne del gene umano eosinofina-3 con le regioni codificanti rappresentate in nero. In bianco sono rappresentati 5' e 3' UTR. La posizione degli SNPs analizzati sono indicati con frecce.

(B): Frequenze genotipiche dei tre SNPs analizzati; sono stati genotipizzati mediante sequenziamento di 161 pazienti CSS e 124 controlli sani. L'analisi statistica è stata effettuata mediante Chi-quadro di Pearson (Rheumatology, in press)

Patient	Clinical activity	Organ involvement	CRP (mg/dl)	Eo (n/ $\mu$ l)	ANCA	IgE (kU/l)	Eotaxin-3 (pg/ml)
1	Active	A,E,L,P,S,G	11,9	2546	cANCA/PR3	43,7	99,3
	Relapse	A,E,L,P,S,G	7,9	1036	cANCA/PR3	ND	151,7
2	Active	A,E,P,H	3,0	4736	Negative	535	165,2
3	Active	A,E,P,H,B	6,4	4350	Negative	91	461
	Relapse	A,E,P,H,B	4	4320	Negative	21	643
4	Relapse	A,E,L,P,H	0,7	1099	Negative	360	138,8
5	Active	A,E,L,P	0,8	785	pANCA/MPO	9	120
6	Active	A,E,P,S	5,5	5200	pANCA/MPO	197	150,5
7	Active	A,E,L,P	1,6	2034	Negative	96	63
8	Active	A,E,L	7,3	49280	Negative	2295	429
9	Active	A,E,P,S	1,0	3686	Negative	3527	128,9
10	Active	A,E,S,G	13	7650	Negative	769	51
11	Active	A,E,L,P,H,K,S	14,4	896	pANCA/MPO	1384	348,8
12	Active	A,E,L,P,S,H	1,1	9000	Negative	380	260
13	Active	A,E,L,H	1,6	5140	Negative	1692	227
14	Active	A,E,L,K,P,S	0,3	924	pANCA/MPO	127	246,1
15	Relapse	A,E,P,K,H	1,6	4800	Negative	182	243

CRP - C-reactive protein, Eo - Eosinophils, ANCA - Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, PR3 - proteinase 3, MPO - myeloperoxidase, IgE - Immunoglobulin E, A - asthma, E - sinusitis, L - lung, P - peripheral neuropathy, S - skin, G - gastrointestinal tract, H - heart, K - kidney, B - CN

**Tabella 10:** Caratteristiche cliniche dei pazienti CSS (Rheumatology, in press)

## **Studio di SNPs nei geni PTPN22, STAT4, IL12RA nelle vasculiti ANCA-associate e nella IRF**

La ricerca di una correlazione fra i polimorfismi rs2476601 del gene PTPN22 (Gregersen, 2005) (Wu et al., 2005), del polimorfismo rs7574865 del gene STAT4 (Korman, Kastner, Gregersen, & Remmers, 2008) e il polimorfismo rs6887695 del gene IL12RA (Holland, 2007) è motivata dalla dimostrazione di un loro coinvolgimento in altre patologie autoimmuni-infiammatorie (Lettre & Rioux, 2008).

Le frequenze alleliche dei pazienti e dei controlli sono risultate in equilibrio di Hardy-Weinberg. I tre polimorfismi indagati sono stati testati per i sintomi clinici caratterizzanti le

patologie indagate. L'analisi statistica completa è tuttora in corso, ma da risultati preliminari è stata evidenziata un'associazione statisticamente significativa fra PTPN22 e WG ( $P < 0.005$ ).

### **Studio di associazione Genome Wide (GWAS) nella WG e MPA**

Nel 2009 è nata l'idea di effettuare uno studio esteso a tutto il genoma, per ricercare i determinanti genetici delle vasculiti ANCA-associate; il gruppo proponente è stato quello del Prof. Ken Smith, dell'Università di Cambridge; data la complessità dello studio, la proposta di partecipazione è stata estesa a più centri europei (Cambridge, Manchester, Birmingham, Groningen, Copenhagen, Maastricht, Erlangen, Bad Branstedt, Svezia, Italia e Parigi), in modo da raccogliere quanti più casi possibili. Il centro di Parma ha fornito più della metà dei casi italiani. Nella prima fase dello studio sono stati analizzati 1250 campioni del Regno Unito; gli SNPs maggiormente significativi sono stati testati per conferma (replication) in 1200 pazienti di altri stati europei, in modo da testare gli SNPs positivi su pazienti con un background genetico diverso. Gli SNPs testati nella prima fase sono stati 1 milione, nella seconda fase 130 circa. Lo studio è tuttora in fase di lavorazione.

## **5. DISCUSSIONE**

Come per i risultati, anche la discussione verrà suddivisa per ogni singolo studio pubblicato durante il Dottorato.

### **Ricerca determinanti genetici del sistema maggiore di istocompatibilità nella Periaortite Cronica.**

Nel presente studio sono stati valutati i geni HLA-A, -B, -DR e i polimorfismi TNFA(-238A>G) e TNFA (-308A>G). Negli studi pubblicati (Martorana et al., 2006) (Vaglio, Greco et al., 2006), è stato dimostrato che la patologia è statisticamente associata al gene HLA-DRB1\*03, che è a sua volta un marker di numerose condizioni autoimmuni quali il diabete mellito di tipo 1 (Hawkins et al., 1987) e la miastenia grave (Vieira et al., 1993). Non esistono, però, chiare evidenze circa i meccanismi patogenici che governano lo sviluppo della reazione fibro-infiammatoria retroperitoneale. Molte delle proteine coinvolte nella genesi e nell'amplificazione del processo flogistico, così come anche nella deposizione di matrice extracellulare, sono sintetizzate da geni polimorfici. Gli SNPs di queste proteine possono alterarne l'espressione e condizionarne alterati livelli circolanti o tissutali.

Nella successiva review (Vaglio, Greco et al., 2006) è stata presa in considerazione la CP, con le caratteristiche di autoimmunità; non sono descritti casi familiari, tuttavia una componente genetica è stata dimostrata: si illustra l'associazione del gene HLA-DRB1\*03 dimostrata dal nostro gruppo, che non solo conferisce suscettibilità allo sviluppo della malattia, ma modula la risposta infiammatoria.

Il sistema HLA contribuisce a mediare meccanismi patogenici autoimmuni; infatti, gioca un ruolo cruciale nella selezione positiva e negativa delle cellule T nel timo, in modo che particolari molecole HLA possono selezionare cloni self-reattivi di cellule T.

Nel nostro studio, una buona percentuale di pazienti presentava sintomi costituzionali, elevati livelli di proteina C-reattiva correlata ad autoanticorpi e malattie autoimmuni implicanti altri organi o apparati. Tali manifestazioni sembrano maggiormente frequenti in pazienti HLA-DRB1\*03 positivi, ma, data la popolazione poco numerosa, non ha raggiunto la significatività statistica; questo dimostra che l'HLA non solo contribuisce alla suscettibilità della malattia, ma influenza anche l'intensità della risposta autoimmune/infiammatoria.

### **Ricerca determinanti genetici del sistema maggiore di istocompatibilità nella CSS.**

Il CSS ha due principali subsets, uno vasculitico, legato alla presenza di ANCA ed uno allergico-eosinofilo, ANCA-negativo. Questo studio (Vaglio et al., 2007) ha quindi dimostrato che i geni HLA-DRB4 e HLA-DRB1\*07 sono un fattore di rischio genetico per lo sviluppo della CSS ed aumentano la suscettibilità allo sviluppo di manifestazioni vasculitiche della malattia.

Le implicazioni dello studio sono molteplici. Le molecole HLA hanno un ruolo fondamentale nell'interazione fra cellule T e cellule che presentano l'antigene (APC), poiché le prime riconoscono epitomi antigenici solo quando sono presentati da APC in associazione all'HLA (Weyand, Hicok, Conn, & Goronzy, 1992).

La scoperta che pazienti CSS hanno un repertorio ristretto di geni HLA supporta l'ipotesi che solo determinanti antigenici selezionati potrebbero essere implicati nella genesi del CSS, e simultaneamente incrementare il ruolo patogenico delle cellule T. A supporto di questa ipotesi, l'espansione clonale di cellule T condivide recettori specifici per cellule T, in modo da riconoscere un limitato numero di antigeni (Muschen et al., 1999).

Sulla base di queste ipotesi, nasce quindi l'idea della malattia guidata dall'antigene.

Il gene HLA-DRB4 codifica l'antigene supertipico HLA-DR53 ed esiste solo in linkage disequilibrium con i geni HLA-DRB1\*04, DRB1\*07 e DRB1\*09.

Diverse malattie sono legate a questi geni, alcuni dei quali hanno alcuni segni clinici con il CSS. Ad esempio, l'artrite reumatoide è associata al gene HLA-DRB1\*04 (Heldt et al., 2003). Alcune vasculiti sono associate con geni HLA: l'arterite giganto-cellulare con l'HLA-DRB1\*04 (Weyand et al., 1992), mentre l'HLA-DRB1\*07 con l'atopia (Aron et al., 1996; Senechal et al., 1999).

In alcune malattie, l'HLA non solo gioca un ruolo nella suscettibilità alle malattie, ma influenza lo spettro delle caratteristiche cliniche; per esempio, l'allele HLA-DRB1\*0401 è correlate alle manifestazioni extra-articolari in pazienti con artrite reumatoide (Turesson, Weyand, & Matteson, 2004). Dopo aver scoperto l'associazione fra CSS e HLA-DRB4, abbiamo comparato le caratteristiche cliniche dei pazienti HLA-DRB4 positivi e negativi ed osservato che i primi condividevano sintomi costituzionali, caratteristiche vasculitiche, porpora, mononeuropatie multiple, emorragie alveolari e ANCA.

I nostri dati non solo rinforzano l'ipotesi che il CSS ha due subsets separati, postulata 2 anni prima da Kallenberg (Kallenberg, 2005), ma evidenzia che fattori immunogenetici influenzano questa dicotomia clinica.

Nel 2008, un anno dopo la pubblicazione del nostro lavoro scientifico, è stato pubblicato sulla stessa rivista una lettera di un gruppo tedesco (Wieczorek, Hellmich, Gross et al., 2008) che conferma le nostre scoperte.

## **Ricerca di correlazione fra Periaortite Cronica e CC chemokine receptor 5 polymorphism**

La IRF e le forme aneurismatiche (inflammatory abdominal aortic aneurysm, IAAA), sono due sottogruppi della Periaortite Cronica (CP). Il recettore CCR5 delle chemochine è

espresso in modo predominante sui monociti e sulle cellule T polarizzate Th-1. L'attività di CCR5 media le cellule T ed il reclutamento dei monociti; il gene CCR5 ha un polimorfismo con una delezione di 32 nucleotidi nella regione promotore, che crea una forma troncata di CCR5 non funzionale, che non è espressa sulla membrana cellulare. I soggetti omozigoti per questo polimorfismo mancano completamente del recettore sulla membrana cellulare, mentre gli eterozigoti esprimono basse quantità del recettore. La totale o parziale assenza del recettore influenza lo sviluppo di malattie infiammatorie, modulandone la progressione (Zhou, Huang, Farver, & Hoffman, 2003). In questo studio multicentrico (Luigi Boiardi, Augusto Vaglio, Davide Nicoli, Enrico Farnetti, Alessandra Palmisano, Nicolò Pipitone, Federica Maritati, Bruno Casali, Davide Martorana, Gabriella Moroni, Beniamina Gallelli, Carlo Buzio and Carlo Salvarani: CC chemokine receptor 5 polymorphism in chronic periaortitis. *Rheumatology*, in press) è stata analizzata la maggior coorte CP al mondo e scoperto un'associazione positiva fra l'allele CCR5\_32 e l'IAAA, indicando che tali pazienti potrebbero avere una ridotta espressione di questo recettore delle chemochine. Nei pazienti IRF, invece, le differenze non erano significative. Concludendo, il polimorfismo CCR5 $\Delta$ 32 è associato con un aumentato rischio di sviluppare la forma aneurismatica della CP (IAAA), particolarmente in quei pazienti senza malattie aterosclerotiche.

### **Ricerca di correlazione fra Eotassina-3 e CSS**

La diagnosi differenziale di CSS è difficoltosa, in quanto ci sono più malattie che condividono alcune caratteristiche cliniche. Analizzando sieri di pazienti CSS è stato notato che pazienti con infezione da parassiti erano associati con eosinofilia periferica. La maggior parte dei pazienti rivelava bassi livelli di eotassina-3; la stessa caratteristica era rilevata anche da pazienti con polmonite eosinofila, eosinofilia indotta da farmaci ed eosinofilia

tropicale. Questo studio (Jochen Zwerina, Christian Bach, Davide Martorana, Maria Jatzwauk, Guido Hegasy, Frank Moosig, Jan Bremer, Stefan Wiczorek, Alexander Moschen, Herbert Tilg, Thomas Neumann, Bernd Spriewald, Georg Schett and Augusto Vaglio: Eotaxin-3 in Churg-Strauss Syndrome: A clinical and immunogenetic study. *Rheumatology*, in press) ha dimostrato che l'eotassina-3 è altamente elevata nel siero di pazienti CSS, confrontata a controlli sani, malattie eosinofiliche e altre vasculiti dei piccoli vasi. Nessuno dei tre SNPs ha mostrato influenzare invece l'espressione del gene eotassina-3. Quindi, l'eotassina-3 sierica è un marker sensibile e specifico per la diagnosi di CSS nella pratica di laboratorio, mentre gli SNPs dello stesso gene non lo sono.

### **Studio di SNPs nei geni PTPN22, STAT4, IL23R nelle vasculiti ANCA-associate e nella IRF**

**PTPN22:** È stato studiato il polimorfismo G/A rs2476601 sito sul gene PTPN22 sul cromosoma 1. Per questo polimorfismo sono presenti in letteratura diversi studi di associazione con patologie autoimmuni vasculitiche (ad esempio WG) e non, come il morbo di Crohn (De Jager et al., 2006), la spondilite anchilosante (Orozco et al., 2006), la sclerosi multipla (Matesanz et al., 2005) e la psoriasi (Nistor et al., 2005), che sono risultate non associate, mentre il diabete di tipo 1 (Onengut-Gumuscu, Ewens, Spielman, & Concannon, 2004), la malattia di Graves (Heward et al., 2007), la tiroidite di Hashimoto (Kahles et al., 2005), la malattia di Addison (Skinningsrud et al., 2008), il Lupus Sistemico Eritematoso (Harley, Kelly, & Kaufman, 2006), artriti di origine ignota e l'Artrite Reumatoide che invece sono risultate associate a R620W. È interessante notare il fatto che le malattie autoimmuni associate a R620W siano caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi come fattore prominente, mentre in quelle patologie autoimmuni non

associate al polimorfismo studiato non presentino autoanticorpi come caratteristica principale, ma il loro sviluppo sia secondario ad altri fattori.

I risultati ottenuti con genotipizzazione del SNP, rs2476601 su PTPN22 non hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa con le vasculiti MPA, CSS e FRP considerate rispetto alle popolazione di controllo mentre l'associazione con WG è risultata significativa ( $P < 0.005$ ).

L'associazione è stata confermata su una popolazione tedesca (Jagiello, Aries et al., 2005).

Concludendo, le informazioni ricavate dallo studio sono:

- WG è associata al polimorfismo rs2476601 su PTPN22
- MPA, CSS e FRP non sono associate al polimorfismo rs2476601 su PTPN22
- i dati ottenuti sono statisticamente significativi, validati e confermano i risultati di altri studi sullo stesso polimorfismo su altre popolazioni non italiane.

Sulla base di queste informazioni e di quelle riscontrate in letteratura si possono fare ipotesi sul ruolo che svolge la variante genetica studiata nella patogenesi e nello sviluppo della WG.

Come detto nell'introduzione, la WG come molte malattie autoimmuni è una malattia poligenica multifattoriale, cioè diversi geni e diversi fattori ambientali intervengono cumulativamente nella sua patogenesi. Si può quindi affermare che uno dei geni coinvolti sia il PTPN22, gene che codifica per una protein-tirosina fosfatasi non recettoriale intracellulare chiamata N22 o LYP che ha un analogo nel topo denominato PEP.

Ricordando che la variante polimorfica studiata in questo lavoro determina un cambio amminoacidico da Arginina a Triptofano che sembra innalzare l'attività di PTPN22 (definita come gain of function), si può ipotizzare che i due modelli proposti finora sul

ruolo della variante nella patogenesi di altre malattie autoimmunitarie siano validi anche per la WG (Gregersen, 2005).

Il primo ipotizza che l'incremento nell'attività di PTPN22, dovuto alla variante, innalzi la soglia richiesta per una segnalazione efficace da parte del T-cell receptor (TCR) ai timociti in fase di sviluppo; ciò porterebbe ad un difetto nella selezione (delezione) dei linfociti T autoreattivi e quindi alla sopravvivenza di una popolazione di linfociti autoreattivi.

Il secondo modello invece, coinvolgerebbe i linfociti T regolatori ( $T_{reg}$ ). L'aumento dell'attività di PTPN22 dovuto alla variante, porterebbe ad una ridotta segnalazione da parte del TCR in queste cellule e di conseguenza ad una ridotta funzione regolatoria da parte dei  $T_{reg}$  (Gregersen, 2005).

Le alterazioni non coinvolgono soltanto la linea T in quanto anche la linea B risulta influenzata; soggetti portatori della variante infatti hanno alterazioni nella popolazione B ed hanno una minore responsività alla stimolazione via B-cell receptor (BCR). Sebbene la differenziazione e la proliferazione delle cellule B sia influenzata dalla funzionalità T, l'associazione della variante R620W con una diminuita risposta via BCR, sta ad indicare che i processi intrinseci alle cellule B sono direttamente alterati dalla variante.

Queste scoperte sembrerebbero paradossali in quanto ci si aspetterebbe che l'autoimmunità derivi da un'iperresponsività piuttosto che da un'iporesponsività delle cellule B e T; si è dimostrato tuttavia come, in effetti, la variante R620W e quindi l'autoimmunità, sia associata ad un calo nella risposta TCR e BCR mediata, con conseguente proliferazione di cloni autoreattivi.

Il polimorfismo rs2476601 è da considerarsi quindi un fattore predisponente per lo sviluppo di WG. Alcune casistiche hanno evidenziato una modesta correlazione con

alcuni geni HLA, altri studi hanno osservato, come nei pazienti con WG, siano maggiormente rappresentate varianti alleliche anomale di geni codificanti per l' $\alpha$ -1 antitripsina ( $\alpha$ -1 protease inhibitor), potente inibitore di proteasi quali la PR3 e l'elastasi, ed importante quindi nel limitare il potenziale distruttivo di questi enzimi.

Questi cambiamenti globali nelle popolazioni linfocitarie potrebbero perciò costituire un terreno più fertile allo sviluppo di una patologia autoimmune, come ad esempio la WG, o favorendo lo sviluppo e la proliferazione di linfociti autoreattivi o perdendo il meccanismo regolatorio col quale sono tenuti sotto controllo.

Inoltre da questo studio si può ricavare un altro dato importante: siccome WG e MPA sono molto affini e simili per alcuni aspetti clinici, si poteva pensare che avessero un background genetico comune invece, poiché MPA non risulta essere associata al polimorfismo studiato, questo suggerisce che diversi fattori genetici possano portare a stesse manifestazioni cliniche.

Quindi rimangono ancora molte domande a cui dare risposta prima di aver compreso completamente la patogenesi e lo sviluppo di queste patologie complesse ma si può sicuramente dire che molto si è fatto e molto si sta facendo; anche con l'aiuto degli studi di associazione che, pur mantenendo un valore preliminare, possono comunque essere utili per individuare alcuni fattori genetici predisponenti allo sviluppo di una o più di queste patologie.

**IL23R:** La mancanza di associazione tra IL23R con vasculiti ANCA-associate ed IRF nella popolazione italiana, potrebbe essere spiegata in maniera alternativa, ipotizzando che lo SNP possa essere coinvolto nella progressione della malattia mediante un'interazione gene-ambiente attraverso un trigger non ancora individuato. Tuttavia, alcuni individui caucasici sviluppano vasculiti ANCA-associate indipendentemente da fattori ambientali, sebbene sia

possibile che l'ipotetico trigger ambientale implicato possa essere un fattore ambientale-alimentare mantenuto anche fra i caucasici che vivono altrove.

Per sottolineare il forte impatto che l'ambiente e la distribuzione geografica delle popolazioni hanno sulla maggiore suscettibilità ad alcune malattie, recentemente uno studio condotto sulla popolazione cinese, ha dimostrato che esiste un'associazione tra la maggiore suscettibilità alla spondilite anchilosante e gli SNPs rs27980 ( $P= 0.0048$ ) rs7711564 ( $P= 0.0081$ ) del gene ERAP1 (Davidson et al., 2009). Tale associazione è comune alla popolazione caucasica dove però si riscontra anche un'associazione tra la stessa malattia e SNP (rs11209026) del gene IL23R (Brown, 2009). Tale associazione non è riscontrabile nella popolazione cinese oggetto di studio. I risultati confermano l'elevato valore che rivestono le differenze etniche e geografiche su geni suscettibili e possono gettare le basi per la comprensione dei meccanismi patogenetici che originano malattie complesse e multifattoriali come quelle reumatiche autoimmuni.

**STAT4:** la valutazione del gene STAT4 deriva dalla precedente associazione dello SNP G/T rs7574865 con altre malattie infiammatorie autoimmuni come il morbo di Crohn (Diaz-Gallo et al.), la spondilite anchilosante (Fung et al., 2009), la sclerosi multipla (Rodriguez et al., 2006) e la psoriasi (Zervou, Goulielmos, Castro-Giner, Tosca, & Krueger-Krasagakis, 2009) che sono risultate non associate, mentre il diabete di tipo 1 (Zervou, Mamoulakis, Panierakis, Boumpas, & Goulielmos, 2008), la malattia di Graves (Land, Gudapati, Kaplan, & Seetharamaiah, 2006), la tiroidite di Hashimoto (Land et al., 2006), la malattia di Addison, il Lupus Sistemico Eritematoso, artriti di origine ignota e l'Artrite Reumatoide che invece sono risultate associate a STAT4. È interessante notare che le malattie autoimmuni associate a STAT4 siano caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi come fattore prominente, mentre in quelle patologie

autoimmuni non associate al polimorfismo studiato non presentino autoanticorpi come caratteristica principale, ma il loro sviluppo sia secondario ad altri fattori.

Le informazioni fondamentali ricavate dallo studio sono:

- IRF è associata, sebbene in modo border-line, al polimorfismo rs7574865 su STAT4
- MPA, CSS e WG non sono associate al polimorfismo rs7574865 su STAT4
- i dati ottenuti sono statisticamente significativi e validati.

Sulla base di queste informazioni e di quelle riscontrate in letteratura si possono fare ipotesi sul ruolo che svolge la variante genetica studiata nella patogenesi e nello sviluppo della IRF.

Come detto nell'introduzione, la IRF come molte malattie autoimmuni è una malattia poligenica multifattoriale, cioè diversi geni e diversi fattori ambientali intervengono cumulativamente nella sua patogenesi. Si può quindi affermare che uno dei geni coinvolti è STAT4, gene che codifica per un fattore di trascrizione coinvolto nelle vie di segnalazione di parecchie citochine, incluse IL-12, interferoni di tipo 1, e IL-23.

Il polimorfismo rs7574865 è da considerarsi quindi un fattore predisponente per lo sviluppo di IRF. Le proteine STAT sono fattori trascrizionali citoplasmatici che si attivano con fosforilazione e successivamente dimerizzate e traslocate nel nucleo, dove queste interagiscono con elementi di legame del DNA, STAT4 è richiesto per la trasduzione del segnale di varie citochine pro infiammatorie come IL-12, IL-15 e IL-23 e quindi è fondamentale nella polarizzazione e propagazione di una risposta immune di cellule Th1 (Athie, Flotow, Hilyard, & Cantrell, 2000) (Banerjee, Biswas, & Rouse, 2007). STAT4 è stato anche coinvolto nello sviluppo di sottoinsiemi di nuova scoperta di cellule Th17, le quali mostrano un ruolo dominante nell'infiammazione associata all'autoimmunità. Il ruolo di IL-23 e cellule Th17 in condizioni infiammatorie come artrite reumatoide, sclerosi multipla e malattie infiammatorie intestinali è stato

riconosciuto, e un possibile ruolo nel tipo 1 di diabete mellito è stato ipotizzato (Paust et al., 2009) (Maloy & Kullberg, 2008).

Queste caratteristiche potrebbero quindi costituire terreno più fertile allo sviluppo di una patologia autoimmune, come ad esempio la IRF, o favorendo lo sviluppo e la proliferazione di linfociti autoreattivi o perdendo il meccanismo regolatorio col quale sono tenuti sotto controllo.

Inoltre da questo studio si può ricavare un altro dato importante: oltre ad avere una significatività tra il gene STAT4 e la malattia IRF, dai nostri dati si è visto che anche se non c'è correlazione tra gene STAT4 e malattia MPA, i risultati sono molto vicini alla significabilità, quindi nel caso in cui si andasse ad aumentare il numero di individui testati, potrebbero modificarsi i risultati e quindi diventare significativa anche la correlazione tra STAT4 e MPA.

### **Studio di associazione Genome Wide (GWAS) nella WG e MPA**

L'interesse per lo studio dei polimorfismi nelle malattie a patogenesi immunitaria-infiammatoria è cresciuto notevolmente con il sequenziamento completo del genoma umano. Il progetto genoma umano ha permesso di sapere che ogni individuo possiede un patrimonio di 3 miliardi di basi e di queste il 99,9% è condivisa da tutti gli individui. Si può notare che il restante 0,1% rappresenta le differenze geniche tra individui non imparentati.

Nonostante possa sembrare un quota insignificante sul totale, esso equivale a 3 milioni di nucleotidi differenti da individuo ad individuo, un numero in grado di generare differenze molto rilevanti, ad esempio una diversa suscettibilità a certe malattie, oppure comportarsi da fattori di protezione nei confronti di altre. La maggior parte di queste differenze nel DNA è rappresentato da SNPs. Esistono diverse tipologie di

polimorfismi, la definizione comune li definisce come variazioni non patologiche del DNA presenti in più dell'1% della popolazione. Gli SNP raggruppati in una certa regione vanno a costituire un aplotipo, che può essere tipico di un gruppo di individui, ad esempio della medesima origine geografica. L'elevato numero di variazioni presente in generale, ma in particolare degli SNP, fornisce un enorme fonte di marcatori genetici che possono essere impiegati in diversi modi come ad esempio per studi di mappatura genomica, analisi d'identità o anche nella diagnostica medica.

Nel 2005 il National Institute of Health americano ha dato il via al progetto Genome Wide Association Studies (GWAS) (Samani et al., 2007; Saxena et al., 2007; Zeggini et al., 2007). L'ambizioso studio aveva l'obiettivo di trovare le relazioni esistenti tra le varianti di alcuni geni e la presenza di specifici disturbi o di malattie genetiche. Gli studi Genome Wide hanno perciò lo scopo di individuare varianti casuali lungo tutto il genoma. In tal senso un notevole contributo è giunto dalle nuove tecnologie di genotipizzazione high-throughput e dal Consorzio Internazionale "HapMap", il quale ha studiato i polimorfismi genomici inizialmente su quattro popolazioni, estendendolo poi ad altre ("The International HapMap Project," 2003).

La prospettiva circa gli studi Genome-wide era rivoluzionaria perché permetteva la comprensione e l'individuazione di correlazioni tra la genetica e le malattie partendo da ipotesi a priori. Tuttavia, l'approccio Genome-Wide porta ancora oggi a problematiche relative al numero massivo di test statistici che potrebbero indurre a potenziali falsi negativi o positivi portando a livelli non accettabili i risultati statistici.

Questo ha fornito la spinta verso un importante studio che si basa sui geni candidati, i quali limitano il numero di varianti testate e presentano il vantaggio di selezionare solo varianti associate al tipo di malattie in esame.

Gli studi Genome-wide poggiano sull'ipotesi "malattia comune - variante comune" la quale suggerisce che l'influenza genetica su malattie comuni può essere attribuibile ad un numero limitato di varianti alleliche presenti su 1-5% della popolazione. È fondamentale sottolineare che alcune varianti alleliche causative più rare rispetto a tali percentuali, potrebbero non essere rilevate attraverso questo approccio, in quanto gli SNPs rappresentati nei microarrays hanno una frequenza nella popolazione maggiore del 5%. Malgrado ciò gli studi Genome-Wide sono un punto di partenza verso la scoperta dei meccanismi patogenici alla base di molte malattie e possono avere un forte impatto nella clinica.

Pertanto in ambito diagnostico, è possibile pensare di potere applicare tali studi a quella tipologia di malattie multifattoriali, dove fattori ambientali agiscono su un background genico predisponente costituito da più varianti geniche, ognuna delle quali potrebbe apportare un effetto ridotto ma cumulativo sulla suscettibilità finale alla malattia. La comprensione dei meccanismi di insorgenza di queste malattie può ulteriormente essere complicata dall'eterogeneità: cioè diverse combinazioni delle varianti geniche danno origine a fenotipi simili. Le metodiche convenzionali utilizzate per identificare i fattori monogenici, non possono essere adattate all'analisi dei polimorfismi genetici coinvolti in patologie complesse, diventano necessarie così tecniche che consentano di analizzare più genotipi fra i geni che si sospettano essere candidati, in un numero elevato di campioni.

Nel caso non si decida per un approccio genome-wide, l'approccio per geni candidati può essere posizionale, cioè emergere da un precedente lavoro studio di mappatura (analisi di linkage) o funzionale, nel caso di omologia con un gene la cui funzione è stata identificata tramite un organismo modello.

È necessario soffermarsi su un aspetto importante riguardante gli studi di associazione; di estrema rilevanza risulta essere la dimensione del campione. La numerosità della popolazione (intesa come controlli e pazienti) modifica la soglia di significatività e ne aumenta il valore statistico.

Siccome negli ultimi anni sono stati pubblicati molti studi di associazione per malattie complesse privi di potere statistico, con risultati che potevano sembrare apparentemente significativi ma smentiti successivamente da altri gruppi di lavoro, recentemente sono state pubblicate delle linee guida, definite “ST.RE.G.A” (STrengthening the REporting of Genetic Association studies”) (von Elm, Moher, & Little, 2009).

Le linee guida forniscono diverse indicazioni sia operative che di carattere informativo su come sia richiesto l'organizzare una pubblicazione riferita ad uno studio di associazione; tra le raccomandazioni più importanti è da citare:

- la validazione dei risultati con una seconda metodica di genotipizzazione
- la verifica dell'equilibrio allelico con la legge di Hardy-Weinberg per accertarsi che gli alleli si combinino nei diversi genotipi sulla base delle semplici leggi di probabilità (fase di equilibrio) e non ci siano fattori non casuali che intervengano
- la verifica della replicabilità del dato su una seconda popolazione di una diversa origine geografica ripetendo lo stesso studio con i medesimi risultati.

Gli studi di associazione possono essere intesi come il punto iniziale della comprensione dei meccanismi patogenetici di malattie complesse, al fine di definire il contributo genetico di una malattia; per questo si confronta la distribuzione di determinati SNPs in un campione di individui sani con quella di un gruppo di malati (tutti appartenenti alla medesima zona geografica).

Se un particolare aplotipo si presenta più di frequente in individui malati rispetto ai controlli sani, ciò significa che un gene che contribuisce alla malattia potrebbe essere

localizzato in quell'aplotipo o vicino ad esso. Le prospettive future potrebbero implicare l'utilizzo di tali studi al servizio della farmacogenomica, disciplina emergente che si interessa di come sulla base di un genotipo si possa predire la risposta ad una determinata terapia, e avere informazioni in anticipo riguardo all'efficacia di un certo farmaco. I geni che influenzano la risposta ai farmaci possono presentare varianti alleliche nella popolazione e tutto ciò potrebbe tradursi in termini di farmacocinetica su una maggiore biodisponibilità del farmaco (geni codificanti per trasportatori o proteine coinvolte nel metabolismo) e sulla farmacodinamica riferita al bersaglio terapeutico del farmaco (geni codificanti per recettori, canali ionici, enzimi e proteine regolatorie).

Per mostrare la potenzialità degli studi di genotipizzazione Genome-Wide, si può citare un recente lavoro che ha dimostrato che la presenza di un polimorfismo nel gene IL28B, che codifica per l'interferone-lambda-3, è associata ad una diversa responsività al trattamento per HCV (Ge et al., 2009; Thomas et al., 2009).

Si è potuto osservare che la presenza di determinati SNPs risultava decisiva nel predire la risposta alla terapia convenzionale (peginterferone alfa-2b o-alfa-2 in combinazione con ribavirina). Questo studio ha messo in risalto quindi come i crescenti sviluppi della genetica possano contribuire alla nascita e al miglioramento di discipline come la farmacogenomica e che la cooperazione tra esse può risultare vantaggiosa per la comprensione e il trattamento di patologie complesse.

## EPILOGO

...

*Zorba saltò sulla balaustra che girava attorno al campanile.*

*In basso le auto sembravano insetti dagli occhi brillanti.*

*L'umano prese la gabbiana tra le mani.*

*"No! Ho paura! Zorba! Zorba!" stridette Fortunata beccando le mani dell'umano.*

*"Aspetta. Posala sulla balaustra" miagolò Zorba.*

*"Non avevo intenzione di buttarla giù" disse l'umano.*

*"Ora volerai, Fortunata. Respira. Senti la pioggia. È acqua. Nella tua vita avrai molti motivi per essere felice, uno di questi si chiama acqua, un altro si chiama vento, un altro ancora si chiama sole e arriva sempre come una ricompensa dopo la pioggia. Senti la pioggia.*

*Apri le ali" miagolò Zorba.*

*La gabbianella spiegò le ali. I riflettori la inondavano di luce e la pioggia le copriva di perle le piume.*

*L'umano e il gatto la videro sollevare la testa con gli occhi chiusi.*

*"La pioggia. L'acqua. Mi piace!" stridette.*

*"Ora volerai" miagolò Zorba.*

*"Ti voglio bene. Sei un gatto molto buono" stridette fortunata avvicinandosi al bordo della balaustra.*

*"Ora volerai. Il cielo sarà tutto tuo" miagolò Zorba.*

*"Non ti dimenticherò mai. E neppure gli altri gatti" stridette lei già con metà delle zampe fuori dalla balaustra, perché come dicevano i versi di Atxaga, il suo piccolo cuore era lo stesso degli equilibristi.*

*"Vola!" miagolò Zorba allungando la zampa e toccandola appena.*

*Fortunata scomparve alla vista, e l'umano e il gatto temettero il peggio.*

*Era caduta giù come un sasso.*

*Col fiato sospeso si affacciarono alla balaustra, e allora la videro che batteva le ali sorvolando il parcheggio, e poi seguirono il suo volo in alto, molto più in alto della banderuola dorata che corona la singolare bellezza di San Michele.*

*Fortunata volava solitaria nella notte amburghese. Si allontanava battendo le ali con energia fino a sorvolare le gru del porto, gli alberi delle barche, e subito dopo tornava indietro planando, girando più volte attorno al campanile della chiesa.*

*"Volo, Zorba! So volare!" strideva euforica dal vasto cielo grigio.*

*L'umano accarezzò il dorso del gatto.*

*"Bene, gatto. Ci siamo riusciti" disse sospirando.*

*"Sì, sull'orlo del baratro ha capito la cosa più importante" miagolò Zorba.*

*"Ah sì? E cosa ha capito?" chiese l'umano.*

*"Che vola solo chi osa farlo" miagolò Zorba.*

*"Immagino che adesso tu preferisca rimanere solo. Ti aspetto giù" lo salutò l'umano.*

*Zorba rimase a contemplarla finché non seppe se erano gocce di pioggia o lacrime ad annebbiare i suoi occhi gialli di gatto nero grande e grosso, di gatto buono, di gatto nobile, di gatto del porto.*

**Da "Storia di una gabbianella e del gatto che le insegnò a volare".**

## **6. BIBLIOGRAFIA**

- Arning, L., Holle, J. U., Harper, L., Millar, D. S., Gross, W. L., Epplen, J. T., et al. Are there specific genetic risk factors for the different forms of ANCA-associated vasculitis? *Ann Rheum Dis*.
- Aron, Y., Desmazes-Dufeu, N., Matran, R., Polla, B. S., Dusser, D., Lockhart, A., et al. (1996). Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II alleles DR4 and DR7. *Clin Exp Allergy*, 26(7), 821-828.
- Athie, M. V., Flotow, H., Hilyard, K. L., & Cantrell, D. A. (2000). IL-12 selectively regulates STAT4 via phosphatidylinositol 3-kinase and Ras-independent signal transduction pathways. *Eur J Immunol*, 30(5), 1425-1434.
- Banerjee, K., Biswas, P. S., & Rouse, B. T. (2007). Role of Stat4-mediated signal transduction events in the generation of aggressor CD4+ T cells in herpetic stromal keratitis pathogenesis. *J Interferon Cytokine Res*, 27(1), 65-75.
- Basu, N., Watts, R., Bajema, I., Baslund, B., Bley, T., Boers, M., et al. EULAR points to consider in the development of classification and diagnostic criteria in systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis*, 69(10), 1744-1750.
- Brown, M. A. (2009). Genetics and the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol*, 21(4), 318-323.
- Carr, E. J., Clatworthy, M. R., Lowe, C. E., Todd, J. A., Wong, A., Vyse, T. J., et al. (2009). Contrasting genetic association of IL2RA with SLE and ANCA-associated vasculitis. *BMC Med Genet*, 10, 22.
- Carr, E. J., Niederer, H. A., Williams, J., Harper, L., Watts, R. A., Lyons, P. A., et al. (2009). Confirmation of the genetic association of CTLA4 and PTPN22 with ANCA-associated vasculitis. *BMC Med Genet*, 10, 121.
- Cohen, P., Guillevin, L., Baril, L., Lhote, F., Noel, L. H., & Lesavre, P. (1995). Persistence of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in asymptomatic patients with systemic polyarteritis nodosa or Churg-Strauss syndrome: follow-up of 53 patients. *Clin Exp Rheumatol*, 13(2), 193-198.
- Cooper, J. C., Ben-Smith, A., Savage, C. O., & Winer, J. B. (2000). Unusual T cell receptor phenotype V gene usage of gamma delta T cells in a line derived from the peripheral nerve of a patient with Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 69(4), 522-524.
- Csernok, E., Trabandt, A., & Gross, W. L. (1997). Immunogenetic aspects of ANCA-associated vasculitides. Editorial overview. *Exp Clin Immunogenet*, 14(3), 177-182.
- Davidson, S. I., Wu, X., Liu, Y., Wei, M., Danoy, P. A., Thomas, G., et al. (2009). Association of ERAP1, but not IL23R, with ankylosing spondylitis in a Han Chinese population. *Arthritis Rheum*, 60(11), 3263-3268.
- De Jager, P. L., Sawcer, S., Waliszewska, A., Farwell, L., Wild, G., Cohen, A., et al. (2006). Evaluating the role of the 620W allele of protein tyrosine phosphatase PTPN22 in Crohn's disease and multiple sclerosis. *Eur J Hum Genet*, 14(3), 317-321.
- Diaz-Gallo, L. M., Palomino-Morales, R. J., Gomez-Garcia, M., Cardena, C., Rodrigo, L., Nieto, A., et al. STAT4 gene influences genetic predisposition to ulcerative colitis but not Crohn's disease in the Spanish population: a replication study. *Hum Immunol*, 71(5), 515-519.
- Fries, J. F., Hunder, G. G., Bloch, D. A., Michel, B. A., Arend, W. P., Calabrese, L. H., et al. (1990). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis. Summary. *Arthritis Rheum*, 33(8), 1135-1136.
- Fung, E. Y., Smyth, D. J., Howson, J. M., Cooper, J. D., Walker, N. M., Stevens, H., et al. (2009). Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1

- diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. *Genes Immun*, 10(2), 188-191.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A. J., Simon, J. S., Shianna, K. V., Urban, T. J., et al. (2009). Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461(7262), 399-401.
- Gilkeson, G. S., & Allen, N. B. (1996). Retroperitoneal fibrosis. A true connective tissue disease. *Rheum Dis Clin North Am*, 22(1), 23-38.
- Gregersen, P. K. (2005). Gaining insight into PTPN22 and autoimmunity. *Nat Genet*, 37(12), 1300-1302.
- Griffith, M. E., & Pusey, C. D. (1997). HLA genes in ANCA-associated vasculitides. *Exp Clin Immunogenet*, 14(3), 196-205.
- Gross, W. L. (1997). Systemic necrotizing vasculitis. *Baillieres Clin Rheumatol*, 11(2), 259-284.
- Guillevin, L., Durand-Gasselino, B., Cevallos, R., Gayraud, M., Lhote, F., Callard, P., et al. (1999). Microscopic polyangiitis: clinical and laboratory findings in eighty-five patients. *Arthritis Rheum*, 42(3), 421-430.
- Guillevin, L., Lhote, F., Amouroux, J., Gherardi, R., Callard, P., & Casassus, P. (1996). Antineutrophil cytoplasmic antibodies, abnormal angiograms and pathological findings in polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome: indications for the classification of vasculitides of the polyarteritis Nodosa Group. *Br J Rheumatol*, 35(10), 958-964.
- Hagen, E. C., Andrassy, K., Csernok, E., Daha, M. R., Gaskin, G., Gross, W. L., et al. (1996). Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). A report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Methods*, 196(1), 1-15.
- Halperin, S., Nehrke, M. F., Hulicka, I. M., & Morganti, J. B. (1976). Partitioning chi-square the analysis of contingency tables with repeated measurements. *Exp Aging Res*, 2(2), 105-118.
- Harley, J. B., Kelly, J. A., & Kaufman, K. M. (2006). Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol*, 28(2), 119-130.
- Hawkins, B. R., Lam, K. S., Ma, J. T., Low, L. C., Cheung, P. T., Serjeantson, S. W., et al. (1987). Strong association of HLA-DR3/DRw9 heterozygosity with early-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Chinese. *Diabetes*, 36(11), 1297-1300.
- Heckmann, M., Holle, J. U., Arning, L., Knaup, S., Hellmich, B., Nothnagel, M., et al. (2008). The Wegener's granulomatosis quantitative trait locus on chromosome 6p21.3 as characterised by tagSNP genotyping. *Ann Rheum Dis*, 67(7), 972-979.
- Heldt, C., Listing, J., Sozeri, O., Blasing, F., Frischbutter, S., & Muller, B. (2003). Differential expression of HLA class II genes associated with disease susceptibility and progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 48(10), 2779-2787.
- Hellmich, B., Epplen, J. T., & Gross, W. L. (2004). Are ANCA-associated vasculitides inherited? *Clin Exp Rheumatol*, 22(6 Suppl 36), S1-2.
- Heward, J. M., Brand, O. J., Barrett, J. C., Carr-Smith, J. D., Franklyn, J. A., & Gough, S. C. (2007). Association of PTPN22 haplotypes with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(2), 685-690.
- Holland, S. M. (2007). Interferon gamma, IL-12, IL-12R and STAT-1 immunodeficiency diseases: disorders of the interface of innate and adaptive immunity. *Immunol Res*, 38(1-3), 342-346.
- Horai, Y., Miyamura, T., Takahama, S., Hirata, A., Nakamura, M., Ando, H., et al. Churg-Strauss syndrome associated with elevated levels of serum interleukin-5 and T cell receptor-Cbeta gene rearrangement. *Mod Rheumatol*.

- Hunder, G. G., Arend, W. P., Bloch, D. A., Calabrese, L. H., Fauci, A. S., Fries, J. F., et al. (1990). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis. Introduction. *Arthritis Rheum*, 33(8), 1065-1067.
- The International HapMap Project. (2003). *Nature*, 426(6968), 789-796.
- Izzedine, H., Servais, A., Launay-Vacher, V., & Deray, G. (2002). Retroperitoneal fibrosis due to Wegener's granulomatosis: a misdiagnosis as tuberculosis. *Am J Med*, 113(2), 164-166.
- Jagiello, P., Aries, P., Arning, L., Wagenleiter, S. E., Csernok, E., Hellmich, B., et al. (2005). The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum*, 52(12), 4039-4043.
- Jagiello, P., Gencik, M., Arning, L., Wiczorek, S., Kunstmann, E., Csernok, E., et al. (2004). New genomic region for Wegener's granulomatosis as revealed by an extended association screen with 202 apoptosis-related genes. *Hum Genet*, 114(5), 468-477.
- Jagiello, P., Gross, W. L., & Epplen, J. T. (2005). Complex genetics of Wegener granulomatosis. *Autoimmun Rev*, 4(1), 42-47.
- Jagiello, P., Klein, W., Schultz, H., Csernok, E., Gross, W. L., & Epplen, J. T. (2005). Association study of Wegener granulomatosis and the functionally relevant A645G polymorphism in the bactericidal/permeability increasing protein (BPI) gene. *Int J Immunogenet*, 32(1), 3-6.
- Jagiello, P., Wiczorek, S., Yu, P., Csernok, E., Gross, W. L., & Epplen, J. T. (2005). Association study with Wegener granulomatosis of the human phospholipase Cgamma2 gene. *J Negat Results Biomed*, 4, 1.
- Jayne, D., Rasmussen, N., Andrassy, K., Bacon, P., Tervaert, J. W., Dadoniene, J., et al. (2003). A randomized trial of maintenance therapy for vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *N Engl J Med*, 349(1), 36-44.
- Jennette, J. C., Falk, R. J., Andrassy, K., Bacon, P. A., Churg, J., Gross, W. L., et al. (1994). Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum*, 37(2), 187-192.
- Kahles, H., Ramos-Lopez, E., Lange, B., Zwermann, O., Reincke, M., & Badenhoop, K. (2005). Sex-specific association of PTPN22 1858T with type 1 diabetes but not with Hashimoto's thyroiditis or Addison's disease in the German population. *Eur J Endocrinol*, 153(6), 895-899.
- Kallenberg, C. G. (2005). Churg-Strauss syndrome: just one disease entity? *Arthritis Rheum*, 52(9), 2589-2593.
- Kallenberg, C. G. (2007). Antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated small-vessel vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*, 19(1), 17-24.
- Kallenberg, C. G., Brouwer, E., Weening, J. J., & Tervaert, J. W. (1994). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int*, 46(1), 1-15.
- Korman, B. D., Kastner, D. L., Gregersen, P. K., & Remmers, E. F. (2008). STAT4: genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity. *Curr Allergy Asthma Rep*, 8(5), 398-403.
- Kuwana, M., Wakino, S., Yoshida, T., & Homma, M. (1992). Retroperitoneal fibrosis associated with aortitis. *Arthritis Rheum*, 35(10), 1245-1247.
- Laiitt, R. D., Hubscher, S. G., Buckels, J. A., Darby, S., & Elias, E. (1992). Sclerosing cholangitis associated with multifocal fibrosis: a case report. *Gut*, 33(10), 1430-1432.
- Land, K. J., Gudapati, P., Kaplan, M. H., & Seetharamaiah, G. S. (2006). Differential requirement of signal transducer and activator of transcription-4 (Stat4) and Stat6 in a thyrotropin receptor-289-adenovirus-induced model of Graves' hyperthyroidism. *Endocrinology*, 147(1), 111-119.
- Langford, C. A., Sneller, M. C., Hallahan, C. W., Hoffman, G. S., Kammerer, W. A., Talar-Williams, C., et al. (1996). Clinical features and therapeutic management of

- subglottic stenosis in patients with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum*, 39(10), 1754-1760.
- Larsen, C. E., & Alper, C. A. (2004). The genetics of HLA-associated disease. *Curr Opin Immunol*, 16(5), 660-667.
- Lettre, G., & Rioux, J. D. (2008). Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. *Hum Mol Genet*, 17(R2), R116-121.
- Lhote, F., Cohen, P., & Guillevin, L. (1998). Polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome. *Lupus*, 7(4), 238-258.
- Maloy, K. J., & Kullberg, M. C. (2008). IL-23 and Th17 cytokines in intestinal homeostasis. *Mucosal Immunol*, 1(5), 339-349.
- Mamegano, K., Kuroki, K., Miyashita, R., Kusaoi, M., Kobayashi, S., Matsuta, K., et al. (2008). Association of LILRA2 (ILT1, LIR7) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis. *Genes Immun*, 9(3), 214-223.
- Manger, B. J., Krapf, F. E., Gramatzki, M., Nusslein, H. G., Burmester, G. R., Krauledat, P. B., et al. (1985). IgE-containing circulating immune complexes in Churg-Strauss vasculitis. *Scand J Immunol*, 21(4), 369-373.
- Marinoni, M., Boccasanta, P., Venturi, M., Andreoli, M., Carrabba, M., & Raule, M. (1998). Retroperitoneal fibrosis: unusual localization. *Hepatogastroenterology*, 45(22), 973-977.
- Martorana, D., Vaglio, A., Greco, P., Zanetti, A., Moroni, G., Salvarani, C., et al. (2006). Chronic periaortitis and HLA-DRB1\*03: another clue to an autoimmune origin. *Arthritis Rheum*, 55(1), 126-130.
- Masi, A. T., Hunder, G. G., Lie, J. T., Michel, B. A., Bloch, D. A., Arend, W. P., et al. (1990). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Churg-Strauss syndrome (allergic granulomatosis and angiitis). *Arthritis Rheum*, 33(8), 1094-1100.
- Matesanz, F., Rueda, B., Orozco, G., Fernandez, O., Leyva, L., Alcina, A., et al. (2005). Protein tyrosine phosphatase gene (PTPN22) polymorphism in multiple sclerosis. *J Neurol*, 252(8), 994-995.
- Monach, P. A., & Merkel, P. A. Genetics of vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*, 22(2), 157-163.
- Muller Kobold, A. C., van der Geld, Y. M., Limburg, P. C., Tervaert, J. W., & Kallenberg, C. G. (1999). Pathophysiology of ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*, 14(6), 1366-1375.
- Muschen, M., Warskulat, U., Perniok, A., Even, J., Moers, C., Kismet, B., et al. (1999). Involvement of soluble CD95 in Churg-Strauss syndrome. *Am J Pathol*, 155(3), 915-925.
- Niederer, H. A., Willcocks, L. C., Rayner, T. F., Yang, W., Lau, Y. L., Williams, T. N., et al. Copy number, linkage disequilibrium and disease association in the FCGR locus. *Hum Mol Genet*, 19(16), 3282-3294.
- Nistor, I., Nair, R. P., Stuart, P., Hiremagalore, R., Thompson, R. A., Jenisch, S., et al. (2005). Protein tyrosine phosphatase gene PTPN22 polymorphism in psoriasis: lack of evidence for association. *J Invest Dermatol*, 125(2), 395-396.
- Onengut-Gumuscu, S., Ewens, K. G., Spielman, R. S., & Concannon, P. (2004). A functional polymorphism (1858C/T) in the PTPN22 gene is linked and associated with type I diabetes in multiplex families. *Genes Immun*, 5(8), 678-680.
- Orozco, G., Garcia-Porrúa, C., Lopez-Nevot, M. A., Raya, E., Gonzalez-Gay, M. A., & Martin, J. (2006). Lack of association between ankylosing spondylitis and a functional polymorphism of PTPN22 proposed as a general susceptibility marker for autoimmunity. *Ann Rheum Dis*, 65(5), 687-688.
- Parums, D. V., Chadwick, D. R., & Mitchinson, M. J. (1986). The localisation of immunoglobulin in chronic periaortitis. *Atherosclerosis*, 61(2), 117-123.

- Paust, H. J., Turner, J. E., Steinmetz, O. M., Peters, A., Heymann, F., Holscher, C., et al. (2009). The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 20(5), 969-979.
- Pavone, L., Grasselli, C., Chierici, E., Maggiore, U., Garini, G., Ronda, N., et al. (2006). Outcome and prognostic factors during the course of primary small-vessel vasculitides. *J Rheumatol*, 33(7), 1299-1306.
- Rao, J. K., Weinberger, M., Oddone, E. Z., Allen, N. B., Landsman, P., & Feussner, J. R. (1995). The role of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener granulomatosis. A literature review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, 123(12), 925-932.
- Rioux, J. D., & Abbas, A. K. (2005). Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature*, 435(7042), 584-589.
- Rodriguez, M., Zoecklein, L., Gamez, J. D., Pavelko, K. D., Papke, L. M., Nakane, S., et al. (2006). STAT4- and STAT6-signaling molecules in a murine model of multiple sclerosis. *FASEB J*, 20(2), 343-345.
- Saleh, A., & Stone, J. H. (2005). Classification and diagnostic criteria in systemic vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 19(2), 209-221.
- Samani, N. J., Erdmann, J., Hall, A. S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., et al. (2007). Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, 357(5), 443-453.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463-5467.
- Savage, C. O., Harper, L., Cockwell, P., Adu, D., & Howie, A. J. (2000). ABC of arterial and vascular disease: vasculitis. *BMJ*, 320(7245), 1325-1328.
- Savige, J. A., Chang, L., Cook, L., Burdon, J., Daskalakis, M., & Doery, J. (1995). Alpha 1-antitrypsin deficiency and anti-proteinase 3 antibodies in anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated systemic vasculitis. *Clin Exp Immunol*, 100(2), 194-197.
- Savige, J. A., Yeung, S. P., Gallicchio, M., & Davies, D. J. (1989). Two ELISAs to detect anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA) in various vasculitides. *Pathology*, 21(4), 282-287.
- Saxena, R., Voight, B. F., Lyssenko, V., Burt, N. P., de Bakker, P. I., Chen, H., et al. (2007). Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*, 316(5829), 1331-1336.
- Schapira, H. E., Kapner, J., & Szporn, A. H. (1986). Wegener granulomatosis presenting as renal mass. *Urology*, 28(4), 307-309.
- Schmitt, W. H., Csernok, E., Kobayashi, S., Klinkenborg, A., Reinhold-Keller, E., & Gross, W. L. (1998). Churg-Strauss syndrome: serum markers of lymphocyte activation and endothelial damage. *Arthritis Rheum*, 41(3), 445-452.
- Senechal, H., Geny, S., Desvaux, F. X., Busson, M., Mayer, C., Aron, Y., et al. (1999). Genetics and specific immune response in allergy to birch pollen and food: evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II allele HLA-DR7. *J Allergy Clin Immunol*, 104(2 Pt 1), 395-401.
- Simons, M. J. (1978). HLA genetics, immunity and disease. *P N G Med J*, 21(1), 56-64.
- Sinico, R. A., Di Toma, L., Maggiore, U., Bottero, P., Radice, A., Tosoni, C., et al. (2005). Prevalence and clinical significance of antineutrophil cytoplasmic antibodies in Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum*, 52(9), 2926-2935.
- Sinico, R. A., Di Toma, L., Maggiore, U., Tosoni, C., Bottero, P., Sabadini, E., et al. (2006). Renal involvement in Churg-Strauss syndrome. *Am J Kidney Dis*, 47(5), 770-779.
- Skinningsrud, B., Husebye, E. S., Gervin, K., Lovas, K., Blomhoff, A., Wolff, A. B., et al. (2008). Mutation screening of PTPN22: association of the 1858T-allele with Addison's disease. *Eur J Hum Genet*, 16(8), 977-982.

- Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O'Huigin, C., et al. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, *461*(7265), 798-801.
- Tsuchiya, N., Kobayashi, S., Hashimoto, H., Ozaki, S., & Tokunaga, K. (2006). Association of HLA-DRB1\*0901-DQB1\*0303 haplotype with microscopic polyangiitis in Japanese. *Genes Immun*, *7*(1), 81-84.
- Tsuchiya, N., Kobayashi, S., Kawasaki, A., Kyogoku, C., Arimura, Y., Yoshida, M., et al. (2003). Genetic background of Japanese patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: association of HLA-DRB1\*0901 with microscopic polyangiitis. *J Rheumatol*, *30*(7), 1534-1540.
- Turesson, C., Weyand, C. M., & Matteson, E. L. (2004). Genetics of rheumatoid arthritis: Is there a pattern predicting extraarticular manifestations? *Arthritis Rheum*, *51*(5), 853-863.
- Vaglio, A. (2009). Retroperitoneal fibrosis: new insights into clinical presentation and diagnosis. *Medicine (Baltimore)*, *88*(4), 208-210.
- Vaglio, A., Greco, P., Corradi, D., Palmisano, A., Martorana, D., Ronda, N., et al. (2006). Autoimmune aspects of chronic periaortitis. *Autoimmun Rev*, *5*(7), 458-464.
- Vaglio, A., Martorana, D., Maggiore, U., Grasselli, C., Zanetti, A., Pesci, A., et al. (2007). HLA-DRB4 as a genetic risk factor for Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum*, *56*(9), 3159-3166.
- Vaglio, A., Pipitone, N., & Salvarani, C. Chronic periaortitis: a large-vessel vasculitis? *Curr Opin Rheumatol*, *23*(1), 1-6.
- Vaglio, A., Salvarani, C., & Buzio, C. (2006). Retroperitoneal fibrosis. *Lancet*, *367*(9506), 241-251.
- van der Geld, Y. M., Tool, A. T., Videler, J., de Haas, M., Tervaert, J. W., Stegeman, C. A., et al. (2002). Interference of PR3-ANCA with the enzymatic activity of PR3: differences in patients during active disease or remission of Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol*, *129*(3), 562-570.
- Vieira, M. L., Caillat-Zucman, S., Gajdos, P., Cohen-Kaminsky, S., Casteur, A., & Bach, J. F. (1993). Identification by genomic typing of non-DR3 HLA class II genes associated with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, *47*(2), 115-122.
- Vivas, I., Nicolas, A. I., Velazquez, P., Elduayen, B., Fernandez-Villa, T., & Martinez-Cuesta, A. (2000). Retroperitoneal fibrosis: typical and atypical manifestations. *Br J Radiol*, *73*(866), 214-222.
- von Elm, E., Moher, D., & Little, J. (2009). Reporting genetic association studies: the STREGA statement. *Lancet*, *374*(9684), 98-100.
- Weaver, J., Goldblum, J. R., Turner, S., Tubbs, R. R., Wang, W. L., Lazar, A. J., et al. (2009). Detection of MDM2 gene amplification or protein expression distinguishes sclerosing mesenteritis and retroperitoneal fibrosis from inflammatory well-differentiated liposarcoma. *Mod Pathol*, *22*(1), 66-70.
- Weyand, C. M., Hicok, K. C., Conn, D. L., & Goronzy, J. J. (1992). The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*, *117*(10), 801-806.
- Wieczorek, S., Hellmich, B., Arning, L., Moosig, F., Lamprecht, P., Gross, W. L., et al. (2008). Functionally relevant variations of the interleukin-10 gene associated with antineutrophil cytoplasmic antibody-negative Churg-Strauss syndrome, but not with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum*, *58*(6), 1839-1848.
- Wieczorek, S., Hellmich, B., Gross, W. L., & Eppel, J. T. (2008). Associations of Churg-Strauss syndrome with the HLA-DRB1 locus, and relationship to the genetics of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides: comment on the article by Vaglio et al. *Arthritis Rheum*, *58*(1), 329-330.
- Wieczorek, S., Holle, J. U., Bremer, J. P., Wibisono, D., Moosig, F., Fricke, H., et al. Contrasting association of a non-synonymous leptin receptor gene polymorphism with Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome. *Rheumatology (Oxford)*, *49*(5), 907-914.

- Wieczorek, S., Holle, J. U., & Epplen, J. T. Recent progress in the genetics of Wegener's granulomatosis and Churg-Strauss syndrome. *Curr Opin Rheumatol*, 22(1), 8-14.
- Wieczorek, S., Holle, J. U., Muller, S., Fricke, H., Gross, W. L., & Epplen, J. T. A functionally relevant IRF5 haplotype is associated with reduced risk to Wegener's granulomatosis. *J Mol Med*, 88(4), 413-421.
- Wieczorek, S., Knaup, S., Gross, W. L., & Epplen, J. T. (2009). Genetic Variability of RXRB, PPARA, and PPARG in Wegener's Granulomatosis. *PPAR Res*, 2009, 786781.
- Willcocks, L. C., Lyons, P. A., Rees, A. J., & Smith, K. G. The contribution of genetic variation and infection to the pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *Arthritis Res Ther*, 12(1), 202.
- Willscher, M. K., Novicki, D. E., & Cwazka, W. F. (1978). Association of HLA-B27 antigen with retroperitoneal fibrosis. *J Urol*, 120(5), 631-633.
- Wu, H., Cantor, R. M., Graham, D. S., Lingren, C. M., Farwell, L., Jager, P. L., et al. (2005). Association analysis of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 in systemic lupus erythematosus families: increased T allele frequency in systemic lupus erythematosus patients with autoimmune thyroid disease. *Arthritis Rheum*, 52(8), 2396-2402.
- Zeggini, E., Weedon, M. N., Lindgren, C. M., Frayling, T. M., Elliott, K. S., Lango, H., et al. (2007). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, 316(5829), 1336-1341.
- Zervou, M. I., Goulielmos, G. N., Castro-Giner, F., Tosca, A. D., & Krueger-Krasagakis, S. (2009). STAT4 gene polymorphism is associated with psoriasis in the genetically homogeneous population of Crete, Greece. *Hum Immunol*, 70(9), 738-741.
- Zervou, M. I., Mamoulakis, D., Panierakis, C., Boumpas, D. T., & Goulielmos, G. N. (2008). STAT4: a risk factor for type 1 diabetes? *Hum Immunol*, 69(10), 647-650.
- Zhou, Y., Huang, D., Farver, C., & Hoffman, G. S. (2003). Relative importance of CCR5 and antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol*, 30(7), 1541-1547.