



U

UNIVERSITAT DE BARCELONA

B

FACULTAT DE MEDICINA

*Departament de Biologia Cel·lular i*

*Anatomia Patològica*

**Bases genètiques de la febre mediterrània  
familiar a la població espanyola, dinàmica  
genòmica i història natural de les  
mutacions en el locus *MEFV***

Tesi Doctoral presentada per

**Anna Aldea Tomé**

Per a optar al grau de

**DOCTORA EN BIOLOGIA**

**Director:**

**Jordi Yagüe i Ribes**

**Tutor:**

**Carles Enrich i Bastus**

Tesi Doctoral realitzada al Servei d'Immunologia  
de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona

Barcelona, Març 2004



**Bases genètiques de la febre mediterrània  
familiar a la població espanyola, dinàmica  
genòmica i història natural de les  
mutacions en el locus *MEFV***



Atlas Català 1375, per Abraham

Cresques i Jafudà Cresques



*A mis padres, por estos 31 años.*

*Al meu gran germà Ivan.*

*Al Dani,  
el meu recés de pau.*

*No hi ha camí per a la pau. La pau és el camí.  
Gandhi.*



## AGRAÏMENTS

És molta la gratitud que sento en vers a totes les persones que durant els darrers sis anys han contribuït a la realització d'aquesta tesi doctoral. Són moltes les experiències viscudes durant aquest temps, tant en el laboratori d'Immunologia com a fora. La història d'aquest projecte però, va començar molt abans d'arribar-hi, a la Facultat de Biologia. Voldria agrair doncs, a totes aquestes persones, el seu ajut, suport i complicitat que en un moment donat o altre m'han brindat, i que han fet que el llarg camí que fa vuit anys vaig emprendre arribés finalment a la seva fi. Conscient però, que no puc escriure un altre volum per a correspondre-les a totes, intentaré fer-ho de manera breu.

Al Dr. Jordi Vives, per l'acolliment al Servei d'Immunologia, i per l'oferiment de l'espai per treballar i permetre el desenvolupament de la part experimental d'aquest treball.

Al Jordi Yagüe-*director*, pels ensenyaments que m'ha donat, dintre i fora del laboratori. Vull agrair-li la confiança que sempre m'ha fet, i el bon ambient que ha procurat instaurar al grup. Al Jordi-*company*, per la vitalitat i l'entusiasme que sent per les petites grans coses de la vida, que m'ha transmès des del primer dia. També a la Mar i la Paula, per fer-nos passar vetllades i dies d'estiu inoblidables.

A l'equip, pel gran ambient de treball i la qualitat humana que hi he trobat, i perquè sense l'esforç de tots i totes, res no hauria estat possible. A la Fina, per saber escoltar, i parlar sense embuts. La seva complicitat, comprensió i recolzament constants han estat molt, molt importants per a mi. Al Juantxo, la seva senzillesa, per estar sempre disposat a ajudar tothom i per fer tan fàcil la convivència. A la Montse, per la seva propera humanitat. A la Susana, treballadora de mena, pel seu bon humor i pel bon rotllo que ha donat a l'equip, que per cert, encara ha d'escurar moltes botelles de cava...

Gràcies a tot el personal del Servei d'Immunologia. Molt especialment al Ramon, al Ramonet, per qui no tinc paraules per agrair-li tot: el suport i la seva amistat des dels temps durs de Can Ruti fins als dies incerts que vivim (el Dani i jo) actualment. Ah, però! no li perdono les dutxes d'aigua freda...ni el sopar que em deu... Gràcies, al sempre entranyable Jordi Milà, pels seus bons consells sobre el misteriós món dels cultius cel·lulars i pel seus acudits càustics, que fan veure la vida des d'una altra òptica. Al Xavi, *mi piltrafilla favorito, el huracan Mitch, el follonero*... La seva bondat i la seva força han revolucionat el laboratori en aquests darrers mesos. I pel seu bon humor (*rata negra* a part) a la darrera incorporació al grup de *los Ramones*, al William Franco.

A la Pepa: mare, marona, que no t'acaroni..., però no per això és menys bona (ben segur que aquesta dita no la sap). Ha estat una gran sort poder conèixer aquesta filla de Rasquera i compartir amb ella tantes estones, bons consells, receptes, peücs, bombons, i pastissets!! Continuarà...

Al Carles, pel seu inestimable i desinteressat ajut amb l'edició d'imatges i amb tot tipus de "problemes" informàtics. Li dec moltes *birres*. A la Virgi, que està en el *top-ten* de les llamineres del laboratori (després de la Pepa, és clar), per la bona idea que va tenir de descobrir-nos els calendaris d'advent i per la seva contribució amb el seu treball en aquesta tesi.

A la Montse Plana, a la qual aprecio molt. Visca l'Excel!!! i visca el Mac de la cantonada!!! Per les rialles, sempre desencaixades, que m'encomana. Que saludables i que bé que venien a mitja tarda!!

A la Teresa, la Tere, *quam celerrime!* per les interessants converses, sempre il·lustratives, sobre el ésser o el estar, i per perfumar d'*Opium* les petites estances del laboratori.

Gràcies també al Jaume, l'Odette, el Paco, la Guadalupe i al Toni, encara que quedin més lluny els dies que vam compartir plegats.

Moltes gràcies als companys *de gal.leres*, que han estat, i són, molts els que han contribuït al bon ambient, molt necessari per aquest tipus de tasca dura i interminable.

Gràcies a la Carme, amb qui vaig començar les meves primeres passes al laboratori d'Immuno. A l'Agustí, que encara que no vam coincidir, ha estat testimoni del progrés d'aquesta tesi. Sempre és d'allò més agradable tenir a prop la seva persona. Al Javier, a l'*extralargo*, que té el do innat de treure't una riulla i que tant s'ha trobat a faltar. Gràcies a la Fiorella, per alegrar-nos els dies amb la seva vitalitat (que encara fa), i a l'Eduard, sempre disposat a donar-me un cop de mà. Va ser una època inoblidable la que vam conèixer junts, i al grup d'*els pacos* antics: el Pep, per la seva amistat. No són poques les aventures que podem explicar plegats. A l'Olga Padilla, per encomanar-me les ganes de viure que té i, en aquesta darrera etapa, també les de ser mare.

No voldria deixar de recordar la Mònica Gudayol, que malauradament ens va deixar a mig camí, per passar a una vida millor. Vam gaudir molt intensament amb ella i la recordaré sempre.

Als de la darrera fornada, gràcies a la Mònica Armàn, amb qui he pogut compartir, entre moltes altres coses, la recta final de la tesi. M'alegro d'haver pogut compartir-la plegades, doncs han estat molt reconfortants les converses d'aquests darrers dies. La seva facilitat de tracte i valentia d'enfrontar-se a les decisions difícils són d'admirar. Desitjo que el futur li porti el millor d'aquesta professió.

A la Idoia, que encara corre pel lab, i que espero que no trigui gaire en haver d'escriure els agraïments de la seva tesi. Al Rafael, que *es mas malo que un venenoor!!*, per augmentar el bon rotllo al laboratori, *y por esas sevillanas que aun nos tenemos que marcar*. A la Montse, per brindar-nos sempre el seu somriure i una paraula agradable. A la Sandra, a qui espero que no se li faci gaire llarg, ànims, molts ànims!. A la M<sup>a</sup> Rosa, qui sempre m'ofereix una visió en perspectiva de la vida en aquesta professió, i qui m'ha donat molts ànims en la recta final, i a l'Anna Ibàñez, que tan sí sí, com sí no, l'he afegida en aquest grup. Espero que tingui una etapa final del més fructífera, com es mereix.

A la Olga Millán, amb qui hem compartit de tot, penes, alegries, congressos, OT, nervis pre-tesi, i ...cremat!! Espero mantenir la seva amistat i veure créixer a qui porta dintre seu, i als que vinguin. Un especial record també per l'Ernest.

A la Raquel, exemple de tenacitat, paciència, positivisme i bon humor. La seva tesi tampoc no va ser bufar i fer ampolles. El seu somriure permanent, m'ha alegrat sempre i m'ha ajudat a veure les coses amb perspectiva.

Gràcies a *les noies del camarot*, la M<sup>a</sup> José, l'Anna, l'altra Anna, i la Catalina, malgrat la tinguem a l'altra punta del món, pel bon humor que desprenen i per la filosofia amb que es prenen la vida. Gràcies també al Rodrigo, el Harold i la Núria.

Moltes gràcies a la Belén, amb qui durant aquest darrer any hem rigut i patit amb les tesis dels respectius companys, i qui m'anima d'allò més en aquests darrers dies. M'hauria agradat tenir-la més temps tan a prop. A la Isabel, per amenitzar-me amb les seves històries, tan minuciosament detallades, que ara podrà explicar el *seu nevodet* o *nevodeta*. Al Juanjo, que no és que li vulgui agrair les seves trapelleries, no és això, però sí que ens fes passar més fàcilment les hores de facs amb el seu humor peculiar. A l'Àngels, entranyable i bona fe, a qui sempre li toca pagar les bromes del Juanjo, per la seva senzillesa de tracte. A l'Elias, amb que he connectat espontàniament des de l'inici i a qui hauria volgut tenir més a prop i gaudir de la seva companyia. Pot ser en una altra vida tindrem la ocasió... A la Montse Cervera, per la seva força i el seu bon humor, ingredients indispensables per superar tot tipus de situacions difícils. A la Lourdes, per les converses i ànims en horari de vestuari, no per això menys valorades. A la Mari Carmen, pel seu tracte tan agradable i per introduir-me al món de la família, tan llunyà encara per a mi. A la Loli, la seva simpatia i bona disponibilitat per tot, per la feina i per organitzar la gresca, que també és important. Gràcies també a la Paca, qui m'ha transmès el seu interès per les tècniques culinàries, a la Marisol, la Mari, la Laura, la M<sup>a</sup> José, la Lluïsa, a l'altra Lluïsa, la Maite i la Virgínia.



A la Mercè Bayo i a la Cristina Moreno, per a mi dues persones entranyables, cadascuna amb el seu estil personal. Gràcies per fer la feina “que no es veu” però que és imprescindible, i per facilitar-nos tant la vida.

Com no, a la Juanita, per compartir amb tots nosaltres la seva alegria i la seva font d'energia.

Vull agrair altres persones que també han col·laborat molt directament a la realització d'aquesta tesi i durant el meu període de formació.

Gràcies al Campistol, de qui m'emporto un grat record, i amb qui vam patir un llarg períple intentant que ens publicuessin l'article. Va pagar la pena, però.

Al grup de la Unitat de Biologia Evolutiva de la Pompeu Fabra. Al Francesc Calafell, no només per haver-me ensenyat tant durant la nostra col·laboració sinó per ajudar-me també en la recta final d'aquesta tesi. Gràcies també a l'Óscar Lao, a qui li desitjo que passi per això molt aviat i que li vagi molt bé. Gràcies també al Jaume Bartranpetit, a l'Arcadi Navarro, al Tomàs, i especialment, al David Comas. Pel bon acolliment i pel suport que m'han donat a tirar endavant en la recta final.

Als companys d'Immunologia de Can Ruti. Al Ricardo Pujol-Borrel, per estar amb mi, malgrat tot, durant els dies de *Prodes*, i per acollir-me sempre tan bé en el seu laboratori. Al Manel, a qui li tinc especial afecte i admiració, per tot el seu ajut i els ànims de final d'etapa, sobre tot. Gràcies molt especialment al Kolko, a qui tinc moltíssima estimació i a qui considero un bon amic. Sempre tan atent i respectuós. És únic. Li desitjo el millor en aquesta fase final, ben segur que triomfarà. Gràcies també a la Pilar, la Manoli, l'Aura, el Xavi i la Marta Vives, companys de travessia inoblidables.

No voldria deixar en la memòria el meu pas pel LBMC, també a Can Ruti. Diuen que *no hay mal que por bien no valga*. Sense l'experiència que vaig adquirir durant la meva estància tampoc no hauria arribat aquí.

Vull recordar especialment els inicis d'aquesta travessia. A la Dolores, li he d'agrair tot, des que la vaig tenir de professora a bioquímica, a segon de Biologia. Sense ella saber-ho, em va transmetre el seu entusiasme pel món de la recerca. La confiança que va dipositar en mi des de l'inici, va estar clau en un moment molt decisiu. La meticulositat i el rigor pel treball, i el seu cantó humà ha estat sempre per mi un exemple i una referència. Sempre m'ha ajudat molt saber que la he tingut a prop, en els moments bons i en els no tan bons. Moltes gràcies de tot cor. Recordo els temps en què vaig començar al lab de bioquímica i li feia d'ombra a la Gemma i la Carme, i que em delia per tenir el meu propi projecte de recerca. Gràcies també a elles, per fer-me de referent personal i professional. Gràcies al Xavi Galan, veí de laboratori i veí d'Horta, que llavors era ja gairebé doctor i que, més tard, m'ha animat sempre molt en els llocs més insospitats on ens hem trobat, gràcies per la proximitat que m'ha fet sentir malgrat el temps. Gràcies al David per tots els ànims, i felicitats per la seva tesi, relativament recent.

Voldria adreçar-me també als amics de tota la vida, que també hi han participat.

A l'Anna Bigas, que té moltes preguntes a fer-me, però que deixarem per un altre dia... No tinc paraules per descriure tot el suport que sempre m'ha donat, en la realització de la tesi, i en cada una de les coses que m'han passat des que la conec. Ha estat imprescindible. Estic molt contenta de tenir-la sempre al meu costat, a ella, i al seu Dani també.

A l'Anna Rebollo, a qui estimo i admiro. Amb qui el temps ni la distància no importen. La nostra és una connexió molt especial. El seu coratge i valentia m'han ensenyat sempre molt.

De manera especial a l'Araceli, amb qui hem connectat des del primer dia de manera molt especial. Que puc dir? per la seva gran amistat, gràcies.

I, com no? a la colla més trempada, als qui considero una segona família, i que com a tal, va creixent per moments amb el naixement d'aquests *boixos baixets* que diria en Serrat. Gràcies al Martí i els camins nous que sempre m'ensenya, a l'Anna i la seva bona onda, al Narcís, pel seu *savoir-faire*, al Miki i la Cristina, per la seva amistat i bona disposició a tothora, al Quim i l'Esther, per la seva senzillesa i generositat, al Pep i l'Àngela, perquè per fi podem gaudir, de i amb vosaltres. Gràcies a la Júlia amb qui passo menys estones de les que voldria, per la seva amistat i la seva alegria, i al Jannic, al que aprecio molt. A la Mar, l'Isaac, el Noè i la Bruna, per tot el que ens ensenyen. Gràcies al Xavi, inimitable, únic per la seva senzillesa i bondat. A la Mentxu, per saber-lo portar (que no ha de ser fàcil, ji, ji...), i aportar tan bon rotllo al grup. *And last, but not least...* al Marc. He reservat aquesta expressió anglòfona per a ell (segur que ja riu). El meu *meristem*, company de festes i de tantes coses!! Espero que també de soci del Garden Valls-Aldea. És un amic, és únic.

Per finalitzar, moltes gràcies a la meva gran família, en el sentit més ampli de la paraula, perquè tots, d'una manera o altra han estat testimonis i patidors, tant d'aquesta tesi com de la del Dani, i sempre ens hi han fet costat.

Als meus pares, Jesús i Carmen, a l'Ivan, a la Sandra *petita*. A la Marga (*a mi tío Antonio*) i a la ratita Carmeli. Al Ricard i l'Elena, al Jose i la Montse, als meus cosins, a l'abuela.

A la Lía i el Sebi, al Christian i la Sandra, al Rubén i l'Emma, al Víctor, als tiets i la iaia Pepita.

Al Dani, qui ha estat el suport fonamental. Gràcies per cuidar-me tant.

Gràcies a tots i a totes, moltes gràcies.

Els treballs realitzats en la present tesis doctoral han generat les següents publicacions en revistes de l'especialitat:

**1) Familial Mediterranean Fever In The Spanish Population: Clinical Heterogeneity And Diverse Spectrum Of MEFV gene Mutations.**

*Pendent de submissió.*

A Aldea, JI Aróstegui, J Buades, V Mas, JM Campistol, C Arnal, R Toribio, MA de Frutos, LF Díez, J Casademont, T Mijares, L Moral, A Selva, J Ordi, C Clemente, J Moré, J Muñoz-Vico, B Sacristán, F Rius, S Plaza, M Masó, J Vives, J Yagüe.

**2) A Severe Autosomal-Dominant Periodic Inflammatory Disorder With Renal AA Amyloidosis And Colchicine Resistance Associated To The MEFV H478Y Variant In A Spanish Kindred: An Unusual Familial Mediterranean Fever Phenotype Or Another MEFV-Associated Periodic Inflammatory Disorder?**

*American Journal of Medical Genetics* 124A:67-73 (2004) IF: 2,3

A Aldea, JM Campistol, JI Aróstegui, J Rius, M Masó, J Vives, J Yagüe.

**3) I591I MEFV Mutation In A Spanish Kindred: Is It A Mild Mutation, A Benign Polymorphism Or A Variant Influenced By Another Modifier?**

*Human Mutation* 20: 148-150 (2002). IF: 6.9

A Aldea, J Casademont, JI Aróstegui, J Rius, M Masó, J Vives, J Yagüe

**4) Heterogeneity Among Patients With Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Periodic Syndrome (TRAPS) Phenotypes.**

*Arthritis and Rheumatism* 48(9): 2632-2644 (2003) IF: 7,4

E Aganna, L Hammond, PN Hawkins, A Aldea, SA McKee, HKP van Amstel, C Mischung, K Kusuhara, FT Saulsbury, HL Lachmann, A Bybee, EM McDermott, M LaRegina, JI Arostegui, JM Campistol, S Worthington, KP High, MG Molloy, N Baker, JL Bidwell, JL Castañer, ML Whiteford, PL Jassens-Korpola, R Manna, RJ Powell, P Woo, P Solis, K Minden, J Frenkel, J Yagüe, RM Mirakian, GA Hitman, MF McDermott.

**5) The West Side Story: MEFV Haplotype In Spanish FMF Patients And In Controls. Evidences Of High LD And Recombination “Hot-Spot” At The MEFV Locus.**

*Human Mutation* 23: 399. (2004) IF: 6.9.

**A Aldea**, F Calafell, JI Aróstegui, O Lao, F Rius, S Plaza, M Masó, J Vives, J Yagüe

Els treballs han estat finançats, en part, pel següent ajut:

00/3110 Marató TV3.

***ÍNDEX***



<b>ABREVIATURES .....</b>	<b>1</b>
<b>BASES DE DADES ELECTRÒNIQUES I CODIS D'IDENTIFICACIÓ .....</b>	<b>3</b>
<b>I- INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>7</b>
<b>1. LES SÍNDROMES HEREDITÀRIES DE FEBRE PERIÒDICA.....</b>	<b>7</b>
<b>2. LA FEBRE MEDITERRÀNIA FAMILIAR.....</b>	<b>7</b>
2.1. MANIFESTACIONS CLÍNiques.....	8
2.2. DADES DEL LABORATORI .....	11
2.3. HERÈNCIA .....	12
2.4. ESTRATÈGIA DIAGNÒSTICA .....	12
2.5. TRACTAMENT .....	15
2.6. EPIDEMIOLOGIA .....	16
2.6.1. POBLACIONS ANCESTRALS .....	16
2.6.2. ELS GRUPS DE JUEUS I LA FMF .....	17
2.6.3. FREQUÈNCIA DE PORTADORS.....	18
2.6.4. POBLACIONS NO-ANCESTRALS .....	19
<b>3. LA FMF A ESPANYA.....</b>	<b>19</b>
3.1. LA COMUNITAT XUETA. ....	20
3.1.1. BREUS APUNTS HISTÒRICS.....	20
3.1.2. ELS XUETES I ELS SEUS ORÍGENS .....	21
<b>4. EL GEN <i>MEFV</i>.....</b>	<b>22</b>
4.1. PROCÉS DE CLONACIÓ.....	22
4.2. EL GEN DE LA FMF .....	23
4.3. EXPRESSIÓ .....	24
4.4. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ.....	25
<b>5. LA PIRINA/ MARENOSTRINA .....</b>	<b>26</b>
5.1. ESTRUCTURA DE LA P/M.....	26
5.1.1. EL DOMINI PIRINA.....	26
5.1.2. ALTRES DOMINIS ESTRUCTURALS DE LA P/M .....	29
5.2. LOCALITZACIÓ CEL·LULAR .....	30
5.3. FUNCIÓ I FISIOPATOLOGIA.....	30
5.3.1. L'INFLAMOSOMA.....	31
5.4. MODEL ANIMAL PER L'ESTUDI DE LA P/M .....	37

6. MUTACIONS EN EL GEN <i>MEFV</i> I HAPLOTIPS ASSOCIATS.....	37
7. HETEROGENEÏTAT DE LOCUS.....	40
8. ESTAT DE LA QÜESTIÓ A L'INICI DE LA PRESENT TESI DOCTORAL.....	40
II- HIPÒTESI DE TREBALL.....	45
III- OBJECTIUS.....	49
IV- RESULTATS.....	53
<b>PART I</b>	
<b>CAPÍTOL 1:.....</b>	<b>59</b>
<b>BASES GENÈTIQUES DE LA FMF A LA POBLACIÓ ESPANYOLA: CARACTERITZACIÓ DE LES MUTACIONS AL GEN <i>MEFV</i> I ASSOCIACIONS GENOTIP-FENOTIP.....</b>	<b>59</b>
<b>FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER IN THE SPANISH POPULATION: CLINICAL HETEROGENEITY AND DIVERSE SPECTRUM OF <i>MEFV</i> GENE MUTATIONS.....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTOL 2:.....</b>	<b>97</b>
<b>LA NOVA VARIANT PATOLÒGICA H478Y DEL <i>MEFV</i> ASSOCIADA A UNA SÍNDROME INFLAMATÒRIA SEVERA AUTOSÒMICA DOMINANT EN UNA FAMÍLIA ESPANYOLA: ÉS UNA FMF INUSUAL O UNA SÍNDROME DIFERENT CAUSADA PER MUTACIONS AL LOCUS <i>MEFV</i>?.....</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>101</b>
<b>CAPÍTOL 3:.....</b>	<b>105</b>
<b>ESTUDI DE L'EFECTE PATOGENIC DE LA VARIANT I591T EN UN PACIENT ESPANYOL DE FMF: EVIDÈNCIES DE L'EXISTÈNCIA DE FACTORS MODIFICADORS DE LA FMF.....</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>107</b>



<b>CAPÍTOL 4:</b> .....	<b>111</b>
<b>ESTUDI DE LA PRESENCIA DE MUTACIONS EN ALTRES GENS CAUSANTS DE SHFP, EN PACIENTS ESPANYOLS CLÍNICAMENT DIAGNOSTICATS DE FMF I SENSE MUTACIONS AL <i>MEFV</i></b> .....	<b>111</b>
CONCLUSIONS.....	115
ANNEX .....	117
 <b>CAPÍTOL 5:</b> .....	 <b>121</b>
<b>RECERCA DE MUTACIONS A LES REGIONS REGULADORES DEL GEN <i>MEFV</i> EN ELS CROMOSOMES NO MUTATS DE FMF I SENSE MUTACIONS AL <i>MEFV</i></b> .....	<b>121</b>
CONCLUSIONS .....	127
 <b>PART II</b>	
 <b>CAPÍTOL 6:</b> .....	 <b>135</b>
<b>DINÀMICA GENÒMICA DEL LOCUS <i>MEFV</i> I HISTÒRIA NATURAL DE LES MUTACIONS CAUSANTS DE LA FMF MÉS FREQUENTS AL VESSANT OCCIDENTAL DE LA MEDITERRÀNIA</b> .....	<b>135</b>
CONCLUSIONS.....	145
 <b>V- DISCUSSIÓ GENERAL</b> .....	 <b>149</b>
I. RELACIÓ CAUSAL ENTRE LES MUTACIONS DEL GEN <i>MEFV</i> I LA FMF .....	149
II. DINÀMICA GENÒMICA DEL LOCUS <i>MEFV</i> .....	155
III. HISTÒRIA NATURAL DE LES MUTACIONS.....	160
 <b>VI- CONCLUSIONS GENERALS</b> .....	 <b>169</b>
BASES GENÈTIQUES DE LA FMF A LA POBLACIÓ ESPANYOLA .....	169
CONSIDERACIONS DIAGNOSTIQUES.....	169
DINÀMICA GENÒMICA DEL LOCUS <i>MEFV</i> .....	170
HISTÒRIA NATURAL DE LES MUTACIONS EN EL <i>MEFV</i> .....	170
 <b>VIII- BIBLIOGRAFIA</b> .....	 <b>173</b>



## ***ABREVIATURES***



**ABREVIATURES**

aa's	aminoàcids
AA	Amiloide A (de l'anglès, A Amyloid)
AC	Abans de Crist
AJ	Jueus ashkenazites (de l'anglès, Ashkenazi Jews)
Ara	Àrabs
AraMag	Àrabs del Maghreb
Arm	Armenis
CAPS	Síndromes de febre periòdica associades a la Criopirina (de l'anglès, Cryopirin Associated Periodic fever Syndromes)
CARD	Domini de reclutament de caspases (de l'anglès, CAspase Recruitment Domain)
CD	Cluster de diferenciació (de l'anglès, Cluster of Differentiation)
<i>CIAS1</i>	Gen de la síndrome autoinflammatòria induïda pel fred (de l'anglès, Cold Induced Autoinflammatory Syndrome)
CINCA/ NOMID	Síndrome crònica infantil articular, cutània i neurològica (de l'anglès, Chronic, Infantile, Neurological, Cutaneous and Articular)/ malaltia inflammatòria multisistèmica d'inici neonatal (de l'anglès, Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease),
CNM	Cromosomes No Mutats
DD	Domini de la mort (de l'anglès, Death Domain)
DED	Domini de la mort induïda (de l'anglès, Death Effector Domain)
Dr	Drusos
ELE	Lesió cutània erisipel·loide de tipus eritematós (de l'anglès, Erysipela-like erythema)
FCU/ FCAS	Síndrome urticariforme freda (de l'anglès, Familial Cold Urticaria)/ síndrome autoinflammatòria freda familiar (de l'anglès, Familial Cold Autoinflammatory Syndrome)
FMF	Febre mediterrània familiar (de l'anglès, Familial Mediterranean Fever)
g.d.l.	Graus de llibertat
HIDS	Síndrome d'hiperimmunoglobulinèmia D i pebre periòdica (de l'anglès,

	HiperImmunoglobulinaemia D Syndrome)
HL	Heterogeneïtat de Locus
IrJ	Jueus Iraquians
LD	Desequilibri de lligament (de l'anglès, Linkage Disequilibrium)
<i>MEFV</i>	Gen humà de la FMF (de l'anglès, MEditerranean FeVer)
<i>MEFV-fl</i>	Trànscrip total del gen humà de la Febre Mediterrània (de l'anglès, full length MEditerranean FeVer)
<i>MEFV-d2</i>	Trànscrip delecció 2 del gen humà de la Febre Mediterrània (de l'anglès, deleted 2 MEditerranean FeVer)
<i>mMEFV</i>	Gen murí de la FMF (de l'anglès, murine MEditerranean FeVer)
mP/M	Pirina/Marenostrina murina (de l'anglès, murine Pyrin/Marenostrin)
<i>MVK</i>	Gen de la Mevalonat kinasa ( de l'anglès, MeValonate Kinase).
MVK	Enzim Mevalonat kinasa ( de l'anglès, MeValonate Kinase).
MWS	Síndrome de Muckle-Wells (de l'anglès, Muckle-Wells Syndrome)
NAJ	Jueus no ashkenazites (de l'anglès, Non-Ashkenazi Jews)
NAfJ	Jueus del nord d'Àfrica (de l'anglès, North-African Jews)
P/M	Pirina/Marenostrina humana (de l'anglès, Pyrin/Marenostrin)
P/M-d2	Pirina/Marenostrina humana delecció 2 (de l'anglès, deleted 2 Pyrin/Marenostrin)
PNM	Pacients No Mutats
PyD	Domini pirina (de l'anglès, Pyrin Domain)
SAA	proteïna sèrica amiloide A (de l'anglès, Serum Amyloid A)
SFDD	Super Família dels Death Domain (de l'anglès, Death Domain Fold Superfamy)
SHFP	Síndromes Hereditàries de Febre Periòdica
T	Turcs
TH	Tel Hashomer
TNFR1	Receptor 1 del TNF (de l'anglès, TNF Receptor 1)
TNFR1s	Receptor 1 del TNF soluble (de l'anglès, soluble TNF Receptor 1)
<i>TNFRSF1A</i>	Receptor del TNF superfamília 1 A (de l'anglès, TNF Receptor SuperFamily 1 A)
TRAPS	Síndrome periòdica associada al receptor 1 del TNF ( de l'anglès, TNF Receptor 1 Associated Syndrome)

## BASES DE DADES ELECTRÒNIQUES I CODIS D'IDENTIFICACIÓ

---

**Genbank** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

---

<i>MEFV</i>	AJ003147; AF111163
<i>TNFRSF1A</i>	AY131997; NT009731
<i>MVK</i>	AH009614
<i>CIAS1/NALP3/PYPAF1</i>	AF427617
<i>SAAI</i>	NM000331

---

### Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

---

Febre Mediterrània Familiar, FMF	249100
Síndrome d'Hiperimmunoglobulinèmia D i Febre Periòdica, HIDS	260920
Síndrome Periòdica Associada al Receptor del TNF, TRAPS	142680
Urticària Freda Familiar o Síndrome Autoinflamatori Induïda pel Fred, FCU/FCAS	120100
Síndrome de Muckle-Wells, MW	191900
Síndrome Crònica Infantil Articular, Cutània i Neurològica, CINCA o Malaltia Inflamatòria Multisistèmica d'Inici Neonatal, NOMID	607115
Síndrome d'artritis piogènica, pioderma gangrenosa i acné, PAPA	604416

---

**Entrez proteins** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.htm>

---

Pirina/Manerostrina	O15553
Criopirina/NALP3	Q96P20

---





## ***INTRODUCCIÓ***



## I- INTRODUCCIÓ

### 1. LES SÍNDROMES HEREDITÀRIES DE FEBRE PERIÒDICA

Les Síndromes Hereditàries de Febre Periòdica (SHFP) constitueixen un subgrup de malalties autoinflamatòries caracteritzades per la recurrència d'episodis autolimitats de febre i inflamació de seroses, sense una causa infecciosa aparent (Grateau et al., 1999; McDermott, 1999; Galon et al., 2000). La duració dels episodis inflamatoris, la periodicitat en què es presenten, així com la localització anatòmica específica de l'afectació inflamatòria, són alguns dels trets clínics que diferencien els diversos desordres dintre del grup de Síndromes Hereditàries de Febre Periòdica. L'amiloïdosi secundària és la complicació més greu en aquests desordres (Gafni et al., 1968).

Les SHFP es classifiquen segons el patró d'herència. Així, la febre mediterrània familiar (FMF) i l'hiperimmunoglobulinèmia D i febre periòdica (HIDS) s'hereten de forma autosòmica recessiva, mentre que la síndrome periòdica associada al receptor del TNF (TRAPS), la urticària freda familiar o la síndrome autoinflamatòria induïda pel fred (FCU/FCAS) i la síndrome de Muckle-Wells (MW) es transmeten de manera autosòmica dominant. La classificació dintre de les SHFP d'altres síndromes no tan ben caracteritzades com la síndrome crònica infantil articular, cutània i neurològica (CINCA), també anomenada malaltia inflamatòria multisistèmica d'inici neonatal (NOMID) i la síndrome d'artritis piogènica, pioderma gangrenosa i acné (PAPA) està actualment en discussió.

La febre mediterrània familiar és l'arquetip de les SHFP i l'objecte d'estudi de la present tesi doctoral.

### 2. LA FEBRE MEDITERRÀNIA FAMILIAR

La febre mediterrània familiar (FMF) és, amb diferència, la més freqüent de les SHFP, afectant entre 10.000 i 100.000 persones arreu del món (Pras, 1998; Drenth et al., 2001). El registre dels primers casos a la literatura científica data del 1908: Janeway i Mosenthal varen descriure el cas d'una noia jueva de 16 anys que presentava episodis recurrents de febre i de dolor abdominal. D'ençà d'aquesta pacient, es varen anar registrant diversos casos, tots ells amb similars manifestacions clíniques, però amb diferents noms. Així, al 1945, Siegal publicà una recopilació de 10 casos i registrà l'entitat amb el nom de *peritonitis benigna paroxística* en referència al dolor abdominal

agut que patien els pacients. Al 1954, Reimann va descriure la *peritonitis periòdica* en pacients armenis, introduint el concepte de “periodicitat” de la malaltia. Al 1959, Sockmen reportà l’existència de pacients d’origen turc amb *poliserositis recurrent*, destacant l’afectació de múltiples seroses. Al 1964, Siegal va definir el desordre amb el nom de *poliserositis paroxística familiar* en jueus ashkenazites d’origen europeu residents als Estats Units, fent palesa per primera vegada, la naturalesa hereditària de l’entitat. Finalment, l’entitat adoptà el nom actual, tal i com va proposar Heller al 1958, fent referència als tres aspectes més destacats de la malaltia: la naturalesa recurrent dels episodis febrils, la distribució epidemiològica a les poblacions de la conca mediterrània i el caràcter hereditari de l’entitat. Actualment la FMF està catalogada al registre de malalties hereditàries humanes OMIM (de l’anglès, Online Mendelian Inheritance in Man), amb el codi MIM 249100.

### **2.1 Manifestacions clíniques**

La FMF debuta en els primers vint anys de vida del pacient, en el 90% dels casos (Ben-Chetrit et al., 1998). Els episodis inflamatoris consisteixen en brots febrils, en els quals la temperatura corporal rarament arriba als 40°C, acompanyats d’inflamació de les seroses i/o de les sinovies. El quadre inflamatori té una duració d’entre unes hores fins a 3-4 dies i es resolen per sí mateixos. La freqüència d’aquests “atacs” és d’un episodi cada 1 o 2 mesos aproximadament (Sohar et al., 1967).

La serosa més afectada per la inflamació és el peritoneu. Un 95% dels pacients refereixen un dolor abdominal agut, fet que sovint dona lloc al diagnòstic erroni d’apendicitis aguda i, fins i tot, a intervencions quirúrgiques. La pleura és l’altra serosa més freqüentment inflamada. Afecta un 30-50% dels pacients els quals refereixen un dolor toràcic, generalment unilateral. És característica la invasió massiva de leucòcits polimorfonuclears a les sinovies dels pacients de FMF. En el 50-75% dels casos la FMF es manifesta amb un fort component articular en forma d’artràlgia i/o d’artritis no destructiva monoarticular, afectant principalment el costat, genolls o turmells. La duració dels dolors articulars aguts sol ser curta, com la de la febre, però no és rar que puguin durar més temps. Es poden allargar un mes seguit, fins i tot després de la desaparició de la resta de símptomes. La reacció inflamatòria en un brot de FMF també pot afectar la pell, formant lesions cutànies erisipel·loides de tipus eritematós (en anglès Erysipela-like erythema, ELE). La ELE està considerada una afectació característica de la FMF i la manifesten entre el 10 i el 40% dels pacients (Azizi et al., 1976). Hi ha una

sèrie d'afectacions menys freqüents que es poden sumar a les manifestacions típiques de la FMF durant el brot inflamatori, com ara la inflamació escrotal, la irritació de les meninges, mals de cap, miàlgia i certes formes de vasculitis.

L'amiloïdosi secundària de tipus AA és, potencialment, la complicació més greu de la FMF, doncs pot arribar a comprometre la vida del pacient (Gafni et al., 1968). En cada episodi inflamatori, els hepatòcits sintetitzen la proteïna sèrica amiloide A (SAA, de l'anglès *Serum Amyloid A protein*) (Jensen et al., 1998), que és secretada al sèrum i activada per proteòlisi a proteïna amiloide A (AA, de l'anglès *Amyloid A protein*). En alguns pacients, l'increment fisiològic de AA al sèrum durant el procés inflamatori, facilita la precipitació de la proteïna en forma de dipòsit amiloide als teixits (Cohen et al., 1993). A la FMF, l'amiloïdosi es localitza generalment al ronyó, que evoluciona finalment en insuficiència renal. També s'han descrit dipòsits en el tracte gastrointestinal, fetge i melsa. Ocasionalment en cor, tiroide i testicle (Sohar et al., 1967; Kavukcu et al., 1997).

Les manifestacions clíniques descrites fins ara corresponen al fenotip I de la FMF, també anomenada FMF tipus I.

El fenotip II de la FMF, o bé FMF tipus II, el pateixen un grup reduït de pacients els quals debuten amb un quadre d'amiloïdosi. En ocasions, fins i tot pot ser la única manifestació clínica de la malaltia al llarg de la vida del pacient. Es creu que l'acumulació de la substància amiloide en els pacients de FMF tipus II és el fruit d'episodis inflamatoris subclínic succeïts al llarg del temps. Abans que s'establís la colquicina com el tractament eficaç per als pacients de FMF, la incidència d'amiloïdosi secundària a la malaltia era diferent segons la població: un 8% en poblacions amb menys incidència, com els jueus ashkenazites, i d'un 37% en poblacions on la incidència era màxima, com la dels jueus sefardites. Aquestes dades varen canviar però, des que es va començar a administrar colquicina als pacients, l'anomenada "era de la colquicina", a principis dels anys 70. El tractament, que disminueix la freqüència dels episodis inflamatoris, també evita el desenvolupament d'amiloïdosi (veure tractament), situant la incidència d'amiloïdosi actual al voltant d'un 5%, en general a les diferents poblacions.

L'afectació de la FMF en funció del sexe és controvertida. Mentre que uns autors afirmen que afecta de manera similar a homes i dones (Samuels et al., 1998), uns altres argumenten que l'afectació és desigual, en una relació de 1,5-2 homes per cada dona (Cazeneuve et al., 2000; Gershoni-Baruch et al., 2003). En aquest sentit, moltes

dones afectades de FMF refereixen la coincidència de la menstruació amb l'aparició dels episodis inflamatoris, els quals desapareixen durant els mesos d'embaràs, la qual cosa suggereix que pot existir un component hormonal en la presentació de la malaltia (Schwartz en Samuels et al., 1998).

La FMF s'expressa amb una simptomatologia i severitat variables entre diferents grups poblacionals i alhora, s'observen variacions individuals, fins i tot dintre d'una mateixa família (Taula 1).

On es fa més evident l'existència d'aquestes diferències poblacionals és entre els jueus d'origen nord-africà (NAfJ, de l'anglès, North African Jews), que presenten un fenotip més sever de la malaltia, i els jueus d'origen iraquia (IrJ, de l'anglès Iraqi Jews), a jutjar per: l'inici precoç de la malaltia, la major freqüència dels episodis, el fort component articular del quadre inflamatori, la major incidència d'ELE i el requeriment d'una dosi superior de colquicina per controlar els brots inflamatoris (Pras et al., 1998).

Taula 1. Heterogeneïtat clínica a les diferents poblacions afectades de FMF.\* armenis d'EUA (Ben-Chetrit, 1998).

	Freqüència (%)			
	Jueus	Turcs	Àrabs	Armenis
Febre	100	100	100	100
Peritonitis	96	93	94	89
Pleuritis	40	33	40	53
Artritis	76	54	37	21
ELE	41	30	12	20

Hi ha diverses explicacions per a aquest fenomen, no necessàriament mútuament excloents: i) l'existència d'un efecte fenotípic distintiu per a cada una de les variants al·lèliques del gen responsable de la FMF i que a cada grup poblacional hi predomini una mutació diferent, ii) que el *background*, o rerafons genètic, de cada població determini la influència de gens modificadors de l'expressivitat de la FMF, iii) que l'existència de factors ambientals també poden jugar un paper important sobre l'efecte modificador del fenotip de la malaltia (Cazeneuve et al., 2000; Yalcinkaya et al., 2000; Gershoni-Baruch et al., 2003).

## 2.2 Dades del laboratori

Actualment no existeixen marcadors específics de la FMF i les dades del laboratori refereixen la presència d'un quadre inflamatori inespecífic. En general, s'observa que durant els episodis febrils incrementen els reactants de fase aguda i dels nivells sèrics de citocines i interleucines pro-inflamatòries (Taula 2). Els alts nivells solubles de la molècula d'adhesió limfocitària ICAM-1 i del factor quimiotàctic i activador neutrofilic IL8 suggereixen que l'activitat quimiotàctica i d'adhesió dels neutròfils és elevada (Direskeneli et al., 1999), la qual cosa coincideix amb el flux massiu de leucòcits polimorfonuclears (PMNs) observat als compartiments anatòmics afectats dels pacients, i amb la disminució de l'activitat de l'inhibidor quimiotàctic de C5a/IL8 (Samuels et al., 1998).

Taula 2. Resum de les fluctuacions en els nivell sèrics (columna esquerra) i en l'expressió del missatger (columna dreta) de diversos mediadors inflamatoris, interleucines, molècules d'adhesió i reactants de fase aguda entre altres, observats en pacients de FMF durant les crisis inflamatòries i durant els intervals lliure de malaltia. +, increment; -, decrement; nd, no determinat. IL, interleucina; TNFR, receptor del factor de necrosi tumoral (de l'anglès, Tumor Necrosis Factor Receptor); ICAM, molècula d'adhesió intracel·lular (de l'anglès, IntraCel.lular Adhesion Molecule); PRC, proteïna reactiva C; ESR, velocitat de sedimentació eritrocitària (de l'anglès, erythrocyte sedimentation rate); PLA Prostaglandina A<sub>2</sub>). <sup>a</sup>(Gang et al., 1999); <sup>b</sup>(Baykal et al., 2003); <sup>c</sup>(Mege et al., 1993); <sup>d</sup>(Direskeneli et al., 1999); <sup>e</sup>(Notarnicola et al., 2002).

	Nivells sèrics		RT-PCR <sup>e</sup>	
	Episodi inflamatori	Interval lliure de malaltia	Episodi inflamatori	Interval lliure de malaltia
IL1 $\beta$ <sup>a</sup>	-	-	+	+
IL1ra <sup>a</sup>	-	-	nd	nd
IL2r <sup>b</sup>	+	-	nd	nd
IL6 <sup>a, b, c</sup>	+	-	+	+
IL8 <sup>d</sup>	+	-	+	+
IL10 <sup>b</sup>	=	=	nd	nd
TNF $\alpha$ <sup>a, b</sup>	+/-	+/-	+	+
sTNFR1 <sup>a</sup>	+	-	nd	nd
sTNFR2 <sup>a</sup>	+	-	nd	nd
ICAM-1 <sup>d</sup>	+	-	nd	nd
PRC <sup>b</sup>	+	-	nd	nd
ESR <sup>b</sup>	+	-	nd	nd
PLA <sub>2</sub> <sup>a</sup>	+	-	nd	nd

Durant l'interval lliure de malaltia, l'expressió dels missatgers de IL1 $\beta$ , IL6, IL8 i TNF $\alpha$  es manté elevada, la qual cosa suggereix que existeix una inflamació subclínica durant els períodes asimptomàtics de la malaltia (Gang et al., 1999; Notarnicola et al., 2002; Baykal et al., 2003). Ara bé, resta per elucidar la relació d'aquestes observacions amb la fisiopatologia de la FMF.

### ***2.3 Herència***

La FMF es transmet amb un patró d'herència autosòmica recessiva, és a dir, que per a què un individu resulti afectat cal que hagi heretat "el defecte" en cada una de les dues còpies del gen, la paterna i la materna. Així, els individus heterocigots no manifesten la malaltia, i la probabilitat que un descendent de dos individus portadors desenvolupi la malaltia és del 25%.

Malgrat tot, hi ha poblacions on s'observen nombrosos casos afectats en una mateixa família, sovint mostrant patrons d'herència pseudo-dominants o, fins i tot, dominants. És el cas dels jueus ashkenazites, els armenis i els turcs (Aksentijevich et al., 1999; Cazeneuve et al., 1999; Booth et al., 2000).

Aquest fenomen és degut a l'alta freqüència gènica, és a dir, l'alta freqüència d'individus portadors de mutacions en el gen responsable de la FMF, en aquestes poblacions. Alhora, aquestes poblacions sovint són endogàmiques i/o consanguínies, i relativament petites, la qual cosa fa que la probabilitat que un individu afectat s'aparelli amb un individu portador (2 al·lels mutats i 1 al·lel mutat respectivament) sigui força més alta que en poblacions més grans i amb menor freqüència gènica. En aquests casos, la probabilitat de tenir un descendent afectat (2 al·lels mutats) entre la progènie és del 50%, exactament idèntic el que s'espera en els patrons d'herència dominants (1 al·lel mutat).

### ***2.4 Estratègia diagnòstica***

En l'actualitat, no es coneix l'existència de marcadors biològics específics, ja sigui en sang o en altres fluids corporals, que permetin detectar la FMF. Els únics paràmetres de laboratori que s'utilitzen són els mediadors inflamatoris que típicament es veuen elevats durant el procés inflamatori: la velocitat de sedimentació eritrocitària, els nivells sèrics de la proteïna reactiva C i de la proteïna SAA. La proteinúria és un paràmetre important a valorar i resseguir doncs valors superiors als 0,5g de proteïna/24h



són suggerents d'afectació renal, essent necessària la confirmació del dipòsit de substància amiloide (Samuels et al., 1998).

Així doncs, el diagnòstic de la FMF es basa en criteris clínics i, per conveni internacional, en els criteris diagnòstics de Tel-Hashomer (TH) (Taula 3) (Livneh et al., 1997; Pras et al., 1998). Reben el nom del centre on es varen establir, el Chaim Sheba Tel Hashomer Medical Center de Rhaba, a Israel, i és el centre on es refereixen els jueus afectats de FMF de tot l'estat d'Israel.

Taula 3. Criteris clínics de Tel-Hashomer.

---

CRITERIS MAJORS

1. Episodis febrils recurrents i, peritonitis, sinovitis o pleuritis.
2. Amiloïdosi secundària de tipus AA sense historial de predisposició
3. Resposta favorable al tractament continu amb colquicina

CRITERIS MENORS

1. Episodis febrils recurrents
  2. Eritema tipus eritematós
  3. Familiar de primer grau amb FMF
- 

Diagnòstic definitiu

- 2 criteris majors
- 1 criteri major + 2 criteris menors

Diagnòstic probable

- 1 criteri major + 1 criteri menor
- 

Els criteris, o claus, diagnòstics de TH consten d'uns criteris majors i uns de menors. Els criteris majors es basen en la presència d'episodis febrils acompanyats de la inflamació d'una de les seroses, el desenvolupament d'amiloïdosi generalment nefropàtica i la resposta al tractament amb colquicina. Els criteris menors es basen en la manifestació de brots febrils, sense la implicació de cap altre símptoma inflamatori, en la presència de lesions cutànies tipus ELE i en l'existència d'un familiar afectat de FMF en primer grau.

L'origen ètnic dels pacients, tot i no ser crucial, pot ajudar en el correcte diagnòstic de la malaltia. Segons el nombre de criteris majors o menors que compleix el pacient, el diagnòstic és de FMF definitiu o bé de FMF probable (Taula 3).

El motiu de la presència de l'amiloïdosi i la ELE en els criteris de TH és l'alta incidència d'aquestes dues afectacions en els pacients de FMF d'origen jueu. El mateix succeeix amb el criteri d'història familiar de FMF, la qual cosa constitueix l'evidència

més clara que aquestes claus diagnòstiques estan dissenyades en base a les manifestacions clíniques d'un grup poblacional molt concret.

Però dels criteris de TH destaca l'existència d'heterogeneïtat clínica amb la que es presenta la FMF, a jutjar per la presència de febre com a símptoma exclusiu del brot inflamatori o bé acompanyat d'altres signes d'inflamació. Fins i tot s'ha dissenyat un sistema de puntuació severitat (en anglès, severity score) que té com a finalitat la objectivació de la severitat de la malaltia (Taula 4).

Taula 4. Criteri de puntuació per a la  
avaluació de la severitat de la FMF.

Presentació	Puntuació
<b>Edat d'inici (anys)</b>	
< 5	3
5-10	2
11-20	1
>20	0
<b>Freqüència episodis</b>	
> de 2 al mes	3
1-2 per mes	2
< de 1 al mes	1
<b>Dosis de colquicina per controlar els brots (mg/dia)</b>	
No responedors	4
Responedors a 2	3
Responedors a 1.5	2
Responedors a 1	1
<b>Artritis</b>	
Crònica	3
Aguda	2
Presència	2
<b>Amiloïdosi</b>	
Fenotip II	4
Presència	3
<b>Interpretació del resultat</b>	<b>Total punts</b>
Malaltia lleu	2-5
Malaltia moderada	6-10
Malaltia severa	>10

## 2.5 Tractament

La colquicina és el tractament actual de la FMF al que responen més del 90% dels pacients i constitueix un criteri clínic important pel diagnòstic de la FMF.

L'administració d'aquest agent per primera vegada a pacients de FMF va esdevenir, com sovint ha succeït en altres descobriments científics, a conseqüència d'un acte mèdic fortuït. Al 1972, Goldfinger va administrar colquicina a un pacient de FMF per tractar-li la gota: el dolor abdominal que recurrentment patia el pacient va desaparèixer totalment amb la colquicina. Després d'aquesta observació va provar d'administrar la droga en una pacient amb un quadre molt sever de FMF la qual, desesperadament, fins i tot havia comès un intent de suïcidi. Basant-se en la millora d'aquesta pacient, va administrar colquicina a 4 pacients més. Finalment, al 1974, l'èxit dels diversos assaigs que es realitzaren independent i randomitzadament, varen establir que el règim diari de colquicina oral constituïa el tractament d'elecció per la FMF.

La colquicina és un alcaloide vegetal obtingut de *colchicum autumnale* (vellorita en castellà.) i de *gloriosa superba* (gloriosa en castellà). Actua intracel·lularment unint-se a les subunitats de tubulina del citoesquelet, inhibint funcions cel·lulars bàsiques com ara el moviment dels orgànuls pel citoplasma i la secreció del contingut lisosomal o vacuolar a l'exterior cel·lular. L'acció inhibidora de la colquicina en les cèl·lules leucocitàries recau en l'adhesió endotelial, la mobilitat ameboide i la degranulació lisosomal, però l'acció més important és la inhibició de la quimiotaxi neutrofílica. La colquicina, a més de ser eficaç en el tractament de la FMF, ho és en la gota, en la síndrome de Behçet i la cirrosi, mentre que en l'escleroderma i en diverses síndromes dermatològiques el seu efecte terapèutic està encara per determinar (Ben-Chetrit et al., 1998).

En la FMF, la colquicina, retarda els episodis inflamatoris i fins i tot els elimina definitivament, tot i que no té cap efectivitat administrada quan el brot ja està instaurat. Al no produir-se tants atacs inflamatoris, no es veuen incrementats els nivells sèrics de SAA i per tant, disminueix el risc a desenvolupar amiloïdosi. Hi ha autors que fins i tot afirmen que la colquicina té l'efecte de revertir el dipòsit amiloide (Zemer et al., 1986). La dosis d'administració a adults és de 0,5 a 2 mg/dia que rarament se supera doncs provoca alteracions gastrointestinals (Ben-Chetrit and Levy, 1998).

Val a dir que els corticoesteroids o altres antiinflamatoris, que constitueixen un tractament efectiu en altres SHFP, no ho són en la FMF i a l'inrevés: la colquicina no

produeix cap efecte en les altres SHFP (Samuels et al., 1998; Drenth and Van der Meer, 2001).

## 2.6 Epidemiologia

### 2.6.1 Poblacions ancestrals

La FMF, a diferència d'altres trastorns genètics humans no és una malaltia universal. Ben al contrari, la distribució de la FMF és gairebé exclusiva de les poblacions de la conca mediterrània. Està gairebé restringida a quatre poblacions i/o grups ètnics de l'Orient Mitjà: jueus, armenis, àrabs i turcs (Sohar et al., 1967).

Una constant a la literatura científica de la FMF és la utilització del terme *població* poc rigorosa des del punt de vista genètic. S'entén per població, en genètica de poblacions, aquell conjunt d'individus tal que el flux gènic es dona majoritàriament al seu interior. El grup ètnic seria, en canvi, un concepte social, que representa el conjunt d'individus lligats per vincles geogràfics, lingüístics, religiosos i/o culturals. Sovint, però, ambdós conceptes coincideixen; l'aïllament socio-geogràfic, d'una ètnia durant un cert temps pot donar lloc a la diferenciació, genèticament parlant, a través de la restricció del flux gènic entre aquest grup i altres, i donar lloc finalment a una unitat poblacional.

Cal tenir en compte doncs, que la divisió que s'ha descrit al diferenciar aquests quatre grups altament afectats de FMF és ètnica i que no s'ha verificat que corresponguin a unitats genètiques. En el cas del terme àrab, sovint s'utilitza per fer referència als individus de religió musulmana, quan existeixen àrabs que no són musulmans i a l'inrevés, no tots els musulmans són àrabs. Quan es parla de jueus afectats és clara la referència religiosa que se'n fa al mencionar aquest grup poblacional, sovint sense especificar-ne el subgrup al que pertanyen i, ni per suposat, la localització geogràfica, car per raons històriques els jueus no es confinen exclusivament a l'estat d'Israel ni a cap altre.

Al llarg del desenvolupament de la present tesis doctoral s'ha tingut en compte la procedència de les dades dels diferents grups de jueus que es defineixen a continuació.

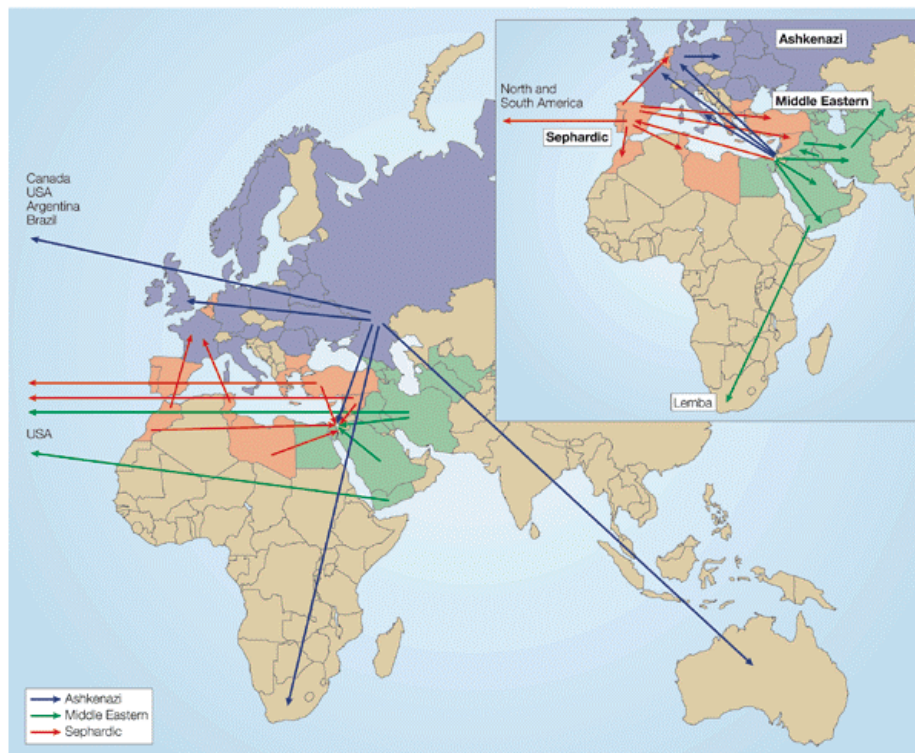
El fet que les quatre poblacions més afectades per la FMF, jueus, àrabs, armenis i turcs, comparteixin mutacions associades al mateix *background*, o rerafons genètic, suggereix un probable origen comú entre aquests grups. Per aquest motiu en el camp de la FMF, la comunitat científica ha convingut anomenar-les *poblacions ancestrals*, per

diferenciar-les d'altres poblacions mediterrànies on els casos de FMF són menys freqüents: les *poblacions no-ancestrals*. Amb aquesta distinció es vol implicar que les poblacions no ancestrals han adquirit la FMF per flux gènic des de les poblacions ancestrals. La població espanyola es trobaria per tant, entre les poblacions no-ancestrals, conjuntament amb altres poblacions europees com la italiana o la francesa.

### 2.6.2 Els grups de jueus i la FMF

Dels 13 milions de jueus contemporanis, uns sis viuen als Estats Units, uns cinc a Israel i la resta viuen distribuïts arreu del món. En funció de la història de les seves migracions, els jueus es divideixen en tres grans grups: els jueus sefardites, els ashkenazites i els de l'Orient Mitjà. Estudis genètics basats en l'anàlisi de polimorfismes del DNA mitocondrial i del cromosoma Y, han demostrat l'origen comú de tots els grups de jueus, malgrat la barreja amb els diferents grups locals (Ostrer, 2001).

Figura 1. Esquema de les migracions dels tres grans grups de jueus. Veure explicacions al text



Nature Reviews | Genetics

Els jueus sefardites, són descendents dels jueus que vivien a *Sefarad*, nom hebreu de la península Ibèrica. Durant l'Edat Mitjana varen ser perseguits pels Reis

Catòlics i finalment varen ser expulsats de la Península Ibèrica al llarg dels segles XIV i XV. El destí d'aquests grups de jueus errants va ser el nord d'Àfrica, Itàlia, els Balcans, Turquia, el Líban, Síria i les Amèriques (Fig. 1). El terme hebreu Ashkenazi, que significa Alemanya, dona nom al grup de jueus ashkenazites, els quals varen partir probablement d'Itàlia per travessar els Alps i establir-se al centre i est d'Europa durant el primer mil·lenni de la nostra era. Fins els segles XIII al XV varen romandre-hi assentats, moment en el què van migrar a Polònia i Lituània. Una bona proporció de jueus ashkenazites van emigrar als Estats Units, on hi constitueixen el 90% dels jueus de tot el país. El tercer gran grup de jueus el constitueixen els de l'Orient Mitjà, els quals han viscut en l'actual Israel i Palestina, així com a l'Iraq, Iran, Àsia central i la península Aràbiga.

A l'estat d'Israel, aproximadament el 47% dels jueus són d'origen ashkenazita, el 30% sefardita i el 23% de l'Orient Mitjà (Ostrer, 2001). Sorprenentment però, el 90% dels pacients de FMF a Israel però, són d'origen sefardita (Pras et al., 1998). Com que la majoria d'estudis sobre la FMF en jueus són realitzats a Israel, sovint s'empra el terme genèric de jueu, com a grup afectat de FMF, sense especificar-ne l'origen sefardita.

### 2.6.3 *Freqüència de portadors*

La prevalença de la malaltia a les poblacions ancestrals és molt elevada: d'entre un afectat de cada 500 o 1000 individus (Daniels et al., 1995; Yuval et al., 1995) i la freqüència de portadors és d'un de cada cinc jueus ashkenazites, un de cada cinc a deu jueus no-ashkenazites, i un de cada set àrabs, armenis o turcs (Aksentijevich et al., 1999; Shinawi et al., 2000; Stoffman et al., 2000; Gershoni-Baruch et al., 2001; Yilmaz et al., 2001). Aquestes dades evidencien discrepàncies en diversos sentits. Primer, entre la freqüència de portadors i la prevalença, la qual cosa evidencia que la penetrància de la malaltia no és complerta. Segon, essent més nombrós el grup de residents a Israel d'origen ashkenazita que els d'origen sefardita, sobta que la gran majoria d'afectats de FMF siguin d'aquest darrer grup, la qual cosa suggereix que la penetrància de les mutacions al *MEFV* en els ashkenazites seria menor a la dels sefardites, així com la importància del rerafons genètic i de factors ambientals en la manifestació de la malaltia.

L'alta freqüència de portadors observada en aquesta àrea geogràfica de la Mediterrània va fer postular la hipòtesi, encara vigent, sobre l'existència d'un cert

avantatge evolutiu en front a patògens endèmics dels individus portadors, respecte els individus no portadors. Seria un paral·lelisme amb l'avantatge selectiu que tenen els portadors de l'anèmia falciforme sobre la malària (Kastner, 1998; Ozen et al., 2002; The International FMF Consortium, 1997). Cal remarcar però, que a diferència de la malària i l'anèmia falciforme, no hi ha cap evidència experimental que verifiqui aquesta hipòtesi. Ans el contrari, hi ha estudis que afirmen que no existeix tal avantatge evolutiu (Brenner Ullman et al., 1994; Langevitz et al., 1997).

#### **2.6.4 Poblacions no-ancestrals**

Tot i que no s'han realitzat estudis sobre la prevalença de la FMF en poblacions no ancestrals, s'han descrit sèries de pacients de FMF a Grècia (Booth et al., 2000; Konstantopoulos et al., 2003), Itàlia (Aksentijevich et al., 1999; Dode et al., 2000; La\_Regina et al., 2003), França (Bernot et al., 1998) i Portugal (Touitou, 2001). S'ha descrit un grup ampli de pacients als Estats Units, d'origen europeu (Samuels et al., 1998). Casos poc freqüents s'han descrit al Regne Unit (Booth et al., 2000), Bèlgica (1999) i anecdòticament, a la Índia, la Xina (Booth et al., 1998), l'Afganistan (Bernot et al., 1998) i el Japó (Shinozaki et al., 2002).

### **3. LA FMF A ESPANYA**

A la població espanyola, els pocs pacients de FMF descrits són casos aïllats. Els autors de la primera publicació, apareguda al 1962, Calvo i Sanchez-Malo descriuen 4 casos pertanyents a dues famílies. L'any 1968, Sanchez-Sicília descriu el cas d'un infant de 3 anys amb FMF i amiloïdosi secundària. Al 1980, en Ribó i col·laboradors publicà una família andalusa afectada de FMF en varies generacions. Però el recull més extens en quant a nombre de pacients, és el realitzat per en Dalmau i col·laboradors al 1981, on hi descriu un grup de fins a 18 pacients de la comunitat xueta de Mallorca. Aquest fet, juntament amb el coneixement de l'alta incidència de la malaltia en els jueus, ha provocat la falsa creença per part dels clínics, en general, que la FMF a la Península Ibèrica està restringida a individus d'origen jueu, alhora que ha dut a la percepció subestimada de la incidència de l'entitat al nostre entorn. Donat que els xuetes constitueixen un dels grups d'estudi de la present memòria, es faciliten a continuació unes breus referències històriques sobre aquesta comunitat.

### 3.1 La comunitat xueta.

#### 3.1.1. Breus apunts històrics

Els primers assentaments de jueus a Mallorca daten del segle I AC. A conseqüència del sentiment antisemita que sorgí a tota Europa durant l'Edat Mitja, els jueus de les Illes Balears, al igual que la resta de jueus a la península Ibèrica, varen patir un seguit de persecucions, amenaces, tortures i execucions. Al 1492, els Reis Catòlics varen decretar l'expulsió dels jueus de la Península Ibèrica. Molts d'ells varen fugir i s'assentaren principalment al nord d'Àfrica. Altres però, van ser obligats a convertir-se i batejar-se com a *cristians nous*. Molts *conversos* continuaren vivint als antics *calls*, els barris jueus, la qual cosa propiciava acusacions de *judaitzar* en secret, és a dir, de seguir practicant ritus jueus en la intimitat. Aquestes acusacions varen generar un odi i un rebuig social vers als nous cristians encara més notable que el que s'havia produït vers als propis jueus.

De la mateixa manera que a Castella s'anomenava *marranos* als conversos, a Mallorca se'ls batejà amb el nom de *xuetes*. La paraula xueta deriva de *xuetó*, que probablement ve de *juetó*, que vol dir jueu, però també pot venir del mot *xuia* que significa cansalada o porc. A banda de l'etimologia del mot, que és força controvertida, el que sí es coneix bé són els fets que es propiciaren a partir del segle XIV. A Mallorca, els xuetes varen patir persecucions i un aïllament social total que durà segles, la qual cosa derivà en el tancament de la població i en l'evident endogàmia. Especialment discriminats foren aquells que duïen algun dels quinze cognoms xuetes: Aguiló, Bonnin, Cortès, Forteza, Fuster, Martí, Miró, Picó, Pinya, Pomar, Seguí, Tarongí, Valentí, Vallerola i Valls, tot i que se sap que n'hi havien dotzenes de cognoms més. L'estigmatització social d'aquesta comunitat ha estat present fins ben recentment: els casaments entre els xuetes i no-xuetes no s'han produït fins la segona meitat del segle XX. Unes dades que il·lustren la vigència d'aquest fet social són les conclusions d'una enquesta feta per la universitat de les Illes Balears al 2001, segons la qual el 30% dels Mallorquins confessa que no es casarien amb un xueta mentre que un 5% declara que ni tan sols vol tenir un amic xueta.



### **3.1.2. Els xuetes i els seus orígens**

Existeix un interès notable en estudiar els orígens de la comunitat xueta i en constatar la veracitat de l'origen jueu d'aquesta població que refereixen les dades històriques. Les evidències científiques que recolzen l'origen jueu dels xuetes són controvertides. Tampoc no està objectivada la influència de la població illenca sobre la comunitat xueta durant el curs de la història, i per tant, si aquest fet pot enmascarar les possibles evidències genètiques que indicarien el presumpte origen jueu dels xuetes.

A principis dels anys 90 es publiquen els primers treballs poblacionals realitzats a la població xueta que estudien la relació de la comunitat xueta amb la comunitat balear no-xueta i amb altres grups jueus i no jueus de la Mediterrània. En base a les freqüències dels polimorfismes de certs enzims eritrocitaris o de grups sanguinis, les primeres conclusions assenyalaren d'una banda la influència genètica de la població espanyola peninsular a les Illes, i de l'altra, una relació més propera entre els xuetes i els Balears no-xuetes que no pas amb d'altres poblacions jueves (Picornell et al., 1990; Picornell et al., 1991; Picornell et al., 1992).

En contraposició a aquests estudis bioquímics però, Buades descriu al 1995, en col·laboració amb investigadors jueus, que tant la prevalença de la FMF en els pacients xuetes (1/1000) com l'afectació predominantment articular que presenten són molt similars a les observades en els pacients de FMF jueus no-ashkenazites d'Israel. A més, destaquen l'absència de pacients de FMF a la comunitat balear no-xueta. Aquests fets suggerien l'existència d'un origen comú entre aquestes dues poblacions, hipòtesi que quedava argumentada pels fluxos històrics de les poblacions mediterrànies al llarg de la història.

L'any següent, al 1996, mitjançant l'anàlisi electroforètica dels polimorfismes de certes proteïnes sèriques s'associa l'origen de la comunitat xueta proper al de les poblacions d'Orient Mitjà (Nevo et al., 1996), a favor de la hipòtesi anterior.

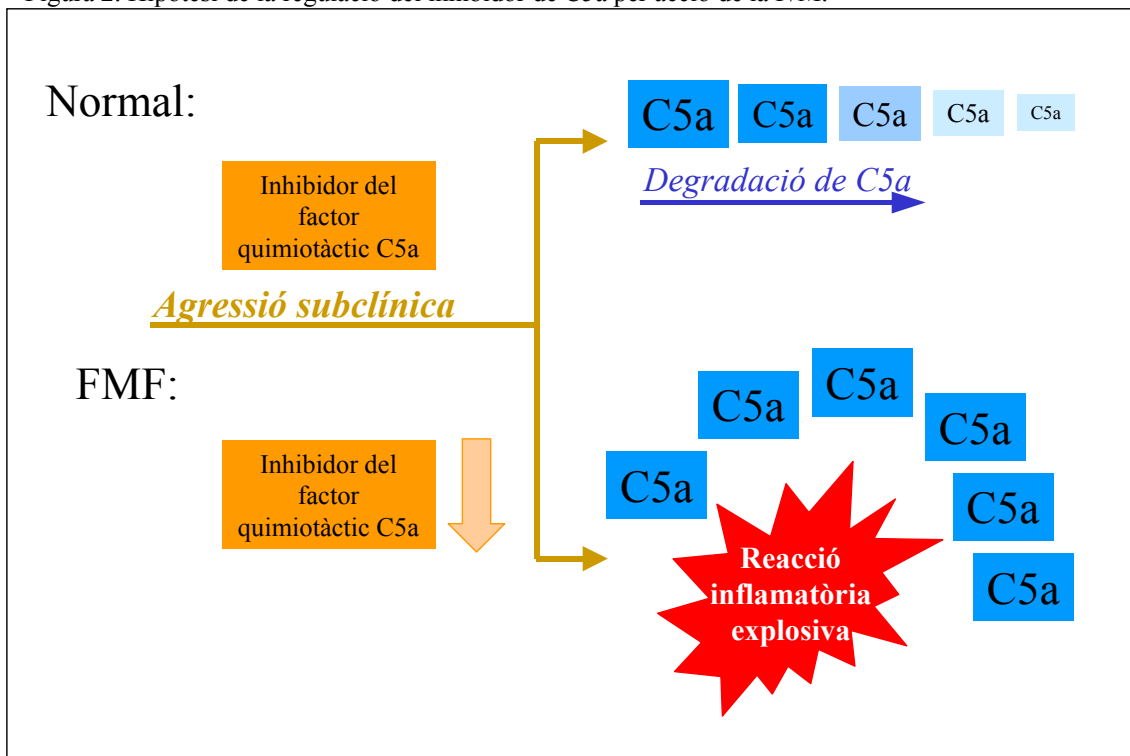
L'estudi genètic de la FMF en els pacients xuetes té un especial interès: el fet que la FMF sigui una malaltia genètica altament prevalent entre els jueus i confinada a poblacions de l'Orient Mitjà, pot aportar dades rellevants sobre l'origen d'aquesta comunitat, i des del punt de vista de la FMF, pot ajudar a entendre la història natural de les mutacions a la vessant occidental de la Mediterrània.

## 4. EL GEN *MEFV*

### 4.1 Procés de clonació

La recerca del gen causant de la FMF es va basar inicialment in criteris funcionals, és a dir, en les alteracions bioquímiques observades als pacients. A jutjar per la naturalesa recurrent i/o reversible dels episodis inflamatoris, se sospitava que el gen causant de la malaltia podia tenir una funció en el control de la inflamació. En Matzner, al 1984, basant-se en l'absència de l'activitat de l'inhibidor del factor del complement i quimiotàctic C5a, va proposar que la causa de la inflamació incontrolada podria ser l'esmentat enzim (Matzner et al., 1984). Així, l'inhibidor de C5a reprimiria el reclutament dels neutròfils en condicions normals, mentre que en absència d'aquest inhibidor, els nivells de C5a augmentarien i desencadenarien l'atracció massiva dels neutròfils al lloc de la inflamació i s'activaria la cascada inflamatòria (Fig. 2).

Figura 2. Hipòtesi de la regulació del inhibidor de C5a per acció de la P/M.



Altres investigadors varen proposar els elevats nivells de mono i d'hidroxiàcids, de dopamina beta hidroxilasa o fins i tot la possible deficiència en lipocortines (Kastner, 1998; Samuels et al., 1998). Però les anàlisis genètiques de lligament varen excloure

aquests gens com els causants de la FMF. El mateix resultat negatiu es va obtenir de l'estudi de lligament pels gens de les interleucines IL-1 i IL-6 i pel gen *SAA1* (Sack et al., 1991), suggerint que, com en altres desordres, les manifestacions fenotípiques observades en els pacients no constituïen la causa de la FMF sinó fenòmens secundaris a la etiologia de la malaltia.

Finalment, a l'estiu de 1997 dos consorcis internacionals varen aconseguir, de manera independent, la clonació del gen de la FMF. El "Consorti per la FMF Internacional", liderat per l'Institut Nacional de Salut dels Estats Units (en anglès, NIH) i el "Consorti per la FMF Francès", format per diversos grups francesos. Els dos consorcis varen abordar la identificació del gen de la FMF amb la tècnica del "clonatge posicional" aplicada a famílies afectades de FMF. Aquesta tècnica té l'avantatge de ser "neutral" en quant a la hipòtesi funcional del gen d'interès. És a dir, que no té en compte la funció del gen en qüestió, sinó que se centra en la recerca de les mutacions causants del desordre. El "clonatge posicional" en una primera fase, es basa en la identificació del cromosoma on es localitza el gen causant de la malaltia, i en una segona fase, en l'acotació de l'interval cromosòmic candidat fins a la troballa del gen.

Les anàlisis de més de 100 marcadors polimòrfics en un pannel de famílies jueves no-ashkenazites afectades, va permetre la localització del locus associat a la malaltia al braç curt del cromosoma 16, centromèric al gen de la hemoglobina alfa. El lligament es va confirmar en pacients de FMF amb altres orígens ètnics com famílies ashkenazites, armènies, àrabs i turques. En una segona fase es va anar acotant l'interval candidat a contenir el gen en qüestió, amb l'anàlisi de més pannells de microsatèl·lits i mitjançant la observació de l'existència d'haplotips comuns entre les diferents poblacions afectades. Es varen seqüenciar els exons genòmics d'un interval d'uns 200kb aproximadament i es varen seleccionar els cDNAs compresos a la regió per identificar tots els gens codificats en l'interval (Fig. 3).

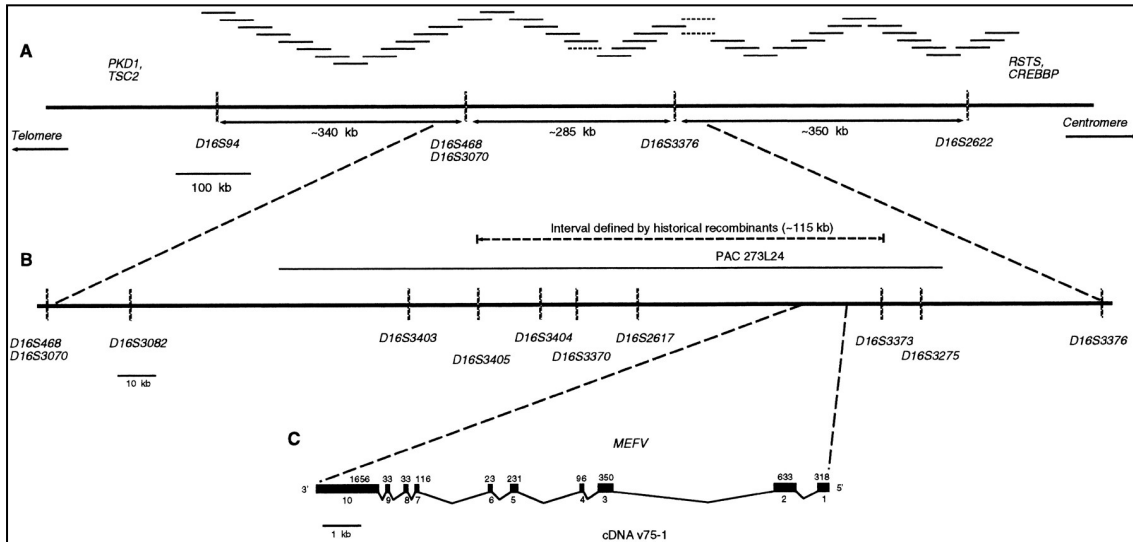
El resultat va ser l'obtenció d'un mapa transcripcional entre els marcadors D16S3082 i D16S3373. Finalment, es va identificar un cDNA de 3.505 nucleòtids que predictivament, codificava per una proteïna de 781 residus aminoacídics.

#### **4.2. El gen de la FMF**

El gen responsable de la FMF va rebre el nom de *MEFV*, l'acrònim de "MEditerranean FeVer". Es localitza al 16p13.3, centromèric als gens PKD1 (Polycystic kidney disease 1) i TSC2 (Tuberous sclerosis 2) i telomèric als gens RSTS (Rubinstein-

Tabi syndrome) i CREBBP (CREB binding protein). Està situat entre els marcadors D16S2617 i D16S3373 (Fig. 3) i està constituït per 10 exons expandits al llarg de 15 kb.

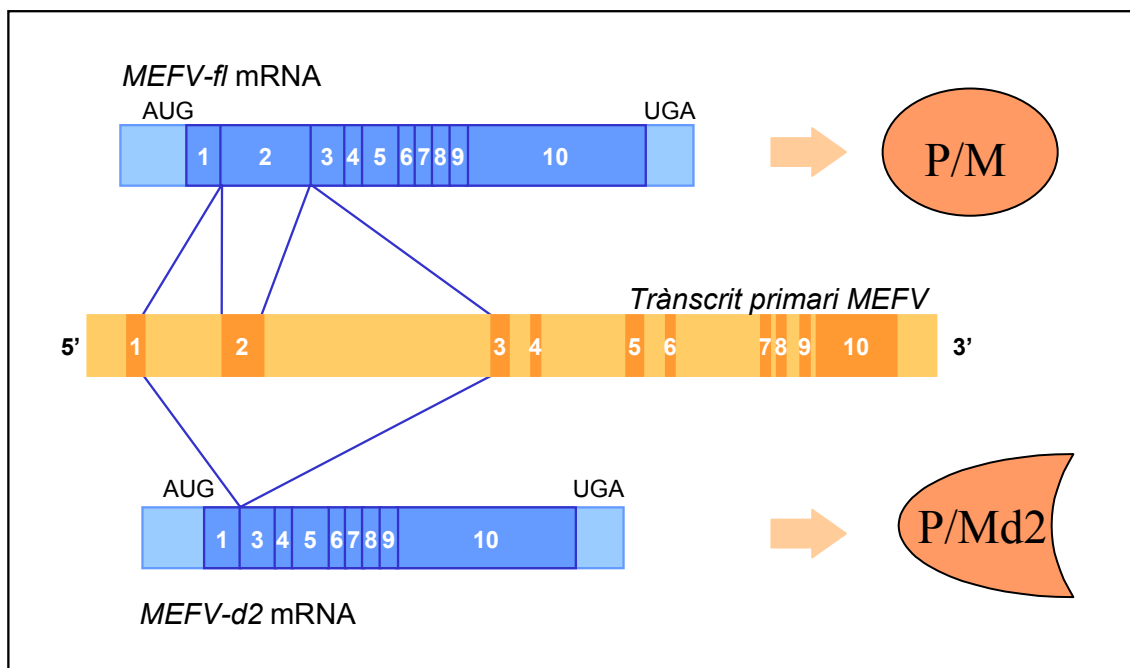
Figura 3. Localització i organització cromosòmica del gen *MEFV*. Les caixes negres representen els exons, que estan numerats del 1 al 10. També esta indicada la grandària de cada un d'ells en pb.



### 4.3. Expressió

El gen *MEFV* es transcriu en dos missatgers: el *MEFV*-fl (de l'anglès, *full length*) i el *MEFV*-d2 (de l'anglès, *deletion 2*) (Papin et al., 2000)(Fig. 4).

Figura 4. El gen *MEFV* i els dos tràncrits: *MEFV*-fl codifica per la P/M. *MEFV*-d2 que té l'exó 2 deleccionat, codifica per P/Md2.



El *MEFV*-fl inclou els 10 exons del *MEFV*, té una llargada de 3,7kb i codifica per una proteïna de 781 residus aminoacídics. Aquesta, va ser batejada pel Consorci Internacional per la FMF amb el nom de *pirina* (P), del grec *pyros*, que significa foc, i pel Consorci Francès per la FMF, amb el nom de *marenostriana* (M), en honor al nom llatí de la Mediterrània, el *Mare Nostrum*.

Els estudis d'expressió del *MEFV*-fl, basats en la detecció per RT-PCR del transcrit, mostren l'expressió exclusivament granulocítica: principalment, en neutròfils i en menor grau en eosinòfils i monòcits (Centola et al., 1998). Al moll d'os es detecta l'expressió incipient del *MEFV*-fl a nivell del pro-mielòcit, la qual incrementa al llarg de la diferenciació mielocítica i té un pic màxim en cèl.lules mielomonocítiques madures. Per RT-PCR es pot detectar l'expressió del *MEFV*-fl també en fibroblastes sinovials. Pel contrari, no s'ha detectat expressió en ganglis limfàtics, melsa o timus, els quals són rics en limfòcits, ni en cap altre teixit. Les línies cel·lulars humanes transformades que expressen el *MEFV* són bàsicament mieloides (The International FMF Consortium, 1997).

El *MEFV*-d2 és el producte de *splicing* alternatiu del gen *MEFV*, al qual li manca l'exó 2, que conserva la pauta de lectura i codifica per una proteïna de 570 residus (P/M-d2). L'expressió d'aquest transcrit és similar a la del *MEFV*-fl. El que és diferent és la localització de P/Md2 per la qual codifica (Papin et al., 2000) (veure apartat de proteïna, estructura y funció) .

#### **4.4. Regulació de l'expressió**

La regulació de l'expressió del *MEFV*-fl s'ha estudiat en monòcits i neutròfils de controls sans mitjançant experiments d'inducció *in vitro* del gen. Aquests experiments han demostrat una regulació diferencial en aquests dos tipus cel·lulars (Taula 5).

En monòcits, l'LPS i les citocines pro-inflamatòries  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  i  $IFN\alpha$  indueixen la sobreexpressió de *MEFV*-fl. Per contra, les citocines anti-inflamatòries IL4, IL10, o el  $TGF\beta$  regulen negativament la seva expressió, fins i tot poden inhibir l'acció mediada per un còctel de LPS i  $IFN\gamma$ . En neutròfils, l' $IFN\gamma$  és l'únic estímul dels testats que indueix una sobreexpressió del *MEFV*, mentre que LPS,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\alpha$ , IL4 i IL10 no tenen cap efecte sobre l'expressió del transcrit.

Aquestes dades estableixen que el *MEFV* és un gen de resposta ràpida al  $IFN\gamma$  i suggereixen un possible mecanisme pel qual el *MEFV* podria regular el procés inflamatori (Centola et al., 1998).

Taula 5. Regulació dels nivells del transcrit *MEFV*-fl en monòcits i neutròfils.

Estímul	Monòcits	Neutròfils
LPS	↑↑↑	-
Citocines pro-inflamatòries:		
IFN $\gamma$	↑↑	↑↑
TNF $\alpha$	↑	-
IFN $\alpha$	↑	-
IL1	-	-
Citocines anti-inflamatòries		
IL4	↓↓↓	-
IL6	-	-
IL8	-	-
IL10	↓↓	-
TGF $\beta$	↓	-
Factors de creixement		
G-CSF	-	-
GM-CSF	-	-
Quimiotàctic C5a	-	-

- cap efecte; ↑, sobreexpressió; ↓, repressió.  
(Centola et al., 1998)

## 5. LA PIRINA/ MARENOSTRINA

### 5.1 Estructura de la P/M

L'estructura de la P/M no es coneix actualment, doncs no ha estat cristal·litzada, i tota la informació referent a l'estructura de la molècula es basa en anàlisis computacionals de la seqüència aminoacídica. Aquestes anàlisis indiquen que la P/M té diversos dominis o motius, ben diferenciats al llarg de la seva seqüència (Taula 6, Fig. 5).

#### 5.1.1 El domini pirina

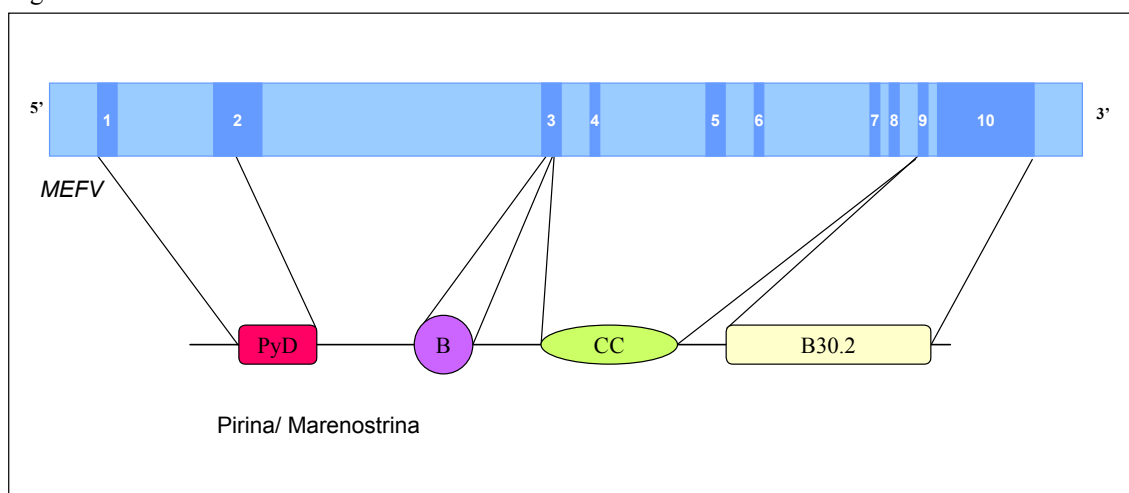
La P/M conté un motiu conservat anomenat domini pirina (PyD, de l'anglès pyrin domain) a l'extrem amino-terminal (Bertin et al., 2000; Martinon et al., 2001) el

qual ha donat nom a una família estructural de proteïnes que tenen aquest domini en comú. Consta d'entre 80 a 100 residus aminoacídics disposats en forma de sis alfa-hèlix les quals formen una estructura que, de forma genèrica, s'anomena *death domain* (literalment de l'anglès, domini de la mort).

Taula 6. Predicció dels dominis de la P/M en base a la seqüència aminoacídica. S'indiquen els residus que constitueixen cada motiu i exons pels quals estan codificats. PyD també té anomenat domini DAPIN<sup>(Staub et al., 2001)</sup> (de l'anglès, Domain in APoptosis and INterferon response) i domini PAAD<sup>(Pawlowski et al., 2001)</sup> (de l'anglès, Pysin, AIM, ASC Death-domain- like). CC coiled-coil, conformació altament enrotllada; NLS, senyals de localització nuclear (de l'anglès Nuclear Localization Signal); rfp, ret finger proteïn.

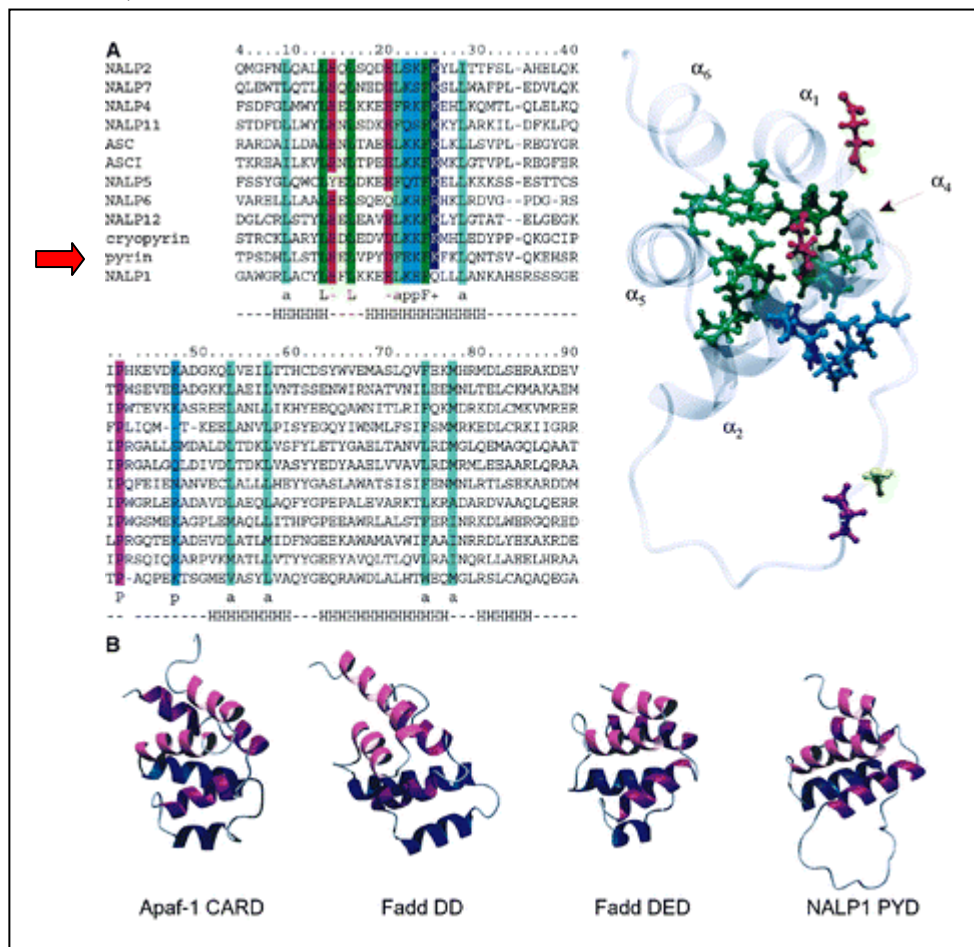
Domini	Residu	Exons	Funcions putatives
Domini pirina (PyD)	1-300	1-2	Apoptosis, inflamació, immunitat innata?
Domini bàsic bZIP	266-280	2	Unió específica al DNA, funció efectora nuclear (Shuman et al., 1990)
SLN	157-163	2	Localització Nuclear (Robbins et al., 1991) Cluster bàsic format per PLSKREE
B-box i dits de Zn	375-407	3	Interacció proteïna-proteïna, en complexos homomultimers (Reddy et al., 1992)
SLN 1	419-422	3-4	Localització Nuclear (Robbins et al., 1991)
CC Alfa-hèlix	408-594	3-9	Possiblement interacció dimèrica (Lupas, 1997)
SLN 2	420-437	4	Localització Nuclear (Robbins et al., 1991)
Rfp o B30.2	577-757	9-10	Desconeguda (Henry et al., 1997)

Figura 5. Localització dels diversos dominis de la P/M.



Els *death domains* són essencials per a la interacció proteïna:proteïna i reben aquest nom degut a què les proteïnes que els contenen estan implicades funcionalment en fenòmens apoptòtics i inflamatoris (veure funció) (Hengartner, 2000). Existeixen tres tipus més de *death domains*, estructuralment molt similars entre ells: el domini DD pròpiament dit (Death Domain), el DED (de l'anglès, Death Effector Domain) i el CARD (de l'anglès, CAspase Recruitment Domain) i el tipus de *death domain* dona nom a la família de proteïnes que el contenen. Així, hi ha la família de proteïnes DD, les DED i les CARD (Fig. 6). Recentment s'ha descrit que aquestes tres, juntament amb les proteïnes PyD (la P/M entre elles) constitueixen la superfamília estructural de receptors apoptòtics *death domain* (SFDD de l'anglès, death-domain-fold superfamily) (Bertin and DiStefano, 2000; Martinon et al., 2001).

Figura 6. Anàlisi estructural de la família PyD. A, alineament de seqüències dels dominis PyD de 12 proteïnes d'*Homo sapiens*, la P/M entre elles. B, plegaments de la SFDD. Els quatre tipus de *death domain* en un membre representatiu de cada una de les quatre subfamílies: Apaf-1, i el domini CARD (Zhou et al., 1999), Fadd, i el domini DD (Berglund et al., 2000), Fadd, i el domini DED (Eberstadt et al., 1998), *NALP1*, i el domini PYD (Hiller et al., 2003).





Els components de la SFDD són, en general, proteïnes adaptadores, és a dir, formen xarxes de proteïnes — no efectores — que interactuen entre elles i que en darrer terme, activen les molècules efectores. Dues característiques importants de la SFDD són: que les interaccions proteïna:proteïna són homotípiques i específiques de subfamília, amb la qual cosa els DD només interaccionen amb DD, els DED amb DED, els CARD amb CARD i els PyD amb PyD (Weber et al., 2001), i que la majoria de membres de les SFDD contenen més d'un *death domain*. Ambdós propietats faciliten la formació de xarxes d'interaccions protèiques. Així per exemple, una proteïna A interacciona amb la proteïna B només si ambdues contenen el domini DD. Si es dona que la proteïna B conté, a més a més del DD, un domini de tipus CARD, podrà interaccionar també amb la proteïna C, sempre i quan la aquesta contingui el domini CARD, la qual serà l'encarregada d'activar la proteïna efectora. Així, encara que la proteïna A no tingui funció efectora per si mateixa, podrà exercir-la mitjançant la formació de xarxes d'interaccions protèiques fins desencadenar en la interacció amb la proteïna efectora. La P/M semblaria funcionar similarment (veure l'apartat funció).

### 5.1.2 *Altres dominis estructurals de la P/M*

El domini bàsic bZIP consisteix en una regió bàsica d'uns 14-20 aa's, amb funció d'unió específica al DNA, i d'una cremallera de Leucines implicades en la dimerització entre proteïnes (Shuman et al., 1990). La presència de la regió bàsica, que no la cremallera de Leucines, suggereix que la P/M pot desenvolupar una funció nuclear efectora.

S'ha observat que la integritat del domini B-box Zinc-finger així com la regió en alfa-hèlix altament enrotllada són vitals per a les interaccions proteïna-proteïna de tipus homomultimeriques suggerint un possible mecanisme funcional (Reddy et al., 1992; Lupas, 1997).

Dues senyals de localització nuclear una d'elles definida per la seqüència bàsica *PLSKREE* i l'altra formada per dos seqüències bàsiques sobreposades, assenyalen una potencial localització cel·lular de la P/M.

El domini ret finger (rfp), també anomenat B30.2, es va definir inicialment com una regió altament homòloga entre una regió del gen humà del complex major d'histocompatibilitat de classe I MHC, i l'extrem carboxi-terminal d'un grup divers de proteïnes intracel·lulars, de membrana i de secreció. Els membres d'aquest grup realitzen una gran diversitat de funcions, algunes al nucli i altres al citoplasma. El gen

*MEFV* s'inclou en la família multigènica RoRet, que agrupa els gens que codifiquen per proteïnes que, a més de tenir en comú el domini rfp/B30.2, tenen el domini b-BOX i la regió d'alfa hèlix altament enrotllada. El gen codificant per la ribonucleoproteïna Ro/52SSA, autoantigènica en la síndrome de Sjögren i en el lupus sistèmic eritematós, també pertany a aquesta família.

### **5.2 Localització cel·lular**

L'anàlisi de la seqüència de la P/M suggereix la localització nuclear de la proteïna, a jutjar per les dues seqüències NLS, el domini bàsic bZIP i el domini B30.2. S'han realitzat diversos estudis que localitzen la P/M al citoplasma. Per exemple, experiments de transfecció a cèl·lules cos-7 d'una proteïna de fusió entre la P/M i la proteïna verda EGFP (de l'anglès, Enhanced-Green Fluorescent Protein), localitzen la proteïna al citoplasma, al voltant del nucli. En aquests experiments, es va simular una situació d'activació cel·lular amb PMA i pervanadat, però cap dels dos estímuls no va provocar la translocació de la P/M-EGFP al nucli (Tidow et al., 2000). Experiments de *two-hybrid* amb el domini ret finger/B30.2 de la P/M com a "molècula ham", han identificat la proteïna P/M-IP1 (de l'anglès, P/M interacting protein1) com una molècula interaccionant amb la P/M. La P/M-IP1 és el producte de l'*splicing* diferencial de GTC-90, una de les proteïnes del complex 13S que està present al citoplasma i en fraccions membranoses del Golgi, la qual cosa suggereix la localització citoplasmàtica de la P/M (Chen et al., 2000). Finalment, s'ha demostrat recentment la colocalització citoplasmàtica de la P/M i la seva interacció — on participa el domini PyD — amb el citoesquelet d'actina i els microtúbuls (Mansfield et al., 2001).

La P/M-d2, a diferència de la P/M, sí es localitza al nucli de la cèl·lula, com demostren experiments de transfecció en cèl·lules COS-7. Alguns autors han hipotetitzat que la forma truncada P/M-d2 podria modular l'acció de la P/M, però no s'ha realitzat encara cap experiment que ho demostrï (Papin et al., 2000).

### **5.3 Funció i fisiopatologia**

La funció de la Pirina/ Marenostrina (P/M) és desconeguda actualment. Malgrat tot, s'ha especulat força sobre les seves possibles funcions a partir d'un seguit d'evidències, basades en les observacions de les anomalies immunològiques dels pacients, en experiments d'expressió del gen, estudis de predicció informàtica del repliegament, experiments de localització de la proteïna i en el model murí. La hipòtesi

que darrerament està guanyant més acceptació postula que la P/M inhibeix l'acció pro-inflamatòria d'un complex multiprotèic anomenat "inflamosoma", comú a la via de senyalització intracel·lular dels Toll-like receptors, i essencial en la resposta immunitària innata.

### 5.3.1 *L'inflamosoma*

L'inflamosoma és el nom amb el qual s'ha batejat molt recentment un complex multiprotèic utilitzat pels Toll-like Receptors (TLR) per activar les caspases pro-inflamatòries i la síntesi de citocines inflammatòries, en resposta a la presència de patrons moleculars associats a patògens (PAMPS, de l'anglès, pathogen associated molecular patterns) com ara l'LPS o el peptidoglicà (Medzhitov, 2001; Janeway et al. 2002). De manera anàloga als TLRs existeixen uns receptors de PAMPs citoplasmàtics, altament conservats filogenèticament, que també activen la maquinària de l'inflamosoma: la família de les proteïnes NALP (Tschopp et al. 2003). A la Taula 7 es recullen els membres descrits fins a l'actualitat de les proteïnes NALP, englobades en la superfamília de proteïnes CATERPILLER descrita recentment, juntament amb tres subfamílies més de proteïnes amb dominis PyD, LRR (Leucine Reach Repeats) i NACHT entre altres, que s'especula que poden tenir funcions relacionades (Harton et al., 2002).

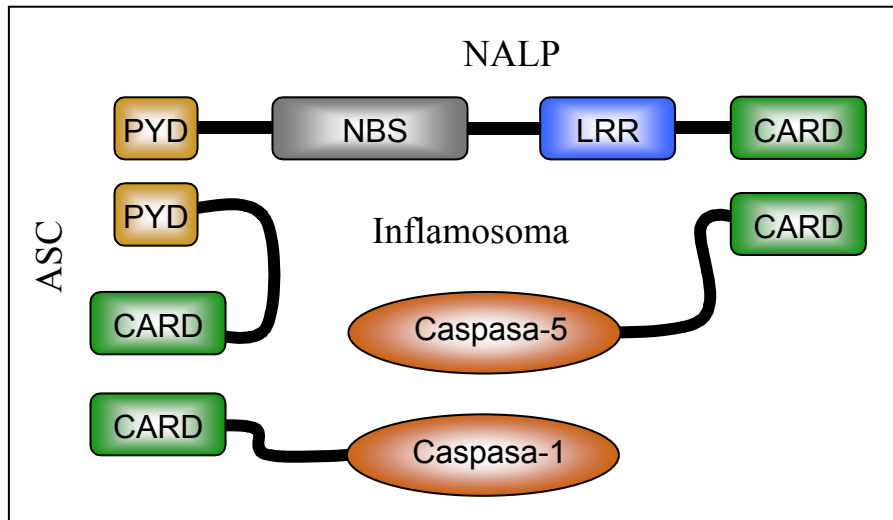
L'estructura bàsica de l'inflamosoma que interacciona amb els receptors intracel·lulars de tipus NALPs té uns 700kDa i sembla estar constituïda per NALP1, la molècula iniciadora de la formació del complex, per ASC, la molècula adaptadora, i per les caspases 1 i 5, responsables del processament i secreció de la citocina inflammatòria IL1 $\beta$ . Malgrat l'estiquiomèria del complex inflamosoma no es coneix amb exactitud, se sap que les interaccions entre els seus components es basen en interaccions homotípiques entre dominis de la SFDD, en concret PyDs i CARDs (veure secció domini pyrina): NALP1 interacciona mitjançant la unió PyD:PyD amb ASC, i per la interacció CARD:CARD amb la caspasa-5. ASC a més d'interaccionar amb NALP1, ho fa també amb la caspasa-1, pel domini CARD, la qual cosa provoca el reclutament de les caspases 1 i 5. La proximitat d'aquests dos enzims és la que dóna lloc a l'activació de la caspasa 1, la qual processa la pro-IL1 $\beta$  inactiva a la forma IL1 $\beta$  bioactiva (Fig. 7) (Tschopp et al. 2003).

Taula 7. La família CATERPILLER (Tschopp et al. 2003).

	Sinònims	Locus	Funció, Interacció o Expressió	Refs
<b>Subfamília NALP</b>				
<i>NALP1</i>	DEFCAP, NAC, CARD7	17p13.1	Cor, timus, melsa, ronyó, fetge, pulmó, PBLs	Hiaing, 2001 Chu, Z, 2001
<i>NALP2</i>	<i>PYPAF2</i> , NBS1, PAN1	19q13.42	PyD uneix ASC. Sobreexpressada activa la caspasa 1	Agostini, 2003
<i>NALP3</i>	<i>PYPAF1</i> , <i>CIAS1</i> , Criopirina	1q44	Alta expressió en PBLs	
<i>NALP4</i>	<i>PYPAF4</i> , PAN2	19q13.41	Inhibeix l'activació de NFkB induïda per TNF i IL1 $\beta$ . En melsa màx expressió	Fiorentino, 2002
<i>NALP5</i>	<i>PYPAF8</i> , Mater	19q13.42	Restricció a oòcits	Tong, 2002
<i>NALP6</i>	<i>PYPAF5</i> , PAN3	11p15.5	Preferentment granulòcits i Ts. Activa NFkB i caspasa 1 (via ASC)	Grenier, 2002
<i>NALP7</i>	<i>PYPAF3</i>	19q13.42		
<i>NALP8</i>	PAN4	19q13.42		
<i>NALP9</i>		19q13.42		
<i>NALP10</i>	PAN5	11p15.4	Ausència de LRRs	
<i>NALP11</i>	<i>PYPAF6</i>	19q13.42		
<i>NALP12</i>	<i>PYPAF7</i> , Monarch-1	19q13.42	Macròfags i eosinòfils. Uneix ASC i activa caspasa 1	Manji, 2002
<i>NALP13</i>		19q13.42		
<i>NALP14</i>		11p15.4		
CARDINAL	TUCAN, CARD8, NDDP1	19q13.33	Ronyó, pulmó, ovari, placenta, testicle, gangli i melsa	Razmara, 2002 Bouchier-H, 2001
<b>Subfamília NOD</b>				
NOD1	CARD4	7p14.3	Cor, múscul llis, melsa, ovari	
NOD2		16q12.1	PBLs (monòcits)	
<b>Subfamília IPAF</b>				
IPAF	NOD3	2p22.3	Còlon, melsa, ronyó, fetge, pulmó, placenta, moll d'os. Uneix ASC i activa caspasa 1	
NAIP	CLAN, CARD12	5q13.2	Cervell, pulmó, mesla, intestí i fetge	Yaraghi, 1998
<b>Subfamília CIITA</b>				
CIITA		16p13	limfòcits, monòcits, CDs	Reith, 2001
<b>Altres membres</b>				
No CARD No PyD		16p13, Xq22		
<b>Membres no-Caterpillers</b>				
Pyrin	Marenostrin	16p13.3	Granulòcits (neutròfils). Induïble per TNF, IFN $\gamma$ , LPS	Centola, 2000
ASC	PYCARD, CARD5, TMS1	16p11.2	Còlon, timus, melsa, intestí, PBLs i leucòcits	Masumoto, 1999
ASCI	ASC2, POP1	16p11.2		

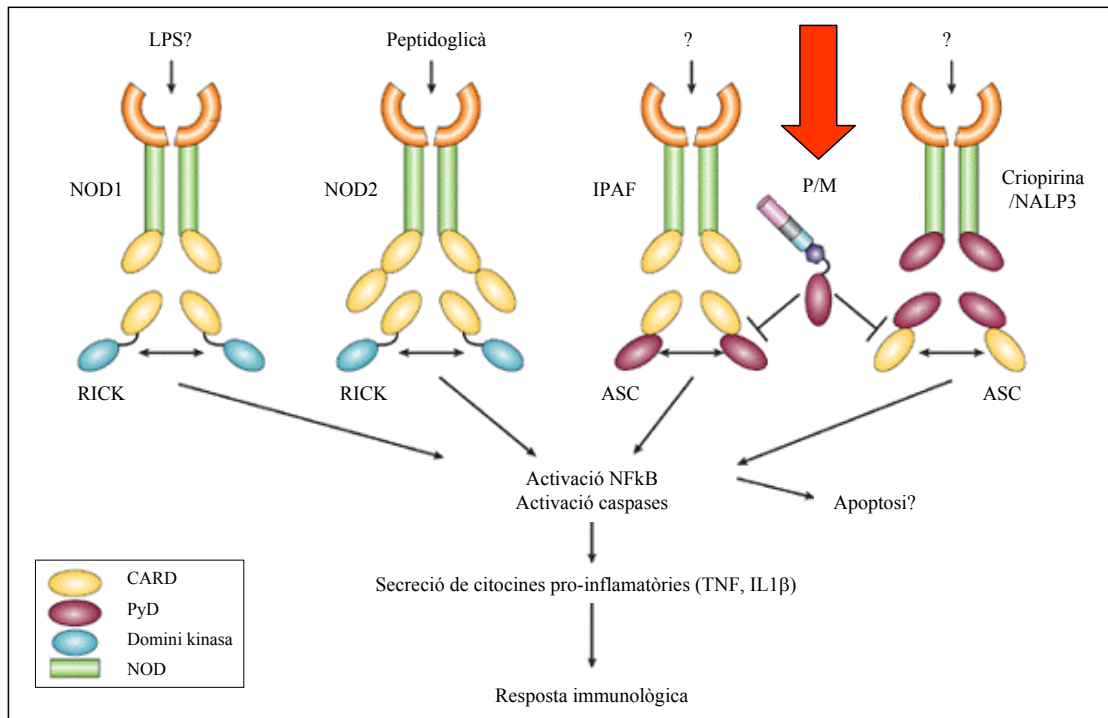
Abreviatures: ASC, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD; CARD, caspase-recruitment domain; *CIAS1*, Cold-Induced Autoinflammatory Syndrome; CIITA, major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator; IPAF, IL-1 $\alpha$ -converting enzyme protease activating factor; LRR, Leucine-rich-repeat; NAIP, neuronal apoptosis inhibitor protein; NBS1, nucleotide-binding site protein 1; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain; NFkB, nuclear factor kB; PAN, Paad and Nacht containing protein; PyD, pyrin domain.

Figura 7. L'inflamosoma. Quan *NALP1* és activat probablement per PAMPs citoplasmàtics, el complex format per *NALP1/ASC/Caspasa-1/Caspasa-5* activa les caspases proinflamàtories (Tschopp et al. 2003). PyD, Pyrin Domain; CARD, caspase-recruitment domain; NACHT, domain present in Neuronal Apoptosis inhibitor protein (NAIP), the major histocompatibility complex (MHC) Class II transactivator(CIITA), HET-E and TP1); LRR, Leucine-rich repeats.



Recentment, s'ha descrit la co-localització de la P/M amb ASC i que la interacció està mediada pel domini PyD d'ambdues molècules (Dowds et al., 2003). A més, s'ha observat que la P/M competeix amb NALP1 per a la interacció amb ASC. S'ha postulat que la funció de la P/M seria la de frenar la maquinària de síntesi de la IL1 $\beta$ , en condicions no inflamàtories, mitjançant el segrest de ASC que al no estar accessible per a NALP1, seria incapaç d'activar les caspases pro-inflamatòries i no s'alliberaria IL1 $\beta$  al medi extracel·lular. En una situació inflamatòria en canvi, i per un mecanisme encara desconegut, es revertiria la interacció P/M-ASC. L'alliberament de ASC permetria la interacció amb NALP1 i la subseqüent producció de IL1 $\beta$ , la inducció de febre i la propagació de la resposta inflamatòria (Inohara et al., 2003). En base a aquest model, s'ha especulat que les mutacions a la P/M inactivarien la supressió de l'inflamosoma que sembla venir exercit per la P/M, la qual cosa es reflexaria en un increment de la producció de IL1 $\beta$  (Fig 8).

Figura 8. Model de competició de P/M amb *NALPs* per la interacció amb ASC (Inohara et al., 2003).

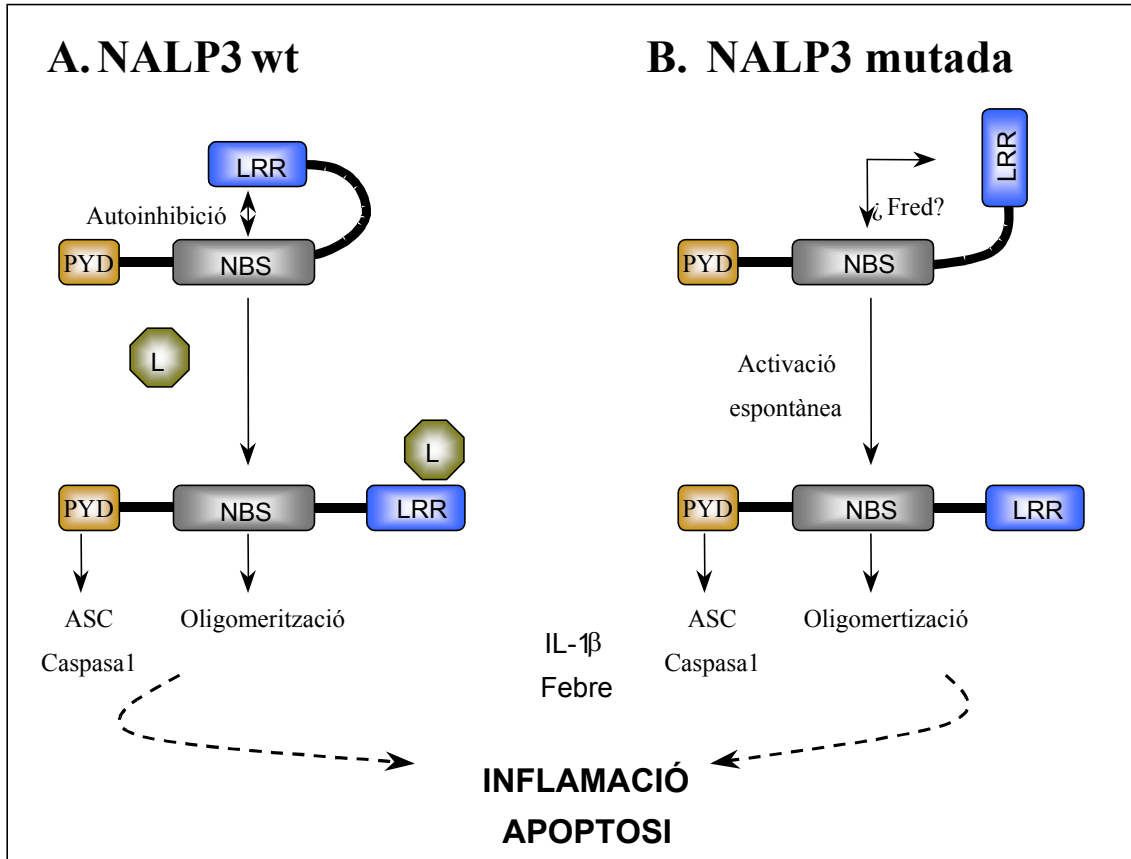


El paper autoinflamatori de la P/M també s'ha posat de manifest amb la recent identificació de la interacció amb CD2BP1 en assaigs de doble-híbrid (en anglès, two-hybrid), una proteïna que causa la síndrome autoinflamatòria autosòmica dominant PAPA quan està mutada. S'ha postulat la possibilitat que les mutacions en CD2BP1 segrestin la P/M, resultant en la des-regulació negativa de la P/M sobre l'inflamosoma, i la superproducció de IL1 $\beta$  (Shoham et al. 2003).

La constitució i la regulació de l'inflamosoma pot ser molt complexa. A més, es creu que poden existir una diversitat d'inflamosomes amb una estructura bàsica en comú però amb molècules iniciadores, i reguladores d'aquestes, diferents. Així, s'especula que a més de NALP1, altres proteïnes de la família de les NALP també podrien induir la formació de l'inflamosoma. Per exemple, l'inflamosoma iniciat per NALP3. S'ha proposat un mecanisme hipotètic pel qual NALP3 (també PYPAF1 o criopyrina), la proteïna mutada en MWS, FCU i CINCA/NOMID, s'autoinhibiria en condicions normals i no interaccionaria amb els components de l'inflamosoma fins que l'estímul (desconegut) no activés la molècula (Fig. 9a) (Tschopp et al. 2003). La hipòtesi planteja que mutacions a NALP3 impedirien l'autoinhibició de la molècula i

activaria l'inflamosoma amb la conseqüent producció de IL1 $\beta$  i febre característica d'aquestes SHFP (Fig. 9b).

Figura 9. Mecanisme hipotètic de l'activació de *NALP3* (Tschopp et al. 2003).



El fet que diverses SHFP tinguin la seva base etiològica en diferents gens relacionats funcionalment en aquest cas amb la constitució i regulació de l'inflamosoma, fa que l'estudi dels gens responsables d'aquestes síndromes així com l'estudi de l'efecte de les diverses mutacions afectant aquests gens, sigui doblement atractiu: d'una banda pot ajudar a entendre el mecanisme etiològic d'aquestes malalties i de l'altra, constitueix potencialment una eina per conèixer millor les vies de senyalització i de regulació dels processos inflamatoris en general.

Resum del gen *MEFV* i de la P/M.

Gen, locus, extensió, exons	<i>MEFV</i> / 16p13.3 / 15kb / 10 exons
cDNA	<i>MEFV</i> -fl <i>MEFV</i> d2 (delecció de l'exó 2)
Especificitat Tissular	Expressat en neutròfils i en menor grau en eosinòfics i monòcits. Detecció per RT-PCR en fibroblastes sinovials No expressat en limfòcits ni cap teixit
Inducció del <i>MEFV</i>	En monòcits l'IFN $\alpha$ , i les citocines proinflamatòries IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ i LPS, indueixen l'expressió de <i>MEFV</i> . Les citocines anti-inflamatòries IL10, TGF $\beta$ i IL4 reprimeixen l'expressió. En neutròfils, només té efecte l'IFN $\gamma$ , que indueix l'expressió.
Producte gènic	Pirina/ Marenostrina, 781 aa's bàsica
Dominis en la P/M similars a famílies protèiques o gèniques	PyD (Super Família Death Domain) Ret finger/B30.2 (Família multigènica RoRet)
Localització subcel·lular	P/M: Citoplasmàtica, associada als microtúbuls i als microfilaments d'actina dels filaments perinuclears i de l'aparell de Golgi P/Md2: Nuclear
Funció	Possiblement regulació inhibidora de l'inflamosoma
Malaltia	Mutacions al <i>MEFV</i> causen la FMF.



### 5.6. Model animal per l'estudi de la P/M

Recentment, en Chae i col.laboradors han generat un model murí amb l'objectiu d'estudiar la implicació d'aquest domini en la funció de la mP/M (P/M murina) i amb la finalitat de suggerir una funció similar per la P/M humana (Chae et al., 2003). Els ratolins d'aquest estudi, modificats genèticament, expressen una mP/M truncada entre l'exó 3 i l'intró 4 i mimetitzen, segons els autors, la situació dels pacients de FMF, en el sentit que ambdós casos mantenen el domini PyD a l'extrem amino-terminal mentre que alhora, presenten un defecte a l'extrem carboxiterminal de la molècula.

En els ratolins homocigots per la mP/M, l'LPS indueix un increment de la temperatura i de la letalitat. Els macròfags d'aquests ratolins tenen una major sensibilitat a l'endotoxina LPS. Alhora, s'observa una major conversió de la procaspasa-1 a caspasa-1 activa, així com el processament de pro-IL1 $\beta$  a IL1 $\beta$  en aquestes cèl.lules i una major resistència dels macròfags a l'apoptosi.

La sensibilitat a LPS observada en el model murí, en el cas de replicar-se en els pacients de FMF, suggeriria un paper crític de la P/M en la immunitat innata, possiblement mitjançant la interacció amb ASC, i una possible explicació per la selecció de les variants mutades de la P/M en humans: l'augment de la resposta innata en presència d'infeccions bacterianes transitòries provocarien una producció de IL1 exagerada i en conseqüència una reacció inflamatòria sistèmica, que en condicions normals tindria un efecte totalment innocu. Finalment, aquestes dades suggereixen noves línies terapèutiques amb agents com els antagonistes del receptor de la IL1 per pacients que no responen a la colquicina.

## 6. MUTACIONS EN EL GEN *MEFV* I HAPLOTIPS ASSOCIATS

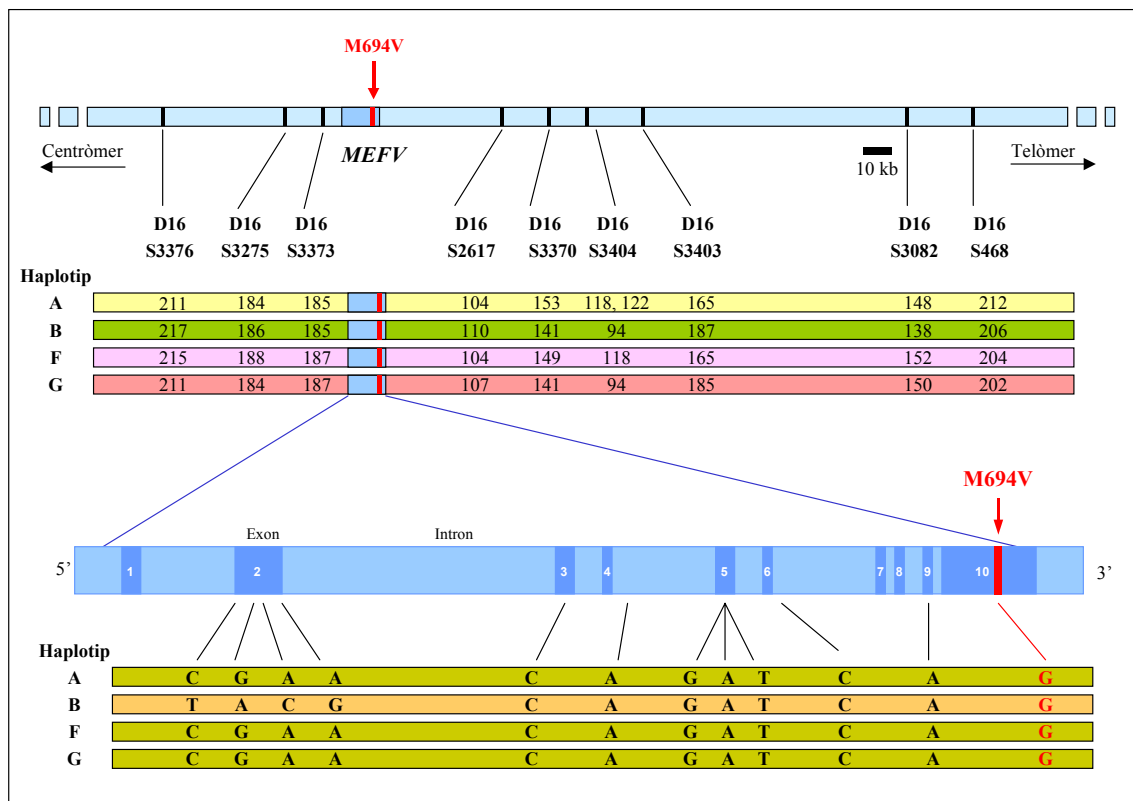
En el procés de clonació del gen *MEFV* es va detectar l'existència de quatre variacions en la seqüència del gen associades a la FMF en pacients de diversos orígens, jueus no-ashkenazites, jueus ashkenazites, armenis, àrabs i turcs (The French FMF Consortium, 1997; The International FMF Consortium, 1997). El 85% dels cromosomes eren portadors d'alguna de les quatre mutacions: M680I, M694V, M694I i V726A.

Les mutacions semblaven força innòcues, en principi, a jutjar pel fet que cap d'elles no truncava la proteïna ni impedia la seva síntesi i que les substitucions eren de tipus conservatiu. Malgrat això, la seva localització, totes elles a l'exó 10, el qual

codifica el domini B30.2, indicava que aquest domini podria tenir un paper important en la funció de la molècula.

Es va observar que cada una de les mutacions es troba en desequilibri de lligament (LD, de l'anglès, linkage disequilibrium) amb almenys un haplotip de microsatèl·lits. És a dir, una mutació donada s'heretava al llarg de les generacions associada a una combinació determinada de marcadors microsatèl·lits localitzats a megabases de distància del gen. Algunes mutacions es varen observar associades a més d'un haplotip. Per exemple, la M694V, la mutació majoritària en els jueus d'origen nord-africà, es va trobar associada a quatre haplotips anomenats Med(A), B, F i G, diferents entre ells en els marcadors de microsatèl·lits externs i flanquejants al *MEFV*. Aquests haplotips de microsatèl·lits eren però, idèntics pel que fa als polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNP, de l'anglès, single nucleotide polymorphism) intragènics: els haplotips Med(A), F i G eren idèntics en tots els SNPs intragènics, mentre que l'haplotip B només compartia amb els altres haplotips els SNPs de l'exó 3 fins al 10 (Figura 10).

Figura 10. Haplotips associats a la variant M694V del gen *MEFV*.



Aquesta convergència d'haplotips suggeria que els haplotips associats a la mutació M694V podrien haver derivat d'un haplotip ancestral (també anomenat fundador), que amb el temps hauria recombinat amb altres haplotips no mutats, generant-se així la diversitat d'haplotips mutats com els que actualment observem (The French FMF Consortium, 1997; The International FMF Consortium, 1997). Donat que l'haplotip B s'observa en els jueus iraquians, una població que s'ha mantingut relativament aïllada de la resta de comunitats jueves des de temps Babilònics (uns 2.500 anys), es creu que l'haplotip fundador de la mutació M694V podria haver existit ja en aquells temps.

Però la hipòtesi va anar més enllà: es va postular que la mutació M694V va migrar des de l'Orient Mitjà a la resta de la conca mediterrània en dues direccions (Fig. 11): per l'est de la Mediterrània fins a la Península Ibèrica — d'on més tard els jueus sefardites haurien estat expulsats al 1492 pel decret d'expulsió proclamat pels Reis Catòlics, cap al nord d'Àfrica — i l'altra, per l'actual Iraq, per on s'hauria dispersat fins a Turquia i Armènia. Similarment, es va trobar la mutació V726A, altament freqüent en pacients armenis i àrabs, associada a l'haplotip anomenat C (també Arm3). Es va suggerir que l'haplotip fundador de la V726A podria tenir uns 2000 anys.



Figura 11. Hipòtesi sobre la migració de les mutacions M694V i V726A.

## **7. HETEROGENEÏTAT DE LOCUS**

Les mutacions al gen *MEFV* són les responsables de la FMF en el 85% dels cromosomes en les poblacions ancestrals, com els dos consorcis per la FMF van descriure. Ara bé, Akarsu et al. va estudiar vuit famílies Turques consanguínies amb almenys 2 afectats de FMF en cada una d'elles i el resultat va ser que en dues de les famílies no es va confirmar el lligament amb el locus *MEFV* (Akarsu et al., 1997). Aquestes dades suggerien de l'existència d'heterocigositat de locus, és a dir, de l'existència d'almenys un altre locus implicat causativament en la fisiopatogènia de la FMF.

## **8. ESTAT DE LA QÜESTIÓ A L'INICI DE LA PRESENT TESI DOCTORAL**

La present tesis doctoral es va plantejar d'acord amb els antecedents que s'han anat desenvolupant al llarg d'aquesta introducció.

La recent clonació del gen *MEFV* constituïa un punt d'inflexió en l'estudi de la FMF en els més diversos aspectes de la malaltia i creava grans expectatives en els camps del diagnòstic, terapèutic i preventiu de la malaltia. En el diagnòstic, l'anàlisi molecular del *MEFV* podia complementar els criteris exclusivament clínics que actualment s'utilitzen per diagnosticar la FMF més acuradament i en poblacions no estrictament ancestrals. En el terapèutic, el coneixement de la funció de la P/M seria especialment interessant pels pacients no responedors a la colquicina, doncs s'obririen línies terapèutiques alternatives. En la prevenció, la identificació de l'efecte fenotípic de les diferents variants al·lèliques permetria la identificació de pacients amb el risc de patir amiloïdosi, la complicació més greu de la malaltia, i per tant el seu tractament precoç.

L'estudi de les bases genètiques de la FMF representava un repte donada l'escassa, si no nul·la, informació genètica de què es disposava en aquell moment i els resultats que s'obtinguessin, sense dubte contribuirien al millor coneixement de la malaltia des del punt de vista genètic.

Tanmateix, l'estudi en poblacions no ancestrals era un camp totalment inexplorat, començant pel fet que es considerava que la FMF no les afectava.

Malgrat la causalitat demostrada de les mutacions al *MEFV* sobre la FMF en poblacions ancestrals, quedava el dubte si les variants detectades podrien ser canvis innocus que, en aquestes poblacions es trobessin en desequilibri de lligament amb les mutacions realment causants de la malaltia. Es desconeixia si podria existir un altre gen causant de la malaltia.

També s'obria un àrea d'estudi sobre l'efecte de les alteracions en el gen *MEFV* amb les manifestacions clíniques.

Tanmateix, la hipòtesi sobre la història natural de les mutacions a l'Orient Mitjà, basada en la identificació de mutacions associades a un mateix rerafons, o *background*, genètic en grups poblacionals diferents, òbviament no contemplava els mecanismes de dinàmica genòmica del locus *MEFV* ni la història de les mutacions a la vessant occidental de la Mediterrània.

Amb aquest estat de la qüestió, es varen plantejar les hipòtesis de treball que s'exposen a continuació.



***HIPÒTESI DE TREBALL***





## **II- HIPÒTESI DE TREBALL**

1. L'estudi de les mutacions del *MEFV* en els pacients de FMF espanyols, així com la detecció de la possible intervenció de factors modificadors de la malaltia, permetrà establir la relació causal de les mutacions al gen *MEFV* i la FMF i establir-ne les bases genètiques.
2. En el cas de demostrar-se la causalitat, es podrien establir correlacions entre les diferents variants al·lèliques i el seu efecte fenotípic.
3. En el cas contrari, seria possible detectar l'existència d'altre o altres gen/s implicat/s en la etiopatogènia de la FMF, o fins i tot, detectar si sota el diagnòstic de FMF, es podrien incloure pacients amb malalties similars a la FMF però amb bases etiològiques diferents.
4. L'estudi de la dinàmica genòmica del locus *MEFV* permetrà estudiar la història natural de les mutacions més freqüents a la vessant occidental de la Mediterrània.



***OBJECTIUS***



### III- OBJECTIUS

Per tal de desenvolupar les hipòtesis de treball plantejades a l'inici de la present tesi doctoral, es van definir els següents objectius generals i específics:

1. Estudiar les bases genètiques de la FMF a la població espanyola
  - 1.1 Detectar la presència de mutacions al *MEFV* en els pacients de FMF espanyols.
  - 1.2 Analitzar la possible heterogeneïtat al·lèlica.
  - 1.3 Establir possibles associacions fenotip-genotip.
  - 1.4 Estudiar la possible interacció de factors modificadors de l'expressivitat de la malaltia.
  - 1.5 Detectar la possible implicació d'altres loci implicats en la malaltia.
  - 1.6 Investigar la possible inclusió de pacients amb malalties similars a la FMF sota el diagnòstic de FMF.
  
2. Estudiar la dinàmica genòmica del locus *MEFV*.
  - 2.1. Estudiar els haplotips intragènics de la població control espanyola.
  - 2.2. Estudiar els mecanismes de generació de la possible diversitat haplotípica.
  
3. Estudiar la història natural de les mutacions més freqüents a la vessant occidental de la Mediterrània.
  - 3.1. Reconstruir i analitzar els haplotips amb mutacions dels pacients espanyols.
  - 3.2. Reconstruir i analitzar els haplotips amb mutacions dels pacients xuetes.
  - 3.3. Comparar els haplotips amb mutacions dels pacients espanyols i xuetes, amb els descrits en poblacions ancestrals i formular hipòtesis integradores sobre la història natural de les mutacions en el vessant occidental de la Mediterrània.



***RESULTATS***





## IV- RESULTATS

El desenvolupament dels objectius plantejats a la present tesi doctoral ha generat els resultats que es mostren a continuació en forma de capítols. En cada un d'ells, a excepció del capítol 5, s'hi adjunta la publicació generada pels resultats obtinguts.

A la primera part dels resultats s'ha abordat l'estudi de les bases genètiques de la FMF a la població espanyola afectada. Al capítol 1, s'ha estudiat en primer lloc, la relació causal de les mutacions al gen *MEFV* sobre la FMF mitjançant la genotipificació d'un grup de pacients espanyols diagnosticats de FMF amb els criteris clínics de Tel Hashomer. Al mateix capítol, s'han descrit els diferents fenotips associats als diversos genotips i s'ha estudiat la possible associació genotip-fenotip en els pacients de FMF.

Als capítols 2 i 3 s'ha aprofundit en l'estudi genètic de casos particulars sorgits de l'estudi al capítol anterior, la qual cosa ha implicat estendre l'estudi als diversos membres de la família. Al capítol 2, s'analitza una família afectada d'una síndrome inflamatòria molt severa i amb un patró d'herència dominant — totalment inusual en aquesta malaltia autosòmica recessiva — que és diagnosticada clínicament de FMF. Al capítol 3, s'estudia la possible existència de factors modificadors que podrien estar modulant l'expressivitat de la FMF en el sinus d'una família.

La identificació, al capítol 1, d'un grup de pacients diagnosticats clínicament de FMF i sense mutacions al *MEFV* va plantejar en primer lloc, la possibilitat que els pacients diagnosticats de FMF tinguin mutacions en els gens responsables d'altres SHFP. Al capítol 4 es presenta el resultat de la genotipificació dels gens *MVK*, *TNFRSF1A* i *CIAS1/NALP3/PYPAF1*, així com la prova funcional del test d'alliberament del receptor, també anomenat *shedding assay*, realitzats en alguns d'aquests pacients.

L'existència de pacients de FMF no portadors de mutacions al *MEFV* va plantejar en segon lloc, la possibilitat que existeixin altres locus/loci implicats en la etiologia de la malaltia. Al capítol 5, s'aborda aquesta qüestió amb l'anàlisi de la regió promotora del *MEFV* en aquest mateix grup de pacients, amb l'objectiu d'excloure la presència de mutacions en certs motius funcionals que podrien tenir un efecte negatiu sobre l'expressió del gen, i amb l'anàlisi dels haplotips del *MEFV*. Es comparen les freqüències haplotípiques del grup de pacients sense mutacions amb les freqüències observades del grup d'individus de la població general, utilitzats com a controls. Es pretén detectar la possible existència d'un o uns haplotips més freqüents en el grup de

pacients al qual podria estar-hi associades mutacions intròniques o situades en regions reguladores del *MEFV*.

A la segona part de la present tesis doctoral s'ha estudiat la dinàmica genòmica del locus *MEFV*, mitjançant la descripció dels haplotips de SNPs intragènics a la població control espanyola. Al capítol 6 es mostra l'anàlisi dels haplotips detectats al locus *MEFV* i s'aborden els possibles mecanismes de generació de la diversitat observada. L'estudi dels haplotips del *MEFV* en població control, pel fet de ser la primera vegada que es realitza, proporciona a la comunitat científica de la FMF una nomenclatura sistematitzada de referència per als haplotips mutats, que pretén ser de referència en posteriors estudis, i es proporciona la descripció de Tag-SNPs, per tal d'optimitzar la recerca de futurs estudis. També al capítol 6, es mostra com l'estudi dels haplotips controls ha estat essencial en la reconstrucció dels haplotips mutats i s'especula sobre l'origen dels haplotips mutats recombinants. L'anàlisi dels haplotips mutats dels cromosomes de pacients xuetes es relacionen amb els observats a la població espanyola i a les poblacions ancestrals, i s'especula sobre l'origen jueu d'aquesta comunitat. Finalment, es contrasten les conclusions extretes a partir dels haplotips associats a mutacions, amb el càlcul de la distància genètica de Reynolds, que té en compte les dades de freqüències al·lèliques rescatades de la bibliografia científica, entre els grups de pacients espanyols, xuetes, i altres poblacions afectades de FMF ancestrals i no ancestrals.

**PART I**







## CAPÍTOL 1:

### **Bases genètiques de la FMF a la població espanyola: caracterització de les mutacions al gen *MEFV* i associacions genotip-fenotip**

L'objectiu principal d'aquest treball va ser l'estudi de les bases genètiques de la FMF als pacients espanyols afectats per la malaltia. Per assolir tal objectiu, s'analitzà la presència de mutacions al gen *MEFV* en aquests pacients i la freqüència al·lèlica de cada una d'elles, per tal d'establir un possible patró de mutacions del gen *MEFV* "característic" dels pacients espanyols de FMF. S'estudià la causalitat de les mutacions detectades al *MEFV* amb la malaltia, intentant establir associacions entre els diversos genotips detectats i les manifestacions clíniques presentades pels pacients.

Es varen estudiar 55 pacients de FMF, pertanyents a 51 famílies no relacionades, referits a la Unitat de Síndromes Hereditàries de Febre Periòdica des del 1998. Els pacients seleccionats, eren d'origen espanyol, vivien a la Península Ibèrica i van ser diagnosticats clínicament amb els criteris clínics de Tel-Hashomer (TH). Es varen excloure pacients amb altres síndromes autoinflamatoris, així com pacients de FMF pertanyents a alguna de les poblacions més afectades per la malaltia (àrabs, armenis, turcs o jueus). En aquest estudi es varen excloure pacients pertanyents a la comunitat xueta (amb un possible origen jueu) també presents al nostre entorn geogràfic, que van ser estudiats en el capítol 6.

Les manifestacions clíniques dels pacients de l'estudi es van recollir en un qüestionari detallat i específic de SHFP, i es va procedir a la detecció de les mutacions M680I, M694V, M694I i V726A a tots els pacients de l'estudi mitjançant l'amplificació de l'exó 10 (on recauen les mutacions descrites) i les zones intròniques flanquejants a l'exó, i la seqüenciació automàtica.

Es va detectar que el 7% dels pacients (4/55) eren portadors de dues mutacions, el 36% eren heterocigots (20/55) i el 57% de pacients no tenien mutacions en aquest exó (31/55).

Les mutacions més freqüents eren: M694V, M694I i la variant K695R, no descrita al moment de la clonació, que era tan freqüent com la M694I. La mutació V726A es va detectar en un sol pacient mentre que la M680I no es va trobar en cap dels pacients.

Es va ampliar l'anàlisi del gen *MEFV* i es va procedir a la seqüenciació de la resta d'exons. Es va detectar que alguns dels pacients heterocigots eren portadors d'una altra mutació, i que alguns dels pacients als quals inicialment no se'ls va detectar cap mutació, eren heterocigots.

Totes les variants detectades en l'anàlisi del *MEFV* eren de tipus *missense*, de canvi d'aminoàcid, i es localitzaven als exons 2, (E148Q, E163A), 3 (E319K), 9 (I591T) i 10 (M694V, M694I, K695R i V726A). D'aquestes, E148Q, I591T i K695R van ser descrites amb posterioritat a la clonació del *MEFV* i en paral·lel a la realització del present treball (Bernot et al., 1998; Aksentijevich et al., 1999). Les variants al·lèliques noves detectades al present treball (E163A i E319K) es varen registrar a la base de dades de mutacions al *MEFV* INFEVERS, després de descartar la seva absència en un pannel de 200 cromosomes de població control. No es va detectar cap inserció ni delecció.

Es va estudiar la possible existència d'al·lèls complexos en els pacients portadors de dues mutacions mitjançant estudis de segregació familiar o, quan no va ser possible, per clonació del cDNA del *MEFV* del pacient. No es va detectar cap al·lel complex, és a dir, que tots els pacients portadors de dues mutacions eren heterocigots compostos.

En resum, el 53% dels pacients espanyols de FMF eren portadors d'una o de dues mutacions al *MEFV* i el 47% dels pacients no presentaven mutacions codificants en el gen. El 16,4% dels pacients eren doble mutats mentre que el 36,4% eren heterocigots. L'espectre de mutacions en el *MEFV* observat era ampli, amb 8 variants diferents, i algunes es descrivien per primera vegada. D'aquests resultats, sorprenia i) el baix nombre de pacients portadors de dues mutacions en una malaltia autosòmica recessiva com la FMF, ii) que els heterocigots manifestaven la malaltia i, a més, eren molt més nombrosos que els doble mutats (relació 2,2:1 respectivament), iii) l'elevat nombre de pacients clínicament diagnosticats de FMF i sense mutacions al *MEFV*.

Es van analitzar per primera vegada, les possibles associacions genotip-fenotip en el grup de pacients espanyols de FMF. El baix nombre de pacients amb mutacions, i la baixa incidència d'amiloïdosi no van permetre establir associacions estadísticament significatives amb cap genotip concret. Malgrat tot, es va observar que i) els pacients sense mutacions referien episodis més llargs dels descrits clàssicament en la FMF (<3 dies,  $p=0.004$ ), i que amb major freqüència presentaven limfadenopaties i mialgia, ii) que el diagnòstic de la majoria de pacients sense mutacions era de FMF probable en contra del diagnòstic de FMF definitiu dels pacients amb mutacions ( $p=0.003$ ), iii) que



els pacients diagnosticats amb una FMF probable també patien episodis més llargs dels tres dies ( $p=0.047$ ), limfadenopaties ( $p=0.036$ ) i mialgia. Aquest fet suggereix que els pacients sense mutacions codificants en el gen *MEFV* podrien patir una *FMF-like*, la qual es caracteritzaria per episodis inflamatoris de duració superiors als 3 dies, i per una alta incidència de limfadenopaties i mialgia.

Finalment, el nombre de pacients amb amiloïdosi era molt petit com per poder establir associacions, malgrat tots ells eren portadors del genotip de risc  $\alpha/\alpha$  del locus *SAA1* ( $p=0.031$ ).



## **Familial Mediterranean Fever in the Spanish population: clinical heterogeneity and diverse spectrum of *MEFV* gene mutations.**

Anna Aldea<sup>1</sup>, Juan I. Aróstegui<sup>1</sup>, Joan Buades<sup>2</sup>, Virginia Mas<sup>1</sup>, Josep M. Campistol<sup>3</sup>, Cristina Arnal<sup>4</sup>, Rafael Toribio<sup>5</sup>, Miguel Angel de Frutos<sup>6</sup>, Luis Felipe Díez<sup>7</sup>, Jordi Casademont<sup>8</sup>, Tilman Mijares<sup>9</sup>, Luis Moral<sup>10</sup>, Albert Selva<sup>11</sup>, Josep Ordi<sup>11</sup>, Carles Clemente<sup>12</sup>, Joan Moré<sup>13</sup>, Javier Muñoz-Vico<sup>14</sup>, Begoña Sacristán<sup>15</sup>, Fina Rius<sup>1</sup>, Susana Plaza<sup>1</sup>, Montse Masó<sup>1</sup>, Jordi Vives<sup>1</sup>, Jordi Yagüe<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Servei d'Immunologia, Institut Clínic d'Infeccions i Immunologia (ICII).<sup>3</sup>Unitat de Transplantament Renal (UTR).<sup>8</sup>Servei de Medicina Interna. Hospital Clínic. Barcelona.

<sup>2</sup>Servei de Medicina Interna. Fundación Hospital Son Llatzer. Palma de Mallorca.

<sup>4</sup>Unitat de Reumatologia Pediàtrica.<sup>11</sup>Servei de Medicina Interna. Hospital de la Vall d'Hebron. Barcelona.

<sup>5</sup>Servei de Medicina Interna. Hospital General de Vic. Barcelona.

<sup>6</sup>Servicio de Nefrología. Hospital Regional "Carlos Haya". Málaga.

<sup>7</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital El Poniente. El Ejido. Almería.

<sup>9</sup>Servei de Medicina Interna. Hospital Nostra Senyora de Meritxell. Principat d'Andorra.

<sup>10</sup>Servicio de Pediatría. Hospital "Vega Baja". Orihuela. Alicante.

<sup>12</sup>Servei de Medicina Interna. Hospital Universitari Dr. Josep Trueta. Girona.

<sup>13</sup>Servei de Medicina Interna. Hospital Mutua de Terrassa. Barcelona.

<sup>14</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Torrecárdenas. Almería.

<sup>15</sup>Servicio de Digestivo. Hospital San Millán-San Pedro. Logroño. La Rioja.

**Running title:** FMF disease and *MEFV* mutations in Spain

### **Correspondence to:**

Jordi Yagüe

Servei d'Immunologia. Institut Clínic d'Infeccions i Immunologia (ICII).

Hospital Clínic. C/ Villarroel, 170.

08036-Barcelona, Spain.

Telephone:+34-93-454-49-20

Fax:+34-93-451-80-38

e-mail address: [jyague@clinic.ub.es](mailto:jyague@clinic.ub.es)

**ABSTRACT**

Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal recessive disorder with a high prevalence in populations from the Mediterranean basin. Clinically characterized by recurrent episodes of fever and serosal inflammation, FMF responds successfully to colchicine therapy. In 1997 two groups identified the relationship between FMF and mutations on the *MEFV* gene, which encodes the pyrin/marenostrin (P/M) protein.

Here we report a broad, systematic study of the clinical and genetic characteristics of FMF in the Spanish population, dincuted since 1998 in 55 patients from 51 non-related Spanish families referred to our Hereditary Periodic Fever (HPF) Syndromes Unit. Patients belonging to other FMF Mediterranean ancestral populations were excluded. Comprehensive mutational analysis of the FMF-associated gene was performed in all patients. All 10 exons and intronic boundaries of the *MEFV* gene were sequenced. Genotypes of the *SAA-1* gene – a risk factor for amyloidosis in these patients – were determined. The general clinical profile of these patients was heterogeneous, as studies in other populations have reported. Nevertheless, the relatively mild level of disease, the low incidence of amyloidosis and the near total absence of family history were characteristic features of FMF disease in Spanish population. The mutational *MEFV* gene analysis was positive in 52% of cases, with a higher proportion of heterozygous than homozygous patients (ratio 2.2:1). Nine different *MEFV* gene mutations were detected. The 3 founder mutations M694V, M694I and E148Q accounted for 77% of mutated chromosomes. Additionally, other less frequent mutations, including 2 new variants – E163A and E319K – were detected. All patients with secondary AA amyloidosis bore the  $\alpha/\alpha$  *SAA-1* genotype.

**Keywords:** HPF syndromes, FMF disease, *MEFV* gene mutations, clinical heterogeneity, amyloidosis.

## **INTRODUCTION**

Familial Mediterranean Fever (FMF) is a hereditary autoinflammatory recurrent disorder characterized by short inflammatory attacks followed by symptom-free intervals (Rogers et al., 1989; Schwabe et al., 1974; Sohar et al., 1967). FMF mainly affects populations from the Mediterranean basin, with high prevalence in the Arab, Armenian, Jewish and Turkish ancestral populations (Sohar et al., 1967). Cases of FMF cases have also been reported in other Mediterranean areas — Greece (Booth et al., 2000; Konstantopoulos et al., 2003), France (Bernot et al., 1998), Italy (Aksentijevich et al., 1999; Dode et al., 2000; La\_Regina et al., 2003), Cyprus (Deltas et al., 2002) — and elsewhere — Portugal (Touitou, 2001), Britain, Australia, India, China (Booth et al., 1998), Afghanistan (Bernot et al., 1998) and Japan (Shinozaki et al., 2002).

The self-limited inflammatory episodes, which last 24-72h, usually appear before the age of 20 (Ben-Chetrit et al., 1998) and are characterized by fever associated with serosal and/or synovial inflammation (Sohar et al., 1967). The most frequent clinical symptoms are fever (38-40°C), abdominal pain due to sterile peritonitis, and joint involvement, manifested either as arthralgia or as arthritis. Other frequent symptoms in the inflammatory episodes are chest pain and pleurisy, usually unilateral, and erysipelas-like erythema (ELE) on the legs, which many experts consider to be the most characteristic cutaneous lesion in FMF (Azizi and Fisher, 1976). Less frequently, FMF patients refer generalized myalgia, headache, enlargement of lymph nodes and testicular swelling and/or pain. The prognosis of FMF is closely associated with the deposition of the cleavage product of the serum amyloid A (SAA) protein in certain organs or tissues (Gafni et al., 1968). The kidney is the most frequently affected organ and the nephrotic syndrome the most common clinical manifestation, although amyloid deposition on intestine, thyroid, spleen, liver and adrenals has also been reported (Kavukcu et al., 1997; Sohar et al., 1967). Renal amyloidosis develops in some patients, without previous typical FMF episodes; this condition is clinically designated as FMF phenotype II (Gafni et al., 1968; Livneh et al., 1999; Mimouni et al., 2000; Sohar et al., 1967). Colchicine therapy prevents both the inflammatory attacks and the development of secondary AA amyloidosis (Zemer et al., 1986). The diagnosis of FMF disease is based on clinical criteria such as the age of onset, the duration and periodicity of

inflammatory attacks, the most common symptoms and responsiveness to colchicine treatment (Livneh et al., 1997; Pras, 1998).

FMF is a hereditary disease with an autosomal recessive inheritance pattern. However, the high prevalence of carriers and/or consanguinity in some populations may lead to the observation of dominant or pseudodominant patterns (Aksentijevich et al., 1999; Booth et al., 2000; Cazeneuve et al., 1999). In 1997 two independent groups reported the association between the Mediterranean FeVer (*MEFV*) gene and FMF disease (The International FMF Consortium, 1997; The French FMF Consortium, 1997). The *MEFV* gene, located on 16p13.3, is composed of 10 exons and spans 15 kb. Exclusively expressed in cells of myeloid lineage (Centola et al., 2000), the *MEFV* gene encodes the pyrin or marenostin (P/M) protein, whose function remains unknown. Recently, it has been reported that P/M is a member of the death-domain-fold superfamily (Bertin and DiStefano, 2000; Martinon et al., 2001) and that it is involved in the apoptotic pathway through caspase recruitment (Pawlowski et al., 2001; Richards et al., 2001), as well as in the regulation of the inflammatory process through interleukin-1 (IL-1) cytokine and nuclear factor kappaB (NFkB) transcription factor production (Manji et al., 2002; Martinon et al., 2001).

Up to 40 *MEFV* gene mutations are currently registered in the INFEVERS data base (URL address: <http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers>) (Sarrauste-de-Menthier et al., 2003). The original founder mutations – E148Q, M680I, M694V, M694I and V726A – have been found in diverse populations throughout the Mediterranean basin (The International FMF Consortium, 1997; The French FMF Consortium 1997; Bernot et al., 1998; Aksentijevich et al., 1999). All of them are located in exons 2 and 10, suggesting the existence of two functional “hot spots” in these regions of the *MEFV* gene Magal et al (Touitou, 2001). Nevertheless, an increasing number of new, less frequent mutations — including private ones — have been reported, widely distributed all over the gene.

The manifestations of FMF disease differs among populations, suggesting that the genetic background and environmental factors may play a role in the expression of the disease (Yalcinkaya et al., 2000; Cazeneuve et al., 2000; Gershoni-Baruch et al., 2003). Furthermore, genotype-phenotype studies have revealed the association between the M694V homozygous state and a severe phenotype (Brik et al., 1999; Cazeneuve et al., 1999; Livneh et al., 1999; Pras et al., 1998; Shohat et al., 1999). Male sex, M694V homozygosity, the  $\alpha/\alpha$  *SAA-1* genotype and occurrence of arthritic attacks have been

described as risk factors for the development of renal amyloidosis (Cazeneuve et al., 2000; Gershoni-Baruch et al., 2003).

The aim of the present report was to study the most commonly manifested clinical symptoms of FMF disease in the Spanish population, as well as the diverse *MEFV* mutations associated to the disorder, and to establish whether there is a genotype-phenotype relationship in the Spanish FMF patients.

## ***MATERIALS AND METHODS.***

### *Subjects*

During the last five years 200 patients suffering from recurrent fever were referred to our institution from different regions in Spain. The clinical manifestations of each patient were registered on a specific Hereditary Periodic Fever (HPF) syndrome clinical questionnaire. Since the purpose of this report was to study FMF disease in the Spanish population the following inclusion criteria were established: 1) patients meeting the established Tel-Hashomer criteria (Pras, 1998) and 2) patients of Spanish origin living in the Iberian Peninsula. Exclusion criteria were: 1) patients with an HPF syndrome other than FMF (TRAPS, HIDS, FCU/FCAS and NOMID/CINCA syndrome) or with recurrent fever as a symptom associated with other diseases (tuberculosis, juvenile chronic arthritis, Crohn's disease and PFAPA syndrome) and 2) FMF patients belonging to any of the most commonly FMF-affected populations (Arabs, Armenian, Turks, Non-Ashkenazi Jews) living in Spain, or belonging to the Chueta community — with strong evidence of direct Jewish ancestries (Crespi et al., 2002) — also living in this country.

A cohort of 55 Spanish FMF patients from 51 unrelated families was studied. Consanguinity was only registered in one patient. Informed, written consent was obtained from all patients and the study was approved by our center's ethical committee.

The clinical manifestations of all patients were studied in order to draw up a general profile of the most commonly manifested FMF symptoms in our population. Clinical data from the type II FMF was analyzed apart in order not to bias the general clinical data.

### *Severity scores*

The Tel-Hashomer severity scores (Pras, 1998) were not used in this study since they focus specifically on amyloidosis and ELE, which are infrequent in our population. Instead, we calculated the Samuels severity scores for each patient.

### *DNA and RNA extraction.*

Genomic DNA from whole blood samples and total RNA from total leukocytes were isolated using QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Germany) and TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) respectively, following the manufacturer's instructions.

### *MEFV mutational screening*

Initial screening of exons 10, 2 and 5 of the *MEFV* gene was performed in all patients. The remaining coding regions were only analysed when one or no mutations were found: exonic and intronic flanking regions were amplified by PCR using specific intronic primers and amplification conditions previously published (The International FMF Consortium, 1997). The sequencing reactions of PCR amplicons (dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, PE Applied Biosystem, Warrington, Great Britain) were analysed in an ABI 3100 automated sequencer.

For patients bearing two *MEFV* mutations in compound heterozygosity, two strategies were followed to identify whether the two mutations were on the same allele (complex allele) or in separate ones. When family members were available a familial mutational segregation analysis was performed. When not, the cloning of the *MEFV* cDNA was attempted

### *MEFV cDNA synthesis and cloning*

Total RNA obtained from total leukocytes was reverse transcribed into cDNA using oligo(dT)<sub>12-18</sub> primers and SuperScript<sup>™</sup> II First-Strand Synthesis System (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA), following the manufacturer's instructions. Full length *MEFV* was amplified from the single-stranded cDNA using a gene specific primer pair (Papin et al., 2000). The RT-PCR product was cloned into the pCR<sup>®</sup>2.1 vector (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) and transfected into TOP10F' bacteria (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA). Plasmidic DNA was prepared using QIAGEN



Plasmid Mini Kit (QIAGEN, Germany), following the manufacturer's procedures and sequenced using both universal primers (T7 and M13 reverse) and *MEFV* specific primers.

*Mutation screening at other HPF syndrome-related genes*

FMF patients with no *MEFV* mutations were analysed for the presence of mutations in other HPF syndrome-related genes such as the *TNFRSF1A* (exons 2-5), the *CIAS1/NALP3/PYPAF1* (exon 3) and the *MVK* gene (all 10 exons). Amplification and sequencing reactions were performed as previously described (The International FMF Consortium, 1997; McDermott et al., 1999; Moriguchi et al., 1999; Hoffman et al., 2001; Houten et al., 2001).

*SAA-1* genotyping.

Exon 3 of *SAA-1* gene was amplified by PCR and sequenced as previously reported (Moriguchi et al., 1999). The different *SAA-1* genotypes were established after analysis of the two polymorphic codons 52 and 57.

Statistics

Given the sample size in this study the significance of the association of data between groups was tested by Fisher's exact test.

## **RESULTS.**

*Clinical data.*

The aim of the present report was to study the clinical and genetic aspects of FMF disease in the Spanish population. On the basis of the Tel-Hashomer criteria, definitive FMF disease was diagnosed in 59% of patients and probable FMF in 41%.

Table 1 shows the features of the FMF Spanish patients and their clinical manifestations. Forty-six percent were male and 54% female. The age at onset varied widely, ranging from 1 month to 53 years, but the great majority (72%) had suffered their first inflammatory attack before the age of 20, and 40% before the age of 10. The duration of the inflammatory attacks also varied between individuals, even in the same family. Sixty-one percent of patients suffered attacks lasting less than 3 days, and over 40% had longer inflammatory episodes. In 59% of cases the episodes occurred monthly.

The most common symptoms in the Spanish FMF patients were fever, abdominal pain and arthralgia. Fever (38-41°C), of subtle onset and frequently accompanied by chills, was reported in 94% of patients. Abdominal pain of variable intensity was identified in 74%. In 7 patients acute abdomen diagnosis was followed by surgical intervention. In all patients who underwent laparotomy the peritonitis was classified as sterile. Joint involvement was usually manifested in 57% of patients as arthralgias, mainly affecting knees, ankles and wrists. Arthritis was only found in 18% of patients, commonly as monoarticular arthritis; in all cases, the X-ray films showed non-erosive and non-destructive arthritis.

Other clinical manifestations identified in the Spanish FMF patients included generalised myalgia, which was observed in 48% of patients, a much higher proportion than that reported in other populations (Pras, 1998; Samuels et al., 1998; Sohar et al., 1967), and unilateral pleurisy accompanied by chest pain, in 30%. Vomiting and headache were both manifested in 26% of patients. Enlargement of lymph nodes was also more frequent (20%) than in the published data (Pras, 1998; Samuels et al., 1998; Sohar et al., 1967). Erysipelas-like erythema was reported in 18% of patients and diarrhea in 17%.

Uncommon symptoms associated with FMF disease in these patients were pericarditis (2 patients), conjunctivitis (1 patient) and constipation (1 patient). No testicular swelling and/or pain was referred in any of the male patients.

In the clinical histories, certain factors were identified as triggers of inflammatory attacks: physical and emotional stress in two, and hormonal factors in 3 women. Some female patients reported an improvement in their symptoms or even the disappearance of their attacks during pregnancy, whereas others associated the higher intensity and/or frequency of inflammatory attacks with the menstrual cycle. No prodromic symptoms other than malaise were reported by any patient.

One patient over the age of 40 developed nephrotic syndrome (7.5gr/24h) as the first symptom of FMF disease. After the identification of amyloid deposition on renal biopsy this patient suffered several inflammatory episodes with abdominal pain and sterile peritonitis without fever. In view of these clinical data, together with the absence of chronic infectious, rheumatologic or neoplastic disease, and the identification of E148Q *MEFV* mutation, phenotype II FMF disease was diagnosed.

Secondary AA amyloidosis was diagnosed in 4 unrelated patients, including the phenotype II FMF patient: 1 by rectal biopsy, 3 by renal biopsy and 1 by intestinal

biopsy. The absence of chronic infectious and neoplastic diseases in all cases ruled out the existence of other secondary AA amyloidosis-causing diseases. The most important clinical symptoms of AA amyloidosis were nephrotic syndrome (3 patients), hepatosplenomegaly (1 patient), intestinal malabsorption (1 patient) and hypothyroidism (1 patient).

The mean severity score of the Spanish group of patients, calculated using Samuels' criteria was 4.6, ranging from 3 to 7 inside the range for "mild disease" (Samuels et al., 1998).

Only 4 familial cases of FMF were detected in the present study (Tables 1 and 2C).

Responsiveness to colchicine treatment was evaluated only in those patients with a follow-up of at least 12 months, first, by the presence or absence of inflammatory attacks and second, by the duration, intensity and frequency of attacks that did not disappear. All but one of the treated patients (97%) responded successfully to colchicine. Of these, most (80%) did not suffer any inflammatory attacks for a long time (>12 months) while a minority (20%) experienced a few episodes within the 12 months after the beginning of the treatment, though intensity, duration and frequency all decreased.

#### *MEFV analysis in the Spanish FMF population*

The mutation analysis revealed 9 patients (16.4%) with two mutations, either in homozygous or in compound heterozygous state, 20 patients (36.4%) with a single mutation, and 26 patients (47.2%) with no *MEFV* mutations (Table 2A). There were 33 mutated unrelated chromosomes, and 69 non-mutated chromosomes.

Table 2B shows the *MEFV* mutations detected in the Spanish FMF patients and their relative frequencies. All of them were missense substitutions; no nucleotide deletions, insertions nor non-sense mutations were found. The M694V variant was the most frequent, accounting for 36% of mutated chromosomes, followed by the M694I and the E148Q mutations (18% each) and the K695R mutation (12%). Other mutations accounted for 16% of carrier chromosomes: the founder V726A mutation, the I591T variant and the probably private Spanish variants: E163A and E319K.

The frequencies of the most common *MEFV* mutations in the present study were compared to those observed in other populations (Figure 1). The allelic frequency of the different *MEFV* mutations in the Spanish FMF patients showed a specific pattern, since

no similar frequencies were observed in any other (ancestral or non-ancestral) population.

The most frequent *MEFV* genotypes in the our group were, surprisingly, simple heterozygous genotypes: the M694V/wt genotype was found in seven patients, followed by the K695R/wt and E148Q/wt genotypes in six and four patients respectively (Table 2C). The M694V mutation was also found in homozygous state in two patients and in compound heterozygosity with three different mutations (4 patients). The M694I was detected in homozygosity in one patient, but also in compound heterozygosity with two variants (one patient each) and in simple heterozygosity (two patients). The I591T was found in two unrelated Spanish FMF patients in both cases as a heterocompound: in combination with the M694I mutation in one patient (Aldea et al., 2002) and with the M694V mutation in the other. The E319K variant was also accompanied by the M694I mutation, whereas the E163A mutation was found with no other coding mutation. The genetic analysis performed in all compound heterozygous *MEFV* did not identify any complex allele. Table 2C also shows that the family history in the Spanish FMF patients is exceptional, with only 4 kindreds having more than one affected family member.

In the course of *MEFV* gene analysis in our cohort of Spanish FMF patients two new mutations were identified: the E163A mutation, and the E319K mutation.

The E163A mutation was caused by a nucleotide A-C transversion at 488 position, located in exon 2 of the *MEFV* gene, resulting in the glutamine-to-alanine exchange at codon 163 of the P/M protein. This E163A exchange affects the last residue of the sequence PLSKREE, previously identified as one of the two nuclear localisation signals (NLS) present in the P/M protein. This mutation was identified in heterozygous state in a child with definitive FMF diagnosis and in four asymptomatic close family members (Figure 2).

The E319K mutation was caused by a nucleotide G-A transition at 955 position in exon 3 in the *MEFV* gene, which resulted in the glutamine-to-lysine exchange at residue 319 of the P/M protein. It was identified in compound heterozygosity with the M694I mutation in one patient with definitive FMF diagnosis (Figure 2).

Thirty-six percent of the Spanish FMF patients had only one *MEFV* mutation whereas 47% showed none. No changes were detected after screening for other HPF syndrome related-genes — *MVK*, *TNFRSF1A* and *CIAS1/NALP3/PYPAF1* — in any of these patients.

### *Genotype-Phenotype correlation*

The possible genotype-phenotype relationships in the Spanish FMF patients were investigated. The patients were grouped according to a range of criteria and their clinical features were compared. Table 3 shows the statistically significant relationships.

Clinical manifestations of patients bearing one, two or no *MEFV* mutations were compared (Table 3A). A significant relationship was shown between episode duration and the number of mutations: the majority of mutated patients suffered the classical 3-day episodes, whereas patients with no *MEFV* mutations suffered longer periods ( $p=0.004$ ). Patients bearing two mutations were associated with chest pain ( $p=0.052$ ) although when pleuritis was specified as the cause of the pain, this association was only a tendency. Interestingly, a tendency was also observed among the patients showing myalgia and lymph node enlargement, most of whom did not bear *MEFV* mutations ( $p=0.1$ ;  $p=0.147$ , not significant).

We compared the clinical manifestations of our patients with either definitive or probable FMF (Table 3B). There was a significant association between episode duration and FMF diagnosis: most of the patients with definitive diagnosis suffered the classical episodes lasting three days, whereas most of the probable FMF patients had longer episodes ( $p=0.047$ ). A significant proportion of the patients showing lymphadenopathy were diagnosed with probable FMF disease ( $p=0.036$ ) and, in the same group of patients, a tendency towards myalgia was also observed. The definitive group presented a slight tendency towards chest pain/pleuritis and arthralgia/arthritis.

### *M694V genotypes*

The number of M694V homozygotes in the study group was low, and conclusions on the relationship between these homozygous patients and FMF manifestations, amyloidosis among them, were difficult to draw. Instead, we studied the possible association of the genotypes involving the M694 residue (M694V and M694I) with a more severe phenotype, in comparison with other genotypes. The only observed tendency was that the 85% of patients with the M694V mutation, regardless of genotype, suffered from the classically short FMF episodes (<3 days) whereas the other genotypes not involving M694V, and also the wt/ wt genotype, suffered from longer episodes ( $p=0.108$ , not significant; Table 3C).

*E148Q genotypes*

The effect of the E148Q mutation in FMF disease is controversial since its presence has been reported in over 2% of the healthy population (Bernot et al., 1998); not all homozygous carriers were symptomatic (Ben-Chetrit et al., 2000; Booth et al., 2001). In our sample over 1.5% of control chromosomes bore the E148Q variant (personal unpublished data), and no E148Q homozygous subjects were observed. The most interesting finding regarding the E148Q mutation in the Spanish patients was its relationship with amyloidosis in the phenotype II patient.

*K695R genotypes*

The K695R mutation was found to cause disease in 6 patients (11%): interestingly, always in simple heterozygosity. In our study group, the mean age of onset of K695R was 6.2 years (8 months to 20 years). The inflammatory attacks associated with this mutation were often short (<1 day) but frequent (monthly); they did not always present fever or abdominal pain but were accompanied by a wide spectrum of symptoms including arthralgia (2) and arthritis (2), myalgia (2), pleuritis (2), ELE (2) and headaches (2). Adenopathy was common to all patients. Surprisingly, one patient who started with severe febrile and inflammatory bouts in the first year of life presented secondary AA amyloidosis and renal failure at the age of 30; the patient was successfully treated with colchicine. The presence of this severe FMF phenotype challenges the widely accepted concept that the K695R variant is a mild mutation (Aksentijevich et al., 1999; Bernot et al., 1998; Samuels et al., 1998).

*Other genotypes*

A 15-year-old Spanish boy suffered mild FMF disease bearing the E163A/wt genotype. The patient started at 8 years with recurrent bouts of fever between 3 and 5 days, every 2-3 months. Fever was accompanied by occasional abdominal and chest pain, and by mild joint involvement, myalgia or headache. Renal function was normal. All symptoms remitted completely after colchicine treatment. Interestingly, four healthy family members presented an identical genotype (Figure 2).

An 18-year-old male patient bearing the E319K/M694I genotype had started to suffer from 5-10 day long episodes of fever, pleuritis, arthritis and generalised myalgia at the age of 15. He responded positively to colchicine treatment.

The I591T *MEFV* mutation had been described previously in a French patient (Touitou, 2001) but no clinical data associated with the new variant were provided. The study of two unrelated Spanish patients in our sample demonstrated the clinical heterogeneity of this variant. The first was a previously reported case of a 25-year-old Spanish FMF patient (Aldea et al., 2002) with the I591T/ M694I genotype. Briefly, the patient presented the first symptoms at the age of 19: recurrent attacks consisted of 24-48 hour-long bouts of fever accompanied by abdominal pain and synovitis. No ELE, arthritis, pleuritis or amyloid deposition were observed, and all symptoms remitted completely after colchicine treatment. Interestingly, the proband was the youngest of three I591T/ M694I siblings and the only one to have FMF symptoms. In contrast, the other patient bearing the I591T mutation was a 29-year-old female with the I591T/ M694V genotype, with a much earlier onset, at the age of 5. The patient showed generalised myalgia and unilateral pleuritis during the episodes, and developed intestinal and thyroid amyloidosis despite the positive response to colchicine treatment.

#### *Amyloidosis, MEFV and SAA-1 genotypes*

Neither of the M694V/ M694V patients developed secondary amyloidosis. The only case of amyloidosis involving the M694V mutation was a patient with the M694V/I591T genotype. Table 4 shows the genotypes associated with amyloidosis in the FMF Spanish patients. Interestingly, 3 cases were heterozygous and one patient with no *MEFV* mutations also developed amyloidosis.

Finally, the analysis of the *SAA-1* genotype revealed that all patients with FMF-associated amyloidosis, including the phenotype II patient, bore the high risk  $\alpha/\alpha$  *SAA-1* genotype ( $p < 0.031$ ) regardless of their *MEFV* genotype.

## **DISCUSSION**

Traditionally, FMF has been considered an ethnically restricted hereditary disease, affecting ancestral populations of the Mediterranean basin, with high prevalence among Arabs, Armenians, Jews and Turks (Rogers et al., 1989; Schwabe and Peters, 1974; Sohar et al., 1967). Recently, epidemiological studies have confirmed the existence of FMF patients from non-ancestral populations in a range of European countries — Greece (Booth et al., 2000; Konstantopoulos et al., 2003), France (Bernot et al., 1998), Italy (Aksentijevich et al., 1999; Dode et al., 2000; La\_Regina et al., 2003), Portugal (Touitou, 2001), United Kingdom (Booth et al., 1998) — at higher incidences than previously expected. Few clinical reports of FMF Spanish patients have been published to date (Dalmau-Diana et al., 1981; Siso et al., 1977). The present study is the first survey of clinical manifestations and genetic characteristics of a wide group of FMF patients in the Spanish population, followed at our HPF Syndromes Unit since 1998.

The clinical manifestations of the Spanish group are in accordance with the general clinical profile of other FMF affected populations: bouts of fever with acute abdominal pain in 90% of cases, articular involvement in about 50-75% of cases and chest pain in 30-50% (Pras, 1998; Samuels et al., 1998; Sohar et al., 1967). ELE, the most specific FMF symptom, which occurs in 3 to 47% of FMF cases depending on the population (Barakat et al., 1986; Majeed et al., 1990; Sohar et al., 1967), was detected in 18% of our group. Few cases reported secondary amyloidosis, and FMF family history was exceptional.

The clinical heterogeneity of FMF disease within populations has been frequently reported (Pras, 1998; Tamir et al., 1999; Shinawi et al., 2000; Pugnere et al., 2003; Nir-Paz et al., 2000; Grateau et al., 2000). Our group was no exception, presenting variability in age of onset (ranging from the first month of life up to 53 years), in length of inflammatory episodes (which lasted three days in 60% of patients but longer in 40%), in episode frequency; there was also a patient with type II FMF disease. Surprisingly, a notably high proportion of Spanish FMF patients suffered from myalgia (48%), whereas in other populations it does not exceed 20%, and a slightly higher proportion of patients than in other FMF studies reported lymphadenopathy (Pras, 1998; Samuels et al., 1998; Sohar et al., 1967). These features may also be examples of the clinical heterogeneity of FMF disease in our population, in which the



genetic background and environmental factors may play important roles in the expression of the disorder. However, it is also possible that a fraction of the patients in the study group may suffer from another — possibly unknown — *FMF-like* disease characterised by longer episodes and higher frequencies of myalgia and adenopathy.

In this connection, statistically significant differences were found between probable and definitive FMF subjects in terms of episode duration and lymphadenopathy. Subjects with probably FMF diagnosis were also more likely to present myalgia, though the difference was not significant. The fact that the probable FMF patients accounted for 40% of the Spanish group may be due to i) the low incidence of amyloidosis, ii) the high number of patients not treated with colchicine in this study, iii) the low incidence of ELE, and iv) the near total absence of FMF family history. These data suggest that by diagnosing the Spanish FMF patients as definitive or probable on the basis of these four criteria (the Tel-Hashomer criteria), some definite FMF cases and some “putative” *FMF-like* cases may have been classified in the probable FMF group.

Nevertheless, the message to clinicians in this country is clear: 1) there are FMF patients in our population who may not necessarily belong to any of the classically FMF-affected ancestral populations; 2) the absence of a FMF family history does not rule out FMF disease; and 3) amyloidosis is not at all a common manifestation in the FMF Spanish patients.

Mutational screening of the *MEFV* gene in a panel of 55 FMF patients from 51 unrelated families of Spanish origin was positive for the 52% of cases, which is the fraction of patients with at least one *MEFV* mutation. These results were surprising on two counts: first, the low frequency of FMF patients bearing two *MEFV* mutations, which may be the consequence of the low proportion of mutated chromosomes (carriers) in the Spanish population; second, the high proportion of patients with only one *MEFV* mutation suffering from a classical profile of FMF disease. No differences were detected between patients bearing one or two *MEFV* mutations as regards clinical manifestations, severity score or colchicine responsiveness.

Compared with other populations, the *MEFV* mutations in the Spanish FMF patients were remarkably heterogeneous (Table 2) (Figure 1). Four out of the 5 most frequent *MEFV* mutations reported in the literature were found in our study group, accounting for the 76% (25/33) of mutated chromosomes. The remaining 24% (8/33) carried 4 different variants including the K695R, the I591T and the probably private

E163A and E319K mutations. Among the founder mutations, M694V, which had been found in about 90% of North African Jews (The International FMF Consortium, 1997; The French FMF Consortium, 1997) was found in 36% of carrier chromosomes in Spanish patients; M694I was detected in 18% of mutated Spanish chromosomes, the same frequency as in some Arab, Turkish and Armenian FMF reports (Touitou, 2001); the E148Q variant accounted for 18% of mutated chromosomes in this study, similar to others (Touitou, 2001). Interestingly, the V726A mutation, which is relatively frequent in Arabs and Armenians, was found in only one Spanish carrier chromosome, a lower proportion than in Greek and Italian FMF patients. The V726A mutation was not reported in the French patients (refs). Similarly, the M680I mutation, which is known to be common in Armenians, was not found either in our study group or in the French population (Touitou, 2001).

Many reports of different FMF populations have studied the spectrum of *MEFV* mutations. In all of them a variable proportion of non-carrier FMF chromosomes was observed (Figure 1), suggesting locus heterogeneity in FMF disease (Akarsu et al., 1997; Chen et al., 1998). In our panel of Spanish FMF patients, up to 68% of unrelated chromosomes (69/102) bore no mutations, identically to that found in FMF patients of Italian origin (La-Regina et al., 2003).

Fifty-two percent of FMF patients in our study had one or two *MEFV* mutations. If we had followed standard *MEFV* mutational screening procedures, that is, searching for the five most frequent mutations, the figure would have been 43%, similar to the recently published data from an Italian FMF sample (42%) (La-Regina et al., 2003). Therefore, the mutations E163A, E319K and I591T, located in exons 2, 3 and 9 respectively, account for the remaining 9% of the positive mutation analysis. These data highlight the importance of the full-length *MEFV* sequencing methodology in FMF patients from non-ancestral populations where private mutations are more frequent.

Although it is possible that some of the heterozygous patients could harbour mutations in regulatory or intronic *MEFV* regions, it may also be the case that certain conditions, such as environmental or emotional stress or intense physical activity, are sufficient to trigger the inflammatory attacks in these patients. Alternatively, the situation of heterozygous or patients with non-detected *MEFV* mutations may be explained by the hypothesis of the existence of mutations in another locus (or other loci) which, together with the *MEFV* locus, would contribute to causing the disease. Under this hypothesis, the heterozygous patients for *MEFV* mutations bear a second mutation

in the unknown “FMF-causing locus 2”, whereas patients with no *MEFV* mutations have inherited two.

Finally, other autoinflammatory syndromes — caused by mutations in other loci — may present overlapping FMF symptoms. In this context the statistically significant relationships observed between i) non-mutated patients and probable diagnosis ( $p=0.003$ ), ii) non-mutated patients and long episode duration ( $p=0.004$ ) and iii) the tendency observed among non-mutated patients and myalgia and lymph node enlargement ( $p=0.1$ ;  $p=0.147$ , not significant), would support the hypothesis suggested above of the “putative” *FMF-like* syndrome in these patients. However, more studies are needed to confirm this hypothesis.

It is well known that some populations show a more severe disease phenotype than others (Brik et al., 1999; Livneh et al., 2000; Pras et al., 1998). The severity of the disease has often been associated with early age of onset, a higher frequency of the autoinflammatory attacks, amyloidosis and a higher colchicine dose at positive response (Pras et al., 1998). Furthermore, several studies associated the severity of the disease and amyloidosis with the M694V/ M694V genotype (Brik et al., 1999; Cazeneuve et al., 1999; Livneh et al., 1999; Pras et al., 1998; Shohat et al., 1999) though others rejected this relationship (Akar et al., 2001; Yalcinkaya et al., 2000). The age at onset of disease and the frequency of the episodes in the Spanish FMF group did not suggest a severe phenotype. Furthermore, although the disease was particularly severe in some patients, the mean severity score of the patients was 4.6, which is in the *mild disease* range (Samuels et al., 1998). Additionally, amyloidosis was practically absent in the Spanish FMF group of patients who successfully responded to colchicine in 97% of cases. In this regard, it is difficult to state whether the near total absence of amyloidosis in the Spanish patients is a feature of the relatively mild disease in our population, or simply the consequence of early colchicine therapy at the moment of diagnosis which would have prevented amyloid deposition. In fact, several reports have demonstrated a dramatic reduction in the incidence of amyloidosis in FMF patients since the establishment of colchicine as the standard treatment (Grateau et al., 1999; Zemer et al., 1986).

The  $\alpha/\alpha$  *SAA-1* genotype has been associated with a sevenfold increased risk for renal amyloidosis compared to other *SAA-1* genotypes (Cazeneuve et al., 2000). The genotype-phenotype studied here confirmed this relationship, regardless of *MEFV* genotype, in the Spanish FMF patients ( $p=0.031$ ). Thus, all patients with FMF-

associated amyloidosis bore the  $\alpha/\alpha$  *SAA-1* genotype. Furthermore, neither of the M694V homozygous Spanish FMF patients in this study had amyloidosis or bore the *SAA*  $\alpha/\alpha$  genotype.

Finally, the genotype-phenotype associations analysed in the present paper suggest the existence of environmental factors as well as other genetic modifier changes which may also be involved in the expression of FMF disease in the Spanish population.

In summary, this is the first exhaustive clinical and genetic analysis of FMF disease in Spanish patients. FMF is generally manifested in these patients as a mild disease, with positive response to colchicine treatment and with the almost total absence of secondary amyloidosis and FMF family history. However, clinical heterogeneity has been described, and the FMF type II also exists in our population. Genetic analyses were positive in the 52% of the Spanish FMF patients, confirming the suspected clinical diagnosis. Additionally, the present report shows a heterogeneous spectrum of *MEFV* mutations, some of them distributed in exons other than those routinely screened. This suggests that full-length *MEFV* gene sequencing is needed to obtain an accurate diagnosis of patients with clinical suspicion of FMF disease, particularly patients from non-ancestral populations, in which private mutations are more frequent. Finally, both environmental and genetic modifiers may also play a role in the expression of the disease.

### ***ACKNOWLEDGEMENTS***

We thank all patients, families and patient's physicians for their collaboration. The work was supported by "MARATÓ TV3" grant 003110 . We also thank Elisa de Lazzari from the Servei d'Epidemiologia i Bioestadística, Hospital Clínic, Barcelona, for her help in the statistical analysis.

### ***REFERENCES***

- Akar E, Yalcinkaya F, Akar N. 2001. Is the Ala138Gly alteration of *MEFV* gene important for amyloidosis? *Hum Mutat* 17: 71.
- Akarsu AN, SAAteci U, Ozen S, Bakkaloglu A, Besbas N, Sarfarazi M. 1997. Genetic linkage study of familial Mediterranean fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population. *J Med Genet* 34: 573-578.

- Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J, Centola M, Pras E, Chae JJ, Oddoux C, Wood G, Azzaro MP, Palumbo G, Giustolisi R, Pras M, Ostrer H, Kastner DL. 1999. Mutation and haplotype studies of familial Mediterranean fever reveal new ancestral relationships and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 64: 949-962.
- Aldea A, Casademont J, Arostegui JI, Rius J, Maso M, Vives J, Yague J. 2002. I591T *MEFV* mutation in a Spanish kindred: is it a mild mutation, a benign polymorphism, or a variant influenced by another modifier? *Hum Mutat* 20: 148-150.
- Azizi E, Fisher BK. 1976. Cutaneous manifestations of familial Mediterranean fever. *Arch Dermatol* 112: 364-366.
- Barakat MH, Karnik AM, Majeed HW, el\_Sobki NI, Fenech FF. 1986. Familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis) in Arabs--a study of 175 patients and review of the literature. *Q J Med* 60: 837-847.
- Ben\_Chetrit E, Lerer I, Malamud E, Domingo C, Abeliovich D. 2000. The E148Q mutation in the *MEFV* gene: is it a disease-causing mutation or a sequence variant? *Hum Mutat* 15: 385-386.
- Ben\_Chetrit E, Levy M. 1998. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 351: 659-664.
- Bernot A, da\_Silva C, Petit JL, Cruaud C, Caloustian C, Castet V, Ahmed\_Arab M, Dross C, Dupont M, Cattani D, Smaoui N, Dode C, Pecheux C, Nedelec B, Medaxian J, Rozenbaum M, Rosner I, Delpech M, Grateau G, Demaille J, Weissenbach J, Touitou I. 1998. Non-founder mutations in the *MEFV* gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 7: 1317-1325.
- Bertin J, DiStefano PS. 2000. The PYRIN domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins. *Cell Death Differ* 7: 1273-1274.
- Booth DR, Gillmore JD, Booth SE, Pepys MB, Hawkins PN. 1998. Pyrin/marenostrin mutations in familial Mediterranean fever. *QJM* 91: 603-606.
- Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soyuturk M, Akar S, Pepys MB, Tunca M, Hawkins PN. 2000. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM* 93: 217-221.
- Booth DR, Lachmann HJ, Gillmore JD, Booth SE, Hawkins PN. 2001. Prevalence and significance of the familial Mediterranean fever gene mutation encoding pyrin Q148. *QJM* 94: 527-531.

- Brik R, Shinawi M, Kepten I, Berant M, Gershoni\_Baruch R. 1999. Familial Mediterranean fever: clinical and genetic characterization in a mixed pediatric population of Jewish and Arab patients. *Pediatrics* 103: e70.
- Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, Roudot\_Thoraval F, Genevieve D, Mndjoyan E, Papazian M, Sarkisian A, Babloyan A, Boissier B, Duquesnoy P, Kouyoumdjian JC, Girodon\_Boulandet E, Grateau G, Sarkisian T, Amselem S. 2000. Identification of *MEFV*-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 67: 1136-1143.
- Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, Dervichian M, Nedelec B, Reinert P, Ayvazyan A, Kouyoumdjian JC, Ajrapetyan H, Delpech M, Goossens M, Dode C, Grateau G, Amselem S. 1999. *MEFV*-Gene analysis in armenian patients with Familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 65: 88-97.
- Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, Kingma DW, Horwitz ME, Mansfield E, Holland SM, O\_Shea JJ, Rosenberg HF, Malech HL, Kastner DL. 2000. The gene for familial Mediterranean fever, *MEFV*, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 95: 3223-3231.
- Chen X, Fischel\_Ghodsian N, Cercek A, Hamon M, Ogur G, Lotan R, Danon Y, Shohat M. 1998. Assessment of pyrin gene mutations in Turks with familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mutat* 11: 456-460.
- Consortium TFF. 1997. A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. *Nat Genet* 17: 25-31.
- Consortium TFI. 1997. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 90: 797-807.
- Crespi C, Mila J, Martinez\_Pomar N, Etxagibel A, Munoz\_SAA I, Priego D, Luque A, Pons J, Picornell A, Ramon M, Castro JA, Matamoros N. 2002. HLA polymorphism in a Majorcan population of Jewish descent: comparison with Majorca, Minorca, Ibiza (Balearic Islands) and other Jewish communities. *Tissue Antigens* 60: 282-291.
- Dalmau\_Diana M, Alarcon\_Zurita A, Piza C, Morey A, Marco J, Bestard J, Mairata S. 1981. (Familial Mediterranean fever. Review of 15 cases). *Rev Clin Esp* 163: 373-376.

- Deltas CC, Mean R, Rossou E, Costi C, Koupepidou P, Hadjiyanni I, Hadjirossos V, Petrou P, Pierides A, Lamnisou K, Koptides M. 2002. Familial Mediterranean fever (FMF) mutations occur frequently in the Greek-Cypriot population of Cyprus. *Genet Test* 6: 15-21.
- Dode C, Pecheux C, Cazeneuve C, Cattan D, Dervichian M, Goossens M, Delpech M, Amselem S, Grateau G. 2000. Mutations in the *MEFV* gene in a large series of patients with a clinical diagnosis of familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 92: 241-246.
- Gafni J, Ravid M, Sohar E. 1968. The role of amyloidosis in familial mediterranean fever. A population study. *Isr J Med Sci* 4: 995-999.
- Gershoni\_Baruch R, Brik R, Lidar M, Shinawi M, Livneh A. 2003. Male sex coupled with articular manifestations cause a 4-fold increase in susceptibility to amyloidosis in patients with familial Mediterranean fever homozygous for the M694V-*MEFV* mutation. *J Rheumatol* 30: 308-312.
- Grateau G, Drenth JP, Delpech M. 1999. Hereditary fevers. *Curr Opin Rheumatol* 11: 75-78.
- Grateau G, Pecheux C, Cazeneuve C, Cattan D, Dervichian M, Goossens M, Delpech M, Amselem S, Dode C. 2000. Clinical versus genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *QJM* 93: 223-229.
- Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 29: 301-305.
- Houten SM, Koster J, Romeijn GJ, Frenkel J, Di\_Rocco M, Caruso U, Landrieu P, Kelley RI, Kuis W, Poll\_The BT, Gibson KM, Wanders RJ, Waterham HR. 2001. Organization of the mevalonate kinase (MVK) gene and identification of novel mutations causing mevalonic aciduria and hyperimmunoglobulinaemia D and periodic fever syndrome. *Eur J Hum Genet* 9: 253-259.
- Kavukcu S, Turkmen M, Eroğlu Y, Canda T, Yorukoğlu K, Işci E, Büyükgebiz A. 1997. Renal, gastric and thyroidal amyloidosis due to familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 11: 210-212.
- Konstantopoulos K, Kanta A, Deltas C, Atamian V, Mavrogianni D, Tzioufas AG, Kollainis I, Ritis K, Moutsopoulos HM. 2003. Familial Mediterranean fever associated pyrin mutations in Greece. *Ann Rheum Dis* 62: 479-481.

- La-Regina M, Nucera G, Diaco M, Procopio A, Gasbarrini G, Notarnicola C, Kone\_Paut I, Touitou I, Manna R. 2003. Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet* 11: 550.
- Livneh A, Langevitz P. 2000. Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 14: 477-498.
- Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, Zaks N, Kastner DL, Pras M, Pras E. 1999. *MEFV* mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Amyloid* 6: 1-6.
- Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, Migdal A, Padeh S, Pras M. 1997. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 40: 1879-1885.
- Majeed HA, Quabazard Z, Hijazi Z, Farwana S, Harshani F. 1990. The cutaneous manifestations in children with familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis). A six-year study. *Q J Med* 75: 607-616.
- Manji GA, Wang L, Geddes BJ, Brown M, Merriam S, Al\_Garawi A, Mak S, Lora JM, Briskin M, Jurman M, Cao J, DiStefano PS, Bertin J. 2002. *PYPAF1*, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* 277: 11570-11575.
- Martinon F, Hofmann K, Tschopp J. 2001. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol* 11: R118-120.
- McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, Mansfield E, Gadina M, Karenko L, Pettersson T, McCarthy J, Frucht DM, Aringer M, Torosyan Y, Teppo AM, Wilson M, Karaarslan HM, Wan Y, Todd I, Wood G, Schlimgen R, Kumarajeewa TR, Cooper SM, Vella JP, Kastner DL, et al. 1999. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Nature* 397: 133-144.
- Mimouni A, Magal N, Stoffman N, Shohat T, Minasian A, Krasnov M, Halpern GJ, Rotter JI, Fischel\_Ghodsian N, Danon YL, Shohat M. 2000. Familial Mediterranean fever: effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. *Pediatrics* 105: E70.
- Moriguchi M, Terai C, Koseki Y, Uesato M, Nakajima A, Inada S, Nishinarita M, Uchida S, Kim SY, Chen CL, Kamatani N. 1999. Influence of genotypes at



- SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of secondary AA-amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 105
- Nir\_Paz R, Ben\_Chetrit E, Pikarsky E, Hassin D, Hasin Y, Chajek\_Shaul T. 2000. Unusual presentation of familial Mediterranean fever: role of genetic diagnosis. *Ann Rheum Dis* 59: 836-838.
- Papin S, Duquesnoy P, Cazeneuve C, Pantel J, Coppey\_Moisan M, Dargemont C, Amselem S. 2000. Alternative splicing at the *MEFV* locus involved in familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostin/pyrin protein to the nucleus. *Hum Mol Genet* 9: 3001-3009.
- Pawlowski K, Pio F, Chu Z, Reed JC, Godzik A. 2001. PAAD - a new protein domain associated with apoptosis, cancer and autoimmune diseases. *Trends Biochem Sci* 26: 85-87.
- Pras E, Livneh A, Balow JE, Kastner DL, Pras M, Langevitz P. 1998. Clinical differences between North African and Iraqi Jews with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 75
- Pras M. 1998. Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scand J Rheumatol* 27
- Pugnere D, Ruiz M, Sarrauste\_de\_Menthier C, Masdoua B, Demaille J, Touitou I. 2003. The MetaFMF website: a high quality tool for meta-analysis of FMF. *Nucleic Acids Res* 31: 286-290.
- Richards N, Schaner P, Diaz A, Stuckey J, Shelden E, Wadhwa A, Gumucio DL. 2001. Interaction between Pyrin and the Apoptotic Speck Protein (ASC) Modulates ASC-induced Apoptosis. *J Biol Chem* 276: 39320-39329.
- Rogers DB, Shohat M, Petersen GM, Bickal J, Congleton J, Schwabe AD, Rotter JI. 1989. Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am J Med Genet* 34: 168-172.
- Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, Deng Z, Sood R, Kastner DL. 1998. Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health. *Medicine (Baltimore)* 77: 268-297.
- Sarrauste-de-Menthier C, Terriere S, Pugnere D, Ruiz M, Demaille J, Touitou I. 2003. INFEVERS: the Registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations. *Nucleic Acids Res* 31: 282-285.

- Schwabe AD, Peters RS. 1974. Familial Mediterranean Fever in Armenians. Analysis of 100 cases. *Medicine (Baltimore)* 53: 453-462.
- Shinawi M, Brik R, Berant M, Kasinetz L, Gershoni\_Baruch R. 2000. Familial Mediterranean fever: high gene frequency and heterogeneous disease among an Israeli-Arab population. *J Rheumatol* 27: 1492-1495.
- Shinozaki K, Agematsu K, Yasui K, Nagumo H, Naitoh H, Naganuma K, Komiyama A. 2002. Familial Mediterranean fever in 2 Japanese families. *J Rheumatol* 29: 1324-1325.
- Shohat M, Magal N, Shohat T, Chen X, Dagan T, Mimouni A, Danon Y, Lotan R, Ogur G, Sirin A, Schlezinger M, Halpern GJ, Schwabe A, Kastner D, Rotter JI, Fischel\_Ghodsian N. 1999. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet* 7: 287-292.
- Siso C, Vinyes\_M A, Badrinas F, Carrera M. 1977. (Study of a Spanish family with familial Mediterranean fever). *Rev Clin Esp* 144: 297-299.
- Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. 1967. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 43: 227-253.
- Tamir N, Langevitz P, Zemer D, Pras E, Shinar Y, Padeh S, Zaks N, Pras M, Livneh A. 1999. Late-onset familial Mediterranean fever (FMF): a subset with distinct clinical, demographic, and molecular genetic characteristics. *Am J Med Genet* 87: 30-35.
- Touitou I. 2001. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 9: 473-483.
- Yalcinkaya F, Cakar N, MisirlioŸlu M, Tumer N, Akar N, Tekin M, TaŸtan H, Kocak H, Ozkaya N, Elhan AH. 2000. Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis. *Rheumatology (Oxford)* 39: 67-72.
- Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, Cabili S, Gafni J. 1986. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 314: 1001-1005.

**TABLES****Table 1.** Phenotypic features and clinical manifestations during the inflammatory episodes in the Spanish FMF patients. Clinical data of the FMF type II patient and of the affected family members of the H478Y-bearing kindred are not included (see Materials and methods).

Features and clinical manifestations	Number of patients
Male / female	25 (46 %)/ 29 (54 %)
Age at onset (yr): mean $\pm$ sd (range)	15 $\pm$ 12 (0-53)
Duration <sup>a</sup> :	
<3 dy	31 (61%)
3-7 dy	15 (29%)
>7 dy	5 (10%)
Frequency:	
<1 per month	32 (59%)
1-2 per month	8 (15%)
> 2 per month	14 (26%)
Fever	52 (94%)
Abdominal pain	40 (74%)
Arthralgia	31 (57%)
Myalgia	26 (48%)
Pleuritis	16 (30%)
Vomiting	14 (26%)
Headache	14 (26%)
Lymphadenopathy	11 (20%)
Erysipelas-like erythema	10 (18%)
Arthritis	10 (18%)
Diarrhea	9 (17%)
Amyloidosis <sup>b</sup>	4 (11%)
Severity score: mean (range)	4.6 (3-7)
Familial history (families)	5
Colchicine response	30/31 (97%)

sd, standard deviation. <sup>a</sup> Data not available for 3 patients (n=51). <sup>b</sup> Included the patient with FMF type II.

**Table 2.** *MEFV* mutation analysis of the Spanish FMF patients. A, fraction of patients with either two, one or no *MEFV* mutations. B, frequency of *MEFV* mutations. C, genotype frequencies.

A. <i>MEFV</i> mutation detection		N. patients (%)
Patients with 2 <i>MEFV</i> mutations		9 (16.4%)
Patients with 1 <i>MEFV</i> mutation <sup>†</sup>		20 (36.4%)
Patients with no <i>MEFV</i> mutations <sup>†</sup>		26 (47.2%)
B. <i>MEFV</i> mutations	Exon	N. of chromosomes (%) <sup>*</sup>
M694V	10	12 (37%)
M694I	10	6 (18%)
E148Q	2	6 (18%)
K695R	10	4 (12%)
I591T	9	2 (6%)
V726A	10	1 (3%)
E163A	2	1 (3%)
E319K	3	1 (3%)
C. Frequencies of <i>MEFV</i> genotypes	N. patients	N. families
M694V/ wt	7	6
K695R/ wt	6	4
E148Q/ wt	4	4
M694V/ M694V	2	1
M694V/ E148Q	2	2
M694I/ wt	2	2
M694V/ V726A	1	1
M694V/ I591T	1	1
M694I/ M694I	1	1
M694I/ I591T	1	1
M694I/ E319K	1	1
E163A/ wt	1	1
Wt/ wt	26	26
Total	55	51

<sup>†</sup> all exons sequenced. <sup>\*</sup> Mutation frequency among all mutated independent chromosomes (n=31).

**Table 3.** Genotype-phenotype relationships. A, Number of *MEFV* mutations; B, FMF probable and definitive diagnosis; C, M694V genotypes.

A.				
Number of <i>MEFV</i> mutations				
	2 mutations n=9 (%)	1 mutation n=19 (%)	0 mutations n=26 (%)	<i>p-value</i>
Episode duration <sup>1</sup>				
<3 days	6 (67)	15 (79)	10 (43)	<i>0.004</i> <sup>2</sup>
3-7 days	0 (0)	4 (21)	11 (48)	
>7 days	3 (33)	0 (0)	2 (9)	
Chest pain				
Yes	5 (56)	3 (16)	4 (15)	0.052 <sup>2</sup>
No	4 (44)	16 (84)	22 (85)	
B.				
FMF diagnosis				
	<i>Definitive</i> n=32 (%)	Probable n=22 (%)	<i>p-value</i>	
Episode duration <sup>1</sup>				
<3 days	22 (73)	9 (43)	<i>0.047</i> <sup>2</sup>	
3-7 days	5 (17)	10 (48)		
>7 days	3 (10)	2 (10)		
Adenopathy				
Yes	3 (9)	8 (36)	<i>0.036</i> <sup>2</sup>	
No	29 (91)	14 (64)		
C.				
M694V genotypes vs other <i>MEFV</i> genotypes				
	M694V genotypes n=13 (%)	Other mutated genotypes n=14 (%)	Wt/ Wt n=27 (%)	<i>p-value</i>
Episode duration <sup>1</sup>				
<3 days	11 (85)	9 (64)	11 (46)	0.108 <sup>2</sup>
3-7 days	1 (8)	3 (21)	11 (46)	
>7 days	1 (8)	2 (14)	2 (8)	

Significant *p* values in italics. <sup>1</sup>total 51 patients. <sup>2</sup>Fischer's exact test.

**Table 4.** *MEFV* and *SAA1* genotypes associated to secondary AA amyloidosis.

<b>A. Amyloidosis associated <i>MEFV</i> genotypes</b>		
	Num. cases	Localization
M694V/ I591T	1	Intestinal/ thyroid
K695R/ wt	1	Renal
E148Q/ wt <sup>1</sup>	1	Renal
Wt/ wt	1	Systemic
<b>B. Amyloidosis and <i>SAA1</i> genotype</b>		
	$\alpha/\alpha$	Other than $\alpha/\alpha$
	n=24 (%)	n=31 (%)
Amyloidosis <sup>2,3</sup>		
Yes	4 (17)	0 (0)
No	20 (83)	31 (100)

<sup>1</sup> the Type II FMF patient<sup>2</sup> included Type II FMF<sup>3</sup> Significant Fischer's exact test (p= 0.031)

## **FIGURE LEGENDS**

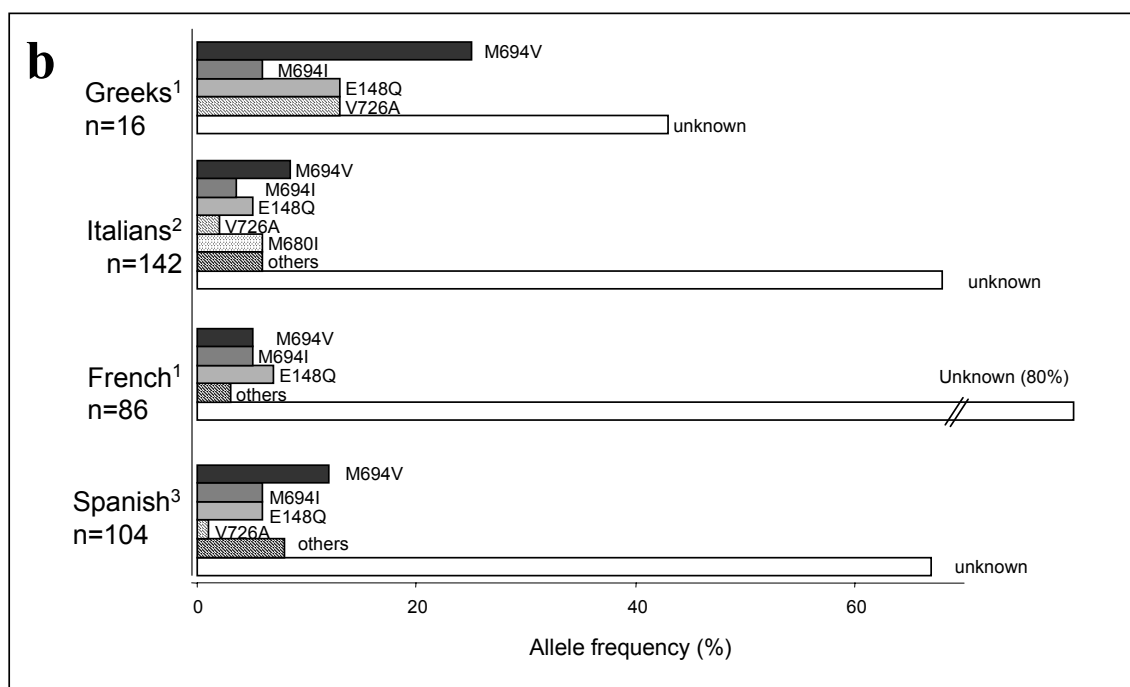
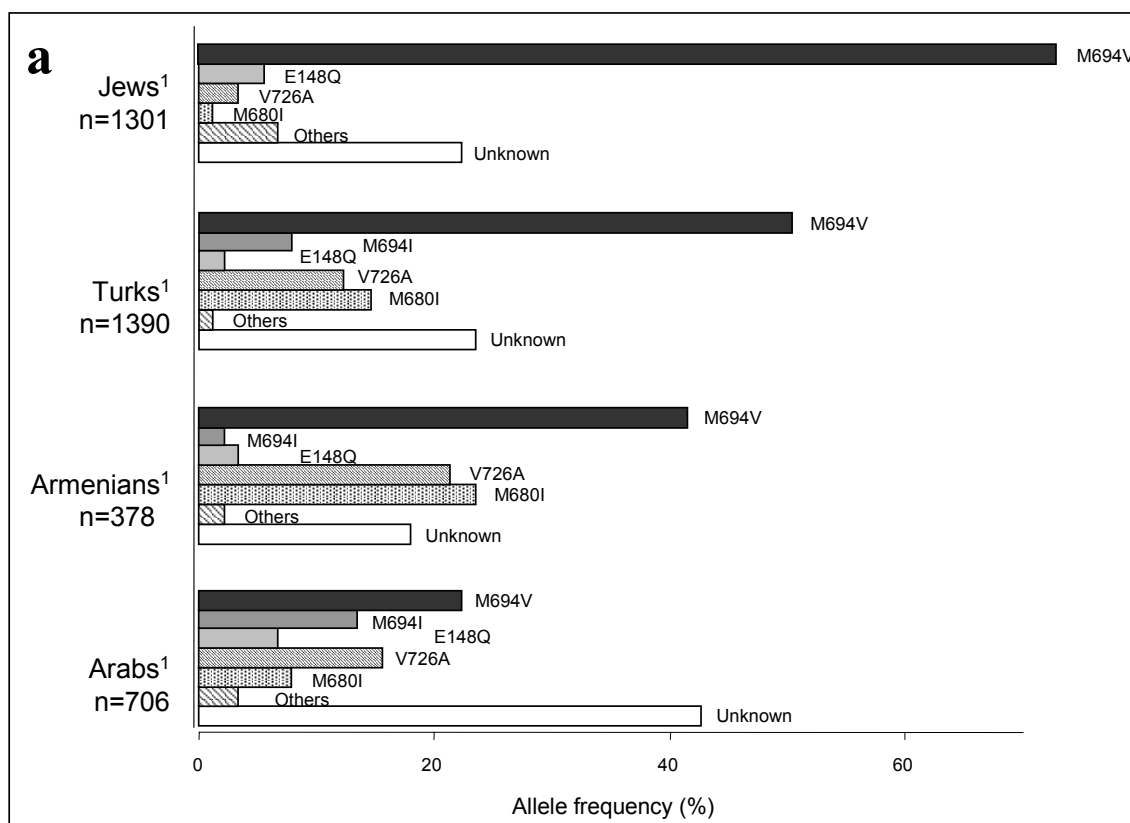
### **Figure 1**

Allelic frequencies of the most common *MEFV* mutations in ancestral (a) and non-ancestral (b) FMF affected populations. n= number of tested chromosomes. <sup>1</sup>Data from (Touitou, 2001); <sup>2</sup>Data from (La\_Regina et al., 2003); <sup>3</sup>Data from the present study.

### **Figure 2**

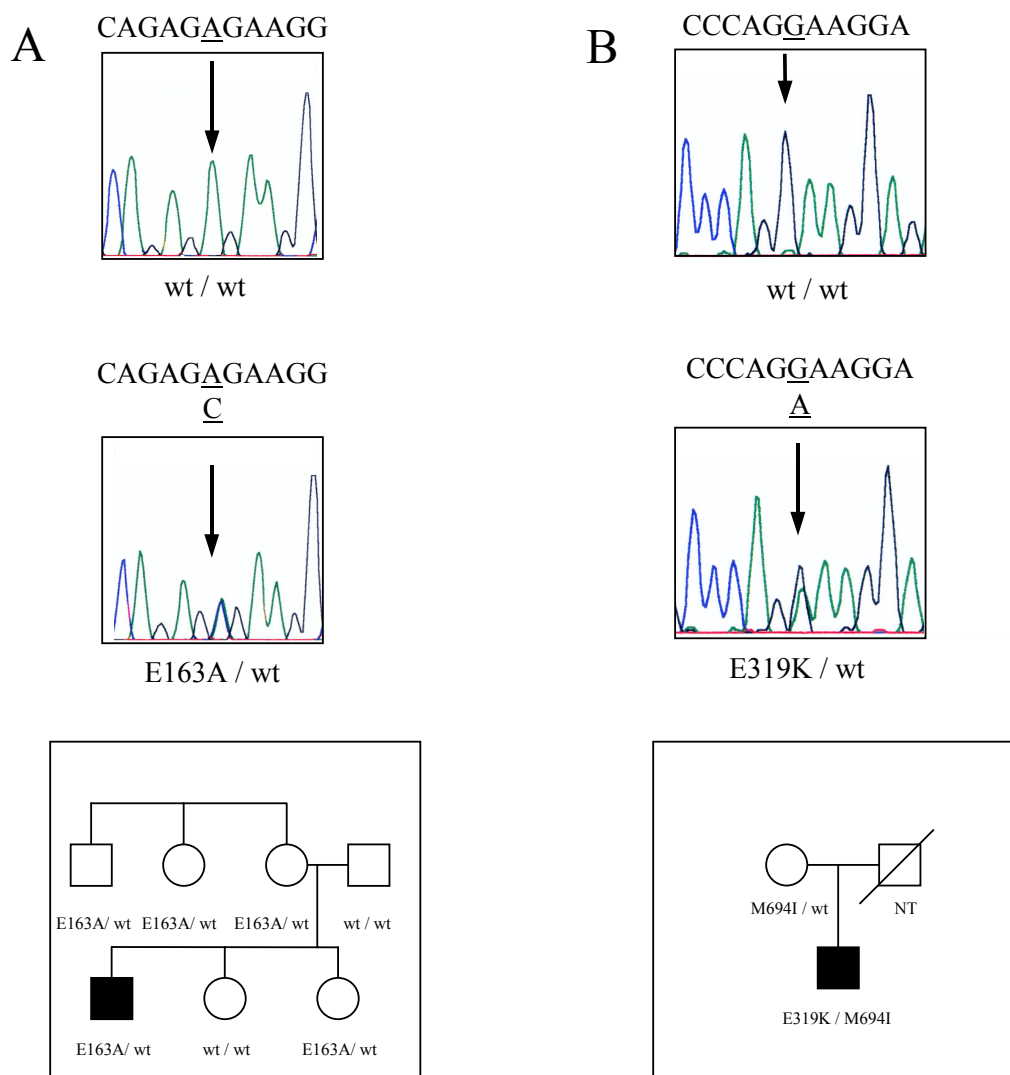
The two new *MEFV* mutations found in the Spanish FMF patients. Electrophoregram, pedigree and genetic description of the E163A (a) and E319K (b) variants. Open circles/squares denote healthy subjects and black figures denote FMF patients.

Figure 1



**Figure 2**

Electropherograms, pedigrees and genetic description of the 2 new *MEFV* gene mutations identified in the Spanish FMF patients. A: E163A variant. B: E319K variant. The open circles / squares denotes healthy individuals while the black square FMF male patient. NT: Not tested



Mutation	Nucleotide change	Position	Exon	Control chromosomes	Comments
E163A	A>C transversion	488	2	0/200	Incomplete penetrance
E319K	G>A transition	955	3	0/200	Compound heterozygous with M694I

Submitted to Infervers data base



## CONCLUSIONS

### *La FMF a la població espanyola*

1. Clínicament, els pacients espanyols diagnosticats de FMF constitueixen un grup heterogeni: un subgrup manifesta la simptomatologia clínica típica de la malaltia mentre que l'altre subgrup manifesta episodis lleugerament més llargs i amb una major freqüència de limfadenopaties i mialgia.
2. Existeixen pacients espanyols de FMF sense origen ètnic destacable, per la qual cosa, s'hauria de considerar que el criteri ètnic a la població espanyola no constitueix un criteri d'exclusió en el diagnòstic clínic de la malaltia.
3. L'absència d'antecedents familiars de FMF és altament infreqüent a la població espanyola (90%), per la qual cosa no hauria de ser considerat un criteri diagnòstic de la malaltia.
4. La incidència d'amiloïdosi i d'ELE en els pacients espanyols de FMF és baixa (11 i 18% respectivament).

### *Bases genètiques de la FMF*

1. Les mutacions en el gen *MEFV* són les causants de la FMF en alguns dels pacients espanyols però no en tots: el 52% dels pacients són portadors de 1 o 2 mutacions al gen *MEFV*. Els pacients portadors de dues mutacions són el 16% dels pacients i existeix una proporció de pacients heterocigots que supera el doble dels pacients portadors de dues mutacions.
2. L'espectre de mutacions del gen *MEFV* observades als pacients de FMF espanyols és heterogeni i es troben en altres exons diferents del 10. Les mutacions més freqüents són M694V, M694I, E148Q i K695R, i es detecten mutacions privades.
3. L'anàlisi genètica de tots els exons i regions intròniques adjacents del gen *MEFV* incrementa en un 10% la detecció de mutacions a la població espanyola, que podria ser extensiu a altres poblacions especialment a les no ancestrals.
4. L'alta freqüència de pacients heterocigots qüestiona el patró d'herència de la FMF i suggereix l'existència d'almenys un altre locus implicat en la malaltia.
5. Un 48% dels pacients espanyols de FMF, no presenta cap mutació al *MEFV*. D'aquests, els diagnosticats clínicament amb una FMF probable, podrien manifestar un fenotip de FMF inusual o bé una nova síndrome de febre periòdica, altrament anomenada, *FMF-like*.







## CAPÍTOL 2:

### **La nova variant patològica H478Y del *MEFV* associada a una síndrome inflamatòria severa autosòmica dominant en una família espanyola: és una FMF inusual o una síndrome diferent causada per mutacions al locus *MEFV*?**

L'objectiu del següent treball va ser aprofundir en l'estudi genètic d'una pacient diagnosticada clínicament de FMF amb un fenotip inusual, a jutjar per i) un sever quadre inflamatori en el que hi predominava un component articular de llarga duració, ii) la no resposta a la colquicina, fins i tot a dosis altes, iii) el patró d'herència autosòmic dominant observat a la família, que afectava 3 generacions.

L'estudi del gen *MEFV* es va basar inicialment en l'anàlisi de l'exó 10 del *MEFV* degut a què és on es troben les mutacions descrites, M680I, M694V, M694I i V726A. Davant l'absència de mutacions en aquest exó s'analitzà la resta d'exons del *MEFV*, que detectà una sola mutació en un dels al·lels. Es tractava de la variant H478Y, situada a l'exó 5, no descrita prèviament.

#### ***H478Y, una nova variant patològica associada a FMF o un nou polimorfisme?***

La H478Y podia ser la causant de la síndrome en la pacient, però cabia la possibilitat que fos un polimorfisme freqüent a la població general. No es va detectar el canvi H478Y en cap dels 200 cromosomes de la població espanyola sana utilitzada com a control. Per tant, la variant H478Y, en cas de ser un polimorfisme, ho havia de ser en una freqüència molt baixa (<0,5%). L'associació de H478Y amb la malaltia determinaria definitivament si la variant era un canvi patològic i descartaria que fos un polimorfisme. Les anàlisis dels familiars afectes revelaren el mateix genotip H478Y/wt en tots ells, i que els familiars sans no portaven la variant H478Y. De l'anàlisi familiar es conclouïa que la H478Y s'associava a la manifestació del fenotip de FMF d'aquests pacients (Fig. 1 de l'article).

***Patró d'herència autosòmica dominant de la síndrome inflamatòria associada a H478Y.***

Restava però explicar la dominància observada en aquesta família. Es va postular una primera hipòtesi basada en el patró d'herència autosòmic dominant observat en aquesta família i en les manifestacions atípiques de la FMF d'aquests pacients, que d'altra banda eren perfectament compatibles amb el diagnòstic clínic de la síndrome de TRAPS, una SHFP autosòmica dominant: els individus afectes d'aquesta família podien ser portadors d'una mutació en algun dels gens responsables de SHFP dominants, la qual cosa explicaria la dominància en la família, i alhora, podrien haver co-heretat la variant H478Y al gen *MEFV*, simplement per atzar. En aquest cas, H478Y no tindria cap efecte sobre el fenotip inflamatori dels pacients, car estaria en recessivitat. La hipòtesi es va descartar degut a què no es va detectar cap alteració en cap dels exons dels gens *TNFRSF1A* ni *CIAS1*. A més, els valors sèrics del receptor 1 soluble del TNF eren normals.

***Hipòtesi del desequilibri en l'expressió dels al·lels mutat i salvatge.***

Una segona hipòtesi basada en l'assumpció que la variant H478Y del *MEFV* era la responsable del fenotip inflamatori en aquesta família, plantejava que podria existir una descompensació entre els missatgers del *MEFV* de l'al·lel mutat, i portador de H478Y, i de l'al·lel no mutat. Podria existir un defecte en la transcripció de la còpia del gen no mutada que impossibilités l'expressió de l'al·lel salvatge, o bé, que induís una expressió inestable del RNA missatger salvatge, la qual cosa impediria la seva traducció a proteïna. D'aquesta manera tota la P/M sintetitzada a la cèl·lula provindria només d'una còpia, que estaria mutada amb la variant H478Y. Així, el pacient "aparentment heterocigot" patiria la malaltia, quan en realitat seria portador de dos "defectes", i semblaria que la H478Y actuaria de forma dominant sobre l'al·lel salvatge. L'anàlisi per RT-PCR del cDNA del *MEFV* dels pacients rebel·là que en tots els casos s'expressaven els dos l'al·lels, el salvatge i el portador de H478Y (Fig. 3 de l'article). Per tant, semblaria no existir un desequilibri en la transcripció dels dos al·lels dels *MEFV* en aquests pacients. Però a més a més del resultat obtingut de l'estudi de l'expressió del cDNA, i en contra de la hipòtesi postulada sobre un desequilibri en la P/M mutada respecte de la no mutada, el suposat "defecte" pel qual l'al·lel salvatge s'hauria deixat d'expressar, hauria d'haver estat present a l'altre al·lel, i per tant, s'hauria d'haver anat incorporant en cada generació amb els membres nouvinguts a la família. Aquesta

possibilitat era altament improbable, a no ser que el “defecte” fos molt freqüent a la població. Per tal de contrastar aquesta hipòtesi es varen estudiar els haplotips dels cromosomes no mutats, els quals van resultar ser diferents en tots els casos, mentre que els cromosomes portadors de la H478Y compartien un haplotip comú a tots ells.

Una altra possibilitat que produiria la expressió diferencial entre els missatgers mutat i salvatge seria l'existència d'un defecte, en desequilibri de lligament amb H478Y, que produís que el missatger de l'al·lel mutat del *MEFV* estigués sobreexpressat respecte el de l'al·lel salvatge. En aquest cas, l'estequiometria de la P/M mutada seria superior a la de la salvatge, produint un efecte global sobre la disfunció de la proteïna. En aquest sentit, els estudis funcionals que es realitzin en un futur sobre la P/M ajudaran a entendre millor l'efecte dominant de la mutació H478Y sobre l'al·lel salvatge i la modulació de H478Y sobre la funció de la proteïna.

### ***El residu His478 de la Pirina/Marenostrina***

Mitjançant models computacionals de predicció de seqüència s'han definit un sèrie de dominis que podrien tenir una paper funcional en la proteïna. D'entre tots els dominis, el domini PyD (de l'anglès, Pyrin Domain) codificat per l'exó 1, és el que sembla tenir més importància funcional. Paradoxalment, la majoria de les mutacions recauen sobre l'exó 10, suggerint un paper bàsic per a aquest exó en la funció de la proteïna. La mutació H478Y produeix una substitució no-conservativa en una regió que conté un domini en hèlix de la P/M, implicat en les interaccions proteïna-proteïna. En aquest context és possible que mutacions en aquest domini, com la H478Y, comprometin la funció de la P/M ja sigui impedint la homodimerització de la P/M no mutada (actuant de variant dominant negativa) com impedint interacció heterotípica amb altres proteïnes.

### ***El fenotip inflamatori associat a la mutació H478Y***

A banda del mecanisme pel qual la H478Y afecta la funció de la P/M, el fet és que en aquests pacients, està associada a un fenotip de FMF que, tot i complir els criteris clínics de T-H, és força particular (Taula 1 de l'article): el patró d'herència és clarament autosòmic dominant, els episodis inflamatoris en aquests pacients excedeixen dels 3 dies en què clàssicament es manifesta la FMF, l'afectació articular és la principal manifestació dels episodis inflamatoris, allargant-se en el temps fins a més de dues setmanes, i afecta diverses articulacions, contrastant amb l'afectació monoarticular de la

FMF clàssica. A més, la severitat de l'artritis en aquesta família arriba a impossibilitar la deambulació a una de les pacients que ha de mantenir-se en cadira de rodes. D'altra banda, s'ha descrit que el 90-95% dels casos de FMF responen perfectament a la colquicina, cas contrari al dels pacients d'aquesta família. I no només això, sinó que la resposta al tractament amb bloquejants del TNF, utilitzada per tractar els pacients de TRAPS, està resultant excel·lent. Tot plegat, planteja la qüestió de si el fenotip dels pacients d'aquesta família, correspon realment al de la FMF, si bé amb presentacions certament atípiques de l'entitat, o si pel contrari, es tracta d'una altra síndrome, causada per mutacions en el gen responsable de la FMF, i associada a la H478Y.

### ***Diferents graus de severitat de la síndrome inflamatòria***

És interessant la observació de l'expressivitat diferencial en els pacients de diferent sexe dintre de la família on les dones manifesten un fenotip marcadament més sever (Taula 1 de l'article). Aquest fet, contrasta amb estudis previs on s'havia associat el gènere masculí amb un major risc de desenvolupar amiloïdosi. Pot ser que el factor hormonal modifiqui d'alguna manera l'expressivitat de la malaltia en les dones, o pot ser simplement una observació estocàstica, donat que només hi ha un home portador de la variant. Caldria estudiar més famílies portadores d'aquesta variant i més pacients masculins per confirmar l'associació entre el gènere i la severitat de la malaltia en aquests casos.

Una altra manifestació diferencial entre les pacients, és l'afectació d'amiloïdosi en dues d'elles. Es va determinar el genotip *SAA1* per tal de relacionar el genotip de risc  $\alpha/\alpha$  amb el desenvolupament d'amiloïdosi en aquesta família i per valorar el risc dels pacients més joves a desenvolupar-la en el futur. Cap de les 2 pacients amb amiloïdosi era portadora d'aquest genotip, suggerint que la causa del dipòsit està associada a la severitat dels episodis inflamatoris *per se*. Cap dels altres pacients però, tampoc no eren portadores de  $\alpha/\alpha$ .



## Clinical Report

# A Severe Autosomal-Dominant Periodic Inflammatory Disorder With Renal AA Amyloidosis and Colchicine Resistance Associated to the *MEFV* H478Y Variant in a Spanish Kindred: An Unusual Familial Mediterranean Fever Phenotype or Another *MEFV*-Associated Periodic Inflammatory Disorder?

Anna Aldea,<sup>1</sup> Josep M. Campistol,<sup>2</sup> Juan I. Arostegui,<sup>1</sup> Josefa Rius,<sup>1</sup> Montserrat Maso,<sup>1</sup> Jordi Vives,<sup>1</sup> and Jordi Yagüe<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Servei d'Immunologia, Institut Clínic d'Infeccions i Immunologia (ICII), Spain

<sup>2</sup>Servei de Nefrologia, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Familial Mediterranean fever (FMF) is an autosomal recessive disease characterized by recurring short attacks of fever and serositis. Secondary AA amyloidosis is the worst complication of the disease and often determines the prognosis. The *MEFV* gene, on chromosome 16p13.3, is responsible for the disease and around 30 mutations have been reported to date. Colchicine is the standard FMF treatment today, and prevents both attacks and amyloid deposition in 95% of patients. Here we describe a three-generation Spanish kindred with five family members affected by a severe periodic inflammatory disorder associated with renal AA amyloidosis and colchicine unresponsiveness. Clinical diagnosis of definite FMF disease was made based on the Tel-Hashomer criteria set. Genetic analyses revealed that all subjects were heterozygous for the new H478Y *MEFV* variant, segregating with the disease. In addition, mutations in the *TNFRSF1A* and *CIAS1/PYPAF1/NALP3* genes, related to the dominantly inherited autoinflammatory periodic syndromes, were ruled out. How-

ever, the dominant inheritance of the disease, the long fever episodes with a predominant joint involvement, and the resistance to colchicine in these patients raise the question of whether the periodic syndrome seen in this kindred is a true FMF disease with unusual manifestations or rather another *MEFV*-associated periodic syndrome. We conclude that the new H478Y *MEFV* mutation is the dominant pathological variant causing the inflammatory periodic syndrome in this kindred and that full-length analyses of the *MEFV* gene are needed to obtain an adequate diagnosis of patients with clinical suspicion of a hereditary periodic fever syndrome, especially those from non-ancestral populations.

© 2003 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** familial Mediterranean fever (FMF); hereditary periodic fever (HPF) syndromes; autosomal dominant inheritance

## INTRODUCTION

The hereditary periodic fever (HPF) syndromes are a rare group of autoinflammatory syndromes of genetic basis characterized by recurrent episodes of fever and serosal inflammation, without infectious etiology. Familial Mediterranean fever (FMF), Hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome (HIDS) are recessively transmitted, whereas the TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) and familial

Grant sponsor: MARATÓ TV3; Grant number: 003110.

\*Correspondence to: Jordi Yagüe, Servei Immunologia, Hospital Clínic, c/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain.

E-mail: jyague@medicina.ub.es

Received 3 January 2003; Accepted 25 March 2003

DOI 10.1002/ajmg.a.20296

urticarial syndromes—familial cold urticaria/familial cold autoinflammatory syndrome (FCU/FCAS) and Muckle–Wells syndrome (MWS)—are dominantly inherited. Tissue deposition of the acute phase protein serum amyloid A (SAA) may lead to the fatal development of secondary AA amyloidosis in some FMF and TRAPS patients. The diagnosis of these HPF syndromes is based on an accurate description of the medical history of the patient, including age of onset, duration and periodicity of attacks, main symptoms, uncommon manifestations and ethnic origin. Recently, several genes involved in HPF syndromes have been identified: the *MEFV* gene on chromosome 16p13.3 associated with FMF [The International FMF consortium, 1997; The French FMF consortium, 1997], the *MVK* gene on chromosome 12q24 associated with HIDS [Drenth et al., 1999; Houten et al., 1999], the *TNFRSF1A* gene on chromosome 12p13 associated with TRAPS [McDermott et al., 1999] and finally, the *CIAS1/PYPAF1/NALP3* gene on chromosome 1q44 associated with the MWS and FCU/FCAS [Hoffman et al., 2001]. Genetic analyses in search of disease causing mutations often support the clinical diagnosis.

FMF, the most frequent HPF syndrome, is highly prevalent in Mediterranean and Middle Eastern populations: non-Ashkenazi Jews, Arabs, Turks, and Armenians [The International FMF consortium, 1997; The French FMF consortium, 1997]. However, it is also present in non-ancestral populations such as Greeks, Italians, Spanish, Portuguese [Touitou, 2001], British [Booth et al., 2000], and Belgians [Anonymous, 1999]. Occasionally, patients of Indian, Chinese, Afghan, and Hungarian origin have also been described [Bernot et al., 1998; Booth et al., 1998]. The disease is characterized by recurrent short (1–3 days) episodes of inflammation and serositis including fever, peritonitis, pleuritis, arthritis, and skin lesions [Sohar et al., 1967]. The cloning of the *MEFV* gene has provided a molecular approach to FMF diagnosis, which is particularly valuable in patients with clinical suspicion of the disease [Grateau et al., 2000; Nir-Paz et al., 2000]. Thirty-three mutations in the *MEFV* gene have been reported (Infervers data base <http://fmf.igh.cnrs.fr/infervers>), accounting for 80% of FMF chromosomes in the classical autosomal recessive pattern of inheritance. Recently, two cases of autosomal dominant transmission have been reported: the deletion of the M694 residue in two unrelated British families and the M694I-E148Q complex allele in two unrelated families of Turkish and Indian origin [Booth et al., 2000]. These mutations are considered to be solitary pathological variants.

Here we describe a three-generation Spanish kindred with a severe dominantly inherited periodic inflammatory disorder complicated with renal AA amyloidosis. This phenotype is associated with a new H478Y mutation in the *MEFV* gene, responsible for FMF disease. However, the long episode duration with predominant joint involvement, the dominant inheritance pattern and colchicine unresponsiveness in these patients raise the question that whether the disorder seen in this kindred is FMF disease with an unusual phenotype or a new *MEFV*-associated disorder. The lack of response to

colchicine treatment prompted the use of biological TNF blocking therapy with infliximab, which has shown promising results elsewhere.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients and Control Subjects

Five patients from a three-generation Spanish family, suffering from a periodic inflammatory syndrome, and their healthy relatives (six individuals) were studied. Approval for the study was obtained from the Institutional Review Board of the Hospital Clínic, Barcelona, and written-informed consent was obtained from the patients. A panel of 100 ethnically matched healthy donors from our DNA bank were used.

Figure 1 shows the familial pedigree and the dominant inheritance in this kindred. Clinical features of each patient (Table I) were recorded through a standardized clinical questionnaire on HPFs. Fever episodes started at a similar age in all affected members, between the age of 9 and 13, with a symptom-free interval ranging from 6 weeks to 3 months. Periodic episodes consisted on high bouts of fever (39°C) with arthritis, arthralgias, and skin lesions resembling an erysipela-like erythema. Whereas fever episodes lasted from 3 to 6 days, arthralgia persisted for up to 3–9 days in a typical attack and exceptionally up to 15–25 days. The joints mainly involved were wrists, fingers, and tarsus, usually in polyarticular and migratory attacks. Patient no. 5, with a very severe form of the condition, was confined to a wheelchair. On several occasions, the patients complained of abdominal and thoracic pain secondary to serositis (peritonitis and pleuritis). All affected females were submitted to abdominal surgery for their clinical symptoms (sterile peritonitis in all

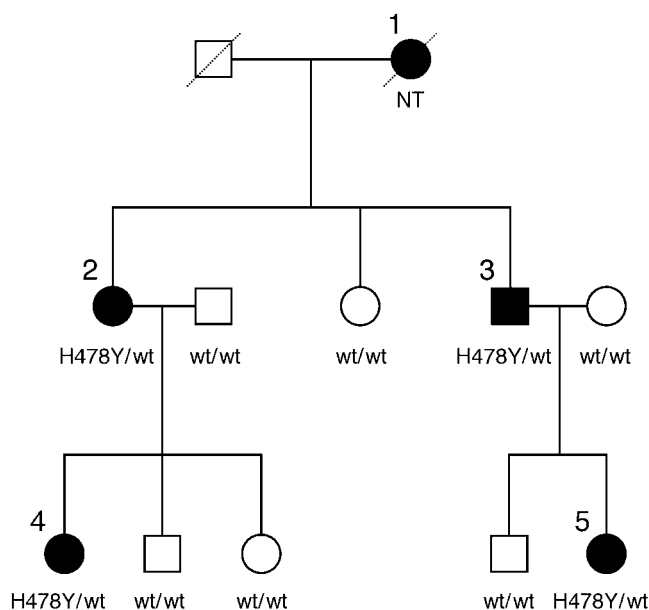


Fig. 1. Autosomal dominant inheritance in the FMF Spanish kindred bearing the H478Y *MEFV* mutation. Shaded symbols represent affected family members, an unshaded symbols show non-affected individuals. NT, not tested.

TABLE I. Characteristics of all Affected Family Members of the FMF Spanish Kindred Bearing the H478Y *MEFV* Variant: Clinical Response to Colchicine and Infliximab Treatment, and Results of Molecular Analyses

Characteristics	Patient no. 1	Patient no. 2	Patient no. 3	Patient no. 4	Patient no. 5
Age (yr)	60 <sup>a</sup>	49	52	24	23
Gender	F	F	M	F	F
Age of onset (yr)	10	9	13	12	11
Attack frequency (wk)	6–10	6–10	8–12	6–8	6–8
Attack duration <sup>b</sup> (dy)	3–15*	3–20*	2–4	3–20*	3–25*
Fever (°C)	39	39	38	39	39
Fever duration (dy)	4–6*	4–6*	2–3	3–5*	4–6*
Abdominal pain	+	+	–	+	+
Pleuritis	+	+	–	+	+
*Arthritis <sup>c</sup>	+	+	+	+	+
Erysipelas	+	+	–	+	+
Proteinuria (mgr/day)	3000	3000	<150	150–300	150–300
Renal amyloidosis <sup>d</sup>	+	+	–	–	–
ESRD dialysis	+	+	–	–	–
Age at amyloidosis (yr)	50*	48*	–	–	–
Colchicine response	–*	–*	+/-	–*	–*
Infliximab response	NT	+ <sup>e</sup>	NT	+	+
<i>MEFV</i> genotype	NT	H478Y/wt	H478Y/wt	H478Y/wt	H478Y/wt
<i>TNFRSF1A</i> mutations	NT	–	–	–	–
<i>CIAS1</i> <sup>f</sup> mutations	NT	–	–	–	–
<i>SAA1</i> genotype	NT	α/β	β/β	α/β	α/β

Numbers at the top row correspond to those of Figure 1.

\*Unusual FMF clinical manifestations shown by the patients of this kindred.

<sup>a</sup>Age deceased; <sup>b</sup>Sinovitis; <sup>c</sup>Wrists; finger and tarsus; polyarticular and migratory; <sup>d</sup>after renal biopsy; <sup>e</sup>only 3-month follow up; <sup>f</sup>*CIAS1/PYPAF1/NALP3*; Yr, years; Wk, weeks; Dy, days; ESRD, end stage renal disease; NT, not tested; +/-, partial colchicine response.

cases). In some cases febrile attacks were related with stress situations, including cold, school examinations, and tiredness. No cases of deafness or urticaria have been described in this family. CRP was persistently high (>5 mg/dl, normal range <0.8 mg/dl) in all affected members, and increased significantly during attacks (15 mg/dl). ANAs and anti-tissular antibodies were negative in all family members. Traces of proteinuria were observed in patients no. 4 and 5. Renal amyloidosis, which developed in two affected females (no. 1 and 2) at the age of 50, started with proteinuria and progressive renal failure, reaching end stage renal disease (ESRD) 3 years later. Renal biopsy using immunohistochemical analysis confirmed the AA amyloidosis (Fig. 2). Interestingly, the clinical syndrome was much more severe in females than in the affected male (no. 3) in terms of periodicity and clinical manifestations (Table I).

Colchicine was administered to all patients, at the highest tolerated doses (mean dose 1.5 mg/day; range: 1–2.5 mg/day) without success. Only the male member (no. 3) presented a partial response, with improvement in joint symptoms. Furthermore, in spite of the colchicine treatment the two older females (no. 1 and 2) developed renal amyloidosis and progressed to ESRD. Infliximab was administered to the two younger females (no. 4 and 5) after the approval of the Spanish Health Department. Before starting infliximab treatment, chest X-ray and PPD were performed to rule out an active pulmonary tuberculosis. Infliximab therapy was started with initial doses of 5 mg/kg/day, administered every 2 weeks during the first 2 months, subsequently every 4 weeks, and currently every 8 weeks. Colchicine was simultaneously administered during Infliximab treatment. Methotrexate was not indicated given the

side effects of this drug and the poor general status of the patients.

### Laboratory Studies

#### *DNA/RNA extraction and cDNA synthesis.*

From whole blood samples, genomic DNA and total RNA were isolated using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany) and Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD), respectively. Complementary DNA (cDNA) was synthesized by oligo (dT)<sub>12–18</sub> priming (Life Technologies).

**PCR amplification and sequencing.** PCR conditions used for *MEFV*, *TNFRSF1A* *CIAS1/PYPAF1/NALP3*, and *SAA1* genes had been described previously [The International FMF consortium, 1997; McDermott et al., 1999; Moriguchi et al., 1999; Hoffman et al., 2001]. Sequencing reactions (dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, PE Applied Biosystem, Warrington, Great Britain) were analyzed in an ABI 377 automated sequencer.

**Soluble *TNFR1* measurements.** The commercially available ELISA kit (R & D Systems, Minneapolis) was used following the manufacturer's standard protocol.

### RESULTS

Based on the Tel-Hashomer criteria for FMF diagnosis [Pras, 1998], all patients in the present kindred with the exception of the male patient no. 3 met one major criterion—recurrent febrile episodes accompanied by peritonitis, sinovitis or pleuritis—and two minor criteria—recurrent febrile episodes, erysipela-like erythema, or FMF in a first degree relative. Patient no.

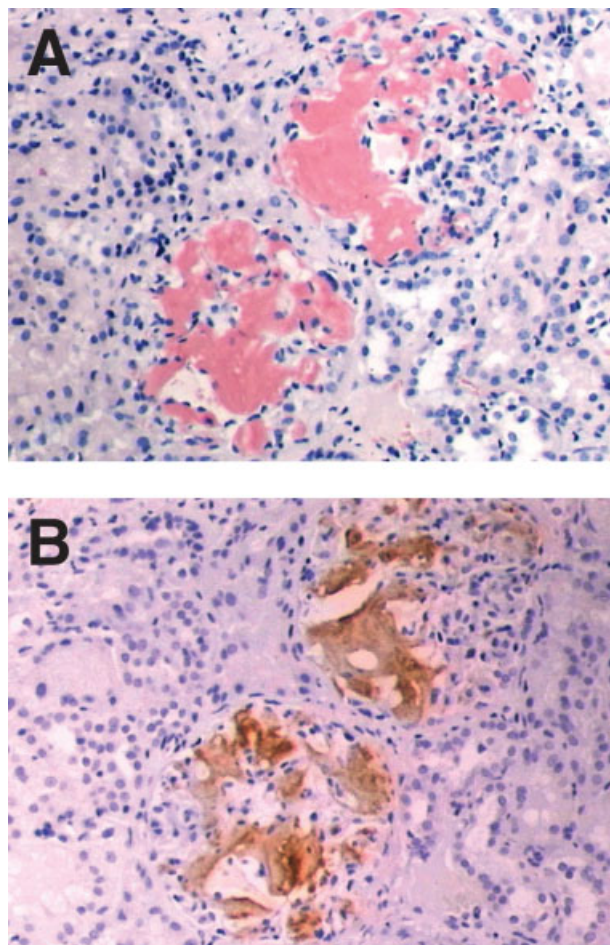


Fig. 2. Renal amyloidosis with massive glomerular involvement. **A:** Congo red stain ( $\times 250$ ). **B:** Immunohistochemical analysis with anti-SAA ( $\times 250$ ). [The color figure can be viewed in the online issue, available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

3 met Livneh FMF diagnostic criteria [Livneh et al., 1997].

### Genetic Findings

Molecular analyses consisting of screening for mutations in the entire coding sequence of the HPF syndromes related genes were performed. Comprehensive *MEFV* analyses were performed and a new variant, the H478Y *MEFV* mutation, caused by a C > T transition at nucleotide 1432 in exon 5, which results in a histidine-to-tyrosine exchange at codon 478, was found in the heterozygous state in all symptomatic members of this kindred (Fig. 3A); no other mutations were found after sequencing all 10 exons and intronic flanking regions of the *MEFV* gene. Additionally, none of the healthy members of this kindred were carriers of this mutation. The possibility that this new variant was a polymorphism was considered, but rejected after analyzing a panel of 100 ethnically matched control donors. Additionally, mutations in the genes responsible for all HPF syndromes with autosomal dominant inheritance were ruled out. No mutations were found in any of the 10 exons

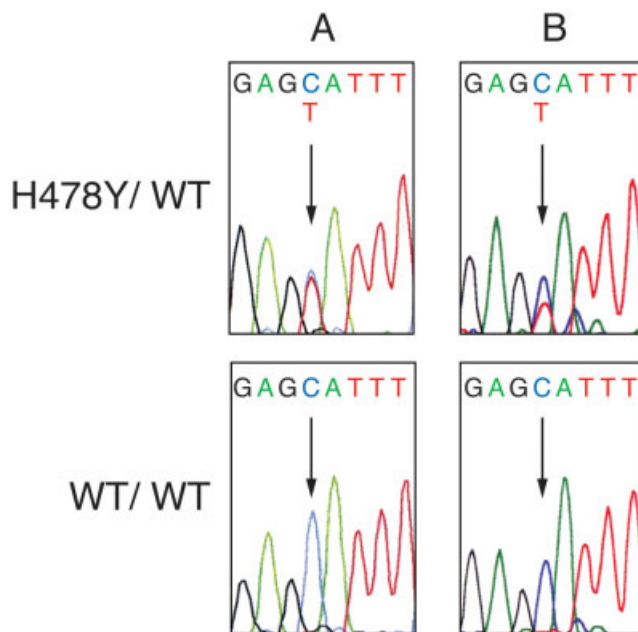


Fig. 3. Electropherogram of the new H478Y *MEFV* variant detected in both genomic (**A**) and complementary DNA (**B**). The C > T transition at nucleotide 1432 in exon 5 converts a histidine-to-tyrosine exchange in codon 478. Patient no. 2 in the present FMF kindred (**top**) and an unrelated healthy donor (**bottom**). [The color figure can be viewed in the online issue, available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

and flanking regions of the *TNFRSF1A* gene in any patient. Furthermore, normal serum levels of soluble TNFR1 were found in all, affected and unaffected, family members (data not shown). Sequencing of all nine exons and bounding sequences of the *CIAS1/PYPAF1/NALP3* gene revealed no mutations.

To demonstrate the dominant transmission of the H478Y *MEFV* variant in this kindred 10 polymorphic intragenic markers ranging from exon 2 to 9 of the *MEFV* locus were analyzed and haplotypes from both the mutated and the wild type *MEFV* allele for all patients were constructed. The SNPs used were: D102D C/T, G138G A/G, A165A A/C, and R202Q A/G in exon 2; R314R C/T in exon 3; the polymorphism i4 A/G in intron 4; E474E A/G, Q476Q G/A and D510D T/C in exon 5 and P588P A/G in exon 9. The H478Y mutation was found to be associated with the CGAGTGAGCG haplotype. This mutation-bearing haplotype was accompanied by a clearly distinct wild type haplotype in each patient (data not shown).

Additionally, RT-PCR expression analyses demonstrated that both the mutated and the normal allele of the *MEFV* gene were expressed in all patients (Fig. 3B).

Finally, none of the patients carried the amyloidosis-associated  $\alpha/\alpha$  genotypy of the *MEFV*-independent modifier factor *SAA1* gene.

### Treatment Response

TNF-blocking biological therapy was administered. After the third dose of Infliximab the clinical status of the two patients improved significantly. Patient no. 4

did not present a febrile syndrome during the whole year and patient no. 5 improved progressively and no longer needed a wheelchair. Though she presented two attacks during the year, they were shorter and less intense than before. CRP decreased progressively in both patients, especially in patient no. 4 who presents levels within the normal range. Infliximab tolerance was excellent in both patients, who now lead normal lives. After the initial positive experience with infliximab in patients no. 4 and 5, we decided to treat patient no. 2 who was receiving dialysis for renal amyloidosis. Initial response to infliximab was satisfactory, although the follow-up was too short to confirm the benefits of biological therapy in this patient. No specific side effects were observed.

## DISCUSSION

We describe the clinical features of a Spanish kindred with a severe hereditary periodic inflammatory disorder.

All affected family members were clinically diagnosed with FMF disease on the basis of clinical criteria. Severity scores for each patient were notably high (mean score 9.5) according to Pras' FMF disease severity score [Pras, 1998].

Molecular analysis of the *MEFV* gene revealed that a new mutation H478Y, located in exon 5 of the gene, was present in the heterozygous state in all patients, segregating with the disease and absent in all living healthy family members. However, since (a) all patients showed episodes with longer fever and articular pain duration and a more severe joint involvement than expected in a classical FMF phenotype (Table I); (b) the dominant inheritance of this kindred does not fit the classical recessive pattern of FMF transmission; and (c) none of the patients showed a favorable response to continuous colchicine treatment, which is the other major FMF diagnostic criteria, we screened for mutations in the two genes responsible for the dominantly inherited HPF syndromes TRAPS and FCU/FCAS/MWS. However, no mutations were found in either the *TNFRSF1A* gene or the *CIAS1/PYPAF1/NALP3* gene.

Few cases with dominant inheritance have been reported in FMF disease. All those described affected the M694 residue: the  $\Delta$ M694 mutation, a trinucleotide deletion in one single allele, was observed in FMF patients of two unrelated British families and the M694I-E148Q complex allele in two FMF unrelated families of Turkish and Indian origin [Booth et al., 2000]. The existence of a second mutation in the *MEFV* promoter region or in another gene in the present kindred seems to be highly unlikely, since this would necessarily mean a high prevalence of these mutations in the Spanish population for co-inheritance (with the H478Y *MEFV* mutation) to occur in each of the three generations of this kindred. Furthermore, the dominant mode of inheritance of the H478Y mutation was demonstrated by analyzing a set of intragenic polymorphisms, which led to the identification of different non-mutated *MEFV* alleles in each patient. Finally, RT-PCR experiments were performed to study whether mutations in the *MEFV* promoter region would abrogate *MEFV* mRNA

expression of the normal allele, revealing that both alleles were expressed in all patients. Pseudo-dominant inheritance has been described in certain populations where FMF is highly prevalent and marriages of a FMF patient to a *MEFV* carrier are frequent. However, this is not the case in the Spanish population [Touitou, 2001; and personal data]. All these data suggest that the H478Y mutation is the pathological variant responsible for the severe autosomal dominant periodic inflammatory phenotype seen in this kindred.

The H478Y *MEFV* variant produces a non-conservative substitution in a region comprising the coiled-coil domain of pyrin/marenostrin, the protein involved in FMF disease. This domain may be involved in protein-protein interactions [The International FMF consortium, 1997]. Thus, it is possible that the mutation would compromise pyrin function, either by impeding homodimerization with wild type pyrin or by abrogating interaction with other proteins. The full-length gene sequencing strategy adopted recently by some groups has increased the number of new *MEFV* mutations along the entire gene sequence [Bernot et al., 1998]. Most of them are private mutations found in non-ancestral populations that may also cause severe FMF disease [Touitou, 2001]. Recently, new SNPs (E474E, Q476Q, R501R, I506I, D510D) and true FMF causing mutations (E474K, F479L, V487M, R501G; Infevers data base) have been described in exon 5 suggesting the functional importance of this domain. Further studies are needed to broaden our understanding of the physiopathological role of these variants.

Previous reports have shown male sex to be an *MEFV*-independent modifying factor for FMF. The risk of renal amyloidosis was four times higher in males than in females, particularly in those patients who did not carry the M694V homozygous phenotype [Cazeneuve et al., 2000; Gershoni-Baruch et al., 2003]. Additionally, clinical manifestations of FCAS/MWS disease in an Indian kindred were milder in females than in males, and no affected female was known to have developed amyloidosis [McDermott et al., 2000]. Although the kindred we describe here is a small one, it is interesting that the male patient's clinical symptoms were far milder than those of the females, who, in addition, developed amyloidosis at the age of  $\sim$ 50. Further studies are needed to understand the physiology by which the patient's sex can modify the risk of amyloidosis in FMF patients.

Finally, in order to investigate the presence of the amyloidosis-associated *SAA1*  $\alpha/\alpha$  genotype [Cazeneuve et al., 2000] in the two patients who developed renal amyloidosis (no. 1 and 2) and to assess the genetic risk of amyloid deposition of the younger carriers (no. 4 and 5), the *MEFV*-independent modifier factor *SAA1* gene polymorphism was analyzed. None of the patients were carriers of the amyloidosis-associated *SAA1*  $\alpha/\alpha$  genotype, which suggests that renal amyloidosis in these patients could have been caused by the severe effect of the H478Y mutation itself.

Taken together, both the clinical features of the present kindred and the genetic data raise the question of whether the periodic autoinflammatory disorder seen in these patients can actually be considered a

different *MEFV*-associated periodic inflammatory disorder, which would be dominantly inherited. In this connection, there are some examples of allelic diseases among the same group of HPF syndromes. Thus, mutations in the *CIAS1/PYPAF1/NALP3* gene result in the phenotypically similar, yet distinct, periodic fever disorders of FCU/FCAS and MWS [Hoffman et al., 2001]. Furthermore, the R260W mutation was identified in two families with MWS and in two families with FCAS of different ethnic origins [Dode et al., 2002]. Furthermore, the V200M variant, was reported in a family with FCU/FCAS [Hoffman et al., 2001] and in an unrelated MWS kindred [Aganna et al., 2002], demonstrating that a single *CIAS1/PYPAF1/NALP3* mutation may cause both syndromes. The phenotypical variation between these two conditions with the same apparent genetic basis may reflect subtle differences in the effects of different mutations or may be the result of differing genetic backgrounds or environmental factors [Hoffman et al., 2001]. Interestingly, the D303N mutation may result in MWS and also in a third *CIAS1/PYPAF1/NALP3*-associated disorder named CINCA/NOMID (Chronic Infantile Neurologic Cutaneous and Articular syndrome/neonatal onset multisystem inflammatory disease), an original entity defined by neonatal onset and a unique cluster of manifestations, including chronic polymorphonuclear cell meningitis, as well as the severe and characteristic joint manifestations, also caused by mutations in the *CIAS1/PYPAF1/NALP3* gene [Feldmann et al., 2002].

Colchicine administration is the main therapy for FMF patients. In most cases it is able to control periodic attacks and prevent amyloid deposition, although it is relatively less effective in controlling joint involvement [Ben-Chetrit and Levy, 1998]. In view of the colchicine resistance in the present kindred and the severity of the disease associated with AA amyloidosis, biological therapy against TNF $\alpha$  was proposed, based on the important role of this cytokine in the pathogenesis of FMF and in the development of AA amyloidosis. Biological therapy blocks TNF $\alpha$  activity through a monoclonal antibody against TNF $\alpha$  (infliximab) or with the TNF $\alpha$  soluble receptor (etanercept) and has shown high efficacy in the treatment of rheumatoid arthritis, Crohn's disease, and spondyloarthropathy [Criscione and St-Clair, 2002]. Although the number of patients in the present study is limited and the follow-up short, the response to infliximab therapy in this kindred was clinically impressive, especially in the two young females. Both had a very severe form of HPF syndrome; infliximab treatment dramatically improved their clinical condition, completely blocked the periodic attacks, and even normalized the CRP in one patient (no. 4). Some reports have demonstrated the high efficacy of biological therapy in selective and severe cases, but experience with this therapy in amyloid diseases as well as in HPF syndromes is still limited [Drewe et al., 2000; Hull et al., 2002]. Thus, though the two younger patients currently lead normal lives, longer follow-up is necessary to confirm the benefits of infliximab in this family, especially as far as the prevention of AA amyloidosis is concerned.

Our results show that the H478Y *MEFV* mutation is a new variant associated with a severe autosomal-dominant periodic autoinflammatory disorder with AA amyloidosis, suggesting that this residue may play an important role in pyrin/marenostrin function. There are three main conclusions. First, the H478Y variant is a dominant-pathological *MEFV* variant. Second, full-length *MEFV* gene sequencing is needed to obtain adequate diagnosis of patients with clinical suspicion of a HPF syndrome, particularly patients from non-ancestral populations, in which private mutations are more frequent. Furthermore, we agree with many authors that the genetic diagnosis of HPF syndromes should be introduced in future revisions of the diagnostic criteria [Cazeneuve et al., 1999]. Third, mutations in the *MEFV* gene may also be responsible for an autosomal-dominant periodic inflammatory disorder accompanied by renal AA amyloidosis. Finally, administration of TNF biological therapy may be an alternative treatment in patients with this aggressive phenotype and colchicine unresponsiveness.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are particularly grateful to all family members who agreed to participate in the study.

## REFERENCES

- Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, Lachmann HJ, Gaudet R, Woo P, Feighery C, Cotter FE, Thome M, Hitman GA, Tschopp J, McDermott MF. 2002. Association of mutations in the *NALP3/CIAS1/PYPAF1* gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum* 46:2445–2452.
- Anonymous. 1999. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 25-1999. A 16-year-old boy with recurrent abdominal pain. *N Engl J Med* 341:593–599.
- Ben-Chetrit E, Levy M. 1998. Colchicine: 1998 update. *Semin Arthritis Rheum* 28:48–59.
- Bernot A, da-Silva C, Petit JL, Cruaud C, Caloustian C, Castet V, Ahmed-Arab M, Dross C, Dupont M, Cattani D, Smaoui N, Dode C, Pecheux C, Nedelec B, Medaxian J, Rozenbaum M, Rosner I, Delpech M, Grateau G, Demaille J, Weissenbach J, Touitou I. 1998. Non-founder mutations in the *MEFV* gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 7:1317–1325.
- Booth DR, Gillmore JD, Booth SE, Pepys MB, Hawkins PN. 1998. Pyrin/marenostrin mutations in familial Mediterranean fever. *QJM* 91:603–606.
- Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soyuturk M, Akar S, Pepys MB, Tunca M, Hawkins PN. 2000. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM* 93:217–221.
- Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, Dervichian M, Nedelec B, Reinert P, Ayvazyan A, Kouyoumdjian JC, Ajrapetyan H, Delpech M, Goossens M, Dode C, Grateau G, Amselem S. 1999. *MEFV*-Gene analysis in Armenian patients with Familial Mediterranean fever: Diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 65:88–97.
- Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, Roudot-Thoraval F, Genevieve D, Mndjoyan E, Papazian M, Sarkisian A, Babloyan A, Boissier B, Duquesnoy P, Kouyoumdjian JC, Girodon-Boulandet E, Grateau G, Sarkisian T, Amselem S. 2000. Identification of *MEFV*-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 67:1136–1143.
- Criscione LG, St-Clair EW. 2002. Tumor necrosis factor-alpha antagonists for the treatment of rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 14:204–211.
- Dode C, Le Du N, Cuisset L, Letourneur F, Berthelot JM, Vaudour G, Meyrier A, Watts RA, Scott DG, Nicholls A, Granel B, Frances C,

- Garcier F, Edery P, Boulinguez S, Domergues JP, Delpech M, Grateau G. 2002. New mutations of *CIAS1* that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: A novel mutation underlies both syndromes. *Am J Hum Genet* 70:1498–1506.
- Drenth JP, Cuisset L, Grateau G, Vasseur C, Van-de-Velde-Visser SD, de-Jong JG, Beckmann JS, Van-der-Meer JW, Delpech M. 1999. Mutations in the gene encoding mevalonate kinase cause hyper-IgD and periodic fever syndrome. International Hyper-IgD Study Group. *Nat Genet* 22:178–181.
- Drewe E, McDermott EM, Powell RJ. 2000. Treatment of the nephrotic syndrome with etanercept in patients with the tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *N Engl J Med* 343:1044–1045.
- Feldmann J, Prieur AM, Quartier P, Berquin P, Cortis E, Teillac-Hamel D, Fischer A. 2002. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in *CIAS1*, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am J Hum Genet* 71:198–203.
- Gershoni-Baruch R, Brik R, Lidar M, Shinawi M, Livneh A. 2003. Male Sex Coupled with Articular Manifestations Cause a 4-fold Increase in Susceptibility to Amyloidosis in Patients with Familial Mediterranean Fever Homozygous for the M694V-*MEFV* Mutation. *J Rheumatol* 30:308–312.
- Grateau G, Pecheux C, Cazeneuve C, Cattani D, Dervichian M, Goossens M, Delpech M, Amselem S, Dode C. 2000. Clinical versus genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *QJM* 93:223–229.
- Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 29:301–305.
- Houten SM, Kuis W, Duran M, de-Koning TJ, Van-Royen-Kerkhof A, Romeijn GJ, Frenkel J, Dorland L, de-Barse MM, Huijbers WA, Rijkers GT, Waterham HR, Wanders RJ, Poll-The BT. 1999. Mutations in *MVK*, encoding mevalonate kinase, cause hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Nat Genet* 22:175–177.
- Hull KM, Drewe E, Aksentijevich I, Singh HK, Wong K, McDermott EM, Dean J, Powell RJ, Kastner DL. 2002. The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): Emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine (Baltimore)* 81:349–368.
- Livneh A, Drenth JP, Klasen IS, Langevitz P, George J, Shelton DA, Gumucio DL, Pras E, Kastner DL, Pras M, Van-der-Meer JW. 1997. Familial Mediterranean fever and hyperimmunoglobulinemia D syndrome: Two diseases with distinct clinical, serologic, and genetic features. *J Rheumatol* 24:1558–1563.
- McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, Mansfield E, Gadina M, Karenko L, Pettersson T, McCarthy J, Frucht DM, Aringer M, Torosyan Y, Teppo AM, Wilson M, Karaarslan HM, Wan Y, Todd I, Wood G, Schlimgen R, Kumarajeewa TR, Cooper SM, Vella JP, Kastner DL, et al. 1999. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 97:133–144.
- McDermott MF, Aganna E, Hitman GA, Ogunkolade BW, Booth DR, Hawkins PN. 2000. An autosomal dominant periodic fever associated with AA amyloidosis in a north Indian family maps to distal chromosome 1q. *Arthritis Rheum* 43:2034–2040.
- Moriguchi M, Terai C, Koseki Y, Uesato M, Nakajima A, Inada S, Nishinarita M, Uchida S, Kim SY, Chen CL, Kamatani N. 1999. Influence of genotypes at *SAA1* and *SAA2* loci on the development and the length of latent period of secondary AA-amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 105:360–366.
- Nir-Paz R, Ben-Chetrit E, Pikarsky E, Hassin D, Hasin Y, Chajek-Shaul T. 2000. Unusual presentation of familial Mediterranean fever: Role of genetic diagnosis. *Ann Rheum Dis* 59:836–838.
- Pras M. 1998. Familial Mediterranean fever: From the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scand J Rheumatol* 27:92–97.
- Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. 1967. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 43:227–253.
- The French FMF Consortium. 1997. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet* 17:25–31.
- The International FMF Consortium. 1997. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 90:797–807.
- Toutou I. 2001. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 9:473–483.

## CONCLUSIONS

1. La mutació H478Y, situada a l'exó 5 del gen *MEFV*, és una nova variant d'aquest gen detectada en una família espanyola diagnosticada de FMF per criteris clínics, que actua com una mutació patològica.
2. En contra del patró clàssic recessiu de la FMF, la mutació H478Y està associada a un patró d'herència autosòmic dominant
3. La variant H478Y està associada a una síndrome inflamatòria periòdica amb una clínica de FMF completament atípica: episodis inusualment llargs, component articular predominant i molt sever, i resistència al tractament amb colquicina.

Aquests fets plantegen la qüestió si el fenotip dels pacients d'aquesta família és el d'una FMF amb manifestacions atípiques o bé una entitat *FMF-like* associada al gen *MEFV*. Anàlogament al que s'observa amb les mutacions al gen *CIAS1/NALP3/PYPAF1*, que poden causar les síndromes de MWS, FCAS/FCU o bé el CINCA/NOMID, les mutacions al *MEFV* no només serien les causants de la FMF, sinó d'almenys una segona entitat (o fenotip) inflamatòria.

4. Les mutacions al gen *MEFV* no es restringeixen a l'exó 10 i és necessària l'anàlisi de la totalitat dels exons del gen.
5. L'anàlisi mutacional s'hauria d'incloure com a criteri diagnòstic de la FMF.
6. El tractament amb bloquejants del TNF pot ser una alternativa terapèutica per als pacients amb clínica de FMF severa i/o resistents a la colquicina.









## CAPÍTOL 3:

### **Estudi de l'efecte patogènic de la variant I591T en un pacient espanyol de FMF: evidències de l'existència de factors modificadors de la FMF**

L'objectiu del següent treball va ser aprofundir en l'estudi genètic d'un pacient de FMF heterocigot per la mutació M694I del gen *MEFV*, per tal d'explicar el motiu de la manifestació de la malaltia amb, aparentment, una sola còpia del gen mutada.

L'estudi inicial del *MEFV* en aquest pacient va consistir inicialment en l'amplificació i seqüenciació de l'exó 10 del gen i de les regions intròniques flanquejants, doncs és on es concentren les mutacions descrites fins al moment. Es va detectar la mutació M694I en només un dels al·lels. Es va abordar l'anàlisi de la resta dels exons per tal de detectar una possible mutació en zones no descrites a l'altre al·lel, que expliqués la manifestació de la malaltia en el pacient, i es va detectar la variant I591T, situada a l'exó 9. L'anàlisi dels pares rebel·là que la M694I l'heretava del pare i la I591T de la mare i, per tant, que el pacient era heterocigot compost M694I/ I591T.

S'acabava de publicar la detecció de la variant I591T del *MEFV* en un sol cromosoma, pertanyent a un pacient de FMF Francès. Malgrat això, no es coneixia el genotip amb el qual s'havia trobat ni la clínica que se li associava, o si podria ser un polimorfisme. Es van analitzar 200 cromosomes de la població control espanyola i es va concloure que I591T no era un polimorfisme a la nostra població, almenys freqüent (<0,5%). Per tal d'estudiar la segregació de la malaltia amb la variant I591T, es va realitzar l'estudi familiar. Sorprenentment, es va observar que mentre els tres germans tenien el mateix genotip M694I/ I591T, només un (el pacient índex) manifestava la malaltia, la qual cosa indicava que el genotip no segregava completament amb la FMF.

#### ***Efecte de la variant I591T***

Es va formular la hipòtesi de l'existència de factors genètics modificadors que actuessin sobre el genotip M694I/I591T i que fessin que només un dels individus portador del genotip manifestés la malaltia. Per exemple, s'acabava de descriure l'existència de dues variants polimòrfiques en el gen responsable de la síndrome de TRAPS, i s'especulava sobre la possibilitat que poguessin actuar inespecíficament com a variants al·lèliques inductores de processos inflamatoris. No es va detectar cap variant

al·lèlica en cap dels gens de SHFP ni en el pacient ni en els germans sans. El sexe tampoc no semblava jugar un paper diferencial, doncs en els dos germans no afectats, els dos sexes estaven igualment representats. En quant a l'edat, els dos germans no afectats eren més grans que el germà simptomàtic i, tot i que no es pot descartar que no puguin desenvolupar la malaltia en un futur, l'edat actual d'aquests, que està al voltant de la trentena, fa poc probable que la manifestin.

L'efecte de la variant I591T és difícil d'establir amb les dades actuals. Situada a l'exó 9, es tracta d'un canvi situat en una regió propera a la del domini B30.2, implicat en la putativa funció transcripcional i/o nuclear de la P/M. Caldria l'estudi de més famílies portadores de la variant per tal de treure'n alguna conclusió, així com aprofundir en el coneixement sobre la funcionalitat de la P/M. Existeixen però varies hipòtesis que expliquen el possible paper d'aquesta variant:

Hipòtesi 1. La I591T és un polimorfisme totalment innocu i la clínica del pacient és un efecte de la M694I, que actuaria com a variant dominant manifestant-se en el pacient per l'acció de factors desencadenants. L'existència de diferències en factors modificadors de l'expressió de la FMF determinaria que la M694I desencadenés la malaltia en el pacient i que "protegís" els germans i el pare.

Hipòtesi 2. La I591T no és innòcua i té un efecte additiu al de la mutació M694I que fa que el pacient manifesti la malaltia. El fenotip associat a M694I/ I591T és força lleu, a jutjar per la resposta a la colquicina, als episodis lleus i al no desenvolupament d'amiloïdosi que s'observa en el pacient. Ara bé, la penetrància de la variant seria incompleta, de manera que la FMF no es manifestaria en els germans. Alhora, la penetrància de I591T es veuria influenciada per l'existència de variants en altres gens o factors modificadors.

## LETTER TO THE EDITOR

I591T MEFV Mutation in a Spanish Kindred:  
Is It a Mild Mutation, a Benign Polymorphism,  
or a Variant Influenced by Another Modifier?

Anna Aldea,<sup>1</sup> Jordi Casademont,<sup>2</sup> Juan I. Aróstegui,<sup>1</sup> Josefa Rius,<sup>1</sup> Montserrat Masó,<sup>1</sup> Jordi Vives,<sup>1</sup>  
and Jordi Yagüe<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Servei d'Immunologia, Institut d'Infeccions i Immunologia (ICII), Hospital Clínic, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Servei de Medicina Interna, Hospital Clínic, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Communicated by Richard G.H. Cotton

Familial Mediterranean fever (FMF, MIM# 249100) is an autosomal recessive disease described mostly in the Mediterranean area and characterized by recurrent febrile episodes in association with peritonitis, pleuritis, and arthritis. In 1997, the gene responsible for FMF disease, the *MEFV* gene [French FMF Consortium, 1997; International FMF Consortium, 1997], was cloned. Today more than 25 *MEFV* mutations have been reported and those occurring in exon 10, especially at the M694 position, have a high penetrance and a severe impact on the course of the disease. In particular, the M694V mutation correlates with a higher amyloidosis risk and severe phenotype in certain populations [Cazeneuve et al., 1999]. Furthermore, the M694I severe mutation may also be amyloidogenic [Mansour et al., 2001]. Finally, the deletion of this codon in one single allele gives rise to the FMF phenotype and a true dominant transmission of the disease [Booth et al., 2000]. However, mild mutations such as E148Q, K695R, and P369S have also been described in the *MEFV* gene [Aksentjevich et al., 1999]. Among these, the E148Q variant may affect the patient phenotype, depending on the genetic background. It has therefore been suggested that E148Q is a functional polymorphism [Touitou, 2001].

Here, we report a Spanish kindred where the proband was the only one of three siblings to have FMF symptoms, though all three carry the I591T/M694I genotype. The index case, a 25-year-old male, presented the first clinical symptoms of FMF at the age of 19. Recurrent attacks consisted of bouts of fever up to 39°C with 24 to 48 hr of duration, occurring weekly at the beginning but monthly during the course of the disease. Fever was accompanied by abdominal pain and sinovitis, though no erisipela, pleuritis, myalgia, lymphadenopathies, or arthritis

were observed. Renal function was normal and no amyloid deposition was observed. All symptoms remitted completely after colchicine treatment (1mg/day).

Comprehensive genetic analyses of the *MEFV* gene were performed in all members of the family. The analyses consisted in PCR amplification and automated sequencing of exon and intron boundaries of the complete gene sequence [International FMF Consortium, 1997]. The results showed that the mother was a healthy carrier of the I591T mutation and that the father, also asymptomatic, was a M694I carrier (Fig. 1). All the descendants were I591T/M694I compound heterozygous but, surprisingly, only the younger son showed clinical FMF phenotype. The two siblings, now aged 34 and 35, have never manifested any disease symptom.

We considered the possibility that the proband might have segregated, by chance, with another hereditary periodic fever syndrome such as TRAPS (TNF receptor-associated periodic syndromes; MIM# 142680) due to the fact that the R92Q and P46L *TNFRSF1A* (MIM# 191190) mutations have both been shown to be present in the normal population [Aksentjevich et al., 2001]. Following McDermott et al. [1999] exons 3 and 4 of the *TNFRSF1A* gene

Received 11 February 2002; accepted revised manuscript 15 March 2002.

\*Correspondence to: Jordi Yagüe, M.D., Ph.D., Servei d'Immunologia, Hospital Clínic Barcelona, c/ Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: jyague@clinic.ub.es

Contract grant sponsor: Marató TV3; Contract grant number: 003110.

DOI: 10.1002/humu.10103

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

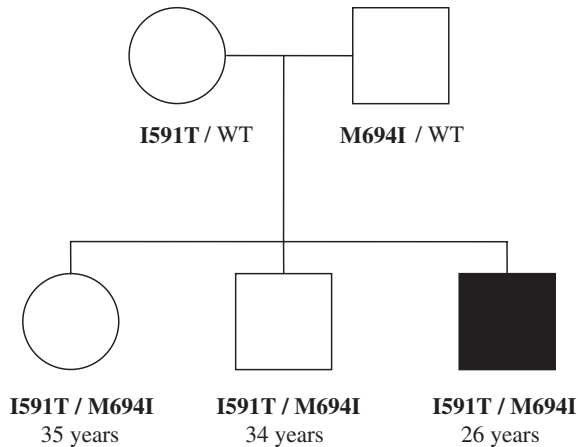


FIGURE 1. Pedigree of the Spanish kindred with FMF bearing the I591T MEFV mutation.

were sequenced for this purpose but neither variant was detected in any family member. Finally, we tested the proband genetically for the MEFV-independent genetic modifier *SAA1* (MIM# 104750) [Moriguchi et al., 1999], in order to assess his susceptibility to amyloidosis in the future [Cazeneuve et al., 2000]. The results show that the proband is a *SAA1* $\alpha/\gamma$  carrier, and therefore does not bear the *SAA1*  $\alpha/\alpha$  susceptibility genotype.

Although the I591T MEFV mutation was first described as located in exon 9 [Touitou, 2001], no data on its clinical effect have been described to date. Since our knowledge of the structure and function of pyrin, the MEFV product, is limited, the functional consequences (and therefore the clinical implications) of this mutation are unknown. However, the differential manifestation of the disease in these siblings, the fact that no severe FMF manifestation such as amyloid deposition was observed in the proband, and the good response to colchicine treatment at minimal doses (1 mg/day), suggest that the I591T MEFV mutation may be a mild mutation with low penetrance. Thus, the presence of allelic variants in other inflammation-related genes or modifier factors of MEFV gene would be critical in the manifestation of the FMF disease in the proband.

Alternatively, it may be that the I591T mutation has no clinical effect and can be considered as a benign polymorphism. Indeed, other authors have questioned about at least one other MEFV mutation reported to be a causing FMF variant: the E148Q variant has been detected in disease-free individuals homozygous to this mutation [Ben-Chetrit et al., 2000]. If this is the case, the FMF phenotype seen in the patient would have been caused by the M694I severe mutation acting as a dominant mutation with variable penetrance, triggered by exogenous factors not present in his siblings. In this connection, it has recently been recognized that MEFV mutations

affecting only one single allele can give rise to FMF, especially when the M694 residue is affected [Booth et al., 2000]. Furthermore, it has been strongly suggested that dominant transmission and incomplete penetrance of the disease phenotype should be taken into account when FMF families are investigated genetically [Cazeneuve et al., 1999]. Further studies of I591T mutation-bearing FMF families are needed to assess the relevance of this mutation on the clinical manifestation of the FMF phenotype and to establish whether the I591T mutation is a mild mutation, a benign polymorphism, or a variant influenced by other modifier factors.

## REFERENCES

- Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J, Centola M, Pras E, Chae JJ, Oddoux C, Wood G, Azzaro MP, Palumbo G, Giustolisi R, Pras M, Ostrer H, Kastner DL. 1999. Mutation and haplotype studies of familial Mediterranean fever reveal new ancestral relationships and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 64:949–962.
- Aksentijevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, Oh HH, Goldbach-Mansky R, Dean J, Athreya B, Reginato AJ, Henrickson M, Pons-Estel B, O'Shea JJ, Kastner DL. 2001. The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in *TNFRSF1A*, ancestral origins, genotype–phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum Genet* 69:301–314.
- Ben-Chetrit E, Lerer I, Malamud E, Domingo C, Abeliovich D. 2000. The E148Q mutation in the MEFV gene: is it a disease-causing mutation or a sequence variant? *Mutations in brief #313*. Online. *Hum Mutat* 15:385–386.
- Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soytorok M, Akar S, Pepys MB, Tunca M, Hawkins PN. 2000. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM* 93:217–21.
- Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, Dervichian M, Nedelec B, Reinert P, Ayzvazyan A, Kouyoumdjian JC, Ajrapetyan H, Delpech M, Goossens M, Dode C, Grateau G, Amselem S. 1999. MEFV-gene analysis in Armenian patients with familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype—genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 65:88–97.
- Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, Roudot-Thoraval F, Genevieve D, Mndjoyan E, Papazian M, Sarkisian A, Babloyan A, Boissier B, Duquesnoy P, Kouyoumdjian JC, Girodon-Boulandet E, Grateau G, Sarkisian T, Amselem S. 2000. Identification of MEFV-independent modifying factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 67:1136–1143.
- French FMF Consortium. 1997. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet* 17:25–31.
- International FMF Consortium. 1997. Ancient missense mutations in a number of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 90:797–807.

- Mansour I, Delague V, Cazeneuve C, Dode C, Chouery E, Pecheux C, Medlej-Hashim M, Salem N, El-Zein L, Levan-Petit I, Lefranc G, Goossens M, Delpech M, Amselem S, Loiselet J, Grateau G, Megarbane A, Naman R. 2001. Familial Mediterranean fever in Lebanon: mutation spectrum, evidence for cases in Maronites, Greek Orthodoxes, Greek Catholics, Syriacs and Shiites and for an association between amyloidosis and M694V and M694I mutations. *Eur J Hum Genet* 9:51–55.
- McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, Mansfield E, Gadina M, Karenko L, Pettersson T, McCarthy J, Frucht DM, Aringer M, Torosyan Y, Teppo AM, Wilson M, Karaarslan HM, Wan Y, Todd I, Wood G, Schlimgen R, Kumarajeewa TR, Cooper SM, Vella JP, Amos CI, Mulley J, Quane KA, Molloy MG, Ranki A, Powell RJ, Hitman GA, O'Shea JJ, Kastner DL. 1999. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 97:133–144.
- Moriguchi M, Terai C, Koseki Y, Uesato M, Nakajima A, Inada S, Nishinarita M, Uchida S, Nakajima A, Yoon Kim Y, Chen C-L, Kamatani N. 1999. Influence of genotypes at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of secondary AA-amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 105:360–366.
- Touitou I. 2001. The spectrum of familial Mediterranean fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 9:473–483.



## **CONCLUSIONS**

1. Existeixen mutacions del gen *MEFV*, associades a malaltia, que estan situades en altres exons a part de l'exó 10. L'extensió de l'estudi genètic del *MEFV* a la totalitat dels 10 exons en pacients amb diagnòstic clínic de FMF incrementa el nombre de pacients diagnosticats a nivell genètic.
2. I591T pot ser un polimorfisme benigne, una mutació lleu i/o estar influenciada per factors modificadors com variants en altres gens SHFP o d'altres.
3. Les bases genètiques de la FMF poden ser més complexes que les d'una malaltia estrictament monogènica, podent existir variants polimòrfiques i factors modificadors de la penetrància de certes variants al·lèliques que dificultin l'establiment d'associacions genotip/fenotip.







## CAPÍTOL 4:

### **Estudi de la presència de mutacions en altres gens causants de SHFP, en pacients Espanyols clínicament diagnosticats de FMF i sense mutacions al *MEFV***

Les manifestacions clíniques que caracteritzen les diferents SHFP presenten similituds evidents, alhora que estan subjectes a variacions, tan individuals com poblacionals. La laxitud dels criteris clínics pel diagnòstic de la FMF, discutida en capítols anteriors, fa plausible que alguns dels pacients espanyols clínicament diagnosticats de FMF sense mutacions al *MEFV*, siguin portadors de mutacions en algun dels gens responsables de les SHFP.

En base a aquesta argumentació es va abordar l'anàlisi dels gens responsables d'altres SHFP — *MVK*, *CIAS1/NALP3/PYPAF1* i *TNFRSF1A* — en els pacients no mutats (PNM) diagnosticats clínicament de FMF.

De l'estudi de 47 pacients no mutats (PNMs) diagnosticats de FMF per criteris clínics, el 96% (45) no portaven mutacions en cap dels gens analitzats.

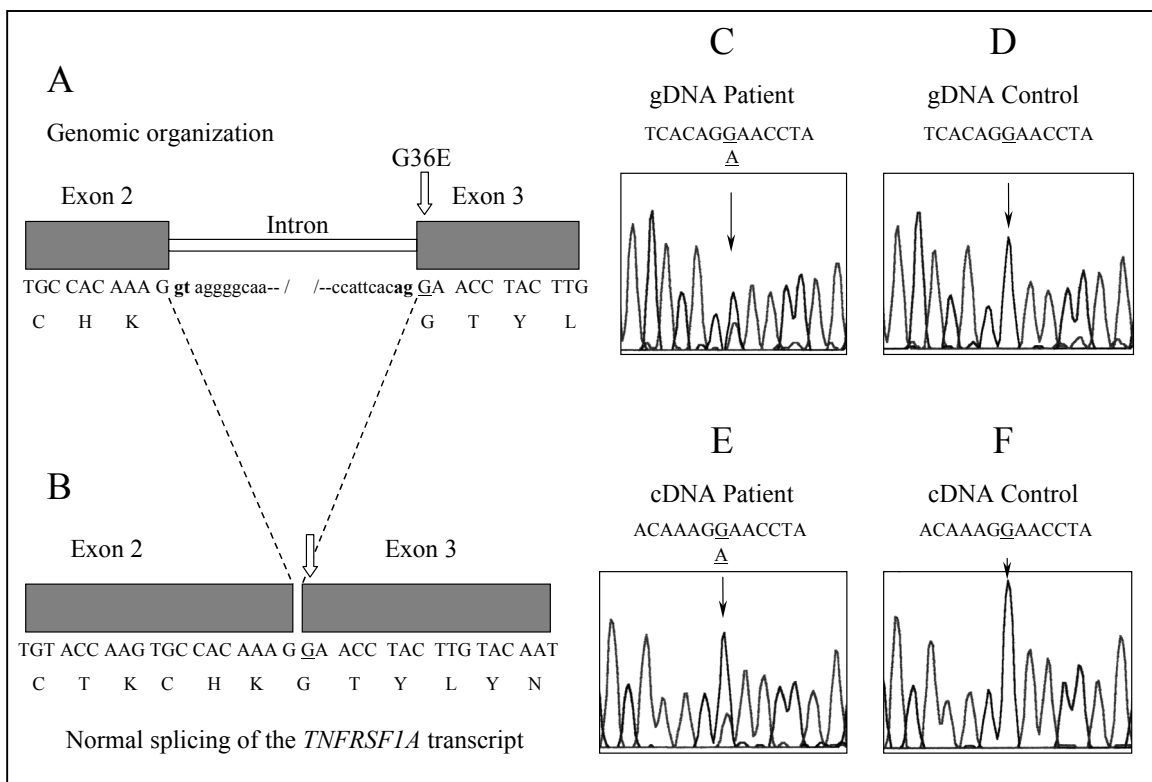
En dos casos (4%) es varen detectar mutacions en el gen *TNFRSF1A*, responsable de la síndrome autosòmica dominant TRAPS. No es varen detectar mutacions en els altres gens, ni al *CIAS1/NALP3/PYPAF1* ni *MVK* en cap dels pacients de FMF no mutats. Els resultats d'aquest treball van donar lloc a una col·laboració internacional, fruit de la qual es va generar la publicació que s'adjunta en aquest mateix capítol.

El primer cas, es tractava d'un nen de 5 anys diagnosticat clínicament de FMF als 2 anys d'edat, sense mutacions al *MEFV*, i que no responia al tractament amb colquicina. Es va detectar la mutació G36E a l'exó 3 del *TNFRSF1A* en un dels al·lels, produïda per el canvi G>A al primer nucleòtid de l'exó (Fig. 1). El fet de no tenir història familiar feia pensar que G36E podia ser una mutació amb penetrància incompleta. Cap dels progenitors eren portadors de la variant i tampoc no es va detectar en 200 cromosomes de la població control, la qual cosa suggeria que G36E era, com altres mutacions del *TNFRSF1A*, una mutació *de novo* associada a la disfunció del receptor, i per tant al TRAPS.

Es va estudiar la causalitat de la variant G36E en el pacient, mesurant els valors de receptor soluble (sTNFR) per ELISA. Els nivells eren normals entre les crisis (1.761 pg/ml), i lleugerament alts, de l'ordre del doble del límit superior dels valors normals, en un dels episodis que va patir el pacient (3.717 pg/ml, taula 1 de l'article). Malgrat els valors de sTNFR en el pacient no han demostrat la causalitat patogènica de la variant, és possible que la mutació actuï per mecanismes diferents de la unió al lligand o al mecanisme de l'alliberament del receptor, com s'ha proposat que succeeix en altres mutacions del mateix gen, també associades al TRAPS.

La detecció d'una mutació en el TNFR va permetre el diagnòstic correcte de TRAPS en el pacient i, com a conseqüència, la possibilitat de reorientar la pauta terapèutica amb agents biològics bloquejants del TNF, amb una resposta satisfactòria.

Figura 1. A i B, Esquematització de la regió exònica on es localitza la mutació G36E en el DNA genòmic i el cDNA. C-F Seqüència genòmica i del cDNA de la mutació G36E en el pacient i en un control.

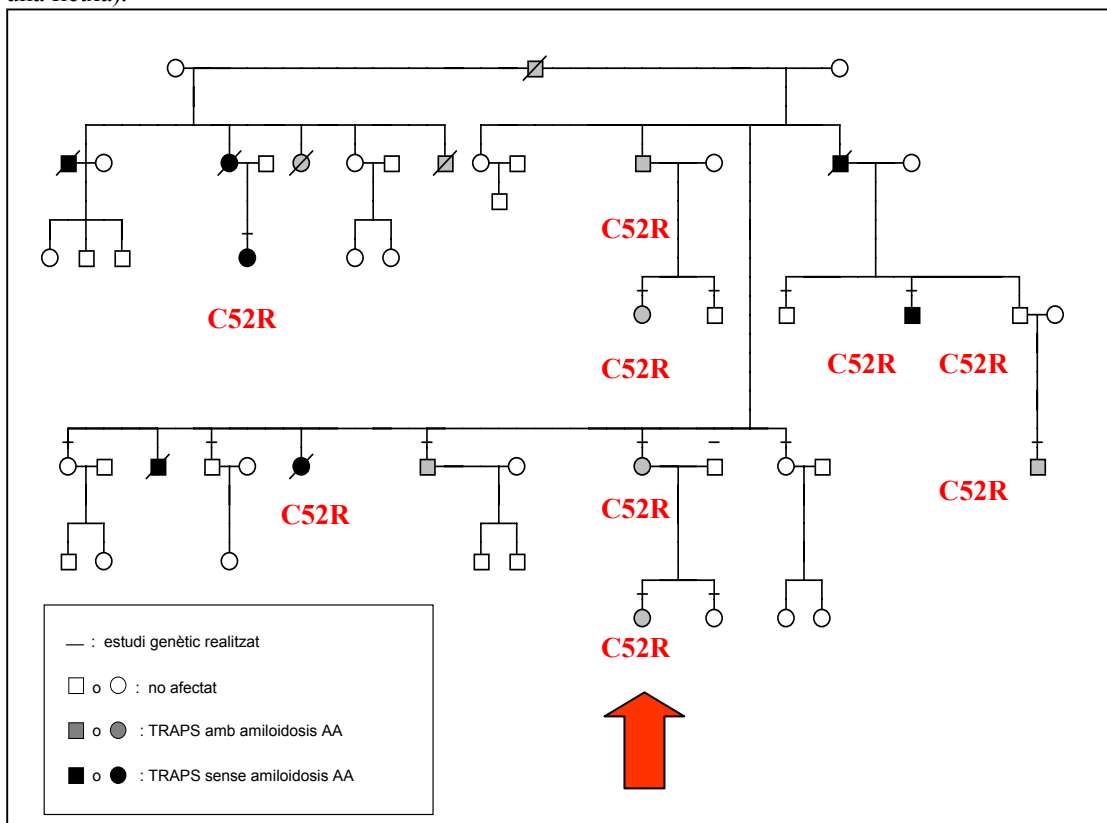


El segon cas es tractava d'una pacient de 18 anys que debutà als 15 anys amb un quadre compatible amb la FMF segons els criteris de TH. La resposta de la pacient al tractament amb colquicina era parcial doncs els episodis inflamatoris, tot i que de forma menys intensa i distanciada en el temps, seguien persistent. La pacient pertanyia a una

família gran de 4 generacions, a la qual hi havia 8 membres diagnosticats de FMF en l'actualitat, i a causa de la qual havien mort 8 membres més (Fig.2). La família havia estat publicada com a família afectada de FMF l'any 1980 a *Anales Españoles de Pediatría* 13(9): 785-788 amb el títol: "FMF". A l'article fins i tot es descriu que dintre la família hi havia 2 fenotips de FMF: el fenotip sever (amb el desenvolupament d'amiloïdosi entre els 30-35 anys) i el fenotip no sever (sense presència d'amiloïdosi).

L'anàlisi del *TNFRSF1A* en el present estudi detectà la mutació C52R a l'exó 2, una substitució de la cisteïna 52 per arginina, no descrita anteriorment. La mutació afectava el mateix residu que la mutació C52F, publicada en el moment de la clonació del gen *TNFRSF1A* i associada a la disfunció del receptor: la variant C52F causava la disminució dels nivells de TNFRs respecte als normals i el defecte de l'alliberament fisiològic del receptor (en anglès, *shedding*) observat en assaigs *in vitro*: del 75% al 23% d'expressió després d'estimular amb PMA.

Figura 2. Pedigrí de l'afectació de TRAPS a la família de la pacient portadora de C52R (indicada amb una fletxa).



La nova mutació C52R, s'associava a les manifestacions inflamatòries en tots els familiars afectats, a excepció d'un portador asimptomàtic, i no es detectava en cap dels individus sans. Malgrat no observar-se cap efecte sobre l'alliberament funcional del receptor al estimular els monòcits de la pacient (Fig.3), la relació de C52R amb la síndrome autoinflamatòria quedava demostrada per la segregació de la variant amb la manifestació de la malaltia, i la correlació amb els nivells de TNFRs, que eren baixos en tots els portadors de C52R, fins i tot en el no simptomàtic (Taula 1 de l'article, individu 5-III-6, 477 pg/ml). Els valors de TNFRs de la pacient mesurats entre les crisis eren inferiors als normals, oscil·lant d'entre 323 a 746 pg/ml (Taula 1 de l'article) i augmentaven discretament durant les crisis, però mai superaren els valors normals (1.278 pg/ml).

La detecció de la mutació al gen responsable del TRAPS va permetre diagnosticar correctament la pacient.

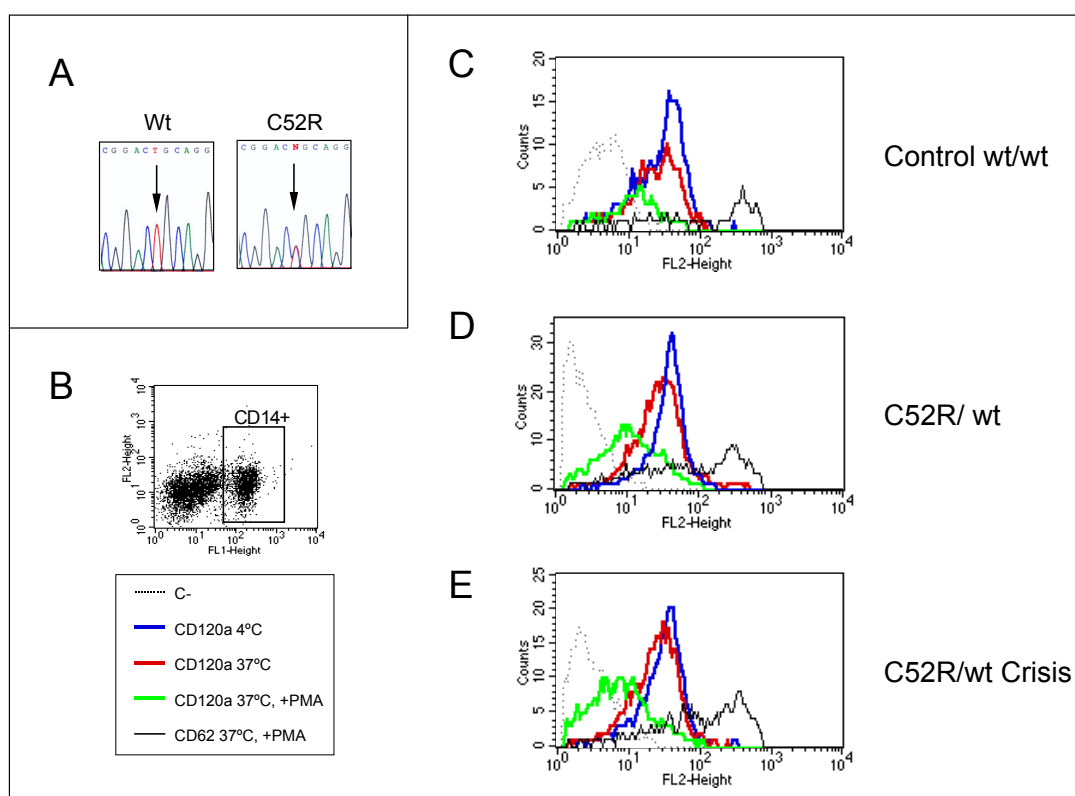


Figura 3. Expressió del TNFR1 en la superfície dels monòcits i resultats de l'assaig de l'alliberament del TNFR1 al medi extracel·lular (*shedding assay*). A, població monocítica, caracteritzada per l'expressió de la molècula CD14+, en base a la qual s'ha analitzat l'expressió del TNFR1. B, control corresponent a un familiar no mutat de la pacient. C, familiar de la pacient portadora de C52R però totalment asimptomàtica degut al tractament. D, pacient portador de C52R durant una de les crisis. La molècula CD62L no relacionada amb el TNFR1 s'ha utilitzat en tots els casos com a control positiu de *shedding* induït per PMA.



## Heterogeneity Among Patients With Tumor Necrosis Factor Receptor–Associated Periodic Syndrome Phenotypes

Ebun Aganna,<sup>1</sup> Linda Hammond,<sup>1</sup> Philip N. Hawkins,<sup>2</sup> Anna Aldea,<sup>3</sup> Shane A. McKee,<sup>4</sup> Hans Kristian Ploos van Amstel,<sup>5</sup> Claudia Mischung,<sup>6</sup> Koichi Kusuhara,<sup>7</sup> Frank T. Saulsbury,<sup>8</sup> Helen J. Lachmann,<sup>2</sup> Alison Bybee,<sup>2</sup> Elizabeth M. McDermott,<sup>9</sup> Micaela La Regina,<sup>10</sup> Juan I. Arostegui,<sup>3</sup> Josep M. Campistol,<sup>3</sup> Sharron Worthington,<sup>11</sup> Kevin P. High,<sup>12</sup> Michael G. Molloy,<sup>13</sup> Nicholas Baker,<sup>14</sup> Jeff L. Bidwell,<sup>15</sup> José L. Castañer,<sup>16</sup> Margo L. Whiteford,<sup>17</sup> P. L. Janssens-Korpola,<sup>5</sup> Raffaele Manna,<sup>10</sup> Richard J. Powell,<sup>9</sup> Patricia Woo,<sup>18</sup> Pilar Solis,<sup>19</sup> Kirsten Minden,<sup>6</sup> Joost Frenkel,<sup>20</sup> Jordi Yagüe,<sup>3</sup> Rita M. Mirakian,<sup>1</sup> Graham A. Hitman,<sup>1</sup> and Michael F. McDermott<sup>1</sup>

Supported in part by grants from The Wellcome Trust (to Dr. M. F. McDermott), Marató de TV3 (to Dr. Yagüe), and the Medical Research Council, UK (to Dr. Hawkins).

<sup>1</sup>Ebun Aganna, BSc, Linda Hammond, PhD, Rita M. Mirakian, MD, Graham A. Hitman, MD, FRCP, Michael F. McDermott, MRCP: Barts and London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, London, UK; <sup>2</sup>Philip N. Hawkins, PhD, FRCP, Helen J. Lachmann, MD, MRCP, Alison Bybee, PhD: Royal Free Hospital, London, UK; <sup>3</sup>Anna Aldea, BSc, Juan I. Arostegui, MD, PhD, Josep M. Campistol, MD, PhD, Jordi Yagüe, MD, PhD: Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Shane A. McKee, MD, BSc, MRCPCH: Belfast City Hospital, Belfast, Northern Ireland; <sup>5</sup>Hans Kristian Ploos van Amstel, PhD, P. L. Janssens-Korpola, BSc: University Medical Center, Utrecht, The Netherlands; <sup>6</sup>Claudia Mischung, BSc, Kirsten Minden, MD: Humboldt University of Berlin, Charité, and HELIOS Klinikum Buch II, Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Berlin, Germany; <sup>7</sup>Koichi Kusuhara, MD, PhD: Kyushu University, Fukuoka, Japan; <sup>8</sup>Frank T. Saulsbury, MD: University of Virginia Health System, Charlottesville; <sup>9</sup>Elizabeth M. McDermott, MD, MRCP, MRCP, Richard J. Powell, MD, MRCP, MRCP: Queen's Medical Centre, Nottingham, UK; <sup>10</sup>Micaela La Regina, MD, Raffaele Manna, MD: Catholic University, Rome, Italy; <sup>11</sup>Sharron Worthington, MBBS, FRACP: Liverpool Hospital, Sydney, Australia; <sup>12</sup>Kevin P. High, MD, MSc: Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, North Carolina; <sup>13</sup>Michael G. Molloy, FRCP, FRCP: National University of Ireland, Cork, Ireland; <sup>14</sup>Nicholas Baker, BSc, FRACP: Nelson Marlborough District Health Board, Nelson Hospital, Nelson, New Zealand; <sup>15</sup>Jeff L. Bidwell, PhD, FRCP: University of Bristol, Bristol, UK; <sup>16</sup>José L. Castañer, MD: Hospital Ramon y Cajal, Madrid, Spain; <sup>17</sup>Margo L. Whiteford, BSc, FRCP: Duncan Guthrie Institute of Medical Genetics, Yorkhill NHS Trust, Glasgow, UK; <sup>18</sup>Patricia Woo, MD, FRCP: Windeyer Institute of Medical Sciences, University College, London, UK; <sup>19</sup>Pilar Solis, MD, PhD: Hospital Clínico Universitario, Valladolid, Spain; <sup>20</sup>Joost Frenkel, MD, PhD: Wilhelmina Children's Hospital and University Medical Center, Utrecht, The Netherlands.

Address correspondence and reprint requests to Michael F. McDermott, MRCP, 5th Floor, Alexandra Wing, The Royal London Hospital, Whitechapel, London E1 1BB, UK. E-mail: M.F.McDermott@qmul.ac.uk.

Submitted for publication March 31, 2003; accepted in revised form May 1, 2003.

**Objective.** To investigate the prevalence of tumor necrosis factor receptor–associated periodic syndrome (TRAPS) among outpatients presenting with recurrent fevers and clinical features consistent with TRAPS.

**Methods.** Mutational screening was performed in affected members of 18 families in which multiple members had symptoms compatible with TRAPS and in 176 consecutive subjects with sporadic (nonfamilial) “TRAPS-like” symptoms. Plasma concentrations of soluble tumor necrosis factor receptor superfamily 1A (sTNFRSF1A) were measured, and fluorescence-activated cell sorter analysis was used to measure TNFRSF1A shedding from monocytes.

**Results.** Eight novel and 3 previously reported *TNFRSF1A* missense mutations were identified, including an amino acid deletion ( $\Delta$ 42) in a Northern Irish family and a C70S mutation in a Japanese family, both reported for the first time. Only 3 *TNFRSF1A* variants were found in patients with sporadic TRAPS (4 of 176 patients). Evidence for nonallelic heterogeneity in TRAPS-like conditions was found: 3 members of the “prototype familial Hibernian fever” family did not possess C33Y, present in 9 other affected members. Plasma sTNFRSF1A levels were low in TRAPS patients in whom renal amyloidosis had not developed, but also in mutation-negative symptomatic subjects in 4 families, and in 14 patients (8%) with sporadic TRAPS. Reduced shedding of TNFRSF1A from monocytes was demonstrated in vitro in patients with the T50M and T50K variants, but not in those with other variants.

**Conclusion.** The presence of TNFRSF1A shedding defects and low sTNFRSF1A levels in 3 families without

**a *TNFRSF1A* mutation indicates that the genetic basis among patients with “TRAPS-like” features is heterogeneous. *TNFRSF1A* mutations are not commonly associated with nonfamilial recurrent fevers of unknown etiology.**

The tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS; MIM no. 142680) is a dominantly inherited multisystem chronic inflammatory disorder that has a relapsing and remitting nature. The phenotype and clinical severity of TRAPS vary, but characteristic features include recurrent fevers, abdominal pain, and cutaneous and synovial inflammation (1,2), which typically last several days to weeks or longer. Other features include muscle tenderness, periorbital edema, and an increased incidence of inguinal hernia among men in some families. A proportion of patients develop systemic AA amyloidosis, which usually presents with nephropathy and is potentially life-threatening.

TRAPS was formerly known as familial Hibernian fever (FHF) and is associated with mutations in the gene on chromosome 12p13 that encodes tumor necrosis factor receptor superfamily 1A (*TNFRSF1A*) (2). Six different missense mutations affecting the extracellular domains of *TNFRSF1A*, 5 of which involved cysteine residues, were initially described in northern European families. At least 24 pathogenic *TNFRSF1A* mutations have now been identified (3), all of which are located in either the first or the second cysteine-rich N-terminal extracellular domains (CRD1 and CRD2) of *TNFRSF1A* (4–11), except for an F112I mutation in CRD3, found in affected members of a Finnish family (12). Most reported mutations involve cysteine residues, but variants that disrupt other residues do occur and may be associated with reduced penetrance (7,13).

Little epidemiologic data on TRAPS is available, but it is the most prevalent autosomal-dominant recurrent fever syndrome (ADRF) and the second most common inherited periodic fever overall, after familial Mediterranean fever (FMF; MIM no. 249100), which is a recessive disorder caused by mutations in the gene for pyrin/marenostrin (14,15). Most reported patients with TRAPS are European, many of Irish Scottish descent, but the disorder has also been reported in patients with diverse ethnic backgrounds, including those in which FMF most characteristically occurs, i.e., Ashkenazi and Sephardic Jews as well as the Maghrebian population (10), Israeli Arabs (6), Argentinian Arabs, Puerto Ricans (7), and Dutch Indonesians (9).

A single gene is responsible for 2 related

autosomal-dominant periodic fevers, Muckle-Wells syndrome (MWS; MIM no. 191900) and familial cold urticaria (FCU; MIM no. 120100) (also called familial cold autoinflammatory syndrome [FCAS]); furthermore, different mutations have been reported in neonatal-onset multisystem inflammatory disease (also known as chronic infantile neurologic cutaneous and articular syndrome) (16). This protein has homology to pyrin/marenostrin, and is variously termed cryopyrin, NALP3, or PYPAF1 (17–19).

Impaired cleavage of the *TNFRSF1A* ectodomain upon cellular activation, with consequent reduction in the plasma concentration of soluble *TNFRSF1A* (s*TNFRSF1A*), has been proposed as a mechanism underlying the hyperinflammatory response in TRAPS (2), although this defect cannot always be demonstrated (4,7). Phorbol myristate acetate (PMA) stimulates metalloproteinase activity, which leads to cleavage of the TNF receptor; the T50M and C52F variants are associated with a marked reduction of PMA-induced *TNFRSF1A* shedding (2,7). Shedding of this TNF receptor from monocytes is impaired to differing extents among patients with the H22Y, C33Y, and P46L variants (7,20). In contrast, although cell surface expression of *TNFRSF1A* after PMA stimulation appears normal in patients with the less penetrant R92Q variant and in those with the c.193-14G>A splice mutation (7), the plasma concentration of s*TNFRSF1A* can nevertheless be abnormally low in these cases (2,7).

TRAPS was first described as a distinct genetic entity in 1999 (2). To further characterize this syndrome and syndromes with similar symptoms, we performed genetic, biochemical, and functional studies in a further 18 families with ADRF, as well as in 176 patients of diverse ethnic backgrounds who had features compatible with TRAPS (“sporadic,” i.e., nonfamilial, cases).

## PATIENTS AND METHODS

**Study subjects.** The study group comprised a total of 222 patients who were referred with longstanding histories of fevers and other symptoms consistent with a diagnosis of TRAPS, including 46 members from 18 apparently unrelated multiplex families and 176 unrelated patients with apparently sporadic cases. Clinical criteria included periodic attacks of fever lasting at least 1 week, abdominal pain, rashes, periorbital edema, the presence of an acute-phase response when symptomatic, and a poor response to colchicine (21). There were at least 2 patients with some features of TRAPS in each of the families, with affected members in at least 2 consecutive generations, consistent with autosomal-dominant transmission. Among the 18 unrelated multiplex families, 4 were from England (1 of Polish English ancestry), 2 each from Spain,

**Table 1.** *TNFRSF1A* mutation-positive TRAPS families and patients with sporadic TRAPS\*

Ethnicity, family member	Mutation (nucleotide change)	Exon/intron	Soluble TNFRSF1A level, pg/ml (normal 746–1,966)	TNFRSF1A shedding, %, measured by FACS (normal $\geq 25\%$ )	TNFRSF1A shedding before/after PMA stimulation, %
Spanish, sporadic	G36E (194 G→A)	3	1,761, 3,717†	–	–
Polish English					
1-I-1‡	T37I (197 C→T)	3	1,528	54	67/13
1-II-1	T37I (197 C→T)	3	680	–	–
Northern Irish					
2-II-1‡	$\Delta$ D42 (del211–213)	3	2,139	27	61/44
2-III-1	$\Delta$ D42 (del211–213)	3	390	–	–
German					
3-III-1	T50K (236 C→A)	3	672	15	91/76
3-III-2	T50K (236 C→A)	3	824†	–	–
3-II-1	T50K (236 C→A)	3	580	–	–
3-II-2	Normal	–	693	–	–
3-I-1	Normal	–	1,367	–	–
English					
4-I-1	T50M (236 C→T)	3	475	8	98/90
4-II-1	T50M (236 C→T)	3	677	–	–
4-II-2	T50M (236 C→T)	3	952†	–	–
Spanish					
5-II-8	C52R (241 T→C)	3	487	–	–
5-II-9	C52R (241 T→C)	3	320	46	75/29
5-III-2	C52R (241 T→C)	3	714	–	–
5-III-5§	C52R (241 T→C)	3	8,820	–	–
5-III-6	C52R (241 T→C)	3	477¶	–	–
5-III-12	C52R (241 T→C)	3	323, 746, 1,278†	52	75/23
5-III-16§	C52R (241 T→C)	3	1,888	–	–
5-IV-1	C52R (241 T→C)	3	539	–	–
Scottish					
6-I-1	F60L (264 C→G)	3	–	–	–
6-II-1	F60L (264 C→G)	3	599	–	–
Dutch					
7-I-1	N65I (281 A→T)	3	792†	28	90/62
7-II-1	N65I (281 A→T)	3	660	37	95/58
Japanese					
8-I-1	C70S (295 T→A)	3	–	–	–
8-II-1	C70S (295 T→A)	3	461, 1,367, 3,280†	–	–
Scottish Australian,	C88R (349 T→C)	4	–	–	–
9-II-1					
English, 10-I-1	R92Q (362 G→A)	4	599	31	87/56
English, sporadic	R92Q (362 G→A)	4	2,047, 872, 2,006, 670	–	–
English, sporadic	Splice junction (c.193-14G>A)	Intron 3	1,062	–	–

\* TRAPS = tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome; TNFRSF1A = tumor necrosis factor receptor superfamily 1A; FACS = fluorescence-activated cell sorter; PMA = phorbol myristate acetate.

† During episode.

‡ Renal transplant amyloidosis.

§ Receiving dialysis.

¶ Asymptomatic.

Scotland, Australia, and the US, and 1 each from Germany, The Netherlands, Ireland, Northern Ireland, New Zealand, and Japan (Tables 1 and 2). A family history of disease was, by definition, absent among the 176 patients who were investigated for possible sporadic TRAPS, most of whom were English.

The study protocol was approved by the East London and City Health Authority Research Ethics Committee. Informed consent was obtained from all subjects. Venous blood was drawn from each study subject, plasma was separated, and

genomic DNA was extracted using PureGene kits (Gentra Systems, Minneapolis, MN). Each patient was screened for *TNFRSF1A* mutations, and both sTNFRSF1A and sTNFRSF1B levels were measured.

**Genetic analysis of TNFRSF1A.** *TNFRSF1A* mutation detection. Two approaches were used for the mutational screening. Screening of exons 2–5 was performed on all 222 patients, by a combination of genomic DNA sequence analysis and denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). When an altered DHPLC pattern was found, the

**Table 2.** *TNFRSF1A* mutation-negative TRAPS families\*

Ethnicity, family member	Soluble TNFRSF1A level, pg/ml (normal 746–1,966)	Soluble TNFRSF1B level, pg/ml (normal 1,003–3,170)	TNFRSF1A shedding, %, measured by FACS (normal $\geq 25\%$ )	TNFRSF1A shedding before/after PMA stimulation, %
<b>Irish Scottish</b>				
11-III-2	132	2,897	–	–
11-III-3	132	2,874	–	–
11-III-4	920	–	–	–
<b>American</b>				
12-I-1	1,209	1,943	18	78/56
12-II-1	685	1,068	16	88/72
<b>American</b>				
13-I-1	533	1,150	16	79/63
13-II-1	653	1,635	2	69/67
<b>Irish</b>				
14-III-1†	731	1,235	–	–
14-III-2	781	1,839	–	–
14-III-3†	1,140	2,162	–	–
14-III-4	650, 806	2,088, 1,433	40	62/22
14-III-5†	826	1,731	–	–
14-IV-1‡	650	1,850	–	–
14-IV-3	727	2,828	5	67/62
<b>Spanish</b>				
15-II-1†	944	2,160	–	–
15-II-2	856	2,219	–	–
15-II-3	809	1,658	–	–
15-II-4	1,429	2,771	–	–
15-II-5†	798	1,560	–	–
15-III-1†	815	1,777	–	–
<b>New Zealand</b>				
16-II-1	972	1,563	–	–
16-I-1	1,217	2,122	–	–
<b>Australian</b>				
17-I-1	1,398	–	–	–
17-II-1	1,095	–	–	–
<b>English</b>				
18-I-1§	1,246	2,003	–	–
18-II-1	1,058	1,683	–	–
18-III-1	721	1,227	–	–
18-III-2	1,410	2,119	–	–

\* See Table 1 for definitions.

† Unaffected family member.

‡ Possibly affected.

§ R92Q mutation.

corresponding exons were reamplified prior to sequencing (2). Because the elution profiles and sequences of exons 2–5 were normal in the probands from 8 of the 18 families, the remaining *TNFRSF1A* coding region (i.e., exons 1 and 6–10) was then sequenced in all of these individuals. These exons were also sequenced in 7 of the patients with sporadic TRAPS. The primers used for reamplification and sequencing were as described (2), except for exon 10 (Table 3).

**Analysis of *TNFRSF1A* promoter region.** An additional 800 bp of the *TNFRSF1A* promoter was also sequenced in the probands of the 8 families that were negative for the *TNFRSF1A* coding region mutation, in the 7 sporadic cases, and in 3 of the 12 affected members from the original FHF family in whom *TNFRSF1A* mutations (specifically C33Y, which was present in the other 9 affected members) had previously been excluded (2). This 800-bp region was first amplified using the external primers TNFR1Pro/1 (forward)

and TNFR1Pro/2 (reverse). The polymerase chain reaction (PCR) product was then sequenced bidirectionally using the external primers, in addition to 4 overlapping internal primers (Pro/4–7) (Table 3).

**PCR.** All reactions were performed under the following PCR cycling conditions: initial denaturation at 94°C for 15 minutes, 35 denaturation cycles at 94°C for 45 seconds, annealing at 60°C for 45 seconds, extension at 72°C for 1 minute, and extension at 72°C for 10 minutes.

**DNA sequencing.** The PCR products were purified, sequenced by fluorescent dye primer chemistry (Amersham, Little Chalfont, UK), and run on an ABI 3700 automated sequencer. Sequence data were analyzed with Sequencher 3.0 (Gene Codes, Ann Arbor, MI).

**Cloning.** Since direct sequencing of the  $\Delta D42$  mutation produced an illegible electropherogram with superimposed tracefile around residues 40–44, amplified product of exons

**Table 3.** Primers used for analysis of *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, and *NALP3/CIAS1/PYPAF1* loci

Region	Primer(s)*	Size, bp
<i>TNFRSF1A</i> exon 10	5'-TGGGGTTGCCGCCCGAGGCT-3' 5'-CATCTCGCAGGACGGTCCTTAG-3'	396
<i>TNFRSF1A</i> Pro/1	5'-CTAGGAGGCTAGTGAAGAAGCTCTG-3'	942
<i>TNFRSF1A</i> Pro/2	5'-GTGGCTGAGGTTAGGACCTG-3'	
<i>TNFRSF1A</i> Pro/4	5'-CTGAATTGGAACCCAGAGAAT-3'	120
<i>TNFRSF1A</i> Pro/5	5'-ACTCCCAACCAACACCAAG-3'	
<i>TNFRSF1A</i> Pro/6	5'-CTCCTCCAGCTCTTCTGTGTC-3'	111
<i>TNFRSF1A</i> Pro/7	5'-CAGTGATCTTGAACCCCAAAG-3'	
<i>T50K</i>	5'-CAGGCCCGGGCAGGGTA-3' 5'-CCTGTGCACACTCACCCCTTTC-3'	120
<i>F60L</i>	5'-GCCCCATTACAGGAACCTACTTG-3' 5'-TCTGAGGTGGTTTCTGAAGCGGTTA-3'	
$\Delta$ D42	5'-CCTCTCTTGATGGTGTCTCC-3' 5'-CTGACTCTCCTGCCTGTGC-3'	575
<i>TNFRSF1B</i> exon 2	5'-GATGGCAGTCTTCCCTTCTT-3' 5'-CACACGCTCCTCCAGGCAT-3'	
<i>TNFRSF1B</i> exon 3	5'-AGAGGCTCGCCAGCTGAGA-3' 5'-TGGAGGCAGGGGTGTAAGG-3'	215
<i>TNFRSF1B</i> exon 4	5'-GTGACCGTTTGCGCCCTCT-3' 5'-GCAAGGAGTTTACAAAGGAG-3'	
<i>TNFRSF1B</i> exon 5	5'-GAGTGTTGACAAGTTCGGA-3' 5'-CTGCTCCTCCAGAACCAAAAG-3'	162
<i>CIAS1</i> exon 3a	5'-GTTACCACTCGCTTCCGATG-3' 5'-CCTCGTTCTCCTGAATCAGAC-3'	
<i>CIAS1</i> exon 3b	5'-CATGTGGAGATCCTGGGTTT-3' 5'-GGCCAAAGAGGAAACGTACA-3'	649
<i>CIAS1</i> exon 3c	5'-TTCCAGGGAGTCGTTGAAG-3' 5'-GAGATGAGAGGAGGCAGGTG-3'	

\* Where only 1 primer is shown for a region, it was used for internal sequencing, which is either forward or reverse. For polymerase chain reaction amplification, 2 primers are shown; the first is the forward primer and the second the reverse primer. Underlined nucleotides were modified to create an enzyme restriction site.

2–3 of *TNFRSF1A* was directly subcloned into the pGL3 Easy vector (Promega, Madison, WI) and transfected into TOP 10 bacteria (Invitrogen, Carlsbad, CA) to circumvent this problem. Plasmid DNA samples isolated from the subcloning were prepared with the UltraClean Mini Prep Kit (Mo Bio, Solana Beach, CA) and sequenced.

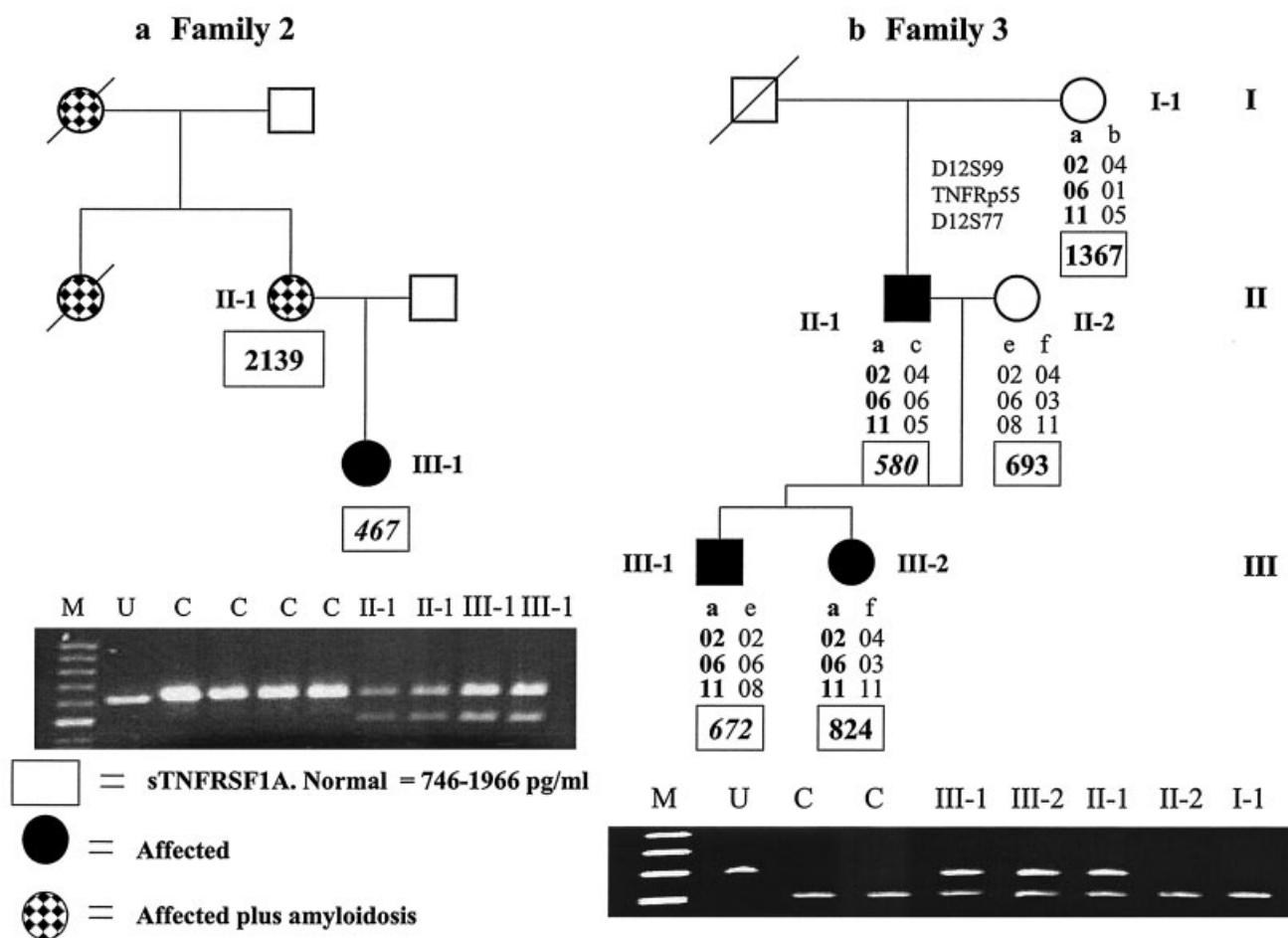
**Restriction endonuclease assays for *TNFRSF1A* mutations.** Upon detection of a *TNFRSF1A* mutation in the proband of a specific family, other available family members were screened for the same mutation. DNA sequencing was generally used for this purpose. Specific restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were developed for mutations in the larger families (i.e., T50K, F60L, and  $\Delta$ D42). The sequences of the RFLP primers are shown in Table 3. The T50K mutation abolishes an *Rsa* I site, C52R creates a *Pst* I site, F60L abolishes an *Mse* I site, and the  $\Delta$ D42 deletion creates an *Mfe* I restriction site.

**Study of other candidate genes in ADRF families without *TNFRSF1A* mutations.** *TNFRSF1B* mutation detection. *TNFRSF1B* on chromosome 1p36 was selected as a candidate gene for mutational screening because of the significant structural and functional homology to *TNFRSF1A*. Sequencing of exons 2–5 (which encode the extracellular ligand-binding domain, structurally homologous to *TNFRSF1A*) was performed in the probands of these families, using the primers shown in Table 3.

*NALP3/CIAS1/PYPAF1* mutation detection. Exon 3 of the *NALP3/CIAS1/PYPAF1* gene, encoding the NACHT domain and flanking regions (19), where all mutations identified so far have been found, was screened in a total of 18 patients. These included probands of the 8 families who were negative for *TNFRSF1A* mutations and 10 patients with sporadic TRAPS with at least 1 of the clinical features of MWS/FCU/FCAS (i.e., amyloidosis, cold-induced urticarial-appearing rash, and hearing loss). To ensure coverage of the entire 1.5-kb region, 3 pairs of overlapping primers, *CIAS1* exons 3a–3c (Table 3), were used for PCR of genomic DNA.

**Microsatellite and single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis of candidate loci.** Informative microsatellite markers flanking the 4 known periodic fever loci, as well as intragenic SNPs, were used to genotype all of the available members of the *TNFRSF1A* mutation-negative families. This was done to test for linkage to the *TNFRSF1A* locus and other known candidate gene loci (*MEFV* and *MVK*) by haplotype sharing, as previously described (22).

*TNFRSF1B* locus (*chromosome1q36*). A biallelic variable-number tandem repeat (VNTR) promoter polymorphism (23) and an informative microsatellite marker from intron 4 were used (24). The VNTR promoter alleles result from the presence of either 1 (allele 1) or 2 (allele 2) repeats of a 15-bp sequence, 5'-GCCGGGCAGGTGGAG-3'; the



**Figure 1.** a, Family 2 (Northern Irish). Pedigree and findings of restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay for the  $\Delta D42$  mutation, which creates an *Mfe* I restriction site, in the 2 affected family members. b, Family 3 (German). Pedigree and findings of RFLP assay, showing that the T50K mutation, carried on haplotype a, has arisen de novo, since it is not present in family member I-1. T50K abolishes an *Rsa* I site. Levels of soluble tumor necrosis factor receptor superfamily 1A (sTNFRSF1A; pg/ml) are shown in boxes, with low levels indicated by italics. M = marker; U = uncut; C = cut.

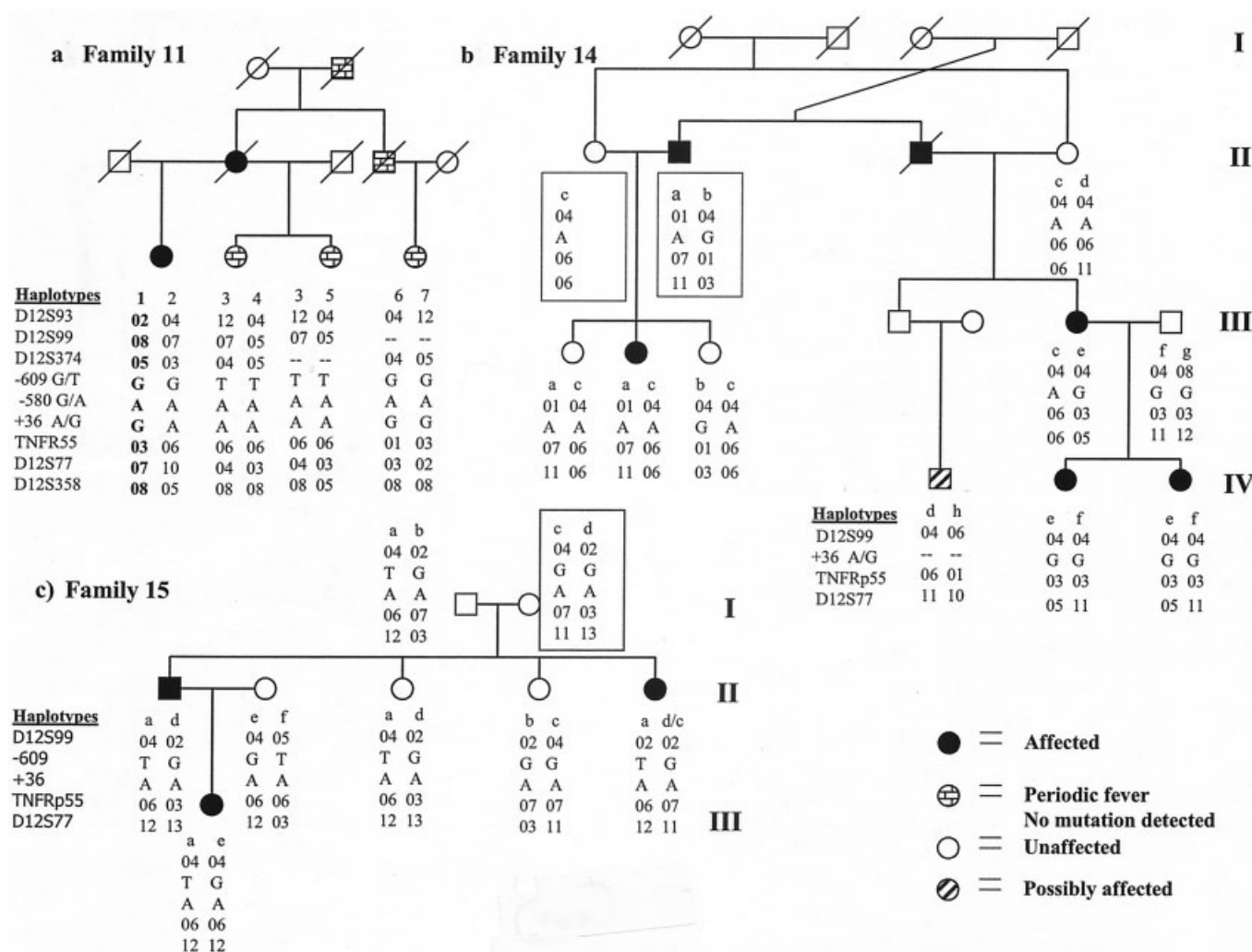
allelic frequencies observed in a Caucasian population were 0.3 (allele 1) and 0.7 (allele 2).

**Intragenic SNPs.** Two intragenic SNPs (exon 1 G/A and intron 7 G/A) from the *TNFRSF1A* locus were also analyzed (24,25). Allele frequencies were as reported (7,26).

**Measurement of TNF receptors, C-reactive protein, and serum amyloid A levels.** The concentrations of sTNFRSF1A and sTNFRSF1B in plasma stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, as described (2). Plasma C-reactive protein concentration was determined using an automated microparticle-enhanced latex turbidimetric immunoassay (COBAS MIRA; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (27), and serum amyloid A protein was measured by latex nephelometry (BNII autoanalyzer; Dade Behring, Marburg, Germany) (28).

**Determination of TNFRSF1A expression and shedding by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis.** The expression of TNFRSF1A was studied by FACS analysis on the

probands and affected members of 10 of the 18 families (Tables 1 and 2). Mononuclear cells were isolated from peripheral blood using Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway). Parallel cultures of  $10^6$  cells were maintained in RPMI 1640/10% fetal calf serum at  $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . PMA (Sigma, St. Louis, MO) was added to one culture at a concentration of 10 ng/ml for 30 minutes. A total of  $10 \mu\text{l}$  of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled TNFRSF1A monoclonal antibody (R&D Systems, Abingdon, UK) was added to  $25\text{-}\mu\text{l}$  cell aliquots in triplicate. An isotype antibody,  $\gamma 1^{\text{FITC}}$  (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA), was used as a control. To identify the monocyte population, double staining was carried out by simultaneous incubation with a phycoerythrin-labeled antibody recognizing the monocyte marker CD14 (1:10 dilution; Becton Dickinson Immunocytometry Systems). After a 45-minute incubation on ice, cells were washed and acquired into a FACSort flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). To quantify



**Figure 2.** a, Genotyping for 6 microsatellite markers flanking the tumor necrosis factor receptor superfamily 1A (TNFRSF1A) locus, plus 3 intragenic markers, in family 11 (Irish Scottish). A C33Y mutation was found in the proband (11-III-1), as well as 8 other family members (results not shown), but not in 3 other symptomatic individuals. The C33Y carrier haplotype 1 in the proband, inferred from segregation analysis performed in the rest of the pedigree, was present in all of the other 8 affected members (results not shown). Two of the symptomatic individuals (11-III-2 and 11-III-3) are half-siblings of the proband, and they have not inherited this haplotype from the affected mother. Also, subject 11-III-4 does not share any haplotype with either 11-III-1, 11-III-2, or 11-III-3. Only subject 11-III-1 in family 11 has a TNFRSF1A mutation (indicated by a boldfaced haplotype). Alleles TA and GA in family 11 are biallelic single-nucleotide polymorphism markers. b, Pedigree of family 14 (Irish). There is a single recombinant in an affected cousin (14-III-6). c, Pedigree of family 15 (Spanish). There is a single recombinant in an asymptomatic sibling (15-II-3). Rectangles refer to inferred haplotypes; the second haplotype of subject 14-II-1 is unknown.

the FITC-positive cells, a marker was set in the fluorescence-1 histogram, using the isotype antibody as a negative control.

## RESULTS

Among the 18 families studied, we found 7 novel *TNFRSF1A* mutations, T37I,  $\Delta$ D42, T50K, C52R, F60L, N65I, and C70S, in the probands of families 1 (Polish English), 2 (Northern Irish), 3 (German), 5 (Spanish), 6 (Scottish), 7 (Dutch), and 8 (Japanese), respectively (Table 1). The  $\Delta$ D42 mutation in family 2 is the first

amino acid deletion identified in TRAPS, and was associated with AA amyloidosis in 3 individuals (Figure 1a). The C70S mutation represents the first report of TRAPS in a patient from the Far East (family 8 from Japan). In the German family with the T50K mutation (family 3), the disease was found to segregate with a 4-marker haplotype, including the TNFRSF1A locus (Figure 1b). This mutation appears to have arisen de novo in the proband (3-II-1), since it was not present in his asymptomatic mother (3-I-1), from whom the haplo-

type was inherited. It was, however, found in both of his affected children, including patient 3-III-2, who had symptoms involving the central nervous system. The T37I mutation was confirmed by direct DNA sequencing in the affected offspring (1-II-1) of the proband in the Polish English family (family 1), and RFLP assays were used to screen for mutations in all available members of families 3 and 6. These assays confirmed the presence of 2 novel mutations (T50K and F60L) in the affected members of both families (Figure 1b and results not shown).

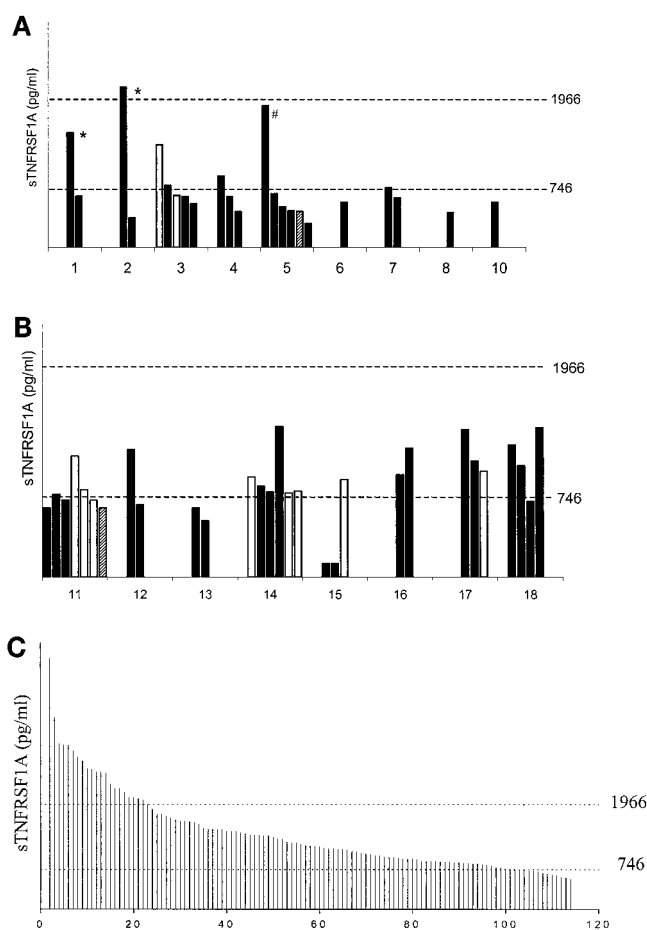
More than 100 northern European and 20 Japanese control chromosomes were also screened by RFLP and DHPLC WAVE analysis for all of these mutations, including 10 samples from healthy Polish controls. No *TNFRSF1A* mutations were found in any of these controls.

Two previously reported *TNFRSF1A* mutations (T50M and C88R) were found in English (T50M; family 4) and Scottish Australian (C88R; family 9) families (Table 1). No *TNFRSF1A* mutations were found in the remaining 8 families (apart from R92Q in a single patient from a total of 4 affected members in family 16), despite sequencing of all 10 exons and 800 bp of the promoter region (Table 2). Family 16 was therefore considered *TNFRSF1A* mutation negative because the R92Q variant did not segregate with disease, and no other variants were identified.

Among the 176 patients with sporadic TRAPS, a de novo mutation, G36E, which was not present in the parents, was found in a Spanish patient (Table 1). The R92Q or c.193-14G>A variant was found in 2 further patients from England with sporadic TRAPS (each in 1 patient). Our mutation survey of the remaining 172 patients with TRAPS revealed no mutations in exons 2–5. The complete *TNFRSF1A* coding and promoter regions, further analyzed in 7 patients with sporadic TRAPS, were also mutation negative.

***TNFRSF1A* promoter.** In addition to the patients listed above, the 5' promoter region of the *TNFRSF1A* gene was sequenced in 26 Caucasian controls (52 chromosomes). Two previously reported promoter SNPs, at positions –609G/T and –580A/G relative to the transcription start site, were identified (21): the –609 SNP was found in both cases and controls, and there were no differences in frequencies between the 2 groups. However the –580G SNP was only found in 1 patient from Africa, and is present in healthy African populations (21).

**Haplotype analysis of other candidate loci in the *TNFRSF1A* mutation–negative families.** We were unable to identify any of the other known periodic fever loci or the *TNFRSF1B* candidate locus in any of the 8

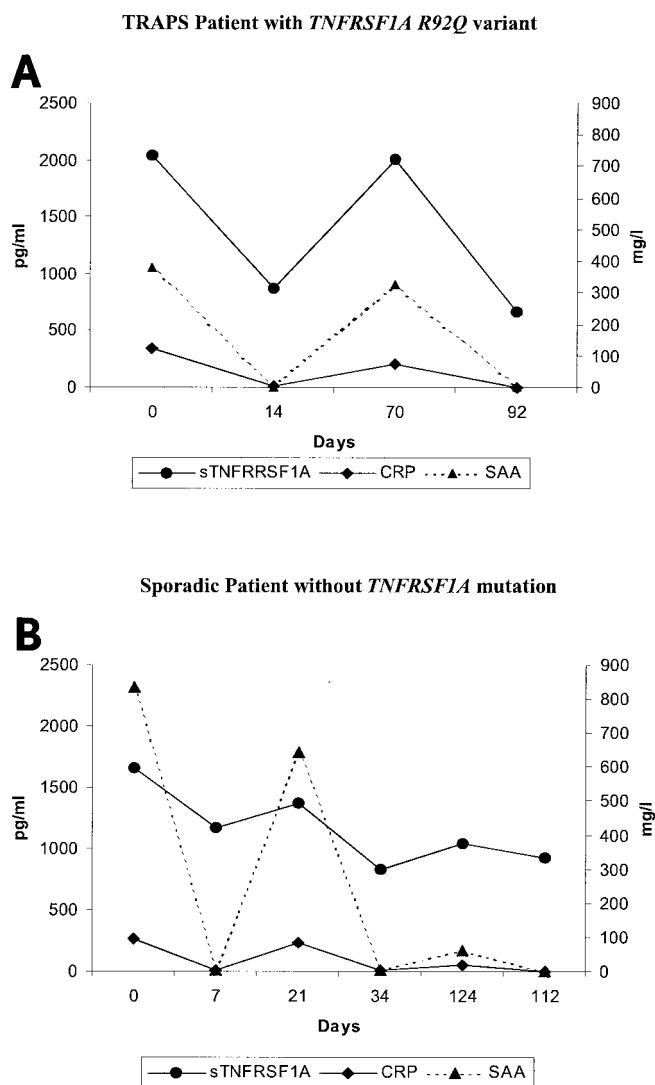


**Figure 3.** Soluble tumor necrosis factor receptor superfamily 1A (sTNFRSF1A) levels in **A**, patients and families with tumor necrosis factor receptor–associated periodic syndrome (TRAPS), **B**, *TNFRSF1A* mutation–negative patients and families, and **C**, patients with sporadic TRAPS. Solid columns represent patients; open columns represent asymptomatic family members; shaded columns indicate probably affected family members. Upper and lower limits of normal are shown by the horizontal broken lines. \* denotes patients with renal transplant; # denotes a patient receiving dialysis.

*TNFRSF1A* mutation–negative families. Genotyping was performed on all available members of families 11, 14, and 15 (Figure 2). Each of these 3 families had at least 3 affected members; family 14 was composed of 13 living members spanning 3 generations, of which 5 members were affected. Recombinants at each candidate locus were found in all of these families.

**Family 11 (Irish Scottish).** Both microsatellite and SNP genotyping were carried out in family 11 in order to compare extended haplotypes in the proband with C33Y (family member 11-III-1) and the 3 affected relatives (11-III-2, 11-III-3, and 11-III-4) (Figure 2), who were negative for this mutation. The 2 *TNFRSF1A* mutation–





**Figure 4.** Serial measurements of sTNFRSF1A (in pg/ml; scale on left), C-reactive protein (CRP) (in mg/liter; scale on right), and serum amyloid protein (SAA) (in mg/liter; scale on right) in **A**, a TRAPS patient with the R92Q variant and **B**, a *TNFRSF1A* mutation-negative patient, showing that all levels tended to rise and fall simultaneously in these patients. See Figure 3 for other definitions.

negative siblings (11-III-2 and 11-III-3) inherited different haplotypes at this locus, as did their affected cousin (11-III-4). Nevertheless, the clinical presentation was markedly similar in all affected individuals in the family, regardless of the presence or absence of mutations.

**Family 14 (Irish).** In family 14 the intragenic marker (TNFRp55) was fully informative, and 1 recombination was observed in an affected cousin (14-III-6) (Figure 2), suggesting that *TNFRSF1A* is not the susceptibility gene. Although cold intolerance and urticaria were among the disease features in this family, no mutations were found in the NACHT domain of *NALP3/CIAS1/PYPAF1*; the *MEFV* and *MVK* loci were also excluded.

**Family 15 (Spanish/Sephardic Jewish).** All 3 affected members of family 15 shared a haplotype at the *TNFRSF1A* locus, but this was also present in an unaffected parent and sibling (Figure 2). The possibility of a low-penetrance *TNFRSF1A* mutation was not supported by the results of sequencing of the complete coding region and 800 bp of the promoter region of *TNFRSF1A* in the proband. Furthermore, there were recombinants at all other known periodic fever loci, as well as *TNFRSF1B* (data not shown). FMF was also excluded by direct sequencing.

**Exclusion of mutations in both *TNFRSF1B* and *NALP3/CIAS1/PYPAF1* genes.** No mutations in the *TNFRSF1B* or *NALP3/CIAS1/PYPAF1* genes were identified in the 8 *TNFRSF1A* mutation-negative families.

**Soluble TNFRSF1A levels in plasma.** Soluble TNFRSF1A levels (normal range 746–1,966 pg/ml) were reduced in most affected members of all of the TRAPS families, regardless of the mutation (Table 1 and Figure 3A). The exceptions were 4 patients with renal insufficiency and 5 others, 2 of whom had very active inflammatory disease. Elevation of the sTNFRSF1A concentration in association with active inflammation was shown to produce pseudonormalization of the value in patient 5-III-12 with the C52R mutation and the patient

**Table 4.** Mean  $\pm$  SD soluble TNFRSF1A and TNFRSF1B levels in TRAPS families, *TNFRSF1A* mutation-negative families, patients with sporadic TRAPS, and controls\*

Subjects	No. of subjects	Soluble TNFRSF1A, pg/ml (normal 746–1,966)	Soluble TNFRSF1B, pg/ml (normal 1,003–3,170)
TRAPS families	19†	637 $\pm$ 242‡	2,181 $\pm$ 560
Mutation-negative families	21†	862 $\pm$ 349	1,894 $\pm$ 527
Sporadic TRAPS	114	1,417 $\pm$ 735§	2,530 $\pm$ 1,468
Controls	24	962 $\pm$ 228	–

\* See Table 1 for definitions.

† All subjects were affected family members.

‡  $P < 0.0001$  versus controls.

§  $P < 0.0033$  versus controls.

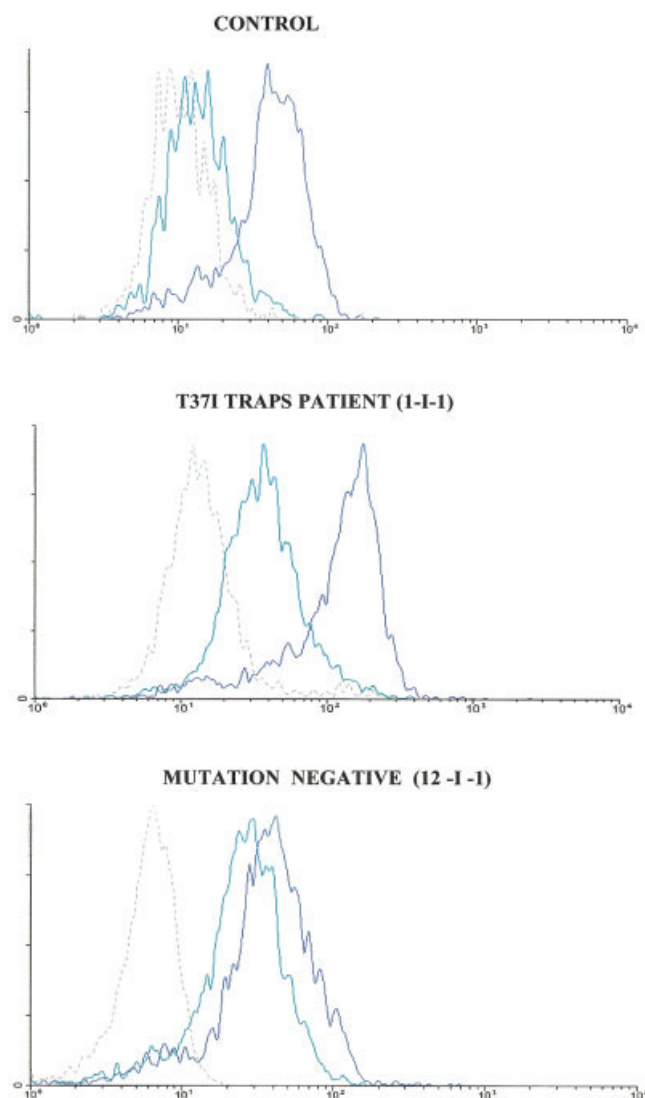
with sporadic TRAPS and the R92Q mutation (Table 1 and Figure 4). The relationship more generally between sTNFRSF1A concentration and the acute-phase plasma protein response, determined by measurement of C-reactive protein, is shown in Figure 4.

The sTNFRSF1A concentration was also low in an asymptomatic carrier of the C52R mutation, and in 4 of 8 families in whom a *TNFRSF1A* mutation was not found (Table 2 and Figure 3B). Among 114 patients with sporadic TRAPS from whom sera were available for study, values were around the lower limit of the normal range in 34 (30%) and below this in 8 (Figure 3C). The values in the remaining 72 patients with sporadic TRAPS were either within (50 patients) or above (22 patients) the normal range. Soluble TNFRSF1A levels were significantly lower in TRAPS patients with mutations (mean  $\pm$  SD 637  $\pm$  242 pg/ml) (Table 4) than in normal control subjects (962  $\pm$  228 pg/ml;  $P < 0.0001$  by Student's 2-tailed *t*-test) (Table 4). Although the mean value among affected members of mutation-negative families (862  $\pm$  349 pg/ml) was within the normal range, there was marked interfamilial variation, and very low levels were observed in the symptomatic members of families 11, 12, 13, 15, and 18. Repeated measurements revealed low or borderline sTNFRSF1A levels in members of some other families (Figure 3B).

Plasma sTNFRSF1A levels varied substantially among the patients with sporadic TRAPS and were elevated in 19% (22 of 118) (Figure 3C). The mean values in this group were significantly higher than in controls ( $P < 0.0033$ ) (Table 4), a finding that would be expected in patients with active inflammatory diseases. Levels of sTNFRSF1B were similar among patients from families with TRAPS, families without mutations, and patients with sporadic TRAPS.

**Determination of TNFRSF1A expression and shedding by FACS analysis.** TNFRSF1A was expressed under basal conditions in most cells of the monocyte-enriched population, at an intensity  $>10$ -fold greater than in the isotype control. Preparations from 4 healthy controls showed at least 35–40% TNFRSF1A shedding following PMA stimulation (Figure 5). A value of  $<25\%$  was considered to indicate impairment of the TNFRSF1A shedding mechanism, and this was demonstrated in association with the T50K variant and, as previously described (7), the T50M variant. In contrast, receptor shedding comparable with that found in healthy control preparations was demonstrated in the probands of the families with the T37I mutation (Figure 5), the  $\Delta$ D42, C52R, and N65I mutations, and in a patient with sporadic TRAPS with the R92Q substitution.

A moderate-to-severe TNFRSF1A shedding deficiency associated with low sTNFRSF1A levels was



**Figure 5.** Examples of TNFRSF1A clearance from monocytes in TRAPS and *TNFRSF1A* mutation-negative patients. Fluorescence histograms are shown for a control subject and for the patient with the T37I mutation, as well as a mutation-negative affected parent. Monocytes were analyzed for TNFRSF1A expression before (dark blue lines) or after (light blue lines) phorbol myristate acetate activation. See Figure 3 for definitions.

present in all affected members of 2 mutation-negative families (families 12 and 13) from the US (Figure 5), and TNFRSF1A shedding was also impaired in the proband of family 14. However, defective receptor shedding was not seen in the affected mother (14-III-4), who also had low sTNFRSF1A levels.

**Founder effect: intragenic haplotype sharing in T50M and C88R carriers.** The T50M mutation, already reported in Irish and French Canadian families (2), was present in family 4 (English), and the C88R mutation

**Table 5.** Haplotypes constructed from flanking *TNFRSF1A* microsatellite markers and intragenic single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in affected members of 3 families with the T50M mutation and 2 families with the C88R mutation

Family*	Disease haplotype				
	D12S99	Exon 1 SNP	p55	Intron 7 SNP	D12S77 microsatellite
T50M mutation					
English (3 patients)	01	G	03	A	10
French Canadian (2 patients)	03	G	03	A	10
Irish (6 patients)	03	G	03	A	08
C88R mutation					
Scottish Australian (3 patients)	05	G	01	G	03
Scottish Australian (13 patients)	05	G	01	G	03

\* The English family with the T50M mutation is family 4 in the present report, and the first Scottish Australian family with the C88R mutation is family 9 in the present report; other families are from previously studied series (2,7).

was found in family 9 (Scottish Australian), plus a second Scottish Australian family from our initial series (2). This raised the question as to whether these mutations were due to genetic founder effects. Genotyping included the 2 intragenic *TNFRSF1A* SNPs, an intragenic microsatellite (p55), and 2 flanking microsatellites (Table 5).

A distinct common 5-marker haplotype, showing linkage disequilibrium over at least 2 cM, cosegregated with the C88R mutation (Table 5). However, in all mutation carriers in the 3 T50M families, the flanking microsatellites were divergent from a common haplotype, with convergence only at the intragenic markers, where the haplotypes were identical. A common allele (144 bp) of the TNFRp55 marker was observed in all T50M patients, and combined with 2 intragenic markers, produced a G-03-A haplotype in all 3 families (Table 5).

## DISCUSSION

Our findings indicate that the genetic etiology and pathogenesis of inherited inflammatory disease among patients and families in whom there are clinical and laboratory features consistent with TRAPS are heterogeneous, in terms of both the presence or absence of mutations in the *TNFRSF1A* gene and defects in shedding of TNFRSF1A from cell surfaces. In half the ADRF families investigated no mutation in the *TNFRSF1A* gene was found to be responsible for the TRAPS-like disease, and the relationship between defects in sTNFRSF1A shedding and plasma concentration of this receptor was inconsistent. Only 2 variants, T50K and T50M, were associated with a marked shed-

ding defect, and the presence or absence of this defect had no bearing on the severity of clinical symptoms.

It is notable that only 2 of the newly identified mutations involved a cysteine residue, as hitherto these have been associated with TRAPS in the majority of cases. Based on the crystal structure of TNFRSF1A proposed by Banner et al (29), both the F60 and T37 residues are crucial for proper domain-2 folding; F60 is a structurally conserved residue between the second and third extracellular domains, and T37 is also a conserved residue between domains 1 and 2 and resides in the beta-turn position in loop 2 of domain 1. Residue 42, deleted in one of these families, is located adjacent to a cysteine residue at position 43, and this deletion would be predicted to significantly inhibit formation of the disulfide bond with the cysteine residue at position 30. Although it has been suggested that mutations that disrupt cysteine residues confer an increased risk for development of AA amyloidosis (7), this complication evidently can occur in patients who have both noncysteine mutations and normal TNFRSF1A shedding. Duration and severity of inflammatory disease are risk factors for susceptibility to AA amyloidosis, but risk is probably influenced by other genetic and possibly environmental factors, as highlighted by the occurrence of amyloidosis in half of the members of the Northern Irish family with the  $\Delta D42$  variant, which was not associated with particularly severe inflammation.

We also screened 176 patients with possible sporadic TRAPS, the vast majority of whom were found to be negative for the *TNFRSF1A* mutation. Findings in these patients and some of the families confirm that the

TRAPS clinical phenotype has a heterogeneous etiology. Indeed it is remarkable that 3 of the 12 affected members of the prototype FHF family (2) did not actually possess the C33Y variant that segregated with an apparently identical disease phenotype in the other 9 affected members.

A moderate-to-severe TNFRSF1A shedding deficiency was present in some affected members of the 3 mutation-negative families in whom this was studied, and several members of these families had low sTNFRSF1A levels. Among the patients with sporadic TRAPS, sTNFRSF1A levels were lower than normal in 14, including the 1 patient with R92Q. These observations suggest that sTNFRSF1A levels may be influenced by other gene(s)/pathways, and we speculate that some individuals who have constitutionally low sTNFRSF1A levels might, in association with other environmental or genetic influences, be susceptible to developing clinical disease that is indistinguishable from TRAPS. It is relevant that sTNFRSF1A levels are normal in patients with MWS/FCU/FCAS or hyperimmunoglobulinemia D with periodic fever syndrome (Aganna E, et al: unpublished data) as well as those with FMF (30), and that we also found normal rates of TNFRSF1A cleavage in a selected patient from each of these disease groups.

We have thus provided some evidence for other, as-yet-unknown, susceptibility genes in *TNFRSF1A* mutation-negative families. Because there were 2 patients with sporadic TRAPS with the R92Q or c.193-14G>A splice mutations, both of which are low-penetrance (7), it might be surmised that these mutations would be more common among asymptomatic carriers and healthy controls, as well as in the sporadic cases. The increased frequency of R92Q among TRAPS patients (present in 1.4% of this group and absent in our controls), as well as the low sTNFRSF1A levels, suggest that it is indeed a low-penetrance mutation rather than a benign polymorphism. There is also accumulating evidence that the presence of the R92Q and c.193-14G>A TNFRSF1A variants in individuals who do not have features of TRAPS may augment the intensity of the nonspecific inflammatory response in other disease processes, analogous to the situation among patients who have the pyrin variant E148Q (7).

The phenotype of the Spanish/Sephardic Jewish family with ADRF (family 15) is unusual. The symptoms in this family included pericarditis and, although pericarditis can occur in FMF (31), the latter was excluded by sequencing and haplotype analysis, and our findings suggest that another gene is responsible for the disease in this family. Potential candidates include members of the ADAM gene family, involved in diverse processes

including ectodomain shedding (32), and ARTS1, an aminopeptidase regulator of TNFRSF1A shedding.

Although a diversity of T50M carrier chromosomes has been reported (7), a single conserved intra-genic haplotype was demonstrated in 3 T50M families in this study. This suggests that T50M is relatively ancient and is carried on a specific haplotype which, over time, has undergone meiotic recombination to generate the various identified haplotypes. Because the C88R haplotype covers 2 cM, it probably has resulted from a more recent mutational event, thus not allowing sufficient time to permit recombination. Furthermore, this haplotype may have spread from Scotland to Australia with the emigration of the eighteenth and nineteenth centuries, and the 2 families with this mutation (family 9 and the previously reported family [2]) probably share a common ancestor.

From a clinical standpoint, we have shown that plasma sTNFRSF1A concentration can vary substantially in individual patients according to the degree of inflammatory activity. Therefore, the significance of sTNFRSF1A measurements should be interpreted only with full knowledge of an individual's clinical condition and concurrent estimation of the acute-phase plasma protein response.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are particularly grateful to the patients who agreed to participate in the study, and to Drs. Paul Galea (Glasgow, UK) and Kevin Murray (Subiaco, Australia) for referring the patients. We also thank Dr. John Mulley (Adelaide, Australia) for providing DNA samples from members of one of the families with TRAPS.

## REFERENCES

1. Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001;345:1748–57.
2. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, McDermott EM, Ogunkolade BW, Centola M, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55kDa TNF receptor (TNF-R1) define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 1999;97:133–44.
3. Sarrauste de Menthier C, Terriere S, Pugnere D, Ruiz M, Demaille J, Touitou I. INFEVERS: the Registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations. *Nucleic Acids Res* 2003;31:282–5.
4. Dodé C, André M, Bienvenu T, Hausfater P, Pêcheux C, Bienvenu J, et al, and the French Hereditary Recurrent Inflammatory Disorder Study Group. The enlarging clinical, genetic, and population spectrum of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46:2181–8.
5. Aganna E, Aksentijevich I, Hitman GA, Kastner DL, Hoepelman AIM, Poesma F, et al. Tumor necrosis factor receptor associated periodic syndrome (TRAPS) in a Dutch family: evidence for a TNFRSF1A mutation with reduced penetrance. *Eur J Hum Genet* 2001;9:63–6.

6. Aganna E, Zeharia A, Hitman GA, Basel-Vanagaite L, Allotey RA, Booth DR, et al. An Israeli Arab patient with a de novo TNFRSF1A mutation causing tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Arthritis Rheum* 2002;46:245–9.
7. Aksentijevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, Oh HH, et al. The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum Genet* 2001;69:301–4.
8. Rosen-Wolff A, Kreth HW, Hofmann S, Hohne K, Heubner G, Mobius D, et al. Periodic fever (TRAPS) caused by mutations in the TNF alpha receptor 1 (TNFRSF1A) gene of three German patients. *Eur J Haematol* 2001;67:105–9.
9. Simon A, Dode C, van der Meer JWM, Drenth JPH. Familial periodic fever and amyloidosis due to a new mutation in the TNFRSF1A gene. *Am J Med* 2001;110:313–5.
10. Dodé C, Papo T, Fieschi C, Pêcheux C, Dion E, Picard F, et al. A novel missense mutation (C30S) in the gene encoding tumor necrosis factor receptor 1 linked to autosomal-dominant recurrent fever with localized myositis in a French family. *Arthritis Rheum* 2000;43:1535–42.
11. Jadoul M, Dode C, Cosyns JP, Abramowicz D, Georges B, Delpech M, et al. Autosomal-dominant periodic fever with amyloidosis: novel mutation in tumor necrosis factor receptor 1 gene. *Kidney Int* 2001;59:1677–82.
12. Nevala H, Karenko L, Stjernberg S, Raatikainen M, Suomalainen H, Lagerstedt A, et al. A novel mutation in the third extracellular domain of the tumor necrosis factor receptor 1 (TNFRSF1A) in a Finnish family with autosomal-dominant recurrent fever. *Arthritis Rheum* 2002;46:1061–6.
13. McDermott MF. Genetic clues to understanding periodic fevers and possible therapies. *Trend Molec Med* 2002;12:550–4.
14. The International FMF Consortium. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 1997;90:797–807.
15. The French FHF Consortium. A candidate gene for familial Mediterranean fever. *Nat Genet* 1997;17:25–31.
16. Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* 2001;29:301–5.
17. Feldmann J, Prieur AM, Quartier P, Berquin P, Certain S, Cortis E, et al. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am J Hum Genet* 2002;71:198–203.
18. Dodé C, Le Du N, Cuisset L, Letourneur F, Berthelot J-M, Vaudour G, et al. New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes. *Am J Hum Genet* 2002;70:1498–506.
19. Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, et al. Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2445–52.
20. Arkwright PD, McDermott MF, Houten SM, Frenkel J, Waterham HR, Aganna E, et al. Hyper IgD syndrome (HIDS) associated with in vitro evidence of defective monocyte TNFRSF1A shedding, and response to TNF receptor blockade with etanercept. *Clin Exp Immunol* 2002;130:484–8.
21. Bridges SL Jr, Jenq G, Moran M, Kuffner T, Whitworth WC, McNicholl J. Single-nucleotide polymorphisms in tumor necrosis factor receptor genes: definition of novel haplotypes and racial/ethnic differences. *Arthritis Rheum* 2002;46:2045–50.
22. McDermott EM, Smillie DM, Powell RJ. The clinical spectrum of familial Hibernian fever: a 14-year follow-up study of the index and extended family. *Mayo Clin Proc* 1997;72:806–17.
23. McDermott MF, Aganna E, Hitman GA, Ogunkolade BW, Booth DR, Hawkins PN. An autosomal dominant periodic fever associated with AA amyloidosis in a North Indian family maps to distal chromosome 1q. *Arthritis Rheum* 2000;43:2034–40.
24. Keen L, Wood N, Olomolaiye O, Bidwell J. A bi-allelic VNTR in the human TNFR2 (p75) gene promoter. *Genes Immun* 1999;1:164–5.
25. Bazzoni F, Gatto L, Lenzi L, Vinante F, Pizzolo G, Zanolin E, et al. Identification of novel polymorphisms in the human TNFR1 gene: distribution in acute leukemia patients and healthy individuals. *Immunogenetics* 2000;51:159–63.
26. Pitts SA, Olomolaiye OO, Elson CJ, Westacott CI, Bidwell JL. An MspA1 I polymorphism in exon 1 of the human TNF receptor type I (p55) gene. *Eur J Immunogenet* 1998;25:269–70.
27. Eda S, Kaufmann J, Molwitz M, Vorberg E. A new method of measuring C-reactive protein, with a low limit of detection, suitable for risk assessment of coronary heart disease. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1999;230:32–5.
28. Ledue TB, Weiner DL, Sipe JD, Poulin SE, Collins MF, Rifai N. Analytical evaluation of particle-enhanced immunonephelometric assays for C-reactive protein, serum amyloid A and mannose-binding protein in human serum. *Ann Clin Biochem* 1998;35:745–53.
29. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 1993;73:431–45.
30. Gang N, Drenth JP, Langevitz P, Zemer D, Breznick N, Pras M, et al. Activation of the cytokine network in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 1999;26:890–7.
31. Tutar HE, Imamoglu A, Kendirli T, Akar E, Atalay S, Akar N. Isolated recurrent pericarditis in a patient with familial Mediterranean fever. *Eur J Pediatr* 2001;160:264–5.
32. Black RA, White JM. ADAMS: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:654–9.

## CONCLUSIONS

1. El 96% dels pacients amb diagnòstic clínic de FMF i sense mutacions al gen *MEFV* no presenten mutacions en els gens responsables d'altres SHFP: *MVK*, *CIAS1/NALP3/PYPAF1* i *TNFRSF1A*.
2. Una petita fracció (4%) d'aquests pacients presentava mutacions al *TNFRSF1A* i una clínica compatible amb la síndrome de TRAPS.
3. La detecció de mutacions al gen *TNFRSF1A* en aquests pacients, ha permès el diagnòstic diferencial de TRAPS i el redreçament de la pauta terapèutica en aquests pacients, els quals estan responent perfectament.
4. El diagnòstic clínic de la FMF a la població espanyola hauria de ser complimentat amb els estudis genètics dels gens relacionats amb les SHFP.
5. L'existència de mutacions *de novo* en els gens implicats a les SHFP d'herència autosòmica dominant, modifica el patró d'herència esperat en aquestes síndromes, que pot ser un element més de confusió en el diagnòstic clínic d'aquestes entitats.



## ANNEX

### ***TEST DE L'ALLIBERAMENT DEL TNFR1: SHEDDING ASSAY***

Es va obtenir la fracció de cèl.lules mononuclears de la sang dels pacients i dels controls, per centrifugació en un gradient de ficoll. Posteriorment, les cèl.lules es van estimular amb PMA a 37°C. Es van fenotipar i es va analitzar l'expressió del receptor per citometria de flux.

#### Obtenció de cèl.lules mononuclears:

- Diluir 20ml sang heparinitzada amb 60 ml de PBS estèril (1:4) en un flascó mitjà de cultiu.
- Preparar 4 tubs de 25 per cada individu amb 6ml de Ficoll (Histopaque-1077; Sigma 1077-1) i dispensar 20 ml de sang diluïda a cada tub.
- Centrifugar a 2000rpm durant 30 min amb capçals de fons pla (no cònics) a temperatura ambient.
- Recuperar l'anell de mononuclears amb pipeta Pasteur estèril i col·lectar els 4 anells de cada individu en 2 tubs de 25ml. Afegir PBS atemperat estèril fins dalt.
- Centrifugar a temperatura ambient a 1500rpm 10 min. i unificar el pellet de cèl.lules en 1 sol tub.
- Rentar de nou però a 4°C.
- En el darrer rentat, resuspendre en 20ml RPMI (10%FCS) fred i comptar les cèl.lules (10µl) mentre es centrifuguen (també a 4°C).
- Ajustar el volum a  $2 \times 10^6$  cels/ml.



Activació cel·lular

- Dispensar 1ml per situació en tubs de 15ml de tub taronja amb fons rodó (no cònic) col·locats en el gel. Situacions:

4°C (2ml)

37°C                    5 min

37°C                    5 min                    +PMA

37°C                    10 min

37°C                    10 min                    +PMA

37°C                    15 min

37°C                    15 min                    +PMA

- Incubar primer els tubs de temps més llarg (tant amb PMA com sense PMA) i la resta deixar-los en gel. Afegir als tubs que convingui 100µl de PMA a 1µg/µl (acabat de descongelar i mantingut en gel; 100ng/ml final). Així, la reacció es parará en el mateix moment per a tots els tubs.
- Passat el temps col·locar tots els tubs en gel i afegir 10ml de PBS fred.
- Centrifugar a 1500 rpm 7 min a 4°C.
- Decantar el SN i resuspendre el pellet en 200µl de Tampó d'Incubació (en 500µl el tub els 4°C).

Fenotipat

- Fraccionar 100µl de cada situació a tubs de FACS que continguin:

5µl CD14-FITC/ 5µl CD62L-PE o bé

5µl CD14-FITC/ 5µl CD120a-PE

Es va procedir a la lectura pel citòmetre de flux, on es va analitzar la regió CD14+ corresponent a la fracció monocítica, marcada en verd.





## CAPÍTOL 5:

### **Recerca de mutacions a les regions reguladores del gen *MEFV* en els cromosomes no mutats de FMF i sense mutacions al *MEFV***

Una de les observacions més evidents del capítol 1 de la present memòria, *Bases genètiques de la FMF a la població espanyola: caracterització de les mutacions al gen MEFV i associacions genotip-fenotip*, és l'alt percentatge de cromosomes no mutats (CNM) en els quals després d'analitzar-hi els 10 exons del *MEFV* i les zones intròniques flanquejants, no es va detectar cap mutació. El 53% dels pacients espanyols de FMF eren portadors d'una o de dues mutacions al gen *MEFV* (16,4% portadors de dues mutacions i 36,4% heterocigots) i el 47% dels pacients no presentaven mutacions codificants en el gen. Dels 72 CNM (el 71% dels cromosomes totals), 20 (27%) són de pacients heterocigots i 52 (73%) són de pacients sense mutacions exòniques detectades o pacients no mutats (PNM).

L'objectiu del següent treball va ser establir si el "defecte" causant de la FMF en els CNM es localitza en zones no exòniques al *MEFV* i per tant, establir si està associat al gen *MEFV* o si, pel contrari, la causa de la FMF es troba en un locus diferent d'aquest. La recerca de mutacions *MEFV* als CNM es va abordar d'una banda, analitzant la regió reguladora del *MEFV* situada a 5' del gen, i de l'altra, analitzant les freqüències haplotípiques dels CNM i les dels controls.

#### ***Anàlisi del promotor del MEFV***

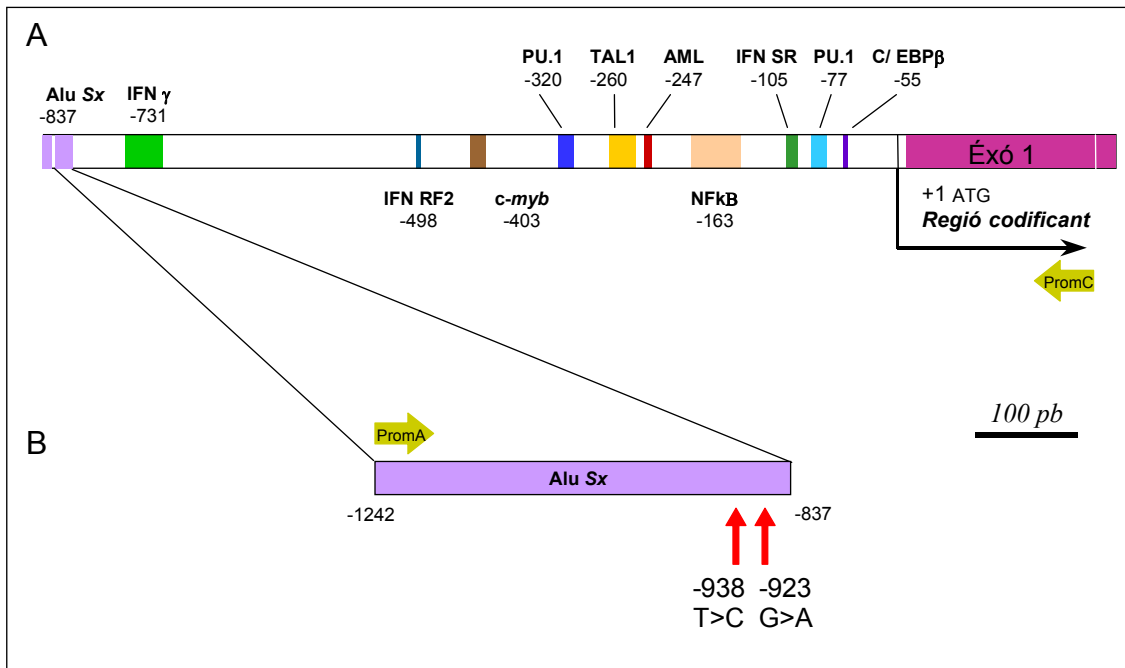
Es coneix que existeixen diversos mediadors inflamatoris que indueixen l'expressió del gen *MEFV* humà. Així, l'LPS, TNF $\alpha$  i IFN $\gamma$ , activen la transcripció del gen en monòcits, i INF $\gamma$  ho fa en neutròfils. Però es desconeix el mecanisme pel qual es dona aquesta activació, i tampoc no s'ha caracteritzat el promotor mínim del gen.

En base als resultats obtinguts *in silico*, s'han descrit una sèrie de seqüències consens, putatius llocs d'unió a factors de transcripció a la regió 5' del *MEFV* (Centola et al., 2000) (Fig.1A). Entre ells, NF $\kappa$ B, i CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP), c-myb, IFN $\gamma$ , PU.1 i AML.

Recentment, s'ha demostrat que els 243 pb de la regió 5' flanquejant al gen són suficients per induir l'expressió de *MEFV* sota l'estímul de TNF $\alpha$ . En particular, que els

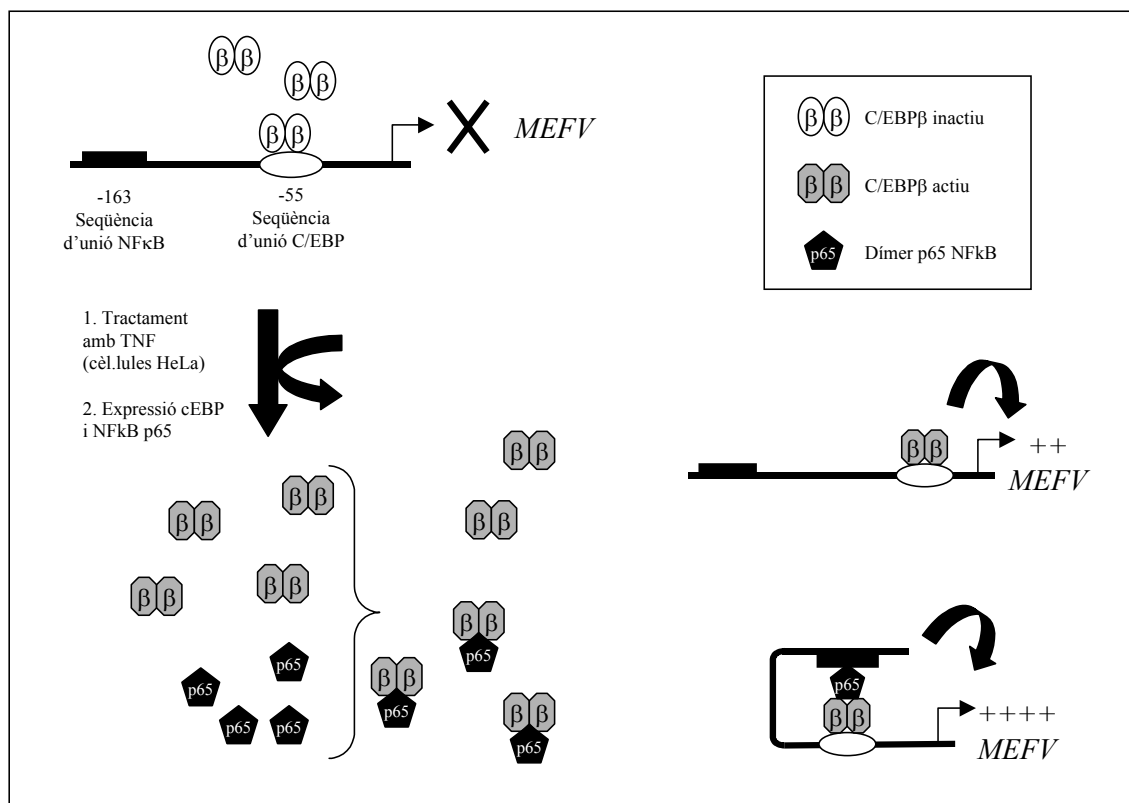
llocs d'unió per a NFκB i C/EBP són funcionalment importants en la inducció del gen sota aquest estímul en cèl.lules HeLa, als quals s'hi uneixen els factors de transcripció NFκB p65 (-163) i C/EBPβ (-55) respectivament (Papin et al., 2003).

Figura 1. Esquema de la regió 5' del gen *MEFV* i localització dels primers de PCR (PromA i PromC) de l'estudi. A; Localització a escala de les seqüències consens més destacades. B; Ampliació de la seqüència *Alu* i posició de les dues variants detectades en PNM Espanyols de FMF. pb, parells de bases.



Els mecanismes d'acció d'aquests dos factors de transcripció, NFκB p65 i C/EBPβ, sobre l'expressió del *MEFV* són diferents: C/EBPβ és essencial per la resposta a TNFα mentre que NFκB p65 actua amplificant el senyal, de manera sinèrgica amb C/EBPβ (Fig.2). També les mutacions en una o altra seqüència consens tenen repercussions diferents: mutacions en les seqüències consens de NFκB disminueixen l'activació de la transcripció del *MEFV* fins a un 50% mentre que mutacions puntuals en C/EBPβ actuen com deleccions, abolint totalment la transcripció del gen (Papin et al., 2003).

Figura 2. Model del paper de NFκBp65 i C/EBPbeta i dels respectius llocs d'unió, en l'activació de la transcripció del *MEFV* induïda per TNFα.



La presència d'alteracions en la seqüència d'aquests motius consens en els CNM, així com en d'altres seqüències presents a la regió 5' del *MEFV* que també podrien tenir repercussions sobre la transcripció del *MEFV* o sobre la regulació del procés transcripcional, podrien constituir el "defecte" causant de la FMF associat a aquests cromosomes i per tant, podrien a explicar la manifestació de la FMF en pacients heterocigots o en els no mutats. En base a aquesta hipòtesi es va realitzar el següent estudi.

Per l'estudi de la regió 5' del *MEFV* es van estudiar 35 dels pacients espanyols de FMF no emparentats, dels quals 33 eren heterocigots pel *MEFV* i 2 eren PNMs.

Es va analitzar una zona de 1.500pb situats a la regió 5' del *MEFV* per tal d'englobar abastament les seqüències consens descrites. Per PCR, es va generar l'amplímer corresponent a aquesta zona genòmica (Fig.1A) que posteriorment es va seqüenciar bidireccionalment amb tres parells de cebadors. Les seqüències dels cebadors i les condicions d'amplificació es mostren a la Taula 1.

Taula 1. Seqüència dels cebadors de la regió 5' del *MEFV* i condicions d'amplificació.

Cebadors	Seqüència (5'-3')	Condicions de PCR	
PCR			
Prom-A	ttg aga caa agt ccc gct ct	Desnaturalització	1 cicle
Prom-B	cac tca gca ctg gat gag ga		94°C 5'
Prom-C	agt tcc aaa ggc cag agt ga	Amplificació	35 cicles
Cebadors			94°C 45'
seqüència			60°C 45''
SF1	ggg gtt tta ctg tgt tgg		72°C 1'30''
SF2	gtc cct gaa acc ccg agt ct	Extensió final	1 cicle
SF3	cct ctc tgt tcc cac tca cc		72°C 20'
SR1	aca aag cag cca gca ctc ag		
SR2	egg ctg tgt tet ctt ctt ac		
SR3	ctc cag act egg ggt ttc ag		

Es varen detectar 2 canvis en la seqüència nucleotídica de la regió 5' del gen, ambdues localitzades en la seqüència repetitiva *Alu* i situades a les posicions -938 i -923 respecte l'origen de transcripció (Fig. 1B).

El canvi T>C a la posició -938 es va detectar en 48 cromosomes (69%), 45 dels quals eren CNM de pacients heterocigots (94%) i 3 eren de PNM (6%). Es va estudiar la possibilitat que la variant fos un polimorfisme: el SNP -938 es va detectar en la població control i en una freqüència al·lèlica que no diferia del grup de pacients, ni en el seu global, ni separatament pel criteri de una o cap mutació en el *MEFV*.

La variant al·lèlica G>A a la posició -923 es va detectar exclusivament en un pacient i en cap dels individus controls. El pacient portador de la variant -923 era el pacient índex de la família presentada al capítol 2. Breument, el pacient pertany a una família afectada d'una síndrome inflamatòria associada a la variant H478Y del *MEFV* i caracteritzada per un fenotip sever, resistent a la colquicina, associat a amiloïdosi i amb un patró d'herència dominant. L'estudi familiar per la detecció de la variant -923 indicava la segregació d'aquesta amb la FMF, és a dir, tots els pacients eren portadors del canvi -923 mentre que cap dels membres sans de la família era portador de la variant, de la qual cosa es dedueix que el SNP -923 i H478Y es troben al mateix cromosoma. Val a dir que el CNM de cada un dels pacients d'aquesta família seguia sense tenir mutacions associades

La seqüència *Alu* és, dels 1.500pb analitzats a 5' del *MEFV*, la que es troba més allunyada de l'inici de la transcripció del gen *MEFV*, a uns 800pb. Els elements *Alu* son seqüències d'uns 300 nucleòtids de llargada que es retrotranscriuen i es tornen a integrar en el genoma de manera aleatòria. S'ha proposat una diversitat de funcions pels elements *Alu* entre les que destaca l'arquitectura cromosòmica. A més, els elements *Alu* han contribuït en gran mesura al desenvolupament de certes malalties humanes, bàsicament mitjançant els mecanismes d'inserció i de recombinació no homòloga. S'estima que contribueixen a les malalties genètiques humanes per aquests mecanismes en un 1% i un 0.3% respectivament (Deininger i Batzer, 1999). La majoria d'insercions *Alu* que causen desordres genètics humans són els que s'inserten en zones exòniques o en introns relativament propers a exons, presumiblement alterant els mecanismes de *splicing*. La influència dels elements *Alu* en l'expressió gènica quan s'inserten a 5' dels gens però, depèn de la distància de la regió promotora o enhancer a la què s'han insertat. S'ha descrit que la inserció d'elements *Alu* propera a aquestes regions influeixen



l'expressió gènica (Britten, 1996). En el cas del gen *MEFV*, es desconeix la influència de les seqüències *Alu* situades a 5' del gen, a uns 1200 pb, sobre l'expressió del gen o en el control de la seva regulació. Així com també l'efecte que poden produir la presència de mutacions puntuals sobre aquests elements. En l'actualitat no s'ha descrit que aquests tipus de mutacions tinguin un efecte transcripcional ni associat a malaltia.

La variant al·lèlica -923 sembla estar restringida a una única família afectada de FMF (o *FMF-like*), segregant amb la malaltia i també amb la mutació del *MEFV* H478Y, la qual cosa implica l'associació física d'ambdues variants al mateix cromosoma i l'absència de mutacions al CNM dels pacients d'aquesta família. Una hipòtesi sobre el possible efecte de -923 en els pacients d'aquesta família és que la variant -923 regularia a l'alça la transcripció del *MEFV* en *cis*, és a dir, sobre el mateix al·lel, que alhora és portador de la variant exònica H478Y. Es postula que la producció de P/M mutada podria ser massiva respecte la proteïna no mutada de l'altre cromosoma, la qual cosa explicaria l'efecte dominant que sembla estar exercint la variant H478Y i el patró d'herència autosòmic dominant de la malaltia en aquesta família. En vista de la localització d'aquesta variant en una regió *Alu* però, el mecanisme proposat sembla poc plausible. El més probable és que el SNP -923 sigui, simplement, la troballa d'un polimorfisme poc freqüent en la població (<0.05%) en desequilibri de lligament amb la H478Y, i no pas el factor responsable de la malaltia en aquesta família, la qual seria causada per un efecte dominant negatiu de la mutació H478Y (veure discussió del capítol 2).

Malgrat aquests resultats, no es pot descartar l'existència de mutacions intròniques o a la zona no traduïda a l'extrem 3' del gen, que podrien ser importants en la regulació de la transcripció o en la estabilitat del missatger del *MEFV*. En cas contrari, les dades que aquí es presenten suggeririen l'existència d'heterogeneïtat de locus en la base genètica de la FMF.

### ***Anàlisi de les freqüències haplotípiques del MEFV***

S'havia demostrat l'absència de mutacions en els 10 exons del *MEFV*, en les zones intròniques flanquejants als exons i en la regió 5' del gen en els CNM dels pacients de FMF. La presència de variants al·lèliques localitzades en zones no analitzades, com ara l'interior dels introns o possibles zones reguladores a 3' del gen, i possiblement implicades en la transcripció del *MEFV* o en la seva regulació, podria explicar per què els pacients heterocigots manifesten la malaltia. Una altra qüestió seria,

un cop detectada la possible variació al·lèlica, demostrar-ne la causalitat i el mecanisme mitjançant el qual causaria la FMF.

Es pot hipotetitzar que aquestes mutacions dificultarien, desregularien o fins i tot anul·larien l'expressió del gen *MEFV* del CNM. Per exemple, afectant l'estabilitat del missatger del gen i dificultant el procés de traducció de la P/M, regulant a la baixa o bé, alterant-ne el control, de l'expressió específica de teixit del *MEFV*. Sota aquesta hipòtesi, la manifestació de la FMF en un pacient heterocigot, s'explicaria per la presència d'una variant no exònica en el CNM que complementaria amb la mutació exònica de l'altre cromosoma, actuant en realitat com un heterocigot compost. De la mateixa manera, els PNM podrien ser portadors de dues mutacions, una en cada un dels CNM. Val a dir que les possibles mutacions, haurien de ser freqüents, donat l'alt nombre de pacients de FMF heterocigots i PNM detectats a la població espanyola.

Per tal d'assolir l'objectiu del present treball es va optar per realitzar el càlcul de la freqüència dels haplotips intragènics al *MEFV* observats en els CNMs i en la població control. Si la "buscada" mutació fos freqüent, l'haplotip amb el qual s'heretaria s'observaria en major freqüència en el grup de pacients que no en la població control. En el cas contrari, es podria afirmar l'absència de defectes freqüents en els CNM en els pacients de FMF alhora que suggeriria l'existència de la participació d'un, o més, loci implicats en la FMF. Aquesta estratègia es plantejava alternativa a l'anàlisi seqüencial dels introns i de la regió reguladora 3' del *MEFV*, i postergava els estudis d'expressió o funcionals que evidentment, s'abordarien en els casos que es detectessin positius.

El grup control el constituïen 100 individus sans (200 cromosomes). Els haplotips del grup control es varen obtenir mitjançant el programa informàtic Arlequin 2.000 que permet inferir haplotips per mètodes estadístics i estimar les freqüències haplotípiques (veure detalls metodològics al capítol 6).

Els haplotips dels CNM provinents dels pacients heterocigots es varen determinar mitjançant l'anàlisi de segregació familiar o per clonació, mentre que els haplotips dels PNM es varen estimar mitjançant la mateixa metodologia que els haplotips controls.

Es varen comparar les freqüències dels haplotips controls *versus* les dels CNM mitjançant el test de la  $\chi^2$ . El resultat va ser negatiu, és a dir, no s'observaren diferències estadísticament significatives entre els dos grups ( $\chi^2=5.614$ ,  $p=0.343$ ).



## CONCLUSIONS

1. No existeixen mutacions freqüents en la regió 5' del *MEFV* en els cromosomes no mutats dels pacients espanyols diagnosticats clínicament de FMF, ni els dels heterocigots ni els dels PNMs, que expliquin la seva afectació per la FMF, en base al model clàssic autosòmic recessiu de la malaltia.
2. El canvi -938 és un polimorfisme present a la població general espanyola.
3. El canvi -938 és una variant detectada únicament en una família i associada a la variant exònica H478Y.
4. La similitud en la freqüència haplotípica observada dels cromosomes no mutats dels pacients diagnosticats clínicament de FMF amb una o cap mutació, amb la freqüència haplotípica detectada a la població control, permet descartar amb una alta probabilitat, l'existència de mutacions no exòniques que siguin les responsables de causar la FMF en pacients amb una o cap mutació exònica.
5. Aquest fet no descarta la possibilitat que algun d'aquests pacients sigui portador d'una alteració en el *MEFV*, no detectada amb la metodologia emprada, que en qualsevol cas, seria poc freqüent.
6. Es confirma la possibilitat de què la síndrome inflamatòria que presenten els pacients sense mutacions al *MEFV* constitueixi una entitat etiopatològica diferent a la de la FMF clàssica i que, per tant, el defecte genètic es localitzi en un altre locus o loci relacionats amb la regulació del procés inflamatori diferent del *MEFV*.



**PART II**









## CAPÍTOL 6:

### **Dinàmica genòmica del locus *MEFV* i història natural de les mutacions causants de la FMF més freqüents al vessant occidental de la Mediterrània**

#### **INTRODUCCIÓ**

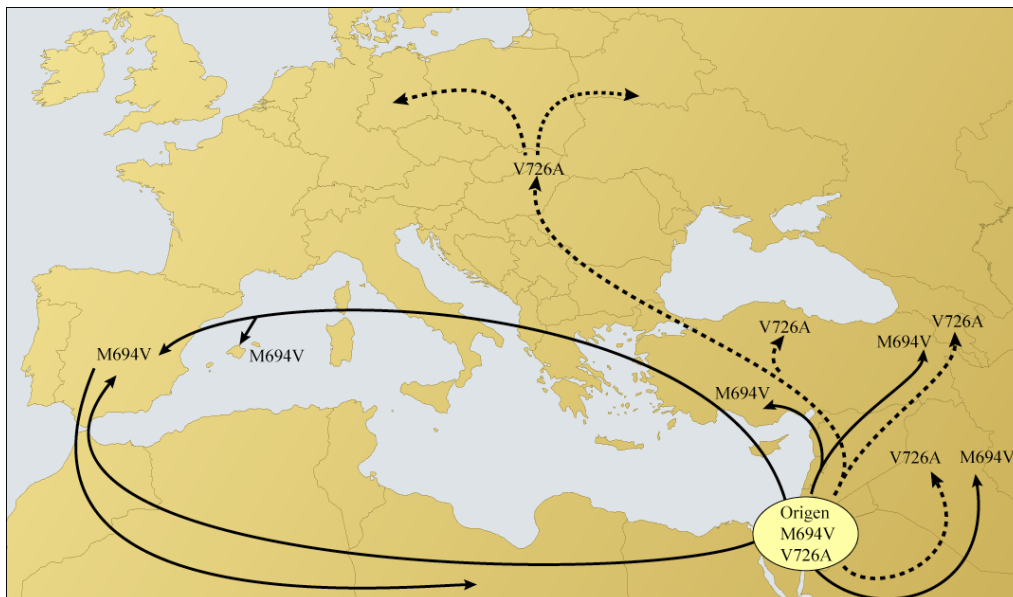
Al 1997, el Consorci Internacional i el Consorci Francès per a la FMF van identificar el gen responsable de la FMF, el gen *MEFV*. Es varen detectar 4 variants a la seqüència genòmica del gen, M680I, M694V, M694I i V726A, que segregaven amb la FMF en famílies pertanyents a poblacions on la malaltia és altament prevalent. La freqüència de les variants al·lèliques detectades en aquestes poblacions era molt alta: el 85% dels cromosomes dels pacients de FMF eren portadors d'alguna d'aquestes mutacions.

Es va observar que cada una d'aquestes mutacions es transmetia a la descendència de manera associada, o en desequilibri de lligament (LD, de l'anglès, linkage disequilibrium), amb un o més haplotips determinats. La mutació M694V es va observar associada a dos haplotips: el Med(A), altament freqüent en pacients jueus del nord d'Àfrica (JNAfr) i en menor grau en pacients armenis (Arm), i el B, detectat en pacients jueus iraquians (JIr). La mutació M680I, s'heretava lligada a l'haplotip anomenat Arm2, freqüent en pacients armenis i turcs (Tur) i la variant M694I es va detectar associada a l'haplotip Ara2, observat en pacients àrabs magrebhins (AraMgb) i jueus no-ashkenazites (JNA). Finalment, la variant V726A s'heretava en LD amb l'haplotip Arm3, present en pacients de diverses ètnies: armenis, jueus ashkenazites (JA) i no-ashkenazites (JNA, bàsicament JIr), turcs i drusos.

El fet que els haplotips associats a la variant M694V convergien en la regió que conté la mutació, és a dir, que compartien la seqüència propera al lloc de la variant, suggeria l'existència d'un haplotip fundador o ancestral. Per aquest fet, juntament amb la detecció d'aquests haplotips en poblacions amb un origen comú fa 2.000-2.500 anys, es va hipotetitzar que la mutació es podria haver generat en temps bíblics, a l'antiga Judea, i que els cromosomes actuals portadors de la M694V s'haurien generat a partir de l'haplotip fundador originat a l'Orient Mitjà.

En aquest sentit, es va proposar una hipòtesi sobre la història natural de les mutacions del *MEFV*, segons la qual, la mutació M694V hauria tingut dues vies de dispersió: 1) a l'oest per la costa africana fins a la Península Ibèrica, des d'on la mutació hauria tornat a migrar amb l'expulsió dels jueus sefardites decretada pels Reis Catòlics, i 2) al nord, bifurcant-se per Turquia i l'Àsia Menor, i per Grècia, Itàlia i la costa més occidental de la mediterrània. Tanmateix, es va hipotetitzar que la mutació V726A s'hauria dispersat per l'Europa central i l'Àsia Menor (Fig.1).

Figura 1. Hipòtesi sobre l'origen i les vies de migració de les mutacions del *MEFV* M694V i V726A per la conca Mediterrània.



D'ençà que es va postular aquesta hipòtesi però, no s'ha avançat més en l'estudi de la història natural de les mutacions del *MEFV*. Els estudis que s'han anat publicant s'han centrat en la detecció de les mutacions causants de la FMF bàsicament en poblacions ancestrals, en les freqüències de les mutacions en aquestes poblacions, i en l'estudi de possibles correlacions genotip-fenotip. Tampoc no s'ha profunditzat en l'estudi dels haplotips de la població control; no es té coneixement de si hi ha un haplotip majoritari i comú a tota la població espanyola o, contràriament, de si hi ha un espectre divers d'haplotips associats al locus del gen *MEFV*, ni quins haplotips el constitueixen.

En el següent capítol es pretenia abordar aquests aspectes en la població espanyola i xueta afectades per la FMF.

### ***Haplotips MEFV a la població control espanyola***

El primer objectiu d'aquest treball va ser analitzar i descriure els haplotips associats al locus *MEFV* en la població control espanyola. En el cas d'observar un espectre ampli d'haplotips, s'establiria una nomenclatura sistematitzada, es calcularien les freqüències haplotípiques i s'analitzarien les similituds i diferències entre els haplotips detectats, mirant d'establir-hi relacions, com ara l'assignació d'un haplotip fundador o ancestral, a partir del qual es podrien haver originat la resta dels haplotips. Finalment, s'estudiarien els possibles mecanismes responsables de la generació de la diversitat haplotípica observada.

### ***Haplotips del MEFV associats a mutacions en els pacients espanyols***

L'altre objectiu principal del treball està relacionat amb els haplotips associats a les mutacions del *MEFV* causants de la FMF en pacients espanyols. Davant el desconeixement de la història natural de les mutacions més freqüents del *MEFV* en poblacions no ancestrals, es va voler determinar, en primer lloc, els haplotips en què es troben les mutacions en els pacients espanyols de FMF i assignar-los un nom en base a la nomenclatura sistematitzada dels haplotips controls, que esdevingués de referència per a altres estudis. En segon lloc, determinar la freqüència de cada un dels haplotips mutats i estudiar els mecanismes generadors de la possible diversitat haplotípica. Finalment, analitzar aquests haplotips, relacionant-los amb els que es detecten en poblacions ancestrals, és a dir, establir si són els mateixos, si són haplotips recombinants o si, pel contrari, són totalment diferents, la qual cosa suggeriria l'existència de mutacions recurrents al vessant més occidental de la conca mediterrània.

### ***Haplotips del MEFV en els pacients xuetes de Mallorca***

L'objectiu d'aprofundir en l'estudi genètic dels pacients de FMF espanyols es va fer extensiu al dels pacients pertanyents a la comunitat xueta de Mallorca, la qual cosa, per les característiques poblacionals d'aquesta comunitat, permetria obtenir una visió més ampla sobre la història natural de les mutacions a l'altra banda de la Mediterrània i, pot ser també, ajudarien a conèixer millor el *background* o rerafons genètic dels

xuetes. Es determinarien les mutacions del *MEFV* causants de la FMF en aquests pacients, els haplotips als quals estarien associades, i les freqüències de cada haplotip.

### ***Història natural de les mutacions del MEFV. Genètica de poblacions.***

En base a les dades obtingudes un tercer objectiu seria postular una hipòtesi sobre la història natural de les mutacions del *MEFV* al seu pas pel vessant occidental de la Mediterrània: s'estudiarien les possibles relacions entre els haplotips mutats dels pacients espanyols i els dels xuetes, així com la relació d'aquests amb els haplotips descrits en poblacions, tant ancestrals com no-ancestrals, i s'integrarien les dades obtingudes en la hipòtesi de la història natural de les mutacions del *MEFV* postulada al 1997. Finalment, s'estudiaria si la informació obtinguda en l'estudi del *MEFV* en els pacients xuetes, més enllà de ser rellevant per la genètica de la FMF, podria ser interpretada en termes de l'origen poblacional d'aquesta comunitat i si podria extreure-se'n alguna conclusió.

### ***METODOLOGIA***

Es varen analitzar, per seqüenciació automàtica, un total de 29 marcadors intragènics al gen *MEFV*, distribuïts al llarg de la seva seqüència gènica, des de l'exó 1 a l'exó 10. Els marcadors utilitzats són polimorfismes d'un sol nucleòtid o SNP (de l'anglès, single nucleotide polymorphism), sinònims i no sinònims, que es localitzen majorment en zones exòniques. Després de calcular les freqüències al·leliques de cada un dels marcadors en el grup control, es varen seleccionar els marcadors informatius que s'utilitzarien per determinar els haplotips en els grups d'estudi (Taula 1).

El grup control estava constituït per 100 individus sans no emparentats: 200 cromosomes. La determinació dels haplotips d'aquest grup es va realitzar per inferència d'haplotips mitjançant el programa informàtic Arlequin, versió 2.000. Aquest programa proporciona un llistat dels haplotips i les seves freqüències, inferits a partir de les dades dels genotips dels individus de la mostra control, en base als haplotips estadísticament més versemblants.

Del grup de pacients, es varen estudiar 50 pacients de FMF espanyols i 14 de xuetes. En cap dels dos grups de pacients no hi havia individus emparentats. La resolució de les fases indeterminades, és a dir, l'assignació dels al·lells en cada una de les posicions heterocigotes amb l'al·lel mutat, es va dur a terme mitjançant l'*anàlisi* dels familiars o, quan no va ser possible, es va clonar el cDNA del *MEFV* corresponent a

cada al·lel de cada un dels pacients per obtenir-ne els haplotips matern i patern en cada cas.

Taula 1. Freqüències al·lèliques dels 9 SNPs en la població control espanyola (200 cromosomes) que defineixen els haplotips intragènics del gen *MEFV*.

Polimorfisme	Al·lel	Freqüència al·lèlica (%)
D102D	T	59.5
	C	40.5
G138G	G	41
	A	59
A165A	C	59.5
	A	40.5
R202Q	G	75
	A	25
R314R	T	53
	C	47
E474E	A	51.5
	G	48.5
Q476Q	G	51.5
	A	48.5
D510D	C	52
	T	48
P588P	G	50
	A	50

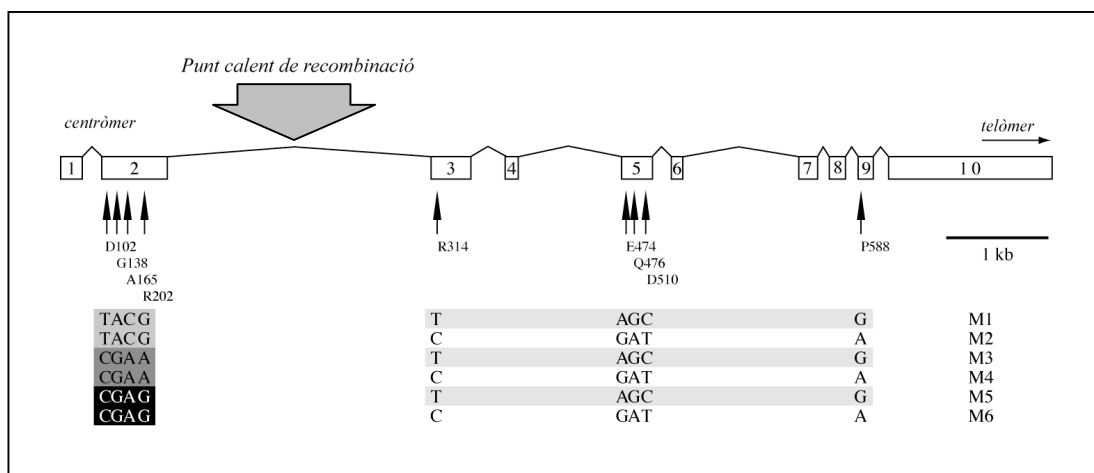
## RESULTATS

### Haplotips controls

L'anàlisi dels haplotips controls mostra que hi ha 6 haplotips intragènics del *MEFV* majoritaris (M) a la població, anomenats M1-M6, que representen el 92% dels cromosomes (Fig.1 de l'article).

Els haplotips M estan constituïts per dos blocs, separats pel l'intró 2, i per combinacions dels subhaplotips de cada un dels blocs (Fig.2).

Figura 2. Representació esquemàtica a escala de la regió genòmica del locus *MEFV*, al 16p13.3, localització dels SNPs intragènics utilitzats per la descripció dels haplotips intragènics i els 6 haplotips majoritaris de la població control espanyola (M1-M6). Els blocs de cada subhaplotip s'indiquen amb diferents tonalitats i la localització del punt calent de recombinació, a l'intró 2, amb una fletxa.

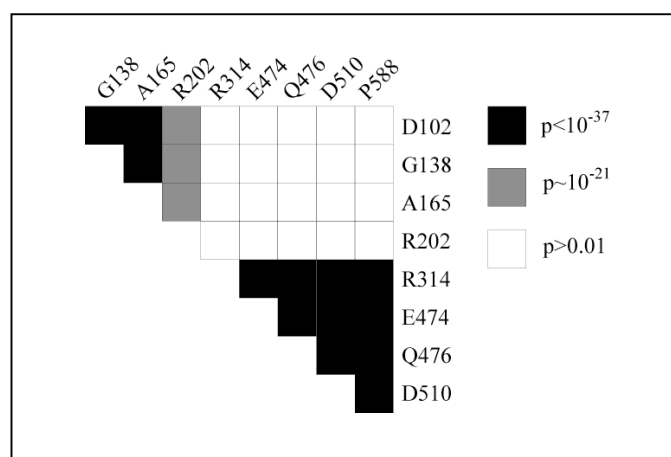


Es va estudiar el LD a dos nivells, per tests de correlació ( $r^2$ ) i pel test de Fisher. Les freqüències haplotípiques dels haplotips majoritaris es troben en equilibri de lligament respecte a les freqüències de cada subhaplotip. En canvi, hi ha un altíssim desequilibri de lligament (LD) dins de cada bloc. Val a dir que el LD existent al bloc 5', on coexisteixen els subhaplotips TACG, CGAA i CGAG, és encara més alt si no es té en compte la darrera posició (R202Q), com ho indiquen els valors del test de Fisher i els valors de l'índex de correlació ( $r^2$ ) dels SNPs que conformen els blocs 5 i 3' del gen (Fig.3). El paràmetre FNF es basa en el principi que el nombre d'haplotips diferents associats a un locus determinat, en general, decreix a mida que augmenta el LD existent en aquest locus. El valor de FNF correspon a la fracció d'haplotips esperats no observats i es calcula amb la fórmula:

$$FNF = (K_{\max} - K_{\text{obs}}) / (K_{\max} - K_{\min})$$

on  $K_{\text{obs}}$  és el nombre observat d'haplotips,  $K_{\max}$  és el nombre d'haplotips esperats en equilibri de lligament i  $K_{\min}$  és el mínim possible d'haplotips donat els nombre d'al·lels a cada locus (per cada haplotip amb només loci bial·lèlics,  $K_{\min} = 2$ )

Figura 3. Significació dels tests exactes de Fischer per a l'associació dels al·lels entre els diferents SNPs constituents dels haplotips del *MEFV*



Per tal de valorar la diversitat d'haplotips observada al locus *MEFV*, es va estimar el valor de FNF amb les dades dels 200 cromosomes de la població control espanyola. Es varen observar un total de 18 haplotips diferents del locus *MEFV* i un valor de FNF de 0.896, mentre en condicions d'equilibri de lligament se n'haurien esperat un total de 156 haplotips i un valor de FNF de 0. Donada la distribució del nombre d'haplotips esperat, el valor observat va ser de 28.02 desviacions estàndards per sota de la mitja. Així, fins i tot encara que els dos blocs del locus *MEFV* estan en equilibri de lligament l'un respecte l'altre, el LD dintre de cada bloc és suficient com per reduir la diversitat fins als 18 haplotips diferents detectats a la població espanyola.

Es va estimar el valor FNF per a altres gens, a partir de la base de dades ALFRED (<http://alfred.med.yale.edu>) la qual ofereix les freqüències haplotípiques d'altres gens i es van comparar els valors de FNF (Taula 2). Les dades demostren que la diversitat d'haplotips associats al *MEFV* és limitada. Només el gen *ATM* té tan poca diversitat com el *MEFV*, i amb diferència dels valors obtinguts per a altres gens.



Taula 2. Valors de FNF del gen *MEFV* i altres. 2N, grandària de la mostra en nombre de cromosomes; SNPs, nombre de SNP estudiats per a cada gen; K, nombre dels haplotips diferents observats; K esp, nombre esperat d'haplotips diferents donat la grandària de la mostra i les freqüències al·lèliques, en condicions d'equilibri de lligament; FNF, de l'anglès Fraction not Found, fracció dels haplotips esperats que no observada a la mostra; d, distància en nombre de desviacions estàndard entre K i Kesp.

Gen	2N	SNPs	K	Kesp	p	FNF	d
<i>ATM</i>	154	14	7	148.9	$10^{-5}$	0.953 ±0.017	64.10
<b><i>MEFV</i></b>	<b>200</b>	<b>9</b>	<b>18</b>	<b>155.98</b>	<b><math>10^{-5}</math></b>	<b>0.885 ±0.026</b>	<b>28.02</b>
<i>PAH</i>	178	6	24	46.71	$10^{-5}$	0.486 ±0.073	8.43
<i>ADH</i>	174	7	17	37.13	$10^{-5}$	0.542 ±0.082	7.69
<i>D4S10</i>	180	5	16	25.96	$10^{-5}$	0.384 ±0.095	5.87
<i>VW</i>	300	6	15	22.40	$1.8 \times 10^{-4}$	0.330 ±0.099	3.52
<i>HOXB6</i>	60	5	9	14.39	$2.3 \times 10^{-3}$	0.375 ±0.128	2.94

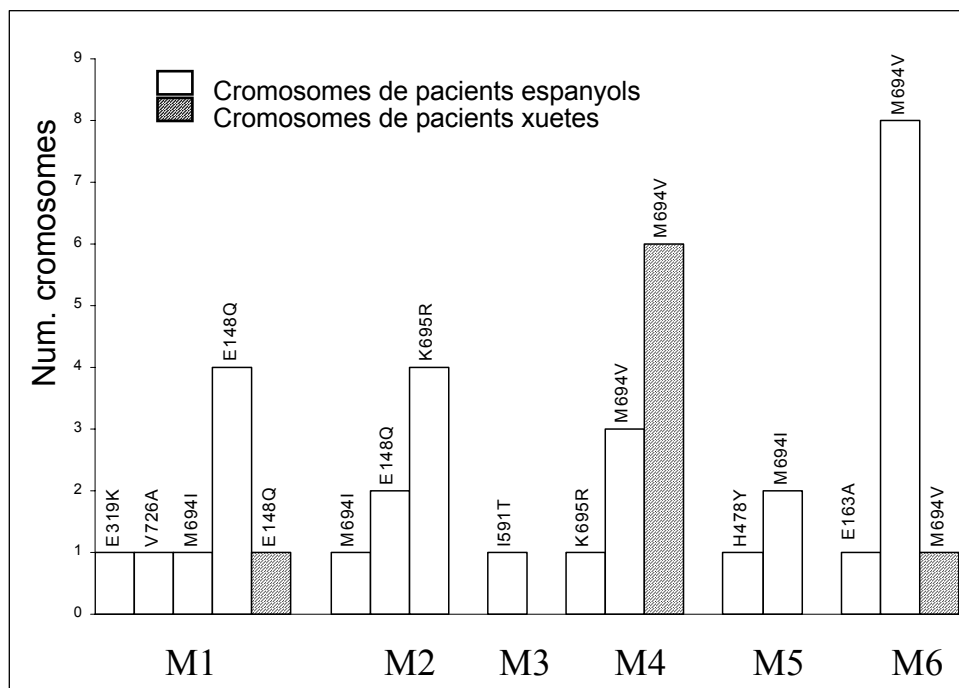
### ***Haplotips mutats***

L'estudi dels cromosomes dels pacients espanyols mostra que el context genòmic de cada una de les mutacions correspon als haplotips trobats a la població control (Figura 2 de l'article). Les mutacions més freqüents en el grup de pacients espanyols es troben associades a més d'un haplotip i no hi ha cap haplotip associat a una mutació en concret (Fig.4).

La mutació M694V s'observa associada, per ordre de freqüència, a l'haplotip M6 i a l'haplotip M4, altrament anomenat Med(A), entre els quals la posició R202Q és la única diferència. Els haplotips observats associats a la mutació E148Q en els pacients espanyols, M1 i M2, convergeixen al bloc de 5' del *MEFV*, el qual conté la mutació. La variant al·lèlica M694I és la que es detecta associada a un més ampli espectre d'haplotips: M2 també anomenat Ara2, i dos haplotips més no descrits prèviament. Finalment, es descriuen per primera vegada els haplotips associats a la variant K695R, i a la menys freqüent I591T, i se suggereix un efecte fundador també per a aquestes mutacions. La variant V726A, molt freqüent en poblacions ancestrals, s'ha detectat en només un cromosoma i associada a l'haplotip M1, també anomenat Arm3(C).

Les mutacions M694V i E148Q són les úniques variants del *MEFV* observades en els pacients xuetes, les quals es varen detectar en 12 i un cromosomes respectivament. M694V es troba associada als mateixos haplotips que en els pacients espanyols, M4 i M6, però a diferència d'aquest, l'haplotip més freqüentment associat a la variant és M4 (Fig.4).

Figura 4. Nombre de cromosomes mutats de pacients de FMF espanyols i xuetes, agrupats pels haplotips que contenen les mutacions.





**MUTATION IN BRIEF**

# The West Side Story: *MEFV* Haplotype in Spanish FMF Patients and Controls, and Evidence of High LD and a Recombination “Hot-Spot” at the *MEFV* Locus

Anna Aldea<sup>1</sup>, Francesc Calafell<sup>2</sup>, Juan I. Aróstegui<sup>1</sup>, Oscar Lao<sup>2</sup>, Josefa Rius<sup>1</sup>, Susana Plaza<sup>1</sup>, Montserrat Masó<sup>1</sup>, Jordi Vives<sup>1</sup>, Joan Buades<sup>3</sup>, and Jordi Yagüe<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Servei d'Immunologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Barcelona, Catalonia, Spain;* <sup>2</sup> *Unitat de Biologia Evolutiva, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Catalonia, Spain;* <sup>3</sup> *Servei de Medicina Interna, Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca, Illes Balears, Spain*

\*Correspondence to: Jordi Yagüe Ribes, Servei Immunologia, Hospital Clínic, c/ Villarroel 170, 08036, Barcelona, Catalonia, Spain; Tel: 34.93.454.49.20; Fax: 34.93.451.80.38' E-mail: jyague@clinic.ub.es

Grant sponsor: MARATÓ TV3; Grant number: 003110; Grant sponsor: MCYT Spain; Grant number: BMC 2001-0772

Communicated by Dvorah Abeliovich

**Mutations at the *MEFV* gene cause, with various degrees of penetrance, familial Mediterranean fever (FMF). This disease is more prevalent in the Middle East than elsewhere, and most studies have focused on those populations. However, FMF occurs also in the Western Mediterranean and these populations should be taken into account for a complete view of FMF. We have analyzed intragenic *MEFV* SNPs in Spanish and Chueta (descendants of converted Jews) FMF patients and controls, and this constitutes the first systematic survey of normal *MEFV* SNP haplotype structure and variability. Our findings have allowed us to systematize the nomenclature of *MEFV* haplotypes and show that there is strong linkage disequilibrium (LD) at the *MEFV* locus and an intragenic recombination hot spot. The high local LD, regardless the recombination hot spot, is responsible for the limited diversity of the *MEFV* control haplotypes found in the Spanish population and it suggests that it may be a common feature to all Mediterranean populations. The *MEFV* mutation spectrum in Spain is quite diverse, and similar to those of France and Italy. On the contrary, the Chueta spectrum was poorer and closer to that of North African Jews, suggesting a direct connection with the Jewish diaspora. © 2004 Wiley-Liss, Inc.**

KEY WORDS: *MEFV*; FMF; SNP; haplotype; linkage disequilibrium; recombination hotspot

## INTRODUCTION

Familial Mediterranean Fever (FMF, MIM# 249100) is an autosomal recessive disease characterized by recurrent short episodes of fever and serositis which may lead to secondary Amyloid A (AA) amyloidosis and renal failure in some patients [Sohar et al., 1967]. FMF affects predominantly people from the Middle East: Non-Ashkenazi Jews (NAJ), Arabs, Armenians and Turks, which are often called “the ancestral populations”. It is less frequent in other Mediterranean populations, and sporadic elsewhere [Touitou, 2001]. It has been shown that FMF is caused by mutations at the *MEFV* gene (*ME*diterranean *Fe*Ver), located in chromosome 16p13.3 [The French FMF Consortium, 1997; The International FMF Consortium, 1997].

Received 24 July 2003; accepted revised manuscript 4 February 2004.

Four missense mutations — c.2040G>C (M680I), c.2080A>G (M694V), c.2082G>A (M694I) and c.2177T>C (V726A) — were found to be associated with FMF in Jewish, Arab, Armenian and Turkish FMF families, accounting for 85% of FMF chromosomes. Additionally, the M694V mutation was associated with the Med (A) haplotype and with the B haplotype. The finding that these two haplotypes converged at intragenic SNPs and the fact that were found in populations relatively isolated for centuries suggested that the M694V variant may be an ancient mutation, originating 2,500 years ago. To date, up to 40 *MEFV* mutations have been reported in the INFEVERS database (<http://fmf.igh.cnrs.fr/infevers>), being distributed in a wide range of non-ancestral populations [Sarrauste de Menthiere et al., 2003].

In the present study we have characterized the *MEFV* SNP haplotypes in Spanish and Chueta (descendants of Majorcan Jews) FMF patients and in Spanish controls in order to address a number of issues. Patterns of linkage disequilibrium (LD) in control haplotypes can be used to infer the genomic dynamics of the *MEFV* region, including the detection of a recombination hotspot in intron 2. The knowledge of SNP haplotype backgrounds in controls allows also to systematize its nomenclature in mutated chromosomes. This information can be then applied to the reconstruction of mutation history and, in particular, to the dispersion of FMF in the Mediterranean basin.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and control subjects

Both approval from the Institutional Review Board of the Hospital Clínic, Barcelona, and written-informed consent from controls and patients were obtained for the present study.

The control group consisted of 100 anonymous autochthonous mainland Spanish healthy donors. This sample is intended as a control for the general Spanish FMF patients rather than for our Chueta patients.

A panel of 50 unrelated Spanish FMF patients was studied. No known consanguinity and no Jewish ancestry, or other ancestry in populations of high FMF incidence, was known for those patients. A group of 14 Chueta unrelated FMF patients from Mallorca, the largest of the Balearic Islands, was also studied. Chuetas are the Mallorcan individuals who carry one of the 15 surnames belonging to crypto-Jews who were persecuted and stigmatized by the Spanish Inquisition in the 17th century and whose descendants were marginalized from mainstream Mallorcan society ever since. Their genetic Sephardic Jewish origin has been shown by the affinity of their HLA haplotypes to those of other Jewish communities [Crespi et al., 2002]. All studied patients were diagnosed with FMF according to the clinical Tel-Hashomer diagnosis criteria.

### *MEFV* haplotype determination

Determination of the *MEFV* intragenic SNP haplotypes was performed by DNA sequencing: all 10 *MEFV* exons as well as the immediately adjacent intronic sequences were analyzed as previously described [The International FMF Consortium, 1997]. Phase resolution of FMF patients was achieved by genotyping asymptomatic parents or siblings or, when not available, by cloning *MEFV* cDNA of each patient [Papin et al., 2000]. *MEFV* control haplotype frequencies were estimated on the basis of unphased genotype data, with the EM algorithm as implemented in the Arlequin software [Schneider et al., 2000].

The reference sequence and version number of *MEFV* cDNA used is NM\_000243.1 (GenBank). The SNPs and mutations studied, in order from centromere to telomere, were: c.181C>T (x1/Y65Y), c.306C>T (x2.1/D102D), c.414G>A (x2.2/G138G), c.442G>C (*E148Q*), c.488A>C (*E163A*), c.495A>C (x2.3/A165A), c.501G>C (*E167D*), c.605G>A (x2.4/R202Q), c.800C>T (*T267I*), c.942C>T (x3.1/R314R), c.955A>G (*E319K*), c.1179C>T (x3.2 P393P), c.1356+43A>G (i4.1), c.1422A>G (x5.1 E474E), c.1428A>G (x5.2/Q476Q), c.1432C>T (*H478Y*), c.1437C>G (*F479L*), c.1530C>T (x5.3/D510D), c.1610+95C>T (i6.1), c.1759+325A>G (i8.1), c.1759+333T>A (i8.2), c.1764A>G (x9.1/P588P), c.1772T>C (*I591T*), c.2040G>C (M680I), c.2040G>A (M680I), c.2040G>C>A (*M680I*), c.2080A>G (*M694V*), c.2082A>G (*M694I*), c.2084A>G (*K695R*), c.2177T>C (*V726A*), c.2230G>T (*A744S*), according to previous nomenclature [underlined; see The International FMF Consortium, 1997; Bernot et al., 1998]. Haplotypes were constructed with the nine informative SNPs underlined above.

## Numerical analyses

LD among pairs of SNPs was measured with  $r^2$  and tested for significance with Fisher's exact test, by using the Arlequin 2.000 software [Schneider et al., 2000]. An overall measure of LD at *MEFV* was obtained by computing the FNF ("Fraction Not Found") statistic [Mateu et al., 2001]. FNF at *MEFV* was compared to that in other genes by extracting data on haplotype frequencies deposited at ALFRED (<http://alfred.med.yale.edu>) [Rajeevan et al., 2003] on those genes for which five or more SNPs had been typed.

Reynolds' genetic distances [Reynolds et al., 1983] between populations were calculated using their relative *MEFV* mutation frequencies regardless of haplotype background (since this information was not available for many of those) using the Arlequin 2.000 software [Schneider et al., 2000]. The Spanish and Chueta were compared to French, Italians, Greeks, North African Arabs, Palestinians, Turks, Armenians, Ashkenazi Jews, and North African Jews [Dode et al., 2000; Shinawi et al., 2000; Touitou, 2001; La\_Regina et al., 2003].

## RESULTS

### Control haplotypes

Analysis of *MEFV* control haplotype frequencies revealed that 92% of chromosomes were accounted for by six major haplotypes (M1-M6). The remaining 8% of the chromosomes carried 12 minor haplotypes (m1-m12), in frequencies ranging from 0.5% to 1.5% (Fig.1). Besides their high frequency, major haplotypes show a peculiar structure: they consist of two blocks, separated by intron 2, and the six haplotypes are the combinations resulting from taking subhaplotypes from each block. That is, the exon 2 SNPs show three subhaplotypes: TACG, CGAA, and CGAG (the latter may have arisen by a rare within-block recombination or by back-mutation at position R202Q; Fig.1), and SNPs in exons from 3 to 9 form subhaplotypes TAGCG and CGATA. The haplotype frequencies are at linkage equilibrium with respect to the subhaplotype frequencies in each block ( $\chi^2=4.637$ , 2 d.f.,  $p=0.0984$ ), suggesting that either an ancient recombination event or a high recombination rate at intron 2 maintains linkage equilibrium between the blocks. Most minor haplotypes can be explained as intrablock recombinants.

Haplotypes	Intragenic SNPs										Frequency %
	E2		E3			E5		E9			
	D102D	G138G	A165A	R202Q	R314R	E474E	Q476Q	D510D	P588P		
M1	T	A	C	G	T	A	G	C	G	27.5	
M2	T	A	C	G	C	G	A	T	A	27.5	
M3	C	G	A	A	T	A	G	C	G	14	
M4	C	G	A	A	C	G	A	T	A	7	
M5	C	G	A	G	T	A	G	C	G	7	
M6	C	G	A	G	C	G	A	T	A	9	
	92 total M										
m1	T	A	C	G	T	A	G	C	A	1.5	
m2	T	A	C	G	T	G	A	T	A	0.5	
m3	T	A	C	G	T	n	n	n	A	0.5	
m4	T	A	C	G	C	n	n	n	A	0.5	
m5	C	G	A	A	C	G	A	T	G	1	
m6	C	G	A	A	T	G	A	T	A	1	
m7	C	G	A	A	C	G	A	C	A	0.5	
m8	C	G	A	A	n	n	n	n	n	0.5	
m9	C	G	A	G	T	A	G	C	A	0.5	
m10	T	A	A	n	C	G	A	T	A	0.5	
m11	T	G	C	A	T	A	G	C	G	0.5	
m12	C	G	C	n	C	G	A	T	A	0.5	
	8 total m										

**Figure 1.** MEFV SNP haplotypes in the control Spanish population and their frequencies (200 chromosomes). M, major haplotypes. m, minor haplotypes. E, exon. n, undetermined.

LD was considered at two levels: as pairwise tests and jointly for the whole gene. Measures and tests of LD showed extremely high within-block LD, with  $r^2 = 0.81-1$  (median, 0.94) in pairs not including c.605G>A (R202Q), and  $r^2 = 0.44-0.48$  in pairs including R202Q. In both groups of cases, all Fisher's exact tests yielded

significances  $\sim 0$ . In contrast, between-block LD was nonexistent, with  $r^2 = 0.0008 - 0.054$  (median, 0.002) and Fisher's exact tests were not significant (except for R202- P588,  $p=0.027$ ).

The overall extent of LD at *MEFV* was assessed through FNF, that is, the fraction of the number of different haplotypes expected under linkage equilibrium that was not found. In a sample of 200 chromosomes, we found 18 different haplotypes at *MEFV*, while the expectation under linkage equilibrium was 155.98, and  $FNF=0.896$ . Then, even if the two blocks within *MEFV* are essentially in linkage equilibrium from each other, LD within the blocks is sufficient to deplete the overall haplotype diversity. In order to provide some context for this result, we selected all genes in the ALFRED database for which  $\geq 5$  SNPs had been typed and haplotypes inferred. The results showed that among *ADH*, *ATM*, *D4S10*, *HOXB6*, *PAH* and *VW* genes, only *ATM* presents a higher FNF than *MEFV*.

#### Non-synonymous SNPs in the control population. Carrier frequency

Three non-synonymous changes were detected in the control sample: c.442G>C (E148Q), R202Q and c.2230G>T (A744S). Since their relation to FMF is controversial for some of them, we compared their frequencies in cases and controls to detect any possible association.

At codon 148, allele frequencies were 98.5% E and 1.5% Q in the control population, whereas in the 142 chromosomes of the Spanish FMF group they were 85% E and 15% Q. The frequency of E148Q is significantly higher in the FMF cases ( $\chi^2 = 32.23$ ,  $p = 1.4 \times 10^{-8}$ ), which can be interpreted as E148Q carrying a relative risk at FMF of 16.4 times to carriers (95% CI: 4.7 to 56.8). These data replicate a previous report which described E148Q as a mutation with low penetrance since it was detected at frequencies of about 2% in CEPH controls and 24% in European and Middle Eastern FMF cases [Bernot et al., 1998; Aksentijevich et al., 1999].

At codon 202, allele frequencies in the control and FMF population were exactly the same: 75% R and 25% Q. Since these frequencies were obviously not significantly different from each other, R202Q is not associated with FMF in the Spanish population and does not confer a significant risk at suffering the disease, as previously reported [Bernot et al., 1998].

The A744S substitution has sporadically been found both in a few FMF patient and in controls, and its status in relation to the disease has not been firmly established [Bernot et al., 1998; Aksentijevich et al., 1999]. We have found it in two out of 200 Spanish control chromosomes, in two healthy relatives of FMF patients, but not in patients themselves. Thus, the role of A744S remains unclear, and larger numbers of patients and controls may be needed to determine whether it can be understood as a polymorphism, a risk factor, or a true mutation.

No other FMF-causing mutations, such as those found in the Spanish patients, were detected in the sample of 200 Spanish control chromosomes. Thus, the carrier rate would be 2.5% if E148Q and A744S are considered, but 0 if only highly-penetrant mutations such as M680I, M694V, M694I, and V726A are taken into account. These figures are much lower than those found in Middle Eastern populations, where carrier rates are 37% in Armenians, over 20% in Turks, Non-Ashkenazi and Ashkeani Jews, and 10-23% in Arabs [Touitou, 2001].

#### Spanish FMF haplotypes

The exons and flanking intron sequences of *MEFV* were sequenced in 100 chromosomes of 50 Spanish FMF patients. In 32 of them, nine different mutations were found; these are given in figure 2, along with their associated haplotypes. M694V is the most frequent variant in the Spanish mutated chromosomes (12/32, 37%). It was linked to the background haplotypes M6 (eight chromosomes) and M4 (four chromosomes). The M694V-M4 haplotypes showed an identical SNP haplotype to the previously reported founder Med(A) haplotype [The French FMF Consortium, 1997; The International FMF Consortium, 1997]. The M694V-M6 haplotypes only differed from the Med(A) haplotype at the R202Q position. Consistent with its high frequency and wide distribution, the M694V-M4 haplotype could be the founder from which the M694V-M6 haplotype had appeared (probably by recombination at the intron 2 hotspot), and genetic drift would explain the inverted founder versus recombinant haplotype proportion of the M694V-bearing chromosomes within the Spanish FMF chromosomes.

E148Q was found in five Spanish FMF chromosomes (5/32, 16%), three with an M1 background and two with M2. This mutation has been frequently reported in complex alleles with several mutations such as V726A [Bernot et al., 1998; Aksentijevich et al., 1999], M694I [Booth et al., 2001] or P369S [Aksentijevich et al., 1999]. However, no complex alleles were found in our Spanish FMF patients; patients carrying E148Q and a different mutation were demonstrated to be compound heterozygotes by family and cloning analysis. The E148Q-M1 intragenic SNP haplotype was previously reported in patients of these Jewish groups and in others of diverse

ethnicities. The two E148Q-bearing haplotypes of our study group converged at exon 2, within the TACG motif, according to previous data [Aksentijevich et al., 1999], supporting the hypothesis of a common founder haplotype.

Spanish and Chueta FMF chromosomes													
MEFV Mutation	Background haplotype	Mutant haplotype frequency (c)		Intragenic SNPs								Previous nomenclature	
				E2		E3	E5		E9				
		Spanish	Chueta	D102D	G138G	A165A	R202Q	R314R	E474E	Q476Q	D510D		P588P
M694V	M6	.66 (8)	.1 (1)	C	G	A	G	C	G	A	T	A	- Med(A) <sup>a</sup> B <sup>b</sup>
	M4	.33 (4)	.9 (10)	C	G	A	A	C	G	A	T	A	
	M2	0	0	T	A	C	G	C	G	A	T	A	
E148Q	M1	.60 (3)	1 (1)	T	A	C	G	T	A	G	C	G	-
	M2	.40 (2)	0	T	A	C	G	C	G	A	T	A	-
K695R	M2	.80 (4)	0	T	A	C	G	C	G	A	T	A	-
	M4	.20 (1)	0	C	G	A	A	C	G	A	T	A	-
M694I	M5	.50 (2)	0	C	G	A	G	T	A	G	C	G	<sup>c</sup>
	M1	.25 (1)	0	T	A	C	G	T	A	G	C	G	-
	M2	.25 (1)	0	T	A	C	G	C	G	A	T	A	Ara2 <sup>d</sup>
I591T	M3	1 (2)	0	C	G	A	A	T	A	G	C	G	-
V726A	M1	1 (1)	0	T	A	C	G	T	A	G	C	G	Arm3(C) <sup>a</sup>
E319K	M1	1 (1)	0	T	A	C	G	T	A	G	C	G	-
E163A	M6	1 (1)	0	C	G	A	G	C	G	A	T	A	-
H478Y	M5	1 (1)	0	C	G	A	G	T	A	G	C	G	-

**Figure 2.** Mutation bearing FMF chromosomes, their background haplotypes and frequencies found in the Spanish and Chueta FMF patients. The vertical red bar indicates the genomic position of the mutation relative to the intragenic SNPs. <sup>a</sup>Bernot et al. <sup>b</sup>The International FMF Consortium. <sup>c</sup>Aksentijevich et al. <sup>d</sup>The French FMF Consortium. M, major haplotypes. E, exon. c, chromosomes.

K695R comprises 5/32 (15.6%) of the mutated chromosomes in the Spanish cases. It is associated in our sample with haplotypes M2 (four chromosomes) and M4 (one). These two backgrounds can be explained by a recombination at intron 2, where most recombination within *MEFV* occurs; this makes recombination much likelier than recurrent mutation as the explanation of the presence of K695R in two different haplotype backgrounds. In fact, this is the first description of the haplotypes associated with K695R.

M694I was detected in 4/32 mutated chromosomes (12.5%), associated to three different haplotypes: M5, M1, and M2. The M694I-M2 haplotype corresponds to the Ara2 founder haplotype, previously reported in two Arab and one Jewish patients [The French FMF Consortium, 1997; Bernot et al., 1998]. All three haplotypes can be connected easily by recombination (either at intron 2 or at intron 9) with frequent haplotypes; however, given the small sample size, an ancestral haplotype cannot be inferred.

The V726A mutation was found in a single FMF chromosome harbouring the background haplotype M1, which corresponds to the haplotype named Druze (C) [The French FMF Consortium, 1997; The International FMF Consortium, 1997; Booth et al., 2001] found in several ethnicities.

A group of rare mutations, including three private mutations, is found in 16% of mutated Spanish chromosomes: I591T, in exon 9, was first described in a French patient [Touitou, 2001]. Here, we show that the I591T mutation found in two unrelated Spanish patients [Aldea et al., 2002] is associated with the same background haplotype (M3), which suggests a common founder haplotype. The private mutations E319K, E163A, and H478Y [Aldea et al., 2003] mutations were found associated with the M1, M6 and M5 haplotypes respectively.

**Chueta FMF haplotypes**

In a sample of 14 unrelated Chueta FMF patients the M694V and E148Q mutations were found. The associated *MEFV* SNP haplotypes are shown in Figure 4.



M694V was associated with the background haplotype M4 (ten chromosomes) previously reported as Med-(A) [Domingo et al., 2000] but also with the M6 haplotype (one chromosome). Both M694V-bearing haplotypes are also found in the group of Spanish FMF chromosomes, but, contrary to the latter population, in Chueta M694V chromosomes the presumably ancestral M4 background is, by far, the most frequent. The E148Q mutation was associated with the M1 haplotype (one chromosome).

## DISCUSSION

### *MEFV* genomic dynamics

The general description of the *MEFV* haplotypes for the first time in a control population has allowed to establish a systematic nomenclature for *MEFV* haplotypes (Fig. 2) which can be used as a reference framework for mutation studies. Six major haplotypes were found, with frequencies ranging from 7% to 27.5%; these were estimated with the EM algorithm, which has been shown to be much more precise in estimating the frequencies of common rather than rare haplotypes [Tishkoff et al., 2000]. Thus, we do not expect that the use of the EM algorithm has biased our description of haplotype structure at *MEFV*.

The *MEFV* SNP haplotype study in the Spanish general population clearly showed two regions separated by intron 2 with a limited number of subhaplotypes each. The six most frequent *MEFV* haplotypes in the control population are found at frequencies that would be expected under a random association of subhaplotypes. That is, there is strong LD between exon 2 SNPs and between exon 3 to exon 9 SNPs, but these two blocks are essentially at equilibrium. There are two possible explanations for this situation: i) continuous recombination at intron 2 (which would be a recombination hotspot), or ii) an ancient recombination event, again at intron 2. The first hypothesis would be much more efficient in maintaining haplotype frequencies at equilibrium between the two blocks, and could explain why LD is almost complete between SNPs R314 and P588 (which are ~5.9 Kb apart) but nonexistent between R314 and R202, which are physically closer (~4.5Kb). An ancient recombination event, and low recombination thereafter, would have allowed haplotype frequencies to drift from equilibrium independently in different populations. Then, although a recombination hotspot explains best haplotype frequencies in the Spanish population, determining haplotype frequencies in other populations would help in resolving the question.

The structure of LD in *MEFV* can be used to define a set of three tag SNPs; R202Q, plus one of any other SNP at exon 2 (D102, G138 or A165), plus one of any of the SNPs between exons 3 to 9 (R314, E474, Q579, D510 or P588). This set would capture any of the haplotypes that are found at frequencies over 5% in the control Spanish population and that add up to 92%.

### The natural history of *MEFV* mutations

Nine different *MEFV* mutations were found in 32 Spanish FMF chromosomes; three of those were private. Two features of the Spanish *MEFV* mutation spectrum seem more prominent: the presence of K695R at relatively high frequencies, and the fact that most of the M694V mutants fall on an M6 SNP background rather than on M4, which is the most frequent elsewhere and presumed to be ancestral; both findings can be easily explained by drift.

We compared the Spanish *MEFV* mutation spectrum with those of 10 other populations and found that the Spanish are closest to the French and Italian *MEFV* spectra (Reynold's genetic distance equals 0.04 in both cases); this genetic distance is half of that to next closest population, the Turks. Fisher's exact tests showed that mutation frequencies are significantly different between Spanish and any other populations at the  $p=0.01$  level, except for the comparisons between Spain and France and Spain and Italy. Then, a Western Mediterranean *MEFV* mutation spectrum can be defined, which is at least quantitatively distinct from that of the so-called ancestral populations. Probably, other mechanisms besides the Jewish diaspora can explain the diffusion of *MEFV* mutations in the Western Mediterranean. In particular, gene flow associated with personal mobility may have spread mutations from the Middle East in the at least 100 generations since the appearance of the most common *MEFV* mutations. Obviously, haplotype backgrounds with a uniform set of markers would help in reconstructing the history of *MEFV* mutations, but this information is not widely available.

The Chueta mutation spectrum is poorer than the Spanish spectrum, and does not contain any private mutation, as expected from a much smaller population. Contrary to the Spanish sample, the Chuetas carry M694V most often on the ancestral M4 background. They are closest to the mutation spectrum of the North African Jews (Reynold's distance ~0), while their genetic distance to the general Spanish population is 0.18. In this case, it is much clearer

that the Chueta owe their *MEFV* mutation spectrum (and their HLA haplotypes as well, [Crespi et al., 2002]) to the Jewish diaspora.

## REFERENCES

- Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J, Centola M, Pras E, Chae JJ, Oddoux C, Wood G, Azzaro MP, Palumbo G, Giustolisi R, Pras M, Ostrer H, Kastner DL. 1999. Mutation and haplotype studies of familial Mediterranean fever reveal new ancestral relationships and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 64: 949-962.
- Aldea A, Casademont J, Arostegui JI, Rius J, Maso M, Vives J, Yague J. 2002. I591T *MEFV* mutation in a Spanish kindred: is it a mild mutation, a benign polymorphism, or a variant influenced by another modifier? *Hum Mutat* 20: 148-150.
- Aldea A, Campistol JI, Arostegui JI, Josefa R, Maso M, Vives J, Yague J. 2003. A severe autosomal-dominant periodic inflammatory disorder with renal AA amyloidosis and colchicine resistance associated to the *MEFV* H478Y variant in a Spanish kindred: An unusual familial Mediterranean fever phenotype or another *MEFV*-associated periodic inflammatory disorder? Article online in advance of print: 3 Jun.
- Bernot A, da\_Silva C, Petit JL, Cruaud C, Caloustian C, Castet V, Ahmed\_Arab M, Dross C, Dupont M, Cattani D, Smaoui N, Dode C, Pecheux C, Nedelec B, Medaxian J, Rozenbaum M, Rosner I, Delpech M, Grateau G, Demaille J, Weissenbach J, Touitou I. 1998. Non-founder mutations in the *MEFV* gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 7: 1317-1325.
- Booth DR, Lachmann HJ, Gillmore JD, Booth SE, Hawkins PN. 2001. Prevalence and significance of the familial Mediterranean fever gene mutation encoding pyrin Q148. *QJM* 94: 527-531.
- Crespi C, Mila J, Martinez\_Pomar N, Etxagibel A, Munoz\_Saa I, Priego D, Luque A, Pons J, Picornell A, Ramon M, Castro JA, Matamoros N. 2002. HLA polymorphism in a Majorcan population of Jewish descent: comparison with Majorca, Minorca, Ibiza (Balearic Islands) and other Jewish communities. *Tissue Antigens* 60: 282-291.
- Dode C, Pecheux C, Cazeneuve C, Cattani D, Dervichian M, Goossens M, Delpech M, Amselem S, Grateau G. 2000. Mutations in the *MEFV* gene in a large series of patients with a clinical diagnosis of familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 92: 241-246.
- Domingo C, Touitou I, Bayou A, Ozen S, Notarnicola C, Dewalle M, Demaille J, Buades R, Sayadat C, Levy M, Ben\_Chetrit E. 2000. Familial Mediterranean fever in the 'Chuetas' of Mallorca: a question of Jewish origin or genetic heterogeneity. *Eur J Hum Genet* 8: 242-246.
- La\_Regina M, Nucera G, Diaco M, Procopio A, Gasbarrini G, Notarnicola C, Kone\_Paut I, Touitou I, Manna R. 2003. Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet* 11: 550.
- Mateu E, Calafell F, Lao O, Bonne\_Tamir B, Kidd JR, Pakstis A, Kidd KK, Bertranpetit J. 2001. Worldwide genetic analysis of the CFTR region. *Am J Hum Genet* 68: 103-117.
- Papin S, Duquesnoy P, Cazeneuve C, Pantel J, Coppey\_Moisan M, Dargemont C, Amselem S. 2000. Alternative splicing at the *MEFV* locus involved in familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostin/pyrin protein to the nucleus. *Hum Mol Genet* 9: 3001-3009.
- Rajeevan H, Osier MV, Cheung KH, Deng H, Druskin L, Heinzen R, Kidd JR, Stein S, Pakstis AJ, Tosches NP, Yeh CC, Miller PL, Kidd KK. 2003. ALFRED: the ALlele FREquency Database. Update. *Nucleic Acids Res* 31: 270-271.
- Reynolds J, Weir BS, Cockerham CC. 1983. Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *105: 767-779.*
- Sarrauste de Menthieri C, Terriere S, Pugnere D, Ruiz M, Demaille J, Touitou I. 2003. INFEVERS: the Registry for FMF and hereditary inflammatory disorders mutations. *Nucleic Acids Res* 31: 282-285.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L: Arlequin 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and biometry laboratory, University of Geneva., Geneva, Switzerland, 2000.
- Shinawi M, Brik R, Berant M, Kasinetz L, Gershoni\_Baruch R. 2000. Familial Mediterranean fever: high gene frequency and heterogeneous disease among an Israeli-Arab population. *J Rheumatol* 27: 1492-1495.

## 8 Aldea et al.

Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. 1967. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 43: 227-253.

The French FMF Consortium. 1997. A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. *Nat Genet* 17: 25-31.

The International FMF Consortium. 1997. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 90: 797-807.

Tishkoff SA, Pakstis AJ, Ruano G, Kidd KK. 2000. The accuracy of statistical methods for estimation of haplotype frequencies: an example from the CD4 locus. *Am J Hum Genet* 67: 518-522.

Touitou I. 2001. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 9: 473-483.

## CONCLUSIONS

1. Es proposa per primera vegada una nomenclatura sistematitzada dels haplotips intragènics al gen *MEFV* per la població general.
2. Existeix una diversitat d'haplotips del *MEFV* força limitada a la població general espanyola, on el conjunt de sis haplotips majoritaris representen la gran majoria dels cromosomes (92%).
3. Es posa de manifest l'existència de dos blocs o subhaplotips, separats per l'intró 2, amb un alt LD dintre de cada bloc.
4. L'alt LD de cada bloc és el responsable de la limitada diversitat d'haplotips del *MEFV* observada a la població general espanyola.
5. L'equilibri de lligament entre els 6 haplotips majoritaris del gen *MEFV* i l'alt LD de cada subhaplotip suggereix l'existència d'un punt calent de recombinació a l'intró 2.
6. Tots els cromosomes mutats es poden explicar per fenòmens de recombinació amb els haplotips observats a la població general.
7. L'haplotip presumiblement fundador M694V-M4, és l'haplotip associat a M694V més freqüent en els cromosomes xuetes, mentre que el recombinant, M694V-M6, és el menys freqüent.
8. La relació "haplotip fundador (M694V-M4) *versus* haplotip recombinant (M694V-M6)" és inversa en els cromosomes de pacients espanyols i podria respondre a l'efecte de la deriva genètica en una població gran com l'espanyola.
9. Les dades referents als haplotips associats a la mutació E148Q en els pacients espanyols recolzen la hipòtesi sobre l'efecte fundador de la mutació, i en contra de la que proposa que E148Q seria una variant recurrent.
10. L'estudi dels haplotips associats a mutacions al *MEFV* en pacients xuetes suggereix la proximitat genètica entre els jueus sefardites i els xuetes.
11. L'índex de Reynolds mostra que l'espectre de mutacions *MEFV* a Espanya és força divers, i similar a l'observat a França i Itàlia, poblacions anomenades no-ancestrals. Per contra, l'espectre de mutacions dels xuetes és força més pobre, i similar a la dels jueus.
12. L'estudi dels haplotips associats a mutacions al *MEFV* en pacients xuetes i l'índex de Reynolds suggereix una connexió directa amb la diàspora jueva.



***DISCUSSIÓ GENERAL***



## V- DISCUSSIÓ GENERAL

### I. *Relació causal entre les mutacions del gen MEFV i la FMF*

Els resultats obtinguts de l'anàlisi del gen *MEFV* als pacients de FMF espanyols indiquen la causalitat de les mutacions sobre la FMF en el 53% dels pacients (53%), entesa com la fracció de pacients amb una o dues mutacions al gen *MEFV*.

Sorprèn la baixa freqüència de portadors de dues mutacions per al *MEFV* en el nostre entorn geogràfic (16,4%), l'alta proporció de pacients heterocigots que manifesten la FMF (36,4%), una malaltia autosòmica recessiva, i la de pacients sense mutacions (47%).

#### Baixa freqüència de dobles mutats

La causa de la baixa freqüència de portadors de dues mutacions al *MEFV* en el grup de pacients espanyols de FMF probablement sigui la baixa freqüència de portadors a la població general espanyola.

Aquestes dades contrasten amb les de les poblacions ancestrals, on la gran majoria de casos de FMF es justifiquen per la presència de mutacions al gen *MEFV* (85%) (The International FMF Consortium, 1997) i on la freqüència de portadors és molt elevada, podent arribar a ser de 1/5 (Yuval et al., 1995; Daniels et al., 1995). L'alta freqüència de portadors en aquestes poblacions ha obert el debat sobre l'existència d'un cert avantatge evolutiu dels individus portadors, respecte els individus no portadors, en front a patògens endèmics. Malgrat que la hipòtesi de l'avantatge selectiu semblaria plausible, hi ha unes quantes dades que la posen en qüestió, entre d'altres, l'existència en poblacions ancestrals d'un elevat nombre de portadors de dues mutacions no afectats per la FMF, suggerint una penetrància variable de les mutacions del *MEFV* (Kogan et al., 2001).

Si la hipòtesi de l'avantatge de l'heterocigot fos certa, la freqüència de portadors observada a la població espanyola s'interpretaria com que el nostre entorn geogràfic no estaria inclòs dintre de l'ambient en el qual el putatiu patògen seria endèmic.

En contraposició a la teoria de la pressió selectiva, la confinació de la FMF gairebé exclusivament a poblacions de l'Orient Mitjà, podria tenir una explicació en l'origen, relativament recent, de les mutacions del *MEFV*, i en l'efecte de la deriva genètica sobre les freqüències al·lèliques de les mutacions en aquestes poblacions. La freqüència al·lèlica en què es detecten les mutacions del *MEFV* a la població espanyola



seria deguda doncs, al flux genètic al llarg de la història des de les poblacions on es varen originar les mutacions cap a la resta de poblacions mediterrànies i a l'efecte de la deriva genètica. Els arguments a favor d'aquest escenari són diversos. En primer lloc, si les mutacions fossin molt antigues estarien repartides arreu del món, la qual cosa causaria una prevalència de la FMF en països, per exemple nòrdics, molt superior a les que s'observen. En segon lloc, que la confinació de la FMF a les poblacions ancestrals cada vegada es posa més en qüestió, doncs cada vegada són més les poblacions mediterrànies on s'observen sèries grans de pacients amb FMF, com la estudiada en aquesta tesi doctoral, per bé que en cap cas no tan freqüents com al vessant oriental.

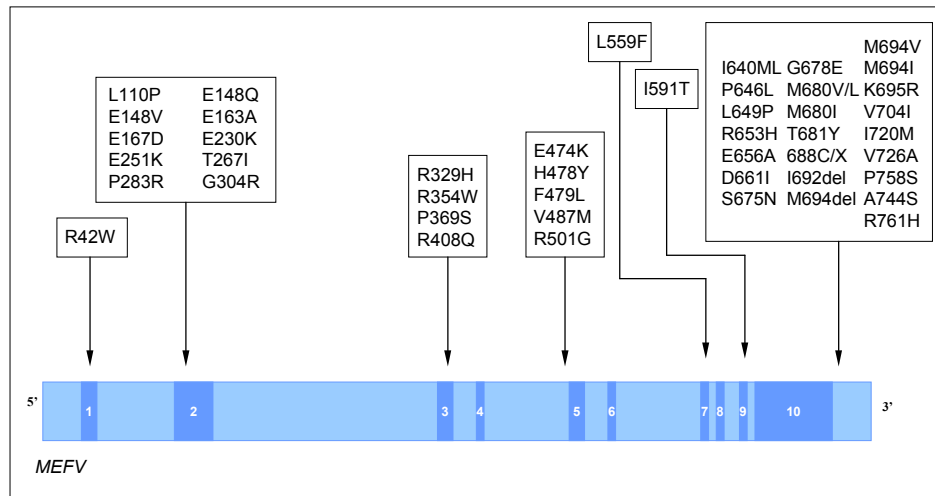
#### *Mutacions al gen MEFV associades a la FMF en pacients espanyols*

L'espectre de mutacions *MEFV* associades a la FMF en pacients espanyols és ampli, i es detecten 3 de les mutacions més freqüents a les poblacions ancestrals: M694V, M694I i V726A, i la E148Q, també molt freqüent en aquests grups. A més, es detecten altres variants no tan freqüents (K695R) i fins i tot algunes que probablement siguin mutacions privades o que afecten una família (E163A, E319K). El patró de mutacions al gen *MEFV* observat a la població espanyola seria per ordre de freqüència: M694V, M694I, E148Q i K695R, clarament diferent al de poblacions ancestrals on sovint el 90% de cromosomes mutats són portadors d'una o dues de les mutacions, i on pràcticament no s'han detectat mutacions privades.

Durant el desenvolupament de la present tesi doctoral, s'han anat publicant treballs mutacionals en poblacions menys afectades per la FMF, la qual cosa ha donat lloc sovint, a la descripció de noves mutacions en el gen *MEFV*. A l'actualitat n'hi ha més de 40 variants al·lèliques registrades a la base de dades INFEVERS, a la qual s'hi han registrat les variants detectades en aquesta tesi doctoral. La localització d'aquestes mutacions i de polimorfismes és al llarg de tota la seqüència codificant del gen, amb l'existència de tres zones on especialment es concentren les variants detectades: els exons 2, 5 i 10 (Fig. 1).

Aquest fet recolza una de les conclusions extretes en la present tesi, respecte la necessitat d'analitzar la totalitat dels exons del *MEFV* per el millor diagnòstic dels pacients de FMF a la població espanyola, que probablement es fagi extensiu a les poblacions no ancestrals en general.

Figura 1. Localització de les mutacions *MEFV* descrites en els exons del gen.



### El dilema de l'heterocigot

L'existència d'un nombre elevat de pacients (47%) que manifestin la malaltia en estat heterocigot pel gen *MEFV* sorprèn d'una entitat amb un patró d'herència àmpliament acceptat fins a l'actualitat, com autosòmic recessiu.

Aquest fenomen constitueix el que en la present tesi doctoral s'ha batejat com el *dilema de l'heterocigot*, que és el que al clínic se li planteja quan un pacient de FMF heterocigot arriba a la consulta, en quant al diagnòstic de la malaltia, el pronòstic i, fins i tot, el consell genètic. Una de les conclusions d'aquesta tesi doctoral és que, en base a la complexitat de les bases genètiques detectades en la FMF en el nostre entorn geogràfic i a la baixíssima freqüència de portadors a la població espanyola (0-2,5%), l'individu heterocigot afectat de FMF s'hauria de considerar com un cas positiu pel *MEFV*, de la mateixa manera que els doble mutats i que conseqüentment, se li hauria de realitzar un seguiment de cara a evitar una possible amiloïdosi. És a dir, la presència d'una sola mutació al *MEFV* suggeriria el diagnòstic de FMF, i la conveniència d'informar sobre la incertesa de l'afectació dels descendents.

Els mecanismes pels quals individus amb una sola alteració en el *MEFV* manifesten la FMF, tal i com ho fan els que tenen dues alteracions, poden ser diversos, des de l'existència de mutacions dominants negatives freqüents, fins a l'existència d'altres locus/loci relacionats en major o menor grau amb l'expressió del *MEFV* i/o amb la P/M, i fins i tot gens no relacionats però implicats en els processos inflamatoris.

També és possible que la FMF es presenti en diversos patrons d'herència i que no només es transmeti de manera autosòmica recessiva, sinó també pseudo-dominant.

En aquest sentit, s'han descrit recentment l'existència de variants del *MEFV* "patològiques" o variants dominant negatives, associades a patrons d'herència dominant: la delecció dels tres nucleòtids del codó 694, observada en pacients de famílies britàniques no relacionades, i l'al·lel complex M694I-E148Q detectat en dues famílies d'origen turc i de la Índia (Booth et al., 2000). La H478Y variant descrita en la present tesi, al capítol 2, s'afegiria a la llista de variants dominants. La P/M funcional codificada pel CNM quedaria funcionalment anul·lada per la proteïna mutada, la qual cosa desencadenaria en la reacció inflamatòria característica de la FMF.

Pot ser que aquestes variants no siguin tan ocasionals, i que es trobin en més alta freqüència de la que cabria esperar per a una malaltia estrictament autosòmica recessiva com la FMF, alhora que no en tots els casos s'observin patrons d'herència dominants. L'existència de factors modificadors, els quals és evident que afecten l'expressivitat de la FMF a la nostra població (capítol 3), actuant en major o menor grau sobre possibles variants dominants negatives, podria modular l'expressió de la FMF de manera diferencial entre els portadors d'una mateixa família, de manera que el patró d'herència resultant podria ser pseudo-dominant o fins i tot passar per autosòmica recessiva.

Si aquesta hipòtesi fos certa però, també s'hauria de complir en les poblacions ancestrals. L'existència de variants dominants freqüents influenciades per factors modificadors podria haver passat subestimada en aquestes poblacions, doncs els patrons d'herència familiar pseudo-dominants i dominants observats en aquestes poblacions, sovint han estat justificats per l'alta freqüència de portadors i per la consanguinitat practicada en aquestes ètnies. És més, el fet que el coneixement actual de la FMF i el concepte clàssic d'herència autosòmica recessiva, entre altres, s'hagin basat en observacions sobre els pacients d'aquestes poblacions, podria haver sobre-simplificat la visió dels aspectes genètics de la FMF. El coneixement de la bioquímica funcional de la P/M ajudarà a resoldre la qüestió sobre l'existència de variants dominants i sobre els seus mecanismes d'acció.

#### *Altres locus/loci implicats en l'etiologia de la FMF*

En la present tesi doctoral es posa de manifest l'existència d'heterogeneïtat de locus (HL) a la FMF, és a dir, de l'existència d'almenys un altre locus a banda del *MEFV*, implicat en la patogènia de la FMF. Akarsu i col·laboradors ho havien suggerit en un principi amb l'anàlisi de microsatèl·lits flanquejants al gen *MEFV* realitzada en

famílies turques afectades de FMF. Tan l'estratègia exhaustiva emprada en el present treball per la recerca de mutacions en el *MEFV*, com el fet que la població d'estudi és no ancestral, han posat de manifest l'evidència més significativa de l'existència d'HL en la FMF fins a la data.

Entre els altres loci candidats a ser responsables de la FMF, hi haurien diferents grups de gens, actuant a diferents nivells amb el *MEFV* i/ o la P/M.

Un primer grup estaria constituït per gens relacionats directament amb el *MEFV*, des dels que n'afectarien l'expressió als granulòcits, induint o reprimint el missatger en aquestes cèl·lules, fins als gens implicats en la localització cel·lular de la P/M com ara els codificants per a possibles transportadors intracel·lulars específics. Cal recordar que l'existència de dues isoformes de la proteïna, la P/M-fl i la P/M-d2, localitzades intracel·lularment en compartiments diferents, s'havia postulat com un possible mecanisme de regulació funcional de la molècula.

Altres gens candidats podrien ser els relacionats funcionalment amb l'acció de la P/M. Les darreres especulacions sobre la funció de la proteïna, la relacionen amb la immunitat innata, participant activament en la repressió de la síntesis de la IL1 $\beta$  en els neutròfils. En aquest procés hi participen un conjunt de proteïnes i complexos moleculars que interactuen entre elles formant cascades de senyalització. De la mateixa manera que mutacions en la P/M causen episodis inflamatoris, l'existència de mutacions en proteïnes que interactuïn amb la P/M i/o participin en aquests processos podrien causar el mateix efecte sobre la inflamació. És possible que els pacients heterocigots pel *MEFV* siguin, a més, portadors de mutacions en algun d'aquests gens i que els efectes d'ambdues mutacions es complementessin negativament causant la desregulació de la reacció inflamatòria típica dels episodis de la FMF.

En aquest sentit, els gens responsables de les SHFP serien bons gens candidats doncs a excepció del gen que causa la síndrome HIDS, la resta estan relacionades amb la inflamació a nivell de la senyalització pro-inflamatòria i anti-apoptòtica. A mode d'exemple, la P/M interacciona *in vitro* amb ASC, proteïna adaptadora bàsica de l'inflamosoma. Recentment s'ha proposat que la P/M actuaria de competidor amb la criopirina per la unió amb ASC. Cal recordar que la criopirina és producte del gen CIAS1/NALP3/PYPAF1 que causa la FCU/FCAS, el SMW i el CINCA/NOMID, i que com la FMF, totes tres malalties són SHFP. Un altre exemple seria el gen CD2BP1, responsable de la SHFP autosòmica dominant PAPA i el producte proteic del qual s'ha descrit que interacciona amb la P/M (Shoham et al. 2003). Evidentment calen més dades

que demostrin la implicació d'aquestes proteïnes en l'estructura de l'inflamosoma *in vivo* que verifiquin el model competitiu proposat i que expliquin la regulació del complex, però sense dubte, són gens candidats a complementar mutacions en heterocigosi del *MEFV*. Val a dir però, que en aquest treball no s'han detectat mutacions en els gens responsables d'altres SHFP.

Alternativament, podrien existir gens no relacionats amb la P/M però importants en la funció inflamatòria dels neutròfils com ara gens implicats en la quimiotaxi, en l'adhesió leucocitària o en receptors d'interleucines, entre altres. Als neutròfils d'un pacient heterocigot pel *MEFV*, on la cascada senyalitzadora de la inflamació mediada per la P/M seria la meitat d'eficient que un individu no portador de mutacions al *MEFV*, la combinació de la mutació *MEFV* amb una altra mutació en algun dels gens implicats en la reacció inflamatòria (independent de la P/M), podria tenir un efecte compensatori que es desregulés el procés inflamatori, i en darrer terme, en la manifestació clínica de la FMF.

#### *Existeixen fenocòpies o FMF-like?*

En el grup de pacients estudiats en la present tesi doctoral hi ha un alt percentatge (47%) en els quals no s'ha detectat cap mutació al *MEFV*. Varies explicacions podrien justificar la simptomatologia de FMF en aquests pacients no mutats (PNM). Com s'ha comentat pels pacients heterocigots, podrien ser portadors de dues mutacions en qualsevol dels gens relacionats amb el *MEFV* i/o la P/M, i implicats en l'etiologia de la FMF. Una altra possibilitat seria que alguns dels PNM manifestessin la simptomatologia d'una fenocòpia de la FMF, o una *FMF-like*, i per tant, no relacionada etiològicament amb el *MEFV*.

Al capítol primer de la present memòria, es va descriure l'existència de dos subgrups clínics de pacients de FMF a la població espanyola: un subgrup homogeni amb un fenotip de FMF clàssic, i un altre subgrup que presentava episodis febrils força més freqüents, de duració superior als 3 dies i amb una major incidència de limfadenopaties i mialgies. El fenotip d'aquest darrer grup de pacients, va correlacionar amb el diagnòstic *probable* de FMF i amb què eren pacients no mutats en el gen *MEFV*, la qual cosa recolzaria la hipòtesi que aquests pacients podrien estar manifestant una fenocòpia o *FMF-like*.

El motiu de la possible co-existència d'aquestes dues malalties sota un mateix diagnòstic probablement radiqui en els propis criteris clínics utilitzats en el diagnòstic de la FMF, els criteris de TH. Aquests, es varen dissenyar a Israel en base a les

manifestacions clíniques que mostraven els pacients de FMF, que eren d'origen predominantment jueu. Ara bé, l'eficàcia d'aquests criteris en el diagnòstic diferencial de la FMF, respecte d'altres SHFP, en poblacions no ancestrals com l'espanyola, és qüestionable. Per exemple, la duració de la febre, característica diferencial de les SHFP, no es té en consideració en el diagnòstic de la FMF. Entre els criteris de TH, cal ressaltar diversos aspectes. Primer, que en una població on la incidència d'amiloïdosi no sigui gaire elevada com en l'espanyola, el segon dels criteris majors deixa de ser avaluable. Segon, que la resposta positiva al tractament continuat amb la colquicina, un altre criteri major, no contempla el 5-10% dels pacients de FMF no responedors al tractament, descrits a la literatura, com tampoc no compta amb la intolerància oral a la colquicina d'alguns pacients, la qual cosa impedeix valorar la resposta al tractament en aquests pacients. Tercer, que el fet d'acomplir el primer criteri major, el de febre recurrent amb afectació de seroses, significa automàticament complir el criteri menor de patir febre i per tant el diagnòstic directe de FMF probable. Finalment, que el criteri d'història familiar de FMF en primer grau és, per definició de la FMF de malaltia autosòmica recessiva, incoherent i només aplicable en comunitats amb una alta freqüència de portadors.

En conclusió, l'aplicació dels criteris de TH, en el diagnòstic de pacients pertanyents a poblacions no-ancestrals com l'espanyola, amb baixes incidències d'amiloïdosi i d'erisipel·les (ELE), i que no refereixin història familiar de FMF, per bé que serveixen de referència, s'haurien d'aplicar amb precaució. Una de les conclusions a les que s'arriba a la present tesi doctoral és que la detecció de dues mutacions al gen *MEFV*, o fins i tot d'una, confirmaria el diagnòstic clínic en els casos dubtosos. Per contra, que l'absència de mutacions en alguns pacients suggereix que alguns d'aquests individus manifestin una *FMF-like*, una malaltia fenotípicament compatible amb la FMF, però amb bases etiopatogèniques diferents.

## ***II. Dinàmica genòmica del locus MEFV***

### ***Descripció dels haplotips detectats a la població espanyola***

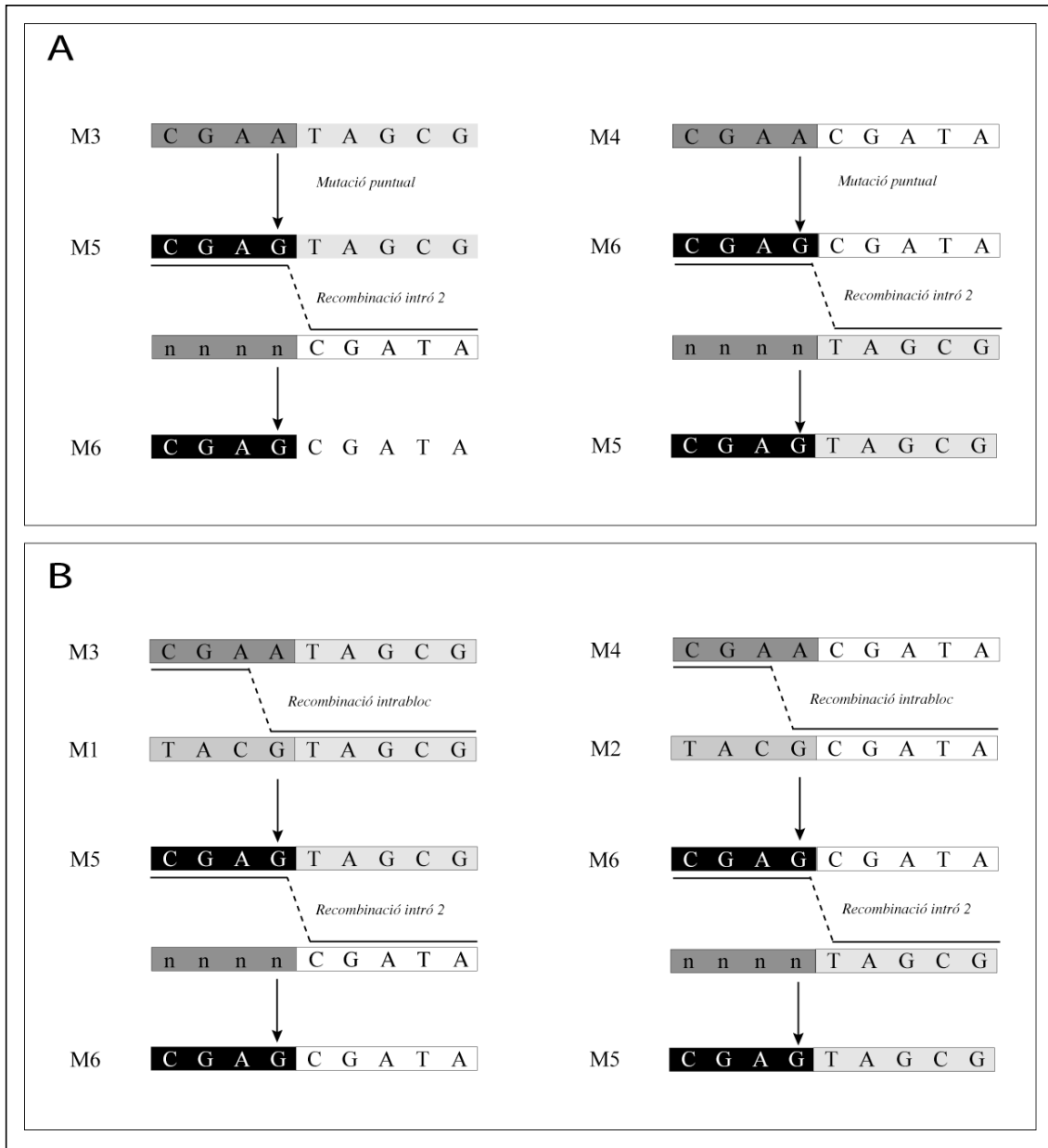
Fins a la data, el present treball constitueix la primera descripció dels haplotips associats al locus *MEFV* en una població control. Un conjunt de sis haplotips, anomenats majoritaris (M1-M6), estan presents en la gran majoria dels cromosomes controls espanyols (92%). Cada un d'aquests haplotips està constituït per dos

subhaplotips, caracteritzats per un alt LD intern, que generen 2 blocs a ambdós extrems del gen i separats per l'intró 2: existeixen 3 subhaplotips diferents associats al bloc de l'extrem 5' del *MEFV* (CGAA, CGAG, TACG) i dos subhaplotips associats al bloc de 3' del gen (CGATA, TAGCG). Les combinacions entre els subhaplotips d'ambdós blocs generen els sis haplotips majoritaris observats a la població espanyola, que es troben en equilibri de lligament entre ells, és a dir, que la combinació dels subhaplotips de cada bloc és a l'atzar.

Aquesta particularitat dels haplotips del gen *MEFV* podria respondre a dos models diferents de dinàmica genòmica del *MEFV*. El primer es basaria en l'existència d'un punt calent de recombinació a l'intró 2. La major susceptibilitat d'aquesta regió gènica a patir recombinacions amb el cromosoma homòleg en relació a altres regions del locus, explicaria fàcilment l'equilibri de lligament en què es troben els haplotips majoritaris entre si mateixos. L'altre model es basa també en un esdeveniment de recombinació a l'intró 2, però no de manera reiterativa, sinó com a fenomen poc freqüent i força antic, suficient però, com per generar els haplotips observats a l'actualitat. Per aquest mecanisme, la deriva genètica s'hauria encarregat que la freqüència dels haplotips M1-M6 fos, molt probablement, diferent en cada població. Detectar-los en equilibri de lligament, com s'observa en la població control espanyola, semblaria menys probable segons aquest darrer model. Malgrat que la hipòtesi del punt calent de recombinació sembla la més plausible, estudiar les freqüències d'aquests haplotips en altres poblacions Mediterrànies ajudarien a resoldre la qüestió.

Entre els 3 subhaplotips de l'extrem 5' del *MEFV*, destaca que la única diferència entre els subhaplotips CGAA i CGAG és la posició 202. D'altra banda s'observa el subhaplotip TACG però no el subhaplotip TACAA, la qual cosa suggereix que CGAA podria haver estat el subhaplotip a partir del qual s'hagués generat CGAG, per recombinació intrabloc o bé per mutació puntual. La figura 2A il·lustra com els haplotips M5 i M6 s'haurien pogut generar a partir de M3 i M4, en base a les hipòtesis de la mutació puntual sobre CGAA i la del punt calent de recombinació. La figura 2B, hipotetitza un altre mecanisme, basat en la recombinació intrabloc i la del hot-spot a l'intró 2.

Figura 2. Possibles mecanismes de generació dels haplotips M5 i M6.





### Diversitat haplotípica

A banda dels mecanismes de dinàmica genòmica associada al locus *MEFV*, s'observa una diversitat d'haplotips associats a la població espanyola. En una situació d'equilibri de lligament dels SNPs del *MEFV*, el nombre d'haplotips esperats seria notablement més nombrós que el nombre d'haplotips observats. La diversitat d'haplotips del *MEFV* observada a la població espanyola és doncs, força limitada i probablement, deguda a l'alt LD existent en els subhaplotips de cada bloc, que és tan alt que fins i tot hauria neutralitzat l'efecte del punt calent de recombinació putatiu.

L'estudi dels haplotips controls ha permès el coneixement de l'estructura del LD del locus *MEFV*. És precisament la obtenció d'aquesta informació la que ha permès establir els "tag SNPs" del gen, és a dir, el nombre mínim de SNPs que defineixen l'haplotip, amb la conseqüent simplificació metodològica de l'adquisició de dades que representa: R202Q, més qualsevol SNP de l'exó 2 (D102D, G138G, A165A), més qualsevol SNP d'entre els exons 3 al 9 (R314R, E474E, Q579Q, D510D, P588P). Aquests SNPs són els mínims marcadors a analitzar per tal de genotipar els haplotips del *MEFV* de qualsevol altre grup poblacional, i obtenir més del 90% dels haplotips presents a la població d'estudi (els que tinguin una freqüència major al 5%).

L'anàlisi dels haplotips controls també ha servit per a assignar, per primera vegada a la literatura, una nomenclatura sistemàtica dels haplotips mutats del *MEFV* i de referència per a futurs treballs mutacionals (Fig.3). A més a més, ha estat essencial en la reconstrucció dels haplotips mutats i per poder realitzar una primera aproximació a la història de les mutacions a la Península Ibèrica.

Figura 3. Resum dels haplotips intragènics del *MEFV* associats a les cinc mutacions més freqüents descrites a la literatura i actualitzat amb les dades del present treball. S'indiquen els grups poblacionals on s'han descrit els haplotips i el nombre de cromosomes entre parèntesi. La barra vermella indica la posició de la mutació relativa als SNPs de l'haplotip. <sup>a</sup> dades de la present tesi doctoral; <sup>b</sup> Bernot et al.; <sup>c</sup> Aksentijevich et al.; <sup>d</sup> The International FMF Consortium; <sup>e</sup> The French FMF Consortium.

Haplotips MEFV mutats	SNPs Intragenics									Altres noms	Etnies (Num. de cromosomes)
	E2			E3		E5		E9			
	D102	G138	A165	R202	R314	E474	Q476	D510	P588		
E148Q-M1	T	A	C	G	T	A	G	C	G		<sup>a</sup> Espanyola (3), Xueta (1) <sup>b</sup> NAJ (1), Arm (1), Francesa (1) <sup>c</sup> AJ (1), Ara (1), Siciliana (1)
E148Q-M2	T	A	C	G	C	G	A	T	A		<sup>a</sup> Espanyola (2) <sup>b</sup> NAJ (1), Dr (1) <sup>c</sup> AJ (2)
E148Q-m13	T	A	C	G	C	G	A	T	G		<sup>c</sup> Dr (1)
M680I-M1	T	A	C	G	T	A	G	C	G	J, Arm2	<sup>b,e</sup> Arm (15), T (5), AraMag (1) <sup>d</sup> Arm (1)
M680I-M5	C	G	A	G	T	A	G	C	G	K	<sup>c</sup> Siciliana (1) <sup>d</sup> Arm (1)
M694V-M4	C	G	A	A	C	G	A	T	A	A, F, G Med (A)	<sup>a</sup> Xueta (10), Espanyola (4) <sup>b</sup> NAJ (6), Arm (3), Francesa (1) <sup>c</sup> Siciliana (1) <sup>d</sup> NAJ (↑), IrJ, Arm (total 64) <sup>e</sup> NAJ (57), Arm (30), AraMag (1), T (6)
M694V-M6	C	G	A	G	C	G	A	T	A		<sup>a</sup> Espanyola (8), Xueta (1) <sup>b</sup> Francesa (1)
M694V-M2	T	A	C	G	C	G	A	T	A	B	<sup>b</sup> NAJ (2), Arm (1) <sup>d</sup> IrJ (5)
M694I-M5	C	G	A	G	T	A	G	C	G		<sup>a</sup> Espanyola (2)
M694I-M2	T	A	C	G	C	G	A	T	A	Ara2	<sup>a</sup> Espanyola (1) <sup>b,e</sup> AraMag (2), NAJ (1)
M694I-M1	T	A	C	G	T	A	G	C	G		<sup>a</sup> Espanyola (1)
V726A-M1	T	A	C	G	T	A	G	C	G	C Arm3 (C)	<sup>a</sup> Espanyola (1) <sup>b</sup> Arm (2), NAJ (1), Dr (1) <sup>c</sup> AJ (5), IrJ (2), Ara (1) <sup>d</sup> IrJ, AJ, Dr, Arm (total 8) <sup>e</sup> Ara (14), NAJ (5), D (2), T (2)

<sup>a</sup> Present estudi  
<sup>b</sup> Bernot et al.  
<sup>c</sup> Aksentijevich et al.  
<sup>d</sup> The International FMF Consortium  
<sup>e</sup> The French FMF Consortium

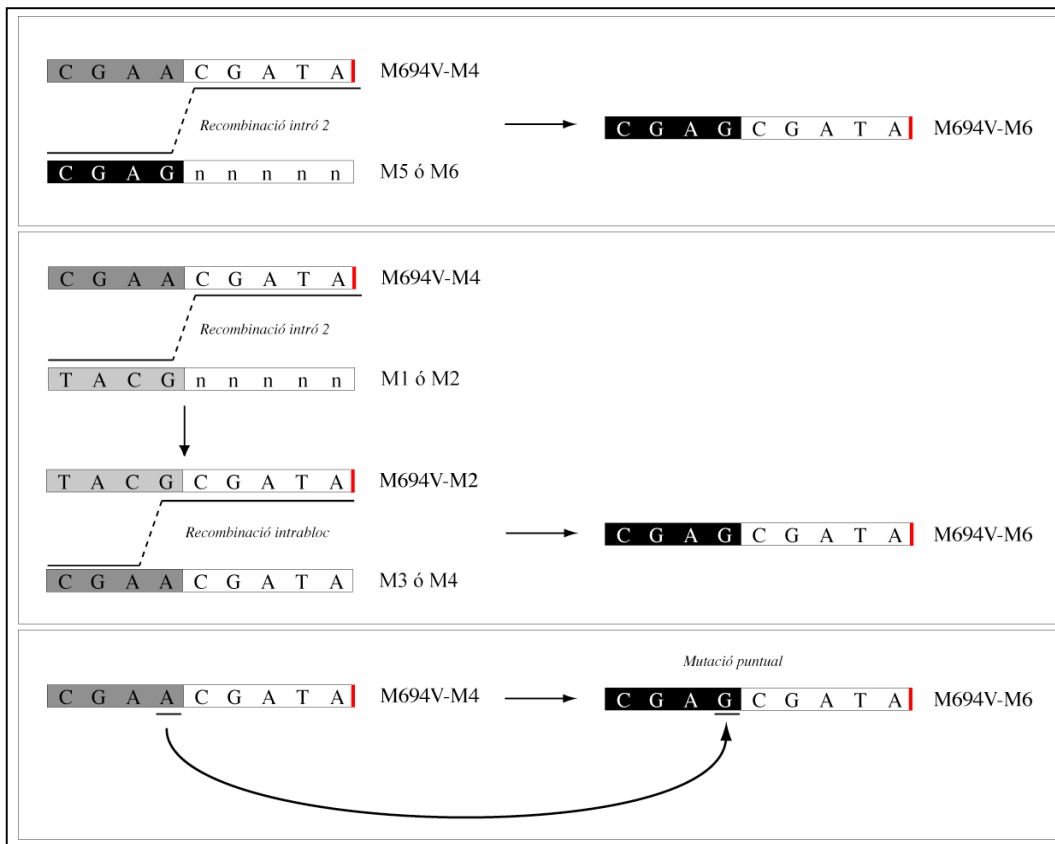
### **III. *Història Natural De Les Mutacions***

En els pacients de FMF espanyols les mutacions M694V, E148Q, M694I que són les més freqüents, juntament amb la K695R, s'observen associades a més d'un haplotip: el prèviament descrit en poblacions ancestrals i un, o més, de nova descripció, que probablement siguin recombinants.

#### *Haplotips associats a la mutació M694V*

Les dades més rellevants giren al voltant de la mutació M694V que, per ordre de freqüència, s'observa associada als haplotips M6 i M4. D'acord amb l'alta freqüència de M694V-M4 en NafJ i l'àmplia distribució en IrJ, Arm, Tur i AraMgb, aquest podria ser l'haplotip fundador a partir del qual s'hauria originat M694V-M6. L'única diferència entre els dos haplotips mutats és la posició R202Q (Fig.4, bloc superior). La hipòtesi més versemblant suggereix que M694V-M6 s'hauria generat per recombinació, a partir de M4-M694V i l'haplotip no mutat M5 o M6. Altres possibilitats serien, a) que sobre M694V-M4 s'hagués produït un doble fenomen de recombinació a l'exó 2 amb els haplotips controls M1 o M2, flanquejant la posició R202Q (Fig.4 bloc central) o b) que s'hagués produït una mutació puntual en aquest residu (Fig.4 bloc inferior). Ambdues possibilitats semblen més improbables ja que implicarien dues recombinacions enlloc d'una, i perquè en general, les taxes de recombinació són superiors a les de mutació. Finalment, M694V es podria haver produït sobre l'haplotip no mutat M6 la qual cosa implicaria dos fenòmens de mutació independents: el que hauria generat l'haplotip fundador (M694V-M4) i el que s'hauria donat a l'haplotip M6. Aquesta hipòtesi implicaria dos fenòmens de mutació independents i que per tant, la variant M694V seria una mutació recurrent. La probabilitat associada a aquests fets és baixa. A més, la putativa mutació recurrent s'observaria associada probablement a altres haplotips i no només a M4 i M6. A jutjar per la convergència observada dels haplotips M694V-M4 i M694V-M6 aquesta darrera hipòtesi sembla poc plausible.

Figura 4. Possibles mecanismes de generació de M694V-M6, a partir de M694V-M4 o Med(A), presumiblement l'haplotip fundador. La barra vermella indica la posició de la mutació relativa als SNPs de l'haplotip.

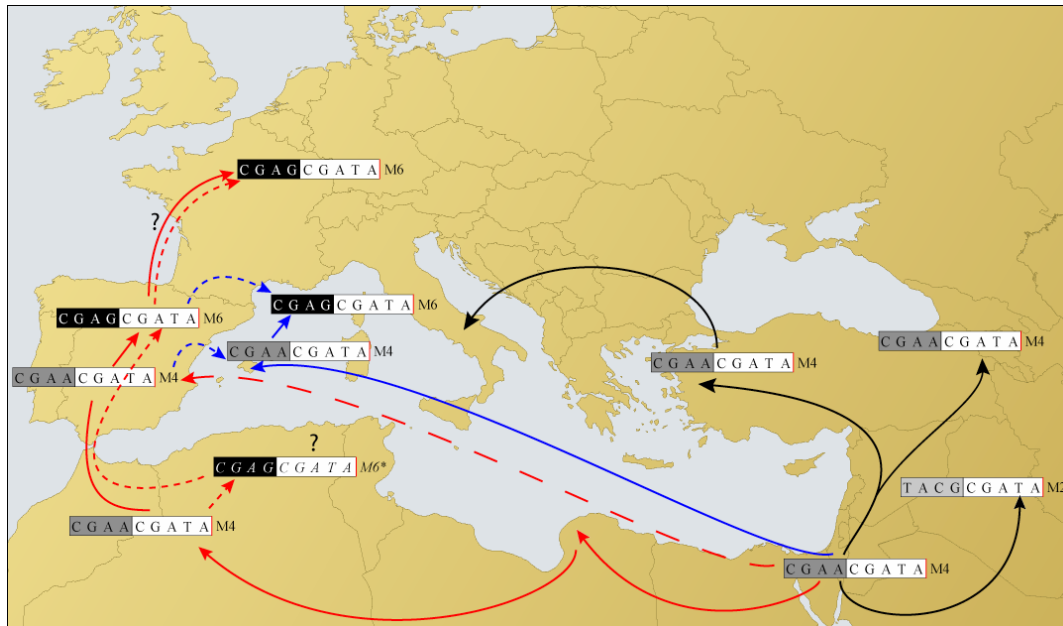


Assumint que M694V-M6 és l'haplotip recombinant, la via d'aparició de M694V-M6 a la península Ibèrica suggeriria dos escenaris possibles. En un d'ells, M694V-M4 s'hauria introduït a la península Ibèrica d'on s'hauria generat M694V-M6. En l'altre escenari, per contra, M4 i M6 haurien arribat per diferents cromosomes al nostre territori (Fig.5, línies vermelles).

En qualsevol dels casos, la presència de l'haplotip M694V-M6 en un pacient d'origen francès, l'únic descrit fins a la data (Bernot et al., 1998), podria explicar-se per migració d'aquest des de la península cap al Nord.

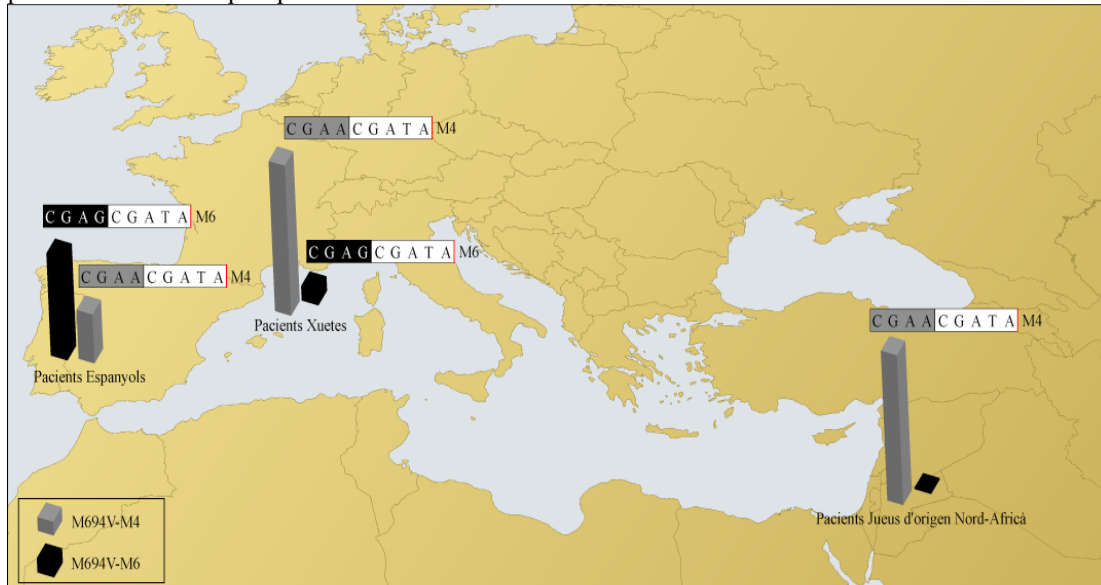
Una dada que crida l'atenció és la relació "haplotip fundador (M694V-M4) versus haplotip recombinant (M694V-M6)". Mentre que en els pacients xuetes el fundador és el més freqüent, en els espanyols ho és el recombinant. Aquesta relació inversa és plausiblement explicable per l'efecte de la deriva genètica en la població espanyola (Fig. 6).

Figura 5. Model sobre la dispersió dels haplotips associats a la variant del *MEFV* M694V (línies negres) i hipòtesi sobre l'aparició i/o introducció de l'haplotip M694V-M6 a la península Ibèrica (línia vermella). Una possibilitat és que un cop introduït M694V-M4 a la península, s'hagués produït M694V-M6 a partir d'una recombinació (línia vermella contínua). Una altra possibilitat és que aquest fenomen hagués tingut lloc durant la migració de M694V-M4 pel nord d'Àfrica i que més tard, s'haguessin introduït ambdós haplotips, M694V-M4 i M694V-M6 a la península Ibèrica (línia vermella discontinuïda). Fluxos de migració a la comunitat xueta (línies blaves). \*M694V-M6 no s'ha detectat en aquestes poblacions del nord d'Àfrica.



Una altra dada remarcable dels haplotips associats a M694V és l'absència de l'haplotip M694V-M2 en el grup de pacients espanyols, també anomenat B i descrit en jueus iraquians. És possible que l'haplotip existeixi en menor freqüència que els altres haplotips associats a M694V i que no s'hagi detectat en el present estudi. Però també és possible que sigui un haplotip característic de jueus iraquians, una comunitat que ha estat relativament aïllada durant segles, i que no hagi arribat a la península Ibèrica.

Figura 6. Possibles mecanismes de generació de M694V-M6, a partir de M694V-M4 o Med(A), presumiblement l'haplotip fundador.



#### Haplotips associats a altres mutacions MEFV

E148Q es va descriure en un primer moment com una mutació recurrent, donat que es va detectar associada a diversos haplotips de microssatèl·lits en diferents poblacions (Bernot et al., 1998). Aksentijevich i col·laboradors van descriure més tard la convergència entre haplotips associats a E148Q i en pacients de diferents ètnies, la qual cosa suggeria un efecte fundador per a la mutació. Les dades referents als haplotips associats a la mutació E148Q en els pacients espanyols mostren la convergència dels haplotips que la contenen, amb la qual cosa es confirma la hipòtesi sobre l'efecte fundador de la mutació, i no la que proposa que E148Q seria una variant recurrent.

Els haplotips associats a la mutació M694I són: M694I-M2, prèviament descrit en àrabs del Magreb i anomenat Ara2, M694I-M1 i M694I-M5. S'observa una convergència a partir de l'exó 3 al 10 d'aquests darrers haplotips, però no amb l'haplotip M694I-M2, el presumptament ancestral. Amb les dades d'aquest treball es fa difícil establir quin dels tres haplotips és l'ancestral i quins són els recombinants, ja que qualsevol podria ser-ho. En qualsevol cas, la resta s'explicarien per recombinacions: una en l'intró 2 i una altra entre l'exó 9 i la mutació. El fet que M694I-M2 s'observi en pacients àrabs del nord d'Àfrica i tenint en compte els antecedents històrics de la península Ibèrica és temptador suposar que M694I-M2 va ser introduït durant els segles de dominància musulmana a la Península Ibèrica. Les dades que demostren els estudis sobre genètica de poblacions, que indiquen que un 5% del background genètic espanyol

seria Nord-africà podrien recolzar la hipòtesi, però tampoc no es pot descartar el flux migratori individual com un altre vehicle de dispersió d'aquest haplotip.

L'únic cromosoma portador de la mutació V726A d'entre els pacients espanyols, duu l'haplotip M1. El mateix haplotip però anomenat Arm3, es va detectar en pacients armenis. Segons la hipòtesi plantejada pel Consorci Internacional de la FMF, la mutació V726A s'hauria dispersat per poblacions centreeuropees i de l'Àsia Menor. Això podria explicar la baixa freqüència d'aquesta mutació a la població espanyola, però alhora suggereix l'existència d'altres mecanismes de dispersió, per bé que més discrets.

Al present treball, es descriu també l'efecte fundador de les variants K695R i I591T per primera vegada. Fora interessant investigar en altres poblacions els haplotips amb els quals s'associen aquestes mutacions. Pot ser, fins i tot, podrien tenir un origen també antic.

#### *Haplotips del MEFV associats a mutacions en pacients xuetes*

L'anàlisi genètica dels pacients xuetes revelà l'existència de M694V i E148Q com les úniques variants del *MEFV* la qual cosa, per bé que la mostra era petita, indica un limitat espectre de mutacions. Els haplotips associats a M694V en els pacients xuetes, M694V-M4 i M694V-M6, són els mateixos que els dels espanyols, amb diferència que en els xuetes el més freqüent és el M694V-M4 i en els espanyols és M694V-M6. Els haplotips associats a M694V observats en els pacients xuetes són similars als observats en pacients jueus d'origen nord d'africà, en els quals s'observa l'haplotip M694V-M4, també anomenat Med(A), amb la diferència que en els xuetes s'hi observa, a més a més, el M694V-M6 (Fig. 6).

S'havia postulat que els jueus antecessors dels xuetes podrien haver estat sefardites, que des de la península, haurien arribat a Mallorca i s'hi haurien assentat. Les dades obtingudes sobre els haplotips mutats en aquest treball poden tenir implicacions en aquest sentit. La predominància de M694V-M4, el presumpte haplotip fundador i l'únic haplotip associat a M694V detectat en jueus israelites, observada en una comunitat petita i tancada com la xueta, indica una relació directa amb els jueus i la diàspora, alhora que suggereix una moderada influència, si no mínima, de la població peninsular sobre la comunitat xueta. Aquestes dades coincideixen amb el recent estudi de Crespi i col·laboradors publicat durant la realització de la present tesis doctoral el qual demostra, mitjançant el tipatge de HLA, la proximitat genètica d'aquestes dues poblacions i una marcada distància amb la població espanyola. Ara bé, no exclou que el

flux migratori de l'haplotip M694V-M4 podia haver estat per part de diferents grups de jueus des d'altres punts de la costa mediterrània.

La presència de l'haplotip M694V-M6 en els pacients xuetes, no observat en poblacions jueves, és una troballa interessant doncs podria recolzar la hipòtesi de l'origen sefardita dels xuetes i pot tenir varies explicacions, totes elles fonamentades en base a què M694V-M6 seria l'haplotip recombinant generat a partir de M694V-M4 (descriu prèviament en aquesta mateixa secció). La detecció en el present treball de M694V-M6 també en pacients espanyols, i només descrit prèviament en un sol pacient francès (Bernot et al., 1998), recolzaria la via de migració del cromosoma portador de M694V-M6 des de la península a les Illes (Fig. 5 línies blaves discontinües). L'estudi dels haplotips en altres poblacions afectades de la malaltia ajudarien a confirmar l'especulació i a descartar el flux de M694V-M4 i M694V-M6 des d'altres zones de la mediterrània.

Una altra hipòtesi que explicaria la presència de M694V-M6 en els pacients xuetes es basaria en què l'esdeveniment de recombinació que generaria M694V-M6 es podria haver donat, a més d'en la població espanyola, en els jueus antecessors dels xuetes (Fig. 5 línia blava contínua). Davant l'existència d'un putatiu punt calent de recombinació en el locus *MEFV* suggerit en aquest mateix treball, la probabilitat que aquest esdeveniment succeís a les Illes Balears mereixeria la seva consideració. L'estudi de la població sana/control xueta podria ajudar a resoldre aquesta qüestió.

L'estudi dels haplotips associats a mutacions al *MEFV* en pacients xuetes ha evidenciat la proximitat genètica entre els jueus sefardites i els xuetes. Aquest fet, és doblement constatat en el present treball mitjançant el càlcul de l'índex de Reynolds. Aquest, és un paràmetre que mesura la distància genètica entre poblacions. La base d'aquests càlculs és la resolució de matrius constituïdes amb l'espectre de mutacions i la freqüència al·lèlica de cada mutació per a cada població. A partir de les dades de la literatura científica (Fig.7) s'han construït les matrius, se n'ha calculat la distància de Reynolds i el resultat s'ha il·lustrat a la figura 8.

S'observa que l'espectre de mutacions *MEFV* a la població espanyola és força divers i similar a l'observat a la francesa i la italiana, coincidint amb la influència multicultural que aquestes poblacions han patit al llarg de la història de les civilitzacions. Per contra, l'espectre de mutacions dels xuetes és força més pobre, i similar a la dels jueus, suggerint una connexió directa amb la diàspora jueva.



Figura 7. Freqüències al·lèliques de les 5 mutacions més freqüents en el gen *MEFV*, en poblacions típicament afectades per la FMF (vessant oriental) i en altres poblacions Mediterrànies on la prevalència de la FMF és menor (vessant occidental).

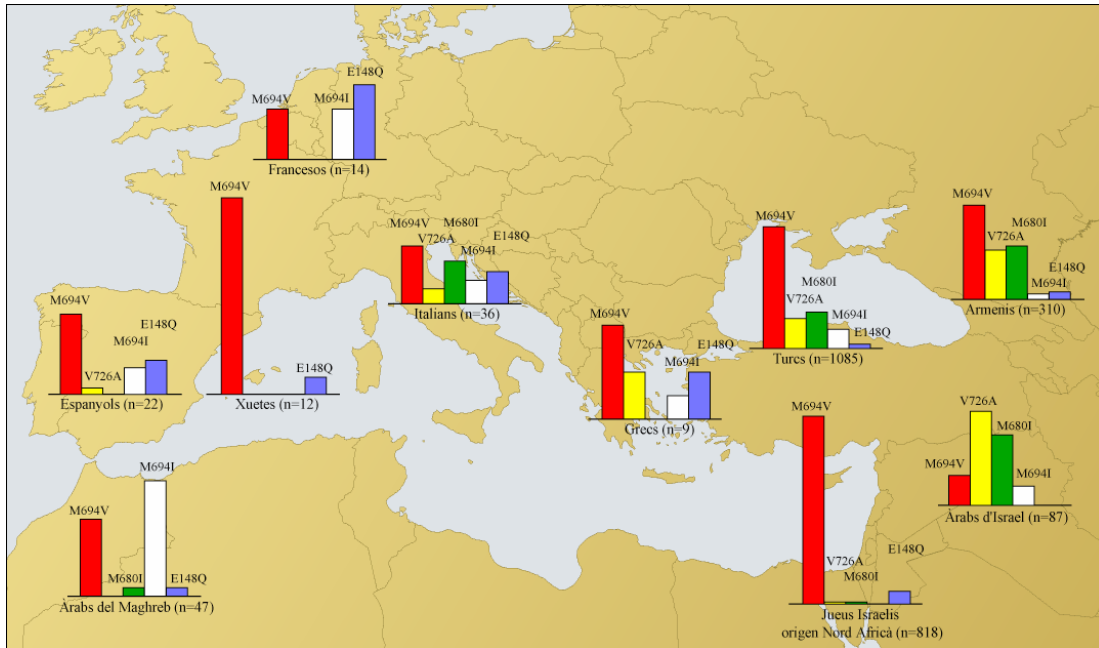
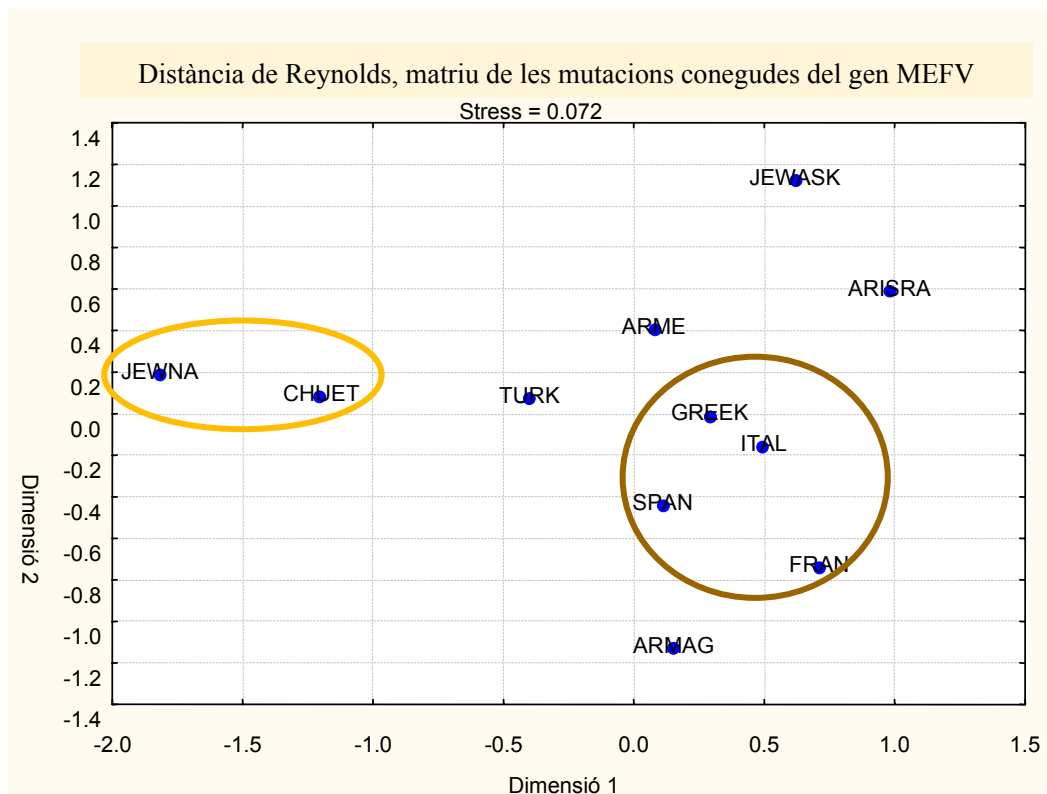


Figura 8. Distància genètica entre les principals poblacions afectades de FMF, ancestrals i no ancestrals, en base a l'índex de Reynolds.



***CONCLUSIONS GENERALS***



## VI- CONCLUSIONS GENERALS

### *Bases genètiques de la FMF a la població espanyola*

1. El 53% dels pacients de FMF espanyols tenen una o dues mutacions en el gen *MEFV*. Els pacients portadors de dues mutacions són el 16% dels pacients i els heterocigots són més del doble dels portadors de dues mutacions.
2. El 47% dels pacients espanyols diagnosticats clínicament de FMF no presenta cap mutació al *MEFV* ni en cap dels gens coneguts responsables d'altres SHFP.
3. L'espectre de mutacions del gen *MEFV* observades als pacients de FMF espanyols és heterogeni i es troben en altres exons diferents del 10. Les mutacions més freqüents són M694V, M694I, E148Q i K695R, i es detecten mutacions privades.
4. L'alta freqüència de pacients heterocigots qüestiona el patró d'herència de la FMF i suggereix l'existència d'almenys un altre locus implicat en la malaltia.
5. Els pacients espanyols diagnosticats clínicament de FMF probable sense mutacions al gen *MEFV* podrien manifestar un fenotip de FMF inusual o bé una nova síndrome de febre periòdica, altrament anomenada, *FMF-like*.

### *Consideracions diagnòstiques*

1. La majoria de pacients de FMF a la població espanyola no pertanyen a cap ètnia relacionada amb les de les poblacions anomenades ancestrals, per la qual cosa l'origen ètnic no s'hauria de considerar un criteri d'exclusió en el diagnòstic clínic de FMF a la població espanyola.
2. Clínicament, els pacients espanyols diagnosticats de FMF constitueixen un grup heterogeni: un subgrup manifesta la simptomatologia clínica típica de la malaltia, relativament lleu, mentre que l'altre subgrup manifesta episodis lleugerament més llargs i amb una major freqüència de limfadenopaties i mialgia.
3. Ni l'amiloïdosi ni l'ELE són manifestacions clíniques freqüents en els pacients espanyols de FMF.
4. Només un 10% dels pacients refereixen història familiar de FMF, per la qual cosa l'absència d'antecedents familiars no hauria de ser un criteri exclouent de la malaltia.
5. Donat que els criteris de Tel Hashomer no detecten la totalitat dels pacients de FMF a la població espanyola, és necessari afegir l'anàlisi de la totalitat dels exons del *MEFV* en el diagnòstic de la FMF a la població espanyola.

### ***Dinàmica genòmica del locus MEFV***

1. Es proposa, per primera vegada, una nomenclatura sistematitzada dels haplotips de SNPs intragènics al gen *MEFV*, basada en criteris genètics i independentment del grup ètnic on s'han estat descrits.
2. Es descriuen Tag-SNPs, per tal d'optimitzar la recerca de futurs estudis.
3. A la població general espanyola s'observa una diversitat d'haplotips del *MEFV* força limitada causada per l'alt LD dels subhaplotips de cada bloc.
4. L'equilibri de lligament entre els haplotips majoritaris del gen *MEFV* i l'alt LD de cada subhaplotip suggereix l'existència d'un punt calent de recombinació a l'intró 2.
5. El punt calent de recombinació és un mecanisme plausible de generació dels haplotips majoritaris.

### ***Història natural de les mutacions en el MEFV***

1. L'estudi dels haplotips associats a mutacions al *MEFV* en pacients espanyols revela la proximitat genètica de la població espanyola amb altres poblacions no ancestrals com la italiana o la francesa i una clara distància amb les poblacions ancestrals.
2. L'estudi dels haplotips associats a mutacions al *MEFV* en pacients xuetes estaria d'acord amb l'origen jueu sefardita dels xuetes.
3. L'estudi dels haplotips associats a mutacions al *MEFV* en pacients xuetes i l'índex de Reynolds indica una proximitat genètica entre els jueus sefardites i suggereixen una connexió directa amb la diàspora jueva.

## ***BIBLIOGRAFIA***



**VIII- BIBLIOGRAFIA**

- Akar E, Yalcinkaya F, Akar N. 2001. Is the Ala138Gly alteration of *MEFV* gene important for amyloidosis? *Hum Mutat* 17: 71.
- Akarsu AN, SAAAtci U, Ozen S, Bakkaloglu A, Besbas N, Sarfarazi M. 1997. Genetic linkage study of familial Mediterranean fever (FMF) to 16p13.3 and evidence for genetic heterogeneity in the Turkish population. *J Med Genet* 34: 573-578.
- Aksentijevich I, Torosyan Y, Samuels J, Centola M, Pras E, Chae JJ, Oddoux C, Wood G, Azzaro MP, Palumbo G, Giustolisi R, Pras M, Ostrer H, Kastner DL. 1999. Mutation and haplotype studies of familial Mediterranean fever reveal new ancestral relationships and evidence for a high carrier frequency with reduced penetrance in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 64: 949-962.
- Azizi E, Fisher BK. 1976. Cutaneous manifestations of familial Mediterranean fever. *Arch Dermatol* 112: 364-366.
- Barakat MH, Karnik AM, Majeed HW, el\_Sobki NI, Fenech FF. 1986. Familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis) in Arabs--a study of 175 patients and review of the literature. *Q J Med* 60: 837-847.
- Baykal Y, Saglam K, Yilmaz MI, Taslipinar A, Akinci SB, Inal A. 2003. Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF-alpha level in familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol* 22: 99-101.
- Ben-Chetrit E, Levy M. 1998. Colchicine: 1998 update. *Semin Arthritis Rheum* 28: 48-59.
- Ben-Chetrit E, Levy M. 1998. Familial Mediterranean fever. *Lancet* 351: 659-664.
- Berglund H, Olerenshaw D, Sankar A, Federwisch M, McDonald NQ, Driscoll PC. 2000. The three-dimensional solution structure and dynamic properties of the human FADD death domain. *J Mol Biol* 302: 171-188.
- Bernot A, da\_Silva C, Petit JL, Cruaud C, Caloustian C, Castet V, Ahmed\_Arab M, Dross C, Dupont M, Cattan D, Smaoui N, Dode C, Pecheux C, Nedelec B, Medaxian J, Rozenbaum M, Rosner I, Delpech M, Grateau G, Demaille J, Weissenbach J, Touitou I. 1998. Non-founder mutations in the *MEFV* gene establish this gene as the cause of familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mol Genet* 7: 1317-1325.
- Bertin J, DiStefano PS. 2000. The PYRIN domain: a novel motif found in apoptosis and inflammation proteins. *Cell Death Differ* 7: 1273-1274.
- Booth DR, Gillmore JD, Booth SE, Pepys MB, Hawkins PN. 1998. Pyrin/marenostrin mutations in familial Mediterranean fever. *QJM* 91: 603-606.
- Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, Booth SE, Bybee A, Soyturk M, Akar S, Pepys MB, Tunca M, Hawkins PN. 2000. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM* 93: 217-221.
- Bouchier-Hayes L, Conroy H, Egan H, Adrain C, Creagh EM, MacFarlane M, Martin SJ. 2001. CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways. *J Biol Chem*. 276: 44069-77.
- Brenner-Ullman A, Melzer-Ofir H, Daniels M, Shohat M. 1994. Possible protection against asthma in heterozygotes for familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 53: 172-175.



- Brik R, Shinawi M, Kepten I, Berant M, Gershoni\_Baruch R. 1999. Familial Mediterranean fever: clinical and genetic characterization in a mixed pediatric population of Jewish and Arab patients. *Pediatrics* 103: e70.
- Britten RJ, 1996. DNA sequence insertion and evolutionary variation in gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9374-7.
- Buades J, Ben\_Chetrit E, Levy M. 1995. Familial Mediterranean fever in the "Chuetas" of Mallorca--origin in inquisition? *Isr J Med Sci* 31: 497-499.
- Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 25-1999. A 16-year-old boy with recurrent abdominal pain. *N Engl J Med* 341: 593-599.
- Cazeneuve C, Ajrapetyan H, Papin S, Roudot\_Thoraval F, Genevieve D, Mndjoyan E, Papazian M, Sarkisian A, Babloyan A, Boissier B, Duquesnoy P, Kouyoumdjian JC, Girodon\_Boulandet E, Grateau G, Sarkisian T, Amselem S. 2000. Identification of *MEFV*-independent modifying genetic factors for familial Mediterranean fever. *Am J Hum Genet* 67: 1136-1143.
- Cazeneuve C, Sarkisian T, Pecheux C, Dervichian M, Nedelec B, Reinert P, Ayvazyan A, Kouyoumdjian JC, Ajrapetyan H, Delpech M, Goossens M, Dode C, Grateau G, Amselem S. 1999. *MEFV*-Gene analysis in armenian patients with Familial Mediterranean fever: diagnostic value and unfavorable renal prognosis of the M694V homozygous genotype-genetic and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 65: 88-97.
- Centola M, Aksentijevich I, Kastner DL. 1998. The hereditary periodic fever syndromes: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Hum Mol Genet* 7: 1581-1588.
- Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, Kingma DW, Horwitz ME, Mansfield E, Holland SM, O\_Shea JJ, Rosenberg HF, Malech HL, Kastner DL. 2000. The gene for familial Mediterranean fever, *MEFV*, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 95: 3223-3231.
- Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, Kastner DL. 2003. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell* 11: 591-604.
- Chen X, Bykhovskaya Y, Tidow N, Hamon M, Bercovitz Z, Spirina O, Fischel\_Ghodsian N. 2000. The familial mediterranean fever protein interacts and colocalizes with a putative Golgi transporter. *Proc Soc Exp Biol Med* 224: 32-40.
- Chen X, Fischel\_Ghodsian N, Cercek A, Hamon M, Ogur G, Lotan R, Danon Y, Shohat M. 1998. Assessment of pyrin gene mutations in Turks with familial Mediterranean fever (FMF). *Hum Mutat* 11: 456-460.
- Chu ZL, Pio F, Xie Z, Welsh K, Krajewska M, Krajewski S, Godzik A, Reed JC. 2001. A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem*. 276: 9239-45.
- Cohen AS, Jones LA. 1993. Advances in amyloidosis. *Curr Opin Rheumatol* 5: 62-76.
- Crespi C, Mila J, Martinez\_Pomar N, Etxagibel A, Munoz\_SAA I, Priego D, Luque A, Pons J, Picornell A, Ramon M, Castro JA, Matamoros N. 2002. HLA polymorphism in a Majorcan population of Jewish descent: comparison with Majorca, Minorca, Ibiza (Balearic Islands) and other Jewish communities. *Tissue Antigens* 60: 282-291.
- Dalmau-Diana M, Alarcon-Zurita A, Piza C, Morey A, Marco J, Bestard J, Mairata S. 1981. (Familial Mediterranean fever. Review of 15 cases). *Rev Clin Esp* 163: 373-376.

- Daniels M, Shohat T, Brenner\_Ullman A, Shohat M. 1995. Familial Mediterranean fever: high gene frequency among the non-Ashkenazic and Ashkenazic Jewish populations in Israel. *Am J Med Genet* 55
- Deininger PL, Batzer MA. 1999. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 67: 183-93.
- Deltas CC, Mean R, Rossou E, Costi C, Koupepidou P, Hadjiyanni I, Hadjirossos V, Petrou P, Pierides A, Lamnisou K, Koptides M. 2002. Familial Mediterranean fever (FMF) mutations occur frequently in the Greek-Cypriot population of Cyprus. *Genet Test* 6: 15-21.
- Direskeneli H, Ozdogan H, Korkmaz C, Akoglu T, Yazici H. 1999. Serum soluble intercellular adhesion molecule 1 and interleukin 8 levels in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 26: 1983-1986.
- Dode C, Pecheux C, Cazeneuve C, Cattan D, Dervichian M, Goossens M, Delpech M, Amselem S, Grateau G. 2000. Mutations in the *MEFV* gene in a large series of patients with a clinical diagnosis of familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 92: 241-246.
- Dowds TA, Masumoto J, Chen FF, Ogura Y, Inohara N, Nunez G. 2003. Regulation of cryopyrin/Pypaf1 signaling by pyrin, the familial Mediterranean fever gene product. *Biochem Biophys Res Commun* 302: 575-80.
- Drenth JP, Van-der-Meer JW. 2001. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 345: 1748-1757.
- Eberstadt M, Huang B, Chen Z, Meadows RP, Ng SC, Zheng L, Lenardo MJ, Fesik SW. 1998. NMR structure and mutagenesis of the FADD (Mort1) death-effector domain. *Nature* 392: 941-945.
- Fiorentino L, Stehlik C, Oliveira V, Ariza ME, Godzik A, Reed JC. 2002. A novel PAAD-containing protein that modulates NF-kappa B induction by cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *J Biol Chem*. 277: 35333-40.
- Gafni J, Ravid M, Sohar E. 1968. The role of amyloidosis in familial mediterranean fever. A population study. *Isr J Med Sci* 4: 995-999.
- Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, O'Shea JJ, Kastner DL. 2000. TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. 12: 479-486.
- Gang N, Drenth JP, Langevitz P, Zemer D, Brezniak N, Pras M, van\_der\_Meer JW, Livneh A. 1999. Activation of the cytokine network in familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 26: 890-897.
- Gershoni-Baruch R, Brik R, Lidar M, Shinawi M, Livneh A. 2003. Male sex coupled with articular manifestations cause a 4-fold increase in susceptibility to amyloidosis in patients with familial Mediterranean fever homozygous for the M694V-*MEFV* mutation. *J Rheumatol* 30: 308-312.
- Gershoni-Baruch R, Shinawi M, Leah K, Badarnah K, Brik R. 2001. Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift. *Eur J Hum Genet* 9: 634-637.
- Grateau G, Drenth JP, Delpech M. 1999. Hereditary fevers. *Curr Opin Rheumatol* 11: 75-78.
- Grenier JM, Wang L, Manji GA, Huang WJ, Al-Garawi A, Kelly R, Carlson A, Merriam S, Lora JM, Briskin M, DiStefano PS, Bertin J. 2002. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett*. 530: 73-8.
- Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ting JP. 2002. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol* 169:4088-93.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.
- Henry J, Ribouchon MT, Offer C, Pontarotti P. 1997. B30.2-like domain proteins: a growing family. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 162-165.

- Hiller S, Kohl A, Fiorito F, Herrmann T, Wider G, Tschopp J, Grutter MG, Wuthrich K. 2003. NMR structure of the apoptosis- and inflammation-related NALP1 pyrin domain. *Structure (Camb)* 11: 1199-1205.
- Hlaing T, Guo RF, Dilley KA, Loussia JM, Morrish TA, Shi MM, Vincenz C, Ward PA. 2001. Molecular cloning and characterization of DEFCAP-L and -S, two isoforms of a novel member of the mammalian Ced-4 family of apoptosis proteins. *J Biol Chem.* 276: 9230-8.
- Inohara N, Nunez G. 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 3: 371-82.
- Janeway CA, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.
- Janeway TC, Mosenthal HO. An unusual paroxysmal syndrome, probably allied to recurrent vomiting, with a study of the nitrogen metabolism. 1908. *Trans. Assoc. Am. Phys.* 23: 504-518.
- Jensen LE, Whitehead AS. 1998. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem J* 334 ( Pt 3): 489-503.
- Kastner DL. 1998. Familial Mediterranean fever: the genetics of inflammation. *Hosp Pract (Off Ed)* 33: 131-134, 139-140, 143-136 passim.
- Kavukcu S, Turkmen M, Eroğlu Y, Canda T, Yorukoğlu K, İyçi E, Büyükgebiz A. 1997. Renal, gastric and thyroidal amyloidosis due to familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 11: 210-212.
- Kogan A, Shinar Y, Lidar M, Revivo A, Langevitz P, Padeh S, Pras M, Livneh A. 2001. Common *MEFV* mutations among Jewish ethnic groups in Israel: high frequency of carrier and phenotype III states and absence of a perceptible biological advantage for the carrier state. *American Journal of Medical Genetics.* 102: 272-6.
- Konstantopoulos K, Kanta A, Deltas C, Atamian V, Mavrogianni D, Tzioufas AG, Kollainis I, Ritis K, Moutsopoulos HM. 2003. Familial Mediterranean fever associated pyrin mutations in Greece. *Ann Rheum Dis* 62: 479-481.
- La\_Regina M, Nucera G, Diaco M, Procopio A, Gasbarrini G, Notarnicola C, Kone\_Paut I, Touitou I, Manna R. 2003. Familial Mediterranean fever is no longer a rare disease in Italy. *Eur J Hum Genet* 11: 550.
- Langevitz P, Amolsky D, Neumann L, Buskila D, Pras M: Ischemic heart disease in patients with familial Mediterranean fever. The role of colchicine. In: Sohar E, Gafni J and Pras M (Eds.), *Familial Mediterranean fever*. Freund Publishing House, Ltd, London, 1997, pp. 47-49.
- Livneh A, Langevitz P. 2000. Diagnostic and treatment concerns in familial Mediterranean fever. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* 14: 477-498.
- Livneh A, Langevitz P, Shinar Y, Zaks N, Kastner DL, Pras M, Pras E. 1999. *MEFV* mutation analysis in patients suffering from amyloidosis of familial Mediterranean fever. *Amyloid* 6: 1-6.
- Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, Migdal A, Padeh S, Pras M. 1997. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 40: 1879-1885.
- Lupas A. 1997. Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7: 388-393.
- Majeed HA, Quabazard Z, Hijazi Z, Farwana S, Harshani F. 1990. The cutaneous manifestations in children with familial Mediterranean fever (recurrent hereditary polyserositis). A six-year study. *Q J Med* 75: 607-616.

- Manji GA, Wang L, Geddes BJ, Brown M, Merriam S, Al\_Garawi A, Mak S, Lora JM, Briskin M, Jurman M, Cao J, DiStefano PS, Bertin J. 2002. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* 277: 11570-11575.
- Mansfield E, Chae JJ, Komarow HD, Brotz TM, Frucht DM, Aksentijevich I, Kastner DL. 2001. The familial Mediterranean fever protein, pyrin, associates with microtubules and colocalizes with actin filaments. *Blood* 98: 851-859.
- Martinon F, Hofmann K, Tschopp J. 2001. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol* 11: R118-120.
- Masumoto J, Taniguchi S, Nakayama J, Shiohara M, Hidaka E, Katsuyama T, Murase S, Sagara J. 2001. Expression of apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, a pyrin N-terminal homology domain-containing protein, in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*. 49: 1269-75.
- Matzner Y, Brzezinski A. 1984. C5a-inhibitor deficiency in peritoneal fluids from patients with familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 311: 287-290.
- Matzner Y, Partridge RE, Levy M, Babior BM. 1984. Diminished activity of a chemotactic inhibitor in synovial fluids from patients with familial Mediterranean fever. *Blood* 63: 629-633.
- McDermott MF. 1999. Autosomal dominant recurrent fevers. Clinical and genetic aspects. *Rev Rhum Engl Ed* 66
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 135-45
- Mege JL, Dilsen N, Sanguedolce V, Gul A, Bongrand P, Roux H, Ocal L, Inanc M, Capo C. 1993. Overproduction of monocyte derived tumor necrosis factor alpha, interleukin (IL) 6, IL-8 and increased neutrophil superoxide generation in Behçet's disease. A comparative study with familial Mediterranean fever and healthy subjects. *J Rheumatol* 20: 1544-1549.
- Mimouni A, Magal N, Stoffman N, Shohat T, Minasian A, Krasnov M, Halpern GJ, Rotter JJ, Fischel\_Ghodsian N, Danon YL, Shohat M. 2000. Familial Mediterranean fever: effects of genotype and ethnicity on inflammatory attacks and amyloidosis. *Pediatrics* 105: E70.
- Moriguchi M, Terai C, Koseki Y, Uesato M, Nakajima A, Inada S, Nishinarita M, Uchida S, Kim SY, Chen CL, Kamatani N. 1999. Influence of genotypes at SAA1 and SAA2 loci on the development and the length of latent period of secondary AA-amyloidosis in patients with rheumatoid arthritis. *Hum Genet* 105
- Nevo S, Picornell A, Miguel A, Castro JA, Joel A, Heno N, Liron M, Ramon MM. 1996. Orosomucoid (ORM1) polymorphism in Arabs and Jews of Israel: more evidence for a middle eastern origin of the Jews. *Hum Biol* 68: 217-229.
- Notarnicola C, Didelot MN, Seguret F, Demaille J, Touitou I. 2002. Enhanced cytokine mRNA levels in attack-free patients with familial Mediterranean fever. *Genes Immun* 3: 43-45.
- Ostrer H. 2001. A genetic profile of contemporary Jewish populations. *Nat Rev Genet* 2: 891-898.
- Ozen S, Balci B, Ozkara S, Ozcan A, Yilmaz E, Besbas N, Ozguc M, Kastner DL, Bakkaloglu A. 2002. Is there a heterozygote advantage for familial Mediterranean fever carriers against tuberculosis infections: speculations remain? *Clin Exp Rheumatol* 20: S57-58.
- Papin S, Cazeneuve C, Duquesnoy P, Jeru I, Sahali D, Amselem S. 2003. The tumor necrosis factor alpha-dependent activation of the human mediterranean fever (*MEFV*) promoter is mediated by a synergistic interaction between C/EBP beta and NF kappaB p65. *J Biol Chem* 278: 48839-48847.

- Papin S, Duquesnoy P, Cazeneuve C, Pantel J, Coppey\_Moisan M, Dargemont C, Amselem S. 2000. Alternative splicing at the *MEFV* locus involved in familial Mediterranean fever regulates translocation of the marenostri/pyrin protein to the nucleus. *Hum Mol Genet* 9: 3001-3009.
- Pawlowski K, Pio F, Chu Z, Reed JC, Godzik A. 2001. PAAD - a new protein domain associated with apoptosis, cancer and autoimmune diseases. *Trends Biochem Sci* 26: 85-87.
- Picornell A, Castro JA, Ramon MM. 1991. Blood groups in the Chueta community (Majorcan Jews). *Hum Hered* 41: 35-42.
- Picornell A, Castro JA, Ramon MM. 1992. PI and TF subtypes in Chuetas (Majorcan Jews). *Hum Hered* 42: 321-323.
- Picornell A, Miguel A, Castro JA, Ramon MM. 1990. Enzymatic polymorphisms in the Jewish community (Chuetas) from the Majorca Island. *Gene Geogr* 4: 165-171.
- Pras E, Livneh A, Balow JE, Kastner DL, Pras M, Langevitz P. 1998. Clinical differences between North African and Iraqi Jews with familial Mediterranean fever. *Am J Med Genet* 75
- Pras M. 1998. Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scand J Rheumatol* 27
- Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, Poyet JL, Geddes BJ, DiStefano PS, Bertin J, Alnemri ES. 2002. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J Biol Chem*. 277: 13952-8.
- Reddy BA, Etkin LD, Freemont PS. 1992. A novel zinc finger coiled-coil domain in a family of nuclear proteins. *Trends Biochem Sci* 17: 344-345.
- Reith W, Mach B. 2001. The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu Rev Immunol*. 19:331-73.
- Ribo\_Golovart MA, Gasso\_Campos M, Esteban\_Velasco B, Castella\_Ribo MA, Pulido\_Bosch R. 1980. (Familial Mediterranean fever (FMF) (author's transl)). *An Esp Pediatr* 13: 785-788.
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. 1991. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64: 615-623.
- Rogers DB, Shohat M, Petersen GM, Bickal J, Congleton J, Schwabe AD, Rotter JI. 1989. Familial Mediterranean fever in Armenians: autosomal recessive inheritance with high gene frequency. *Am J Med Genet* 34: 168-172.
- Sack GH, Talbot CC, McCarthy BG, Harris EL, Kastner D, Gruberg L, Pras M. 1991. Exclusion of linkage between familial Mediterranean fever and the human serum amyloid A (SAA) gene cluster. *Hum Genet* 87: 506-508.
- Samuels J, Aksentijevich I, Torosyan Y, Centola M, Deng Z, Sood R, Kastner DL. 1998. Familial Mediterranean fever at the millennium. Clinical spectrum, ancient mutations, and a survey of 100 American referrals to the National Institutes of Health. *Medicine (Baltimore)* 77: 268-297.
- Sanchez\_Sicilia L, Rodicio\_Diaz JL, Hernando\_Avendano L. 1968. (Familial Mediterranean fever. Report of a case and brief literature review). *Rev Clin Esp* 108: 305-311.
- Schwabe AD, Peters RS. 1974. Familial Mediterranean Fever in Armenians. Analysis of 100 cases. *Medicine (Baltimore)* 53: 453-462.
- Shinawi M, Brik R, Berant M, Kasinetz L, Gershoni\_Baruch R. 2000. Familial Mediterranean fever: high gene frequency and heterogeneous disease among an Israeli-Arab population. *J Rheumatol* 27: 1492-1495.

- Shinozaki K, Agematsu K, Yasui K, Nagumo H, Naitoh H, Naganuma K, Komiyama A. 2002. Familial Mediterranean fever in 2 Japanese families. *J Rheumatol* 29: 1324-1325.
- Shoham NG, Centola M, Mansfield E, Hull KM, Wood G, Wise CA, Kastner DL. 2003. Pyrin binds the PSTPIP1/CD2BP1 protein, defining familial Mediterranean fever and PAPA syndrome as disorders in the same pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13501-6.
- Shohat M, Magal N, Shohat T, Chen X, Dagan T, Mimouni A, Danon Y, Lotan R, Ogur G, Sirin A, Schlezinger M, Halpern GJ, Schwabe A, Kastner D, Rotter JI, Fischel\_Ghodsian N. 1999. Phenotype-genotype correlation in familial Mediterranean fever: evidence for an association between Met694Val and amyloidosis. *Eur J Hum Genet* 7: 287-292.
- Shuman JD, Vinson CR, McKnight SL. 1990. Evidence of changes in protease sensitivity and subunit exchange rate on DNA binding by C/EBP. *Science* 249: 771-774.
- Sohar E, Gafni J, Pras M, Heller H. 1967. Familial Mediterranean fever. A survey of 470 cases and review of the literature. *Am J Med* 43: 227-253.
- Staub E, Dahl E, Rosenthal A. 2001. The DAPIN family: a novel domain links apoptotic and interferon response proteins. *Trends Biochem Sci* 26: 83-85.
- Stoffman N, Magal N, Shohat T, Lotan R, Koman S, Oron A, Danon Y, Halpern GJ, Lifshitz Y, Shohat M. 2000. Higher than expected carrier rates for familial Mediterranean fever in various Jewish ethnic groups. *Eur J Hum Genet* 8: 307-310.
- The French FMF Consortium. 1997. A candidate gene for familial Mediterranean fever. The French FMF Consortium. *Nat Genet* 17: 25-31.
- The International FMF Consortium. 1997. Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever. *Cell* 90: 797-807.
- Tidow N, Chen X, Muller C, Kawano S, Gombart AF, Fischel\_Ghodsian N, Koeffler HP. 2000. Hematopoietic-specific expression of *MEFV*, the gene mutated in familial Mediterranean fever, and subcellular localization of its corresponding protein, pyrin. *Blood* 95: 1451-1455.
- Tong ZB, Bondy CA, Zhou J, Nelson LM. 2002. A human homologue of mouse Mater, a maternal effect gene essential for early embryonic development. *Hum Reprod.* 17: 903-11.
- Touitou I. 2001. The spectrum of Familial Mediterranean Fever (FMF) mutations. *Eur J Hum Genet* 9: 473-483.
- Tschopp J, Martinon F, Burns K. 2003. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:95-104.
- Weber CH, Vincenz C. 2001. The death domain superfamily: a tale of two interfaces? *Trends Biochem Sci* 26: 475-481.
- Yalcinkaya F, Cakar N, Misirlioğlu M, Tumer N, Akar N, Tekin M, Taştan H, Kocak H, Ozkaya N, Elhan AH. 2000. Genotype-phenotype correlation in a large group of Turkish patients with familial mediterranean fever: evidence for mutation-independent amyloidosis. *Rheumatology (Oxford)* 39: 67-72.
- Yaraghi Z, Korneluk RG, MacKenzie A. 1998. Cloning and characterization of the multiple murine homologues of NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein). *Genomics.* 51: 107-13.
- Yilmaz E, Ozen S, Balci B, Duzova A, Topaloglu R, Besbas N, SAAAtci U, Bakkaloglu A, Ozguc M. 2001. Mutation frequency of Familial Mediterranean Fever and evidence for a high carrier rate in the Turkish population. *Eur J Hum Genet* 9: 553-555.

- Yuval Y, Hemo\_Zisser M, Zemer D, Sohar E, Pras M. 1995. Dominant inheritance in two families with familial Mediterranean fever (FMF). *Am J Med Genet* 57
- Zemer D, Pras M, Sohar E, Modan M, Cabili S, Gafni J. 1986. Colchicine in the prevention and treatment of the amyloidosis of familial Mediterranean fever. *N Engl J Med* 314: 1001-1005.
- Zhou P, Chou J, Olea RS, Yuan J, Wagner G. 1999. Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11265-11270.