

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΙΑΣ ΚΑΙ
ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΦΛΕΓΜΟΝΟΣΩΜΑΤΟΣ ΣΤΟΝ
ΟΙΚΟΓΕΝΗ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΠΥΡΕΤΟ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

CLINICAL CHARACTERISTICS AND NLRP3 EXPRESSION AND
FUNCTION IN CRETAN PATIENTS WITH FAMILIAL
MEDITERRANEAN FEVER (FMF)

Αργυρώ Ρέπα

Τριμελής Επιτροπή

Αναπληρωτής Καθηγητής Γ Γουλιέλμος (Επιβλέπων)

Αναπληρωτής Καθηγητής Π. Σιδηρόπουλος (Συνεπιβλέπων)

Καθηγητής Δ. Μπούμπας (Συνεπιβλέπων)

Ηράκλειο 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Abstract	3
Περίληψη	5
1. Γενικό Μέρος	
1.1 Κληρονομούμενοι υποτροπιάζοντες πυρετοί ή αυτοφλεγμονώδη νοσήματα...7	
1.2 Οικογενής Μεσογειακός Πυρετός (Familial Mediterranean Fever – FMF)....	9
1.2.1 Κλινικές εκδηλώσεις.....	9
1.2.2 Θεραπεία	10
1.2.3 Διάγνωση.....	11
1.2.4 Φαινοτυπικές - γονοτυπικές συσχετίσεις.....	12
1.3 Παθοφυσιολογία	13
1.3.1 Ιντερλευκίνη -1β (IL-1β).....	13
1.3.2 Φλεγμονόσωμα.....	13
1.3.3 Πυρίνη	16
2. Ειδικό Μέρος	
2.1 Σκοπός	18
2.2 Μέθοδοι	18
2.2.1 Ασθενείς και ομάδα ελέγχου	18
2.2.2 Ex vivo ενεργοποίηση του NALP-3 φλεγμονοσώματος σε λευκά αιμοσφαίρια (WBCs)	19
2.2.3 Ανάλυση Western blot.....	19
2.2.4 Προσδιορισμός κυτταροκινών.....	20
2.2.5 THP-1 κυτταρικές καλλιέργειες και πλασμιδιακές κατασκευές.....	20
2.2.6 Πειράματα διαμόλυνσης και ενεργοποίηση THP-1 κυττάρων για την παραγωγή IL-1β (Transfection studies and THP-1 stimulation for IL-1b production).....	20
2.2.7 Στατιστική ανάλυση	21
2.3 Αποτελέσματα	22
2.4 Συζήτηση.....	33
2.5 Συμπεράσματα.....	37
3. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	38
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	39
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	43
6. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ	47

CLINICAL CHARACTERISTICS AND NLRP3 EXPRESSION AND FUNCTION IN CRETAN PATIENTS WITH FAMILIAL MEDITERRANEAN FEVER (FMF)

Background: FMF is the prototype hereditary autoinflammatory disorder characterized by recurrent self-limited episodes of fever, articular and serosal inflammation, and accumulation of polymorphonuclear cells into affected tissues. The disease is caused by mutations in the MEFV gene, which encodes for pyrin, a protein predominantly expressed in innate immune cells. Although it is considered autosomal recessive disease, a sizeable number of patients have a single mutated MEFV allele, thus raising the possibility for dominant modes of inheritance. FMF is prevalent among populations of the eastern Mediterranean region with estimated carrier frequency of mutant alleles as high as 1:3–1:5. We have previously reported mutant MEFV carrier frequency of 1:17 in the Cretan population, thus placing it into the intermediate-risk population. Although the inflammatory cytokine interleukin-1b (IL-1b) has been implicated in the pathophysiology of FMF, there is scarce evidence of dysregulated IL-1b production by FMF patients. IL-1b exists in the cytosol in precursor (pro-IL-1b) 33-kD form and is processed mainly by inflammasome-activated caspase-1 into the bioactive 17-kD form. Inflammasomes are intracellular multiprotein complexes consisting of a NLR, such as the NLRP proteins, the adaptor protein ASC and pro-caspase-1. The NLRP3 inflammasome is the best characterized inflammasome for its capacity to produce IL-1b in response to microbial and metabolic stimuli. Mutations in NLRP3 (cryopyrin, CIAS1) are linked to a group of autoinflammatory diseases collectively named CAPS.

The physiologic role of pyrin and how its mutations contribute to FMF inflammation remain elusive. Pyrin interacts with ASC, pro-caspase-1 and other inflammasome components, including NLRP3, to regulate IL-1b maturation. Both pro- and anti-inflammatory functions have been suggested for pyrin and the effects of FMF-associated mutants remain controversial as well. There is lack of evidence regarding the expression of NLRP3 inflammasome and NLRP3-mediated IL-1b production in patients with FMF.

Objectives: To report on the clinical manifestations, genotyping variation, genotype-phenotype correlation and respond to treatment in FMF patients and to assess the protein expression and function of NLRP3 inflammasome in WBCs from FMF patients and healthy individuals.

Materials and methods: During 2005-2013, 160 patients were evaluated for possible FMF. 106 patients were diagnosed with FMF according to the Tel Hashomer diagnostic criteria. For the genetic analysis, we used the ViennaLab FMF StripAssay for 12 common MEFV mutations (E148Q, P369S, F479L, M680I [G > C, G > A], I692 del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H). The clinical, laboratory and genetic characteristics of FMF patients were reviewed.

We isolated peripheral white blood cells (WBCs) from 20 symptoms-free FMF patients and 21 healthy individuals. Seven patients were compound heterozygous for

the M694V, M694I, E148Q mutations, eight patients were heterozygous for the M694V or the E148Q mutation, and the remaining four patients had no identified mutations, yet they fulfilled the diagnostic criteria for FMF. Disease activity was assessed based on clinical features and laboratory tests (including erythrocyte sedimentation rate and serum C-reactive protein levels), and all patients were studied in a symptoms-free period. Twenty-one age and gender-matched healthy individuals were included. Intracellular protein expression of NLRP3, caspase-1, IL-1b at baseline and after LPS/ATP sequential treatment for NLRP3 activation was assessed by immunoblotting. Secreted IL-1b was quantified by ELISA. THP-1 cells were transfected with wild-type or mutant pyrin and IL-1b secretion was measured.

Results: 106 patients (50% women) were diagnosed with FMF with an average age 23.5 years (range 1-60) at the time of first attack. M694V was the most frequent (49.5%) mutation. Combined MEFV heterozygosity and homozygosity was found in 30.1% of the patients, while 19.9% of patients carried no mutation. The most frequent presenting manifestations were abdominal pain and fever. 77,7% had good respond to colchicine 1 mg/day. Two patients started on IL1-blockade (anakinra) due to colchicine failure. Amyloidosis developed in 2 patients. Both patients were homozygotes for M694V mutation. There were no differences in clinical manifestations, response to treatment or expression and function of NALP3-inflammasome among patients with one, two, or no MEFV mutations.

FMF WBCs exhibited lower NLRP3 (mean difference [95% CI] for p113–115 -798 [-1422 to -175], for p64:-4713 [-8939 to -487] arbitrary units [AU]) and active caspase-1 (mean difference [95% CI]:-1604 [-3051 to -157] AU) protein expression compared to healthy individuals, and LPS/ATP treatment resulted in significantly lower intracellular IL-1b levels in FMF patients, irrespectively of MEFV genotype. Likewise, LPS/ATP induced caspase-1-dependent IL-1b release at significantly lower amounts in the FMF group (1182 ± 192 versus 2134 ± 245 pg/mL in controls, $p = 0.004$). Consistently, THP-1 cells transfected with FMF-associated M694V mutant pyrin displayed lower LPS/ATP-induced IL-1b compared with wild-type pyrin-transfected cells.

Conclusion: In a cohort of Cretan FMF patients, the most frequent MEFV mutation was M694V and all but two patients had excellent prognosis on colchicine therapy. Genotype did not correlate with clinical manifestations or response to treatment. M694V homozygosity was predictor for development of amyloidosis. WBCs from FMF patients demonstrate reduced protein expression of NLRP3 and reduced NLRP3-mediated IL-1b production. These aberrancies seem to be linked to mutant pyrin either by altered physical interaction with NLRP3 inflammasome, or by induction of metabolic cell stress leading to decreased NLRP3 levels. Additional studies will be needed to define whether reduced activation of NLRP3 inflammasome in FMF represents a compensatory mechanism to control inflammation or is linked to its pathogenesis though defective anti-microbial responses

Περίληψη

Ο οικογενής μεσογειακός πυρετός (Familial Mediterranean Fever - FMF) είναι το πρότυπο και πιθανότατα ο συχνότερος από τους κληρονομούμενους υποτροπιάζοντες πυρετούς. Χαρακτηρίζεται από αυτοπεριοριζόμενα επεισόδια φλεγμονής. Η νόσος προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *MEFV*, το οποίο κωδικοποιεί για την πυρίνη ή μαρενοστρίνη. Μεταβιβάζεται με το αυτοσωμικό υπολειπόμενο πρότυπο κληρονομικότητας αν και περίπου 25% των ασθενών με τυπική κλινική εικόνα FMF φέρουν μόνο 1 μετάλλαξη και στο 10-20% δεν παρατηρούνται μεταλλάξεις. Υπάρχουν στοιχεία τα οποία εμπλέκουν την IL-1β στην παθογένεια του FMF, που υποστηρίζονται από την κλινική και εργαστηριακή εικόνα φλεγμονής που χαρακτηρίζει τον FMF, από *in vivo* μελέτες σε ζωικά μοντέλα, και από τη θεραπευτική απάντηση των ασθενών ανθεκτικών στην κολχικίνη σε αναστολείς της IL-1. Είναι γνωστό ότι το NLRP3 φλεγμονόσωμα έχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της IL-1β από τα κύτταρα. Υπάρχουν λίγα δεδομένα όσο αφορά στη ρύθμιση της παραγωγής της IL-1β σε ασθενείς με FMF.

Σκοπός: Η καταγραφή των γενετικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με FMF στην Κρήτη, η πιθανή συσχέτιση των γονοτύπων με την κλινική εικόνα, η απάντηση στην θεραπεία και η μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών και της λειτουργίας του NLRP-3 φλεγμονοσώματος σε κύτταρα ολικού αίματος ασθενών με FMF και ομάδας ελέγχου υγιών ασθενών.

Μέθοδοι: Κατά την περίοδο 2005-2013, 160 ασθενείς εκτιμήθηκαν στο ιατρείο των αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων του ΠΑΓΝΗ. 106 ασθενείς διαγνώστηκαν με FMF σύμφωνα με τα διαγνωστικά κριτήρια του Tel Hashomer. Για τη γονοτύπηση χρησιμοποιήσαμε το Kit «FMF Strip Assay» που ανιχνεύει τις 12 πιο συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου *MEFV* (E148Q, P369S, F479L, M680I, M680I, I692, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H). Μελετήθηκαν αναδρομικά και προοπτικά τα δημογραφικά, κλινικά, εργαστηριακά και γενετικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Σε περιφερικό αίμα από 20 ασθενείς και 21 υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου) μελετήσαμε την βασική ενδοκυττάρια έκφραση των πρωτεϊνών NLRP3, κασπάσης-1 και IL-1b αλλά και την έκφραση τους μετά ενεργοποίηση του NLRP3 με LPS/ATP (ανοσοαποτύπωση-immunoblotting). Η συγκέντρωση της απεκκρινόμενης IL-1b στα υπερκείμενα των κυτταρικών καλλιιεργειών εκτιμήθηκε με ELISA. Για να εκτιμήσουμε την επίδραση της μη μεταλλαγμένης (wild-type) και της μεταλλαγμένης πυρίνης στην παραγωγή της IL-1β που επάγεται από την ενεργοποίηση του NLRP3 κάναμε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης ανθρώπινων THP-1 μονοκυττάρων με wild-type και μεταλλαγμένη πυρίνη.

Αποτελέσματα: 106 ασθενείς (50% γυναίκες) διαγνώστηκαν με FMF, με μέση ηλικία έναρξης της νόσου τα 23,5 έτη. Η πιο συχνά ανιχνεύσιμη μετάλλαξη είναι η M694V (49,5%). 30.1% των ασθενών φέρουν δύο μεταλλάξεις (διπλοί ετεροζυγώτες/ομοζυγώτες), ενώ σε 19,9% των ασθενών με τυπική κλινική εικόνα FMF δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη. Κοιλιακό άλγος και εμπύρετο ήταν οι πιο

συχνές κλινικές εκδηλώσεις. Δύο ασθενείς χρειάστηκαν θεραπεία με αναστολέα της IL-1 (anakinra). Δύο ασθενείς εμφάνισαν αμυλοείδωση, και οι δύο ήταν ομοζυγώτες για τη M694V μετάλλαξη. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην κλινική εικόνα, το γονότυπο, την απάντηση στη θεραπεία ή την έκφραση και την δράση του NLRP3- φλεγμονοσώματος μεταξύ ασθενών με 1, 2 ή καμία μετάλλαξη. Σε σχέση με τα υγιή άτομα, οι ασθενείς με FMF είχαν μικρότερη έκφραση πρωτεϊνών του NLRP3 φλεγμονοσώματος και της ενεργοποιημένης κασπάσης-1 τόσο στη βασική τους έκφραση όσο και μετά ενεργοποίηση με LPS/ATP. Η ενεργοποίηση του NLRP3 σε ολικό αίμα είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη παραγωγή και απέκκριση IL-1β στους ασθενείς με FMF σε σχέση με τα υγιή άτομα ανεξάρτητα από το γονότυπο. Ομοίως η ενεργοποίηση με LPS/ATP αύξησε σημαντικά την παραγωγή της IL-1b από τα THP-1 κύτταρα που υπερέκφραζαν την μη μεταλλαγμένη (wild-type) πυρίνη αλλά όχι από αυτά με την M694V μεταλλαγμένη πυρίνη.

Συμπέρασμα: Στην ομάδα παρακολούθησης των ασθενών με FMF, η πιο συχνά ανιχνεύσιμη μετάλλαξη είναι η M694V (51,3%). Σε 19,9% των ασθενών με τυπική κλινική εικόνα FMF δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κλινική εικόνα και την απάντηση στη θεραπεία σε ασθενείς με 1, 2 ή καμία μετάλλαξη. Αμυλοείδωση εμφάνισαν 2 ασθενείς ομοζυγώτες για την M694V. Δύο ασθενείς δεν απάντησαν στην κολχικίνη. Τα κύτταρα από τους ασθενείς με FMF εμφάνισαν μειωμένη έκφραση της NLRP3 πρωτεΐνης και μείωση της παραγωγής της IL-1β επαγόμενης από το NLRP3 φλεγμονοσώματος. Το γεγονός αυτό συνδέεται με τη μεταλλαγμένη πυρίνη είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασής της με το NLRP3 φλεγμονόσωμα ή μέσω επαγωγής μεταβολικού κυτταρικού στρες που έχει ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα της NLRP3. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για να διευκρινιστεί αν η μειωμένη ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος στους ασθενείς με FMF αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό ελέγχου της φλεγμονής στον FMF ή σχετίζεται με την παθογένεσή του μέσω παθολογικών αντιμικροβιακών απαντήσεων.

1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Κληρονομούμενοι υποτροπιάζοντες πυρετοί ή αυτοφλεγμονώδη νοσήματα

Οι κληρονομούμενοι υποτροπιάζοντες πυρετοί είναι μια ομάδα νοσημάτων που χαρακτηρίζονται από υποτροπιάζοντα επεισόδια εμπύρετου, με ποικίλες φλεγμονώδεις εντοπίσεις και απουσία λοίμωξης¹. Ονομάζονται επίσης αυτοφλεγμονώδη νοσήματα γιατί στην παθογένεια τους δεν συμμετέχουν αντιγονοειδικά Τ-Λεμφοκύτταρα ή αυτοαντισώματα² σε αντίθεση με τα αυτοάνοσα νοσήματα όπως ο Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ) και η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ).

Το πρότυπο και πιθανότατα ο πιο συχνός από τους κληρονομούμενους υποτροπιάζοντες πυρετούς είναι ο οικογενής μεσογειακός πυρετός (Familial Mediterranean Fever - FMF).

Στην ομάδα αυτή επίσης ανήκουν το αυτοφλεγμονώδες σύνδρομο υποτροπιάζοντος πυρετού σχετιζόμενο με τον υποδοχέα του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF Receptor Autoinflammatory Periodic Syndrome - TRAPS), το σύνδρομο ανοσοσφαιρίνης D με υποτροπιάζοντα πυρετό (Hyperimmunoglobulin D and Periodic Fever Syndrome - HIDS) και οι κρυσουρινοπάθειες (cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) που αποτελούνται από 3 ξεχωριστά νοσήματα [το σύνδρομο Muckle Wells (MWS), το οικογενές αυτοφλεγμονώδες σύνδρομο μετά από έκθεση στο κρύο (Familial Cold Autoinflammatory Syndrome - FCAS) και το φλεγμονώδες σύνδρομο με εμφάνιση στη νεογνική ηλικία (Neonatal Onset Multi-inflammatory disease - NOMID/CINCA)]³. Τα γενετικά και κλινικά χαρακτηριστικά των συνδρόμων αυτών φαίνονται στους Πίνακες 1 και 2.

Πίνακας 1. Κληρονομούμενοι υποτροπιάζοντες πυρετοί –γενετικά χαρακτηριστικά

	Κληρονομικότητα	Γονίδιο	Χρωμόσωμα	Πρωτεΐνη
FMF	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	MEFV	16p13.3	Πυρίνη/μαρενοστρίνη
TRAPS	Αυτοσωμική επικρατής	TNFRSF1A	12p13	TNFRSF1A
MKD /HIDS	Αυτοσωμική υπολειπόμενη	MVK	12q24	Μεβαλονική κινάση
CAPS				
FCAS	Αυτοσωμική Επικρατής			
MWS	Αυτοσωμική Επικρατής	NLPR3/CIAS1	1q44	Κρυσουρίνη
CINCA	Αυτοσωμική Επικρατής			

Kastner DL. Hereditary periodic fever syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005

Πίνακας 2 . Κληρονομούμενοι υποτροπιάζοντες πυρετοί –κλινικά χαρακτηριστικά

	FMF	TRAPS	HIDS	FCAS	MWS	NOMID/CINCA
Ηλικία εμφάνισης	≤ 20 ετών	Παιδική-ενήλικη ζωή	Παιδική ηλικία	Βρεφική ηλικία	Βρεφική ηλικία	Νεογνική ηλικία
Διάρκεια κρίσης	1-3 ημέρες	Μέρες ή εβδομάδες	3-7 μέρες	12-24 ώρες	2-3 μέρες	Συνεχώς με εξάρσεις
Εκδηλώσεις από το ΓΕΣ	Περιτονίτιδα Δυσκοιλιότητα	Περιτονίτιδα Διάρροια Δυσκοιλιότητα	Κοιλιακό άλγος, έμετοι Διάρροια Σπάνια περιτοναϊσμός	Ναυτία	Κοιλιακό άλγος	Σπάνια
Πλευρίτιδα	Συχνά	Συχνά	Σπάνια	Όχι	Σπάνια	Σπάνια
Μυοσκελετικές εκδηλώσεις	Μονοαρθρίτιδα Πολυαρθρίτιδα Ολιγοαρθρίτιδα	Αρθρίτιδα μεγάλων αρθρώσεων Αρθραλγία Αρθρίτιδα Μυαλγία	Αρθραλγία Συμμετρική πολυαρθρίτιδα			
Δερματική προσβολή	Ερυσιτελοειδές ερύθημα κάτω άκρων	Μεταναστευτικό εξάνθημα	Κνίδωση Διάχυτο κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα	Κνιδωτικό εξάνθημα μετά από έκθεση σε κρύο	Κνιδωτικό εξάνθημα	Κνιδωτικό εξάνθημα
Οφθαλμική προσβολή	Σπάνια	Περικογχικό οίδημα Επιπεφυκίτιδα	Σπάνια	Επιπεφυκίτιδα	Επιπεφυκίτιδα Επισκληρίτιδα	Ραγοειδίτιδα Επιπεφυκίτιδα Προοδευτική απώλεια όρασης
Προσβολή νευρικού συστήματος	Σπάνια άσηπτη μηνιγγίτιδα		Κεφαλαλγία	Κεφαλαλγία	Νευροαισθητήρια απώλεια ακοής	Νευροαισθητήρια απώλεια ακοής Χρόνια άσηπτη μηνιγγίτιδα, Κεφαλαλγία νοητική υστέρηση
Λεμφαδενοπάθεια	Σπάνια	Σπάνια	Αυχενική λεμφαδενοπάθεια στα παιδιά	-	Σπάνια	Λεμφαδενοπάθεια/σπληνομεγαλία
Αγγειίτιδα	Henoch-Schonlein purpura (HSP) Οζώδες πολυαρθρηρίτιδα	HSP, Λεμφοκυτταρική αγγειίτιδα	Δερματική αγγειίτιδα, σπάνια HSP	-	-	Σπάνια
Εμφάνιση αμυλοείδωσης	>20%	10%	Σπάνια	Σπάνια	25%	Σπάνια
Θεραπεία	Κολχικίνη / Anti-IL-1	Κορτικοστεροειδή (CORT) Anti-IL-1 Anti-TNF-α	ΜΣΑΦ CORT Anti-IL-1 Anti-TNF-α	Anti-IL-1	Anti-IL-1	Anti-IL-1

Kastner DL. Hereditary periodic fever syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005

Σήμερα στα αυτοφλεγμονώδη νοσήματα εκτός από τους υποτροπιάζοντες πυρετούς κατατάσσονται και άλλα νοσήματα στα οποία φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο έχει η έμφυτη ανοσία και όχι τα T-Λεμφοκύτταρα ή αυτοαντισώματα³, όπως είναι το σύνδρομο περιοδικού πυρετού με αφθώδη στοματίτιδα, φαρυγγίτιδα και αυχενική λεμφαδενοπάθεια [Syndrome of periodic fever with aphthous stomatitis, pharyngitis, and cervical adenopathy (PFAPA)], το σύνδρομο Blau, η χρόνια υποτροπιάζουσα πολυεστιακή οστεομυελίτιδα [Chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO)] το

σύνδρομο SAPHO (Synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, and osteitis syndrome), η νόσος Αδαμαντιάδη Behcet, η ουρική αρθρίτιδα και άλλα νοσήματα⁴.

1.2 ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟΣ ΠΥΡΕΤΟΣ (Familial Mediterranean Fever - FMF)

Ο FMF είναι το πρότυπο και πιθανότατα ο πιο συχνός από τους κληρονομούμενους υποτροπιάζοντες πυρετούς. Στο 90% των ασθενών η πρώτη εκδήλωση εμφανίζεται σε ηλικία κάτω των 20 ετών⁵.

1.2.1 Κλινικές εκδηλώσεις

Οι πιο συχνές εκδηλώσεις των ασθενών με FMF είναι:

Υποτροπιάζοντα επεισόδια εμπυρέτου άνω των 38⁰C: Τα επεισόδια διαρκούν από 24 - 72 ώρες. Η συχνότητα μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των ασθενών, άλλα και στον ίδιο ασθενή, από 1 φορά την εβδομάδα μέχρι και 1 φορά ανά έτος.

Κοιλιακό άλγος: 90% των ασθενών αναφέρουν κοιλιακό άλγος κατά τη διάρκεια του πυρετού που συχνά συνοδεύεται από περιτοναϊκό ερεθισμό. Σε ασθενείς πριν την διάγνωση του FMF, συχνά τίθεται η διάγνωση της οξείας κοιλίας με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε ερευνητική λαπαροτομία ή άσκοπη χειρουργική επέμβαση (συνήθως σκωληκοειδεκτομή). Το άλγος υποχωρεί σε 24 - 72 ώρες. Σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας έχει συσχετιστεί η εμφάνιση των συμπτωμάτων με την έμμηνου ρύση.

Αρθρίτιδα: συχνή εκδήλωση του FMF είναι και η προσβολή των αρθρώσεων. Συνήθως είναι μονοαρθρίτιδα μεγάλων αρθρώσεων των κάτω άκρων (γόνατο, ποδοκνημική και ισχίο) και σπανιότερα oligo- ή πολυαρθρίτιδα. Υποτροπιάζουσα μονοαρθρίτιδα μπορεί να είναι η μόνη εκδήλωση του FMF⁶. Η αρθρίτιδα μπορεί να επιμένει για εβδομάδες ή μήνες. Μικρό ποσοστό ασθενών θα εμφανίσουν καταστροφική αρθρίτιδα που θα χρειαστεί χειρουργική αποκατάσταση (συνήθως ισχίο)⁷.

Πλευρίτιδα: 30-45% των ασθενών θα εμφανίσουν ετερόπλευρο πλευριτικού τύπου άλγος οξείας έναρξης⁸. Το άλγος υποχωρεί αυτόματα σε 1-3 ημέρες. Σπάνια μπορεί να είναι η μόνη εκδήλωση του FMF⁹.

Ερυσιπελοειδές εξάνθημα: Σε ποσοστό 7-40% των ασθενών έχει περιγραφεί επώδυνη δερματική ερυθρηματώδης βλάβη κνήμης, ραχιαίας επιφάνειας ποδός ή ποδοκνημικής άρθρωσης που διαρκεί 1-2 ημέρες. Εμφανίζεται συχνότερα σε ασθενείς με έναρξη συμπτωμάτων σε ηλικία μικρότερη των 18 ετών¹⁰.

Σπάνιες εκδηλώσεις:

Σπανιότερες εκδηλώσεις του FMF είναι η περικαρδίτιδα, η σοβαρή εμπύρετος μυαλγία, η πορφύρα Henoch-Schonlein, η οζώδης πολυαρτηρίτιδα, η άσηπτη μηνιγγίτιδα και η χρόνια ασκητική συλλογή⁷.

Αμυλοείδωση:

Η αμυλοείδωση αποτελεί την πιο σοβαρή επιπλοκή των ασθενών με FMF. Χαρακτηρίζεται από εναπόθεση αμυλοειδούς σε διάφορα όργανα, κυρίως σε νεφρούς, γαστρεντερικό και ήπαρ. Μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Συνήθως εμφανίζεται μετά από χρόνια σε ασθενείς που δεν λαμβάνουν θεραπεία. Μπορεί όμως να είναι η πρώτη εκδήλωση σε κατά τα άλλα ασυμπτωματικούς ασθενείς (φαινότυπος 2)¹¹. Η επίπτωση της αμυλοείδωσης έχει συσχετιστεί με εθνικότητες, ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων και παρουσία συγκεκριμένων μεταλλάξεων.

1.2.2 Θεραπεία:

Μέχρι τώρα η μόνη αποτελεσματική θεραπεία για την μείωση των επεισοδίων αλλά και για προφύλαξη από αμυλοείδωση σε ασθενείς με FMF παραμένει η κολχικίνη¹². Η κολχικίνη είναι ένα αλκαλοειδές με αντιφλεγμονώδη δράση που αλληλεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους, παρεμβαίνοντας στην ενδοκυττάρια μεταφορά και έκκριση ουσιών. Αναστέλλει την χημειοταξία των ουδετεροφίλων και παρεμβαίνει στην έκφραση μορίων προσκόλλησης στην επιφάνειά τους¹³. Ο τρόπος με τον οποίο δρα στον FMF δεν είναι πλήρως κατανοητός.

Η θεραπεία είναι εφόρου ζωής και η δόση της κολχικίνης είναι από 0,5-2 mg/d ανάλογα την ηλικία, τη βαρύτητα της νόσου και τη νεφρική λειτουργία. Η πιο συχνή παρενέργεια της κολχικίνης είναι οι διαρροϊκές κενώσεις που βελτιώνονται με την μείωση της δόσης. Σπανιότερες παρενέργειες, κυρίως σε μεγαλύτερους ασθενείς με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία, είναι η μυελοτοξικότητα (λευκοπενία), η νευροπάθεια και η μυοπάθεια. Η κολχικίνη δεν φαίνεται να επηρεάζει τη γονιμότητα σε άνδρες και γυναίκες, και δεν φαίνεται να αυξάνει το κίνδυνο για τερατογένηση¹².

Περίπου 10% των ασθενών είναι ανθεκτικοί στην κολχικίνη. Σε αυτούς τους ασθενείς έχουν δοκιμαστεί ιντερφερόνη, θαλιδομίδη, anti-TNFα^{14, 15} που έδειξαν κάποιου βαθμού αποτελεσματικότητα. Τα καλύτερα αποτελέσματα ωστόσο έχει η αναστολή της IL1. Το anakinra και το canacinumab αποτελούν σήμερα εναλλακτική θεραπεία σε ασθενείς ανθεκτικούς ή με δυσανεξία στην κολχικίνη^{16, 17}.

1.2.3 Διάγνωση

Γενετική διάγνωση

Το 1992 πραγματοποιήθηκε η χαρτογράφηση του υπεύθυνου για τον FMF γονιδίου, *MEFV*, στο χρωμόσωμα 16¹⁸. Το γονίδιο αποτελείται από δέκα εξόνια, κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη 781 αμινοξέων, την πυρίνη ή μαρενοστρίνη και εκφράζεται κατά κύριο λόγο στα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα ηωσινόφιλα¹⁹.

Έχουν περιγραφεί πάνω από 300 μεταλλάξεις του γονιδίου που σχετίζονται με το FMF. 80 % αυτών εντοπίζονται στο εξόνιο 10 και οι υπόλοιπες στο εξόνιο 2,3 και 5²⁰.

Ο FMF μεταβιβάζεται σύμφωνα με το αυτοσωμικό υπολειπόμενο πρότυπο κληρονομικότητας. Ο ρόλος του γονιδιακού ελέγχου στη διάγνωση του FMF έχει απασχολήσει τη βιβλιογραφία καθώς:

- 1) 25% - 38% των ασθενών με τυπική κλινική εικόνα FMF φέρουν μόνο μία μετάλλαξη^{21, 22}
- 2) Σε 10-28% των ασθενών με τυπική κλινική εικόνα FMF δεν παρατηρούνται μεταλλάξεις^{22, 23}
- 3) Στους πληθυσμούς που η επίπτωση της νόσου είναι αυξημένη (υψηλού κινδύνου πληθυσμοί για την εμφάνιση του οικογενούς μεσογειακού πυρετού), όπως είναι οι non-Askenazi Εβραίοι, οι Αρμένιοι, οι Άραβες και οι Τούρκοι, τα ποσοστά φορείας ανέρχονται από 1:3 έως 1:7, ενώ στην Κρήτη έχει δειχθεί ότι η συχνότητα φορείας σε υγιή πληθυσμό είναι 6%²⁴.

Αυτά τα δεδομένα έχουν προβληματίσει τόσο για τον τρόπο της κληρονομικότητας, όσο και για την χρησιμότητα του γονιδιακού ελέγχου στη διάγνωση. Υπάρχουν υποθέσεις για αυτοσωμικά επικρατή τρόπο μεταβίβασης για ορισμένες μεταλλάξεις²⁵. Επίσης συζητείται στη βιβλιογραφία η πιθανότητα να μην είναι ο FMF μονογονιδιακή νόσος²⁶.

Στις τελευταίες συστάσεις για τη διάγνωση του FMF καταλήγουν οι ειδικοί ότι ακόμα και σήμερα με τις υπάρχουσες δυνατότητες, η διάγνωση του FMF εξακολουθεί να είναι κατά κύριο λόγο κλινική και ο γονιδιακός έλεγχος μπορεί να την υποστηρίξει αλλά όχι να την αποκλείσει.²⁷

Κλινική διάγνωση

Η κλινική υποψία για FMF τίθεται σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα επεισόδια πυρετού με συνοδό κοιλιακό ή θωρακικό άλγος, ή σε ασθενείς που έχουν υποστεί λαπαροτομία χωρίς παθολογικά ευρήματα ή τέλος σε ασθενείς με αμυλοείδωση ΑΑ χωρίς υποκείμενο νόσημα, ειδικά αν έχουν οικογενειακό ιστορικό θετικό ή ανήκουν σε πληθυσμούς αυξημένου κινδύνου.

Τα πρώτα κλινικά κριτήρια για τη διάγνωση του FMF θεσπίστηκαν το 1997 από το νοσοκομείο Tel Hashomer και τροποποιήθηκαν από τους Livneh et al²⁸ με ευαισθησία και ειδικότητα περίπου 95%.

Σύμφωνα με αυτά τα κριτήρια για να τεθεί η διάγνωση του FMF πρέπει να πληρούνται:

1. ≥ 1 μείζον κριτήριο ή
2. ≥ 2 ελάσσονα κριτήρια ή
3. 1 έλασσον και 5 υποστηρικτικά κριτήρια ή
4. 1 έλασσον και ≥ 4 από τα πρώτα 5 υποστηρικτικά κριτήρια

Μείζονα κριτήρια:

- Τυπική προσβολή (≥ 3 επεισόδια το έτος με πυρετό [$\geq 38^{\circ}\text{C}$] διάρκειας 1 - 3 ημερών)
 - Περιτονίτιδα
 - Πλευρίτιδα ή περικαρδίτιδα
 - Μονοαρθρίτιδα (ισχίο, γόνατο, ποδοκνημική άρθρωση)
 - Πυρετός

Ελάσσονα κριτήρια:

- Άτυπη προσβολή
 - Θωρακικό άλγος
 - Μονοαρθρίτιδα
 - Άλγος κάτω άκρου μετά από άσκηση
 - Απάντηση στην κολχικίνη

Υποστηρικτικά κριτήρια:

- Οικογενειακό ιστορικό FMF
- Καταγωγή από χώρες αυξημένου κινδύνου
- Ηλικία έναρξης συμπτωμάτων < 20 ετών
- Σοβαρές κρίσεις που απαιτούν κατάκλιση
- Αυτόματη ύφεση συμπτωμάτων
- Ασυμπτωματικά μεσοδιαστήματα
- Αυξημένοι δείκτες φλεγμονής κατά τη διάρκεια της κρίσης (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, ταχύτητα καθίζησης ερυθρών, αμυλοειδές Α ορού, ινωδογόνο)
- Επεισοδιακή πρωτεϊνουρία / αιματουρία
- Αρνητική λαπαροτομία ή άσκοπη σκωληκοειδεκτομή
- Συγγένεια γονέων

1.2.4 Φαινοτυπικές - Γονοτυπικές συσχετίσεις

Η κλινική βαρύτητα της νόσου διαφέρει μεταξύ των ασθενών. Περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες έχουν ενοχοποιηθεί για τη διαφορετική κλινική εικόνα των ασθενών.

Η μετάλλαξη M694V είναι η συχνότερα ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στους ασθενείς με FMF και έχει συσχετιστεί με ανάπτυξη αμυλοείδωσης²⁹, σοβαρότερη κλινική εικόνα²² και μικρότερη ηλικία εμφάνισης συμπτωμάτων^{22, 30}.

Η E148Q μετάλλαξη είναι επίσης μία από τις πιο συχνά ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις στους ασθενείς με FMF. Έχει αμφισβητηθεί κατά πόσο συμβάλει στην παθογένεια του FMF λόγω της συχνής φορείας σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου (μέχρι 30% στους Άραβες). Στις τελευταίες οδηγίες για τη διάγνωση του FMF η μετάλλαξη E148Q δεν θεωρείται παθολογική²⁷.

1.3 Παθοφυσιολογία

Η παθοφυσιολογία του FMF δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να έχει η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β)³¹. Η IL-1β υπάρχει στα κύτταρα στην πρόδρομη μορφή της (προ IL-1β) και ενεργοποιείται στην δραστική μορφή της μέσω της κασπάσης-1 (caspase-1), η οποία ενεργοποιείται με τη σειρά της από το φλεγμονόσωμα (inflammosome)³².

1.3.1 Ιντερλευκίνη -1β (IL-1β)

Η IL-1β είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που είναι υπεύθυνη για ποικίλες ανοσολογικές απαντήσεις. Η IL-1β σχετίζεται με την έμφυτη ανοσία (innate immunity) και διαδραματίζει ρόλο στην προφύλαξη του οργανισμού από λοιμώξεις. Αυξάνει την έκφραση μορίων προσκόλλησης (adhesion molecules) σε ενδοθηλιακά και μεσεγχυματικά κύτταρα μέσω διέγερσης παραγωγής χημειοκινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξαγγείωση των ανοσοποιητικών κυττάρων στους ιστούς. Επίσης η IL-1β προκαλεί την παραγωγή των platelet activating factor (PAF), prostaglandin E2 (PGE2) και nitric oxide (NO), ενώ μπορεί να διεγείρει και την παραγωγή IL-6 και του αυξητικού παράγοντα για τον πολλαπλασιασμό των B- κυττάρων (growth factor for B-cell proliferation). Η IL-1β υπάρχει στα κύτταρα στην πρόδρομη μορφή της (προ IL-1β) και ενεργοποιείται στην δραστική της μορφής μέσω της κασπάσης-1 (caspase-1), η οποία ενεργοποιείται με τη σειρά της από το φλεγμονόσωμα (inflammosome)³²

1.3.2 Φλεγμονόσωμα

Το φλεγμονόσωμα (inflammasome) είναι ένα ενδοκυττάριο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που αποτελείται από ένα υποδοχέα της ομάδας των «nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)- like receptors» (NLRs), μια προσαρμοστική πρωτεΐνη (adaptor protein) - όπως είναι η ASC (apoptosis associated speck -like containing a CARD) και πρόδρομες μορφές της κασπάσης³².

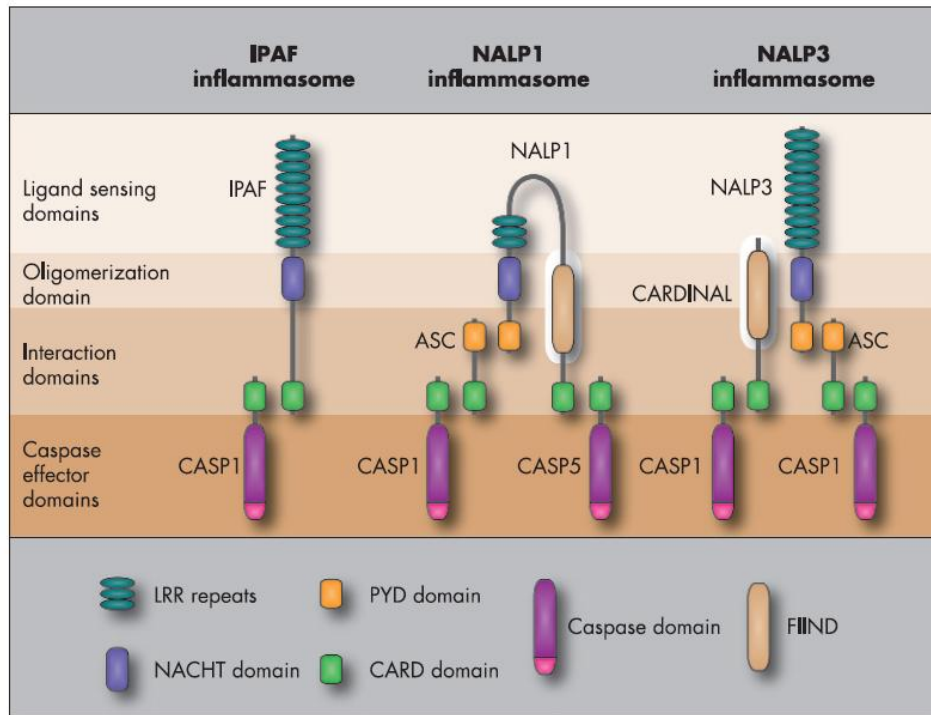
Οι κασπάσες είναι κυστεϊνικές πρωτεάσες που οδηγούν είτε σε φλεγμονή είτε σε κυτταρικό θάνατο. Οι προφλεγμονώδεις κασπάσες είναι η κασπάση -1, -4, και -5. Η πιο καλά μελετημένη κασπάση είναι η κασπάση -1, η οποία μεσολαβεί την παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-1β³².

Οι υποδοχείς NLRs είναι ενδοκυττάριοι υποδοχείς που ανήκουν στην ομάδα των pathogen-recognition receptors (PRRs). Οι PRRs αναγνωρίζουν μικροβιακά μόρια-δομές σημαντικές για τη λειτουργία των μικροοργανισμών που αναφέρονται ως PAMPs (pathogen-associated molecular patterns)³³. Η πρόσδεση των PAMPs στους PRRs οδηγεί σε ενεργοποίηση μονοπατιών της έμφυτης ανοσίας που καταλήγουν στην παραγωγή φλεγμονωδών κυτταροκινών αλλά και στην ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας.

Οι NLRs είναι μια ομάδα από 22 πρωτεΐνες. Χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας κεντρικής περιοχής (nucleotide-binding and oligomerization (NACHT) domain) που έχει στον αμινοτελικό άκρο της είτε περιοχές με πυρίνη (PYD) ή περιοχές με caspase recruitment (CARD)³². Ανήκουν σε 3 υποομάδες: τους nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)- like receptors (NOD1-2, NOD3/NLRC3, NOD4/NLRC5, NOD5/NLRX1, CIITA), τους NLRPs (NLRP1-14, που ονομάζονται και NALPs), και τους IPAF.

Το NLRP-3 φλεγμονόσωμα αποτελείται από την NLRP3 πρωτεΐνη, την προσαρμοστική πρωτεΐνη ASC και την κασπάση-1³² (εικόνα 1). Η NLRP3 ενεργοποιείται από εξωγενή παθογόνα, καθώς και από διάφορα σήματα κινδύνου (danger associated molecular patterns, DAMPs), όπως είναι οι κρύσταλλοι ουρικού οξέος³⁴.

Εικόνα 1 : Φλεγμονοσώματα



Sidiropoulos et al ARD 2008

Η ενεργοποίηση του NALP-3 φλεγμονοσώματος οδηγεί στον ολιγομερισμό της NLPR3 πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την έκθεση των δραστικών μορίων (effector) caspase recruitment domain (CARD) ή πυρίνης (PYD), που μέσω ομοιοτυπικών αλληλεπιδράσεων (homotypic interaction) προσελκύουν μόρια που περιέχουν CARD ή PYD, φέρνοντας τα κοντά και οδηγώντας τα έτσι στην ενεργοποίησή τους³⁵. Σε αυτά τα μόρια ανήκει και η προ-κασπάση-1. (εικόνα 2). Όταν έρχονται κοντά δύο μόρια της προκασπάσης προκαλείται αυτόλυση και μετατροπή σε κασπάση-1. Με τη σειρά της η κασπάση προκαλεί παραγωγή IL-1β.

Το μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλάξεων που σχετίζονται με τον FMF-βρίσκονται στη καρβοξυτελική B30.2/rfp/SRPY περιοχή.³⁸

Η πυρίνη αποτελεί μέλος μιας ευρύτερης οικογένειας πρωτεϊνών που αναφέρεται ως DD-fold υπεροικογένεια και περιλαμβάνει πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία φέρουν μία δομική περιοχή με ελικοειδή διαμόρφωση η οποία δομείται από έξι αντιπαράλληλες έλικες, σε σχηματισμό πτυχής (DD-fold αναδίπλωση). Τέτοιες δομικές DD-fold περιοχές (domains) αποτελούν η PYD (pyrin domain) της πυρίνης και οι DD, DEDs (death effector domains) και οι CARDS (caspase-associated recruitment domains)³⁹.

Η PYD περιοχή της πυρίνης βρίσκεται επίσης στις NLRP πρωτεΐνες, και στην προσαρμοστική πρωτεΐνη ASC (apoptosis associated speck-like containing a CARD).

Η πυρίνη αλληλεπιδρά μέσω PYD- PYD με την ASC, την προκασπάση -1 και άλλα στοιχεία του φλεγμονοσώματος όπως η NLRP-3 πρωτεΐνη, προκειμένου να ρυθμίσει την παραγωγή της IL-1β^{37, 38, 40-42}.

Αν και αρχικά υπήρχαν αντικρουόμενα δεδομένα αναφορικά με τον ρόλο της πυρίνης στην παθογένεια της νόσου, τα ισχυρότερα δεδομένα δείχνουν ότι η πυρίνη δημιουργεί δικό της φλεγμονόσωμα και ενεργοποιεί την IL-1 ανεξάρτητα της NLRP3. Σε HEK-293T κύτταρα που εκφράζουν ASC και προκασπάση-1 έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση της πυρίνης χωρίς μεταλλάξεις (wild type pyrin-WT) αύξησε την ενεργοποίηση της κασπάσης-1 και την παραγωγή της IL-1β, αλλά δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση από τη μεταλλαγμένη πυρίνη^{37, 42}.

Δεδομένα που υποστηρίζουν την προφλεγμονώδη δράση της πυρίνης προέρχονται από τους *Seshadri et al* οι οποίοι έδειξαν ότι τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος αύξησαν την έκφραση της πυρίνης και παράγαγαν περισσότερη IL-1β σε απάντηση στο LPS (διεγέρτης για την ενεργοποίηση μέσω TLR4 υποδοχέων της παραγωγής της proIL-1β) σε σχέση με τα μακροφάγα που προήλθαν από διαφοροποίηση μονοκυττάρων (monocyte-derived macrophages) τα οποία και παράγουν μικρότερη ποσότητα πυρίνης⁴².

Από την άλλη μεριά έχει δειχθεί ότι ποντίκια που δεν έχουν πυρίνη εμφάνισαν αυξημένη απάντηση στην χορήγηση του LPS, και μακροφάγα από αυτά τα ποντίκια εμφάνισαν αυξημένη παραγωγή IL-1β^{43, 44}. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν την αντιφλεγμονώδη δράση της πυρίνης.

In vitro μελέτες επίσης έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση της B30.2/rfp/SRPY περιοχή της πυρίνης με την ASC, την κασπάση-1 και την NLRP3 πρωτεΐνη αναστέλλει την παραγωγή της IL-1β. Αυτή η δράση μειώνεται με την μεταλλαγμένη πυρίνη^{38, 41, 43}.

Η ομάδα του Chae et al³¹ έδειξε ότι knock-in ποντίκια ομόζυγα για μυϊκή πυρίνη στην οποία είχε προστεθεί ανθρώπινη B30.2 περιοχή με μεταλλάξεις που σχετίζονται με τον FMF, εμφάνισαν συμπτώματα που έμοιαζαν με τον FMF. Τα knock-in

μακροφάγα είχαν ενεργοποιημένη κασπάση-1 και παράγαγαν IL-1β σε απάντηση διεγερτών των TLR, ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση του NLRP3. Λαμβάνοντας υπόψη τα προηγούμενα δεδομένα, οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι η πυρίνη και οι μεταλλαγμένες μορφές της, ανάλογα με το περιβάλλον, μπορούν να επιδρούν στην παραγωγή της IL-1β μέσω μονοπατιών εξαρτώμενων αλλά και ανεξάρτητων από την NLRP3 πρωτεΐνη³¹. Αυτό είναι το κυριότερο εύρημα που στηρίζει τη φλεγμονώδη δράση του φλεγμονοσώματος πυρίνης και τη λειτουργία της παθολογικής πυρίνης.

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σκοπός:

Η μελέτη μας είχε δυο τελικά σημεία.

α) την καταγραφή των γενετικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με FMF στην Κρήτη, την πιθανή συσχέτιση των γονοτύπων με την κλινική εικόνα και την απάντηση στην θεραπεία.

β) την μελέτη της έκφρασης των πρωτεϊνών και της λειτουργίας του NLRP-3 φλεγμονοσώματος σε κύτταρα ολικού αίματος σε ασθενείς με FMF και ομάδα ελέγχου υγιών ασθενών.

2.2. Μέθοδοι

2.2.1 Ασθενείς και ομάδα ελέγχου

Από το 2005 λειτουργεί στην Ρευματολογική Κλινική του ΠΑΓΝΗ ιατρείο αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων όπου και παρακολουθούνται σε τακτική βάση ασθενείς με FMF. Κατά την παρακολούθηση καταγράφονται δημογραφικά στοιχεία, κλινικά και γενετικά χαρακτηριστικά (γονότυπος), απάντηση στη θεραπεία και ανεπιθύμητες ενέργειες.

Η διάγνωση του FMF τίθεται σύμφωνα με τα Tel Hashomer κριτήρια²⁸ και για τη γονοτύπηση χρησιμοποιούμε το Kit «FMF Strip Assay» που ανιχνεύει τις 12 πιο συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου *MEFV* (E148Q, P369S, F479L, M680I, M680I, I692, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H).

Για το πρώτο μέρος της εργασίας μελετήθηκαν αναδρομικά και προοπτικά οι ασθενείς της ομάδας παρακολούθησης του ιατρείου FMF.

Για το δεύτερο μέρος της εργασίας μελετήθηκαν 20 ασθενείς από την ομάδα που παρακολουθούνται στο ΠΑΓΝΗ. Η ενεργότητα της νόσου καθορίστηκε βάσει κλινικών και εργαστηριακών ευρημάτων (όπως TKE, CRP) και όλοι οι ασθενείς ήταν ασυμπτωματικοί κατά την εισαγωγή τους στην μελέτη. Ομάδα ελέγχου ήταν 21 υγιή άτομα αντίστοιχης ηλικίας και φύλλου.

2.2.2 Ex vivo ενεργοποίηση του NALP-3 φλεγμονοσώματος σε λευκά αιμοσφαίρια (WBCs)

Έγινε λήψη ηπαρινισμένου ολικού αίματος, το οποίο επεξεργαστήκαμε αμέσως μετά την λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ammonium persulfate buffer. Η βιωσιμότητα των λευκοκυττάρων (WBCs), η οποία εκτιμήθηκε με χρώση trypan blue, ήταν >90% και δεν διέφερε μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου.

Για να εκτιμηθεί η λειτουργία του NALP-3 φλεγμονοσώματος, τα WBCs αρχικά καλλιεργήθηκαν ($0.5 \times 10^6/\text{mL}$) στους 37°C (5% CO_2) σε RPMI-1640 θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% heat-inactivated FBS απουσίας ή παρουσίας του TLR4-ligand (LPS, Calbiochem) (priming phase). Χρησιμοποιήσαμε μικρές συγκεντρώσεις του LPS (250 pg/mL) βασιζόμενοι σε αρχικά δοσο-εξαρτώμενα αποτελέσματα πειραμάτων (Παράρτημα, Εικόνα 1) ώστε να μειωθεί η πιθανότητα μη ανίχνευσης μικρών διαφορών στην παραγωγή της IL-1 β λόγω μεγαλύτερης δόσης του LPS. Μετά 2 ώρες οι καλλιέργειες πλενόταν και προσθέταμε νέο υπόστρωμα με ή χωρίς ATP (5 mM, Sigma) για ακόμα 20 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθεί το NLRP3. Για να καθορίσουμε την επίδραση της κασπάσης-1 στην παραγωγή της IL-1 β ο αναστολέας της κασπάσης -1 Ac-YVAD-CHO (10 μM , Calbiochem) προστέθηκε 15 λεπτά πριν από το ATP και για 10 λεπτά.

2.2.3 Ανάλυση Western blot

Η ενδοκυττάρια έκφραση των πρωτεϊνών NLRP3, κασπάση-1 και IL-1 β υπολογίστηκαν με ανοσοαποτύπωση (immunoblotting) κυτταρικών εκχυλισμάτων (lysates) φρέσκων απομονωμένων WBCs αλλά και από WBCs που είχαν καλλιεργηθεί με ή χωρίς την παρουσία LPS/ATP (όπως περιγράφηκε ανωτέρω). Η λύση των κυττάρων έγινε με 10 mM Tris– HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton-X 100 παρουσία αναστολέων των πρωτεασών (e mini EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε βάσει της μεθόδου Bradford χρησιμοποιώντας το Bio-Rad protein assay kit (Hercules, CA). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση τύπου SDS-PAGE χρησιμοποιώντας 10–15% polyacrylamide gels, και μεταφέρθηκαν σε 0,2 μm nitrocellulose μεμβράνη. Η μεμβράνη έμεινε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, και ακολούθησε επώαση στους 4°C με αντισώματα έναντι της ανθρώπινης NALRP3 (Alexis Biochemicals #ALX-804-819), της caspase-1 (Cell Signaling #2225), της anti-IL-1b (Cell Signaling #2022), της πυρίνης (Santa-Cruz sc-30421), και της β -ακτίνης όλο το βράδυ. Έπειτα τα blots πλύθηκαν και επώαστηκαν με συζευγμένο δεύτερο αντίσωμα (horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεμβράνες της ανοσοαποτύπωσης εμφανίστηκαν με μέθοδο χημειοφωταύγειας (electro-chemiluminescence). Η πυκνότητα της πρωτεΐνης εκτιμήθηκε με το λογισμικό Image J και η ένταση της πρωτεΐνης ομαλοποιήθηκε σύμφωνα με την έκφραση της β - ακτίνης.

2.2.4. Προσδιορισμός κυτταροκινών

Η συγκέντρωση της απεκκρινόμενης IL-1b στα υπερκείμενα των κυτταρικών καλλιιεργειών εκτιμήθηκε με ELISA (e-Bioscience Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!, #88-7010-88; sensitivity 4 pg/mL).

2.2.5. THP-1 κυτταρικές καλλιιεργειες και πλασμιδιακές κατασκευές

THP-1 ανθρώπινα μονοκύτταρα καλλιιεργήθηκαν σε RPMI-1640 θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS, πενικιλίνη (5000 IU/mL)/στρεπτομυκίνη (5000 Ig/mL) (όλα από GIBCO), και 0,5 mM b-mercaptoethanol (Sigma) σε 5% CO₂ στους 37⁰ C. Το pCMV-Tag3a plasmid vector (Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση της πυρίνης (και της πυρίνης χωρίς μεταλλάξεις [wt] - και της μεταλλαγμένης) δημιουργώντας έτσι Pyrin(wt)/pCMV-Tag3A και Pyrin(M694V)/pCMV-Tag3A constructs, που κωδικοποιούν την c-myc-pyrin fusion protein (Dr. Deborah Gumucio, University of Michigan, Ann Arbor, MI) ⁴⁵. Άδεια pCMV-Tag3A χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου.

2.2.6 Πειράματα διαμόλυνσης και ενεργοποίηση THP-1 κυττάρων για την παραγωγή IL-1 β (Transfection studies and THP-1 stimulation for IL-1b production)

THP-1 κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με constructs wild-type (wt) και τη M694V μεταλλαγμένη πυρίνη χρησιμοποιώντας το Amaxa nucleofection. Εν συντομία, τα κύτταρα (2X10⁶ per condition) επανεναιωρήθηκαν (resuspended) σε 100 μL Nucleofector kit V solution (Lonza group LTD., Switzerland). Το κυτταρικό εναιώρημα (Cell suspension) αναμίχθηκε με 1.5 μg ολικού πλασμιδιακού (plasmid) DNA και ακολούθησε διαμόλυνση των κυττάρων (nucleofection) χρησιμοποιώντας το Y-001 πρόγραμμα για ανθρώπινα μονοκύτταρα. Κατόπιν, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε 12-well plates που το καθένα περιείχε 1,5 mL complete medium. Η ανοσοανάπτυξη έδειξε συγκρίσιμα έκφραση της πυρίνης μεταξύ των κυττάρων με τη wt και την μεταλλαγμένη πυρίνη (Παράρτημα, Εικόνα 2). Θετική ομάδα ελέγχου με vector pmaxGFP, που κωδικοποιούν για πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της βιωσιμότητας THP-1 κυττάρων και την αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης των κυτταρικών καλλιιεργειών (Παράρτημα. Εικόνα 2B).

Τα επιμολυσμένα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε macrophage-like κύτταρα προσθέτοντας στο υλικό της καλλιιεργειας PMA 100 nM (Promega) για 72 ώρες. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε νέα καλλιιεργεια και καλλιιεργήθηκαν παρουσία LPS (100 ng/mL) για 2 ώρες. 5 mM ATP προστέθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλα 20 λεπτά. Το υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιιεργειας συλλέχθηκε και προσδιορίστηκε εις διπλούν η IL-1b με ELISA, ενώ τα cell pellets λύθηκαν για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών (Bio-Rad protein assay kit, Hercules, CA). Η

συγκέντρωση της IL-1β (pg/mL) κανονικοποιήθηκε προς 1 μg κυτταρικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος.

2.2.7. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα για το δεύτερο μέρος της μελέτης εμφανίζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα μέσης τιμής (standard error of the mean [SEM] ή μέση τιμή (95% διάστημα εμπιστοσύνης [95% CI]) μεταξύ των δύο ομάδων. Οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων αναλύθηκαν με ανεξάρτητα ή συζευγμένα t-test ανάλογα, χρησιμοποιώντας το Statistical Package for Social Sciences software version 20.0 (SPSS, Inc.). p-value $\leq 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

2.3.Αποτελέσματα

106 άτομα με διαγνωσμένο FMF (50% γυναίκες) παρακολουθούνται στο ιατρείο με μέση ηλικία έναρξης των συμπτωμάτων τα 23,5 έτη (εύρος 1-60 έτη). 51,8% των ασθενών εμφάνισαν το πρώτο επεισόδιο σε ηλικία < 20 ετών.

Γονοτύπηση:

Η πιο συχνά ανιχνεύσιμη μετάλλαξη είναι η M694V (51,3%) (Πίνακας 3α). 30.1 % των ασθενών φέρουν δύο μεταλλάξεις (διπλοί ετεροζυγώτες/ ομοζυγώτες), ενώ στο 19,9% των ασθενών με τυπική κλινική εικόνα FMF δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη. (Πίνακας 3β).⁶⁹

Κλινικές εκδηλώσεις:

Το κοιλιακό άλγος και ο πυρετός είναι οι πιο συχνές κλινικές εκδηλώσεις (πίνακας 4). 20% περίπου των ασθενών δεν εμφανίζουν πυρετό. Σε ένα ασθενή η κύρια εκδήλωση ήταν η αρθρίτιδα. Η διάρκεια των κρίσεων είναι 2,9 μέρες (εύρος 1-7 ημέρες).

Περίπου 5% των ασθενών έχουν υποβληθεί σε ερευνητική λαπαροτομία πριν την διάγνωση και 27% σε άσκοπη χειρουργική επέμβαση (κυρίως σκωληκοειδεκτομή).

Πίνακας 3α. Γονότυποι και αριθμός μεταλλάξεων ασθενών.

Γονότυποι	Αριθμός ασθενών (%)	Μεταλλάξεις	Αριθμός αλληλίων ασθενών
M694V/M694V	5 (4.7)	M694V	60 (51.3)
M694V/E148Q	10 (9.4)	M694I	15 (12.8)
M694V/V726	2 (1.9)	V726A	7 (6)
M694I/E148Q	13 (12.35)	F479L	2 (1.7)
F479L/V726A	2 (1.9)	P396S	2 (1.7)
M694V/-	38 (35.8)	A744S	1 (0,85)
M694I/-	2 (1.9)	K695R	1 (0.85)
V726A/-	3 (2.8)	M680I	1 (0.85)
P396S/-	2 (1.9)	E148Q	28 (23.95)
A744S/-	1 (0.95)		
K695R/-	1 (0.95)		
M680I/-	1 (0.95)		
E148Q/-	5 (4.7)		
-/-	21 (19.8)		
Total	106 (100)	Total	117 (100)

Πίνακας 3β. Αριθμός μεταλλάξεων

Αριθμός μεταλλάξεων	Ασθενείς (%)
1 μετάλλαξη	53 (50%)
2 μεταλλάξεις (ομοζυγώτες/διπλοί ετεροζυγώτες)	32 (30,1%)
Χωρίς μεταλλάξεις	21 (19,9%)

Οι μισοί περίπου ασθενείς (54 άτομα) έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό για FMF.

5 ασθενείς είχαν διαγνωστεί με άλλο αυτοάνοσο νόσημα πριν από την διάγνωση του FMF. Τα νοσήματα που είχαν ήταν: Συστηματικός Ερυθματώδης Λύκος, σύνδρομο Sjogren, Αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα, Κροταφική αρτηρίτιδα και νόσος Crohn.

Οι ασθενείς αυτοί είχαν μεγαλύτερη ηλικία κατά τη διάγνωση [μέση ηλικία 42 έτη (εύρος 16-55 έτη)]. Όλοι είχαν αρθρίτιδα, και η συχνότερη μετάλλαξη και σε αυτήν την ομάδα ήταν η M694V.

Πίνακας 4. Κλινικές εκδηλώσεις

Κλινικές εκδηλώσεις	Ασθενείς (N=106)
Πυρετός	83 (78%)
Κοιλιακό άλγος	95 (89,6%)
Πλευρίτιδα	31 (29%)
Περικαρδίτιδα	5 (4,6%)
Αρθρίτιδα	17 (16%)
Εξάνθημα	4 (3,7%)
Άσκοπη επέμβαση / Λαπαροτομία	29 (27%) / 5 (4,7%)
Διάρκεια κρίσης	2,92 μέρες (1-7)
Συχνότητα κρίσης	14/έτος (3-52)

Απάντηση στη θεραπεία:

Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών ανταποκρίνεται στην κολχικίνη. Το 77,7 % λαμβάνει 1 mg/ημέρα με καλό έλεγχο της νόσου ενώ μόνο 11,1 % χρειάστηκαν δόση 2 mg/ημέρα ώστε να είναι σε ύφεση. Σε δύο ασθενείς έχει χορηγηθεί αναστολέας της

Π-1 λόγω αστοχίας στην κολχικίνη. Η μία ασθενής είναι ομοζυγώτης για τη μετάλλαξη M694V και η άλλη ασθενής ετεροζυγώτης για την μετάλλαξη V726A.

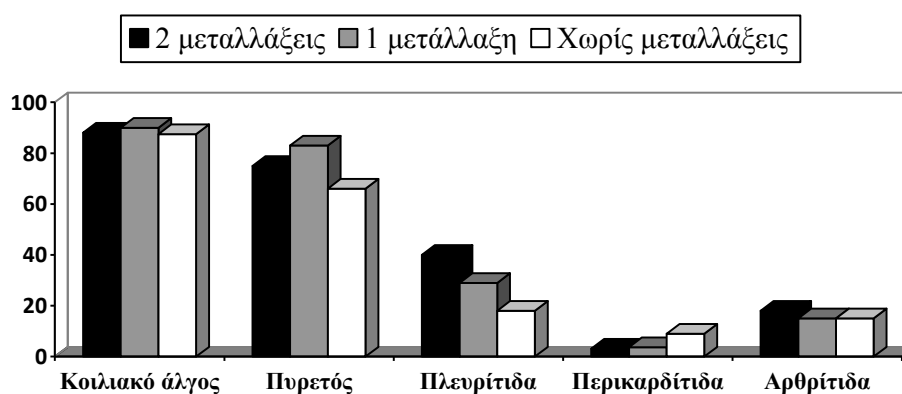
Κλινική εικόνα ανάλογα με το γονότυπο:

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κλινική εικόνα και την απάντηση στη θεραπεία σε ασθενείς με 1, 2 ή καμία μετάλλαξη (Εικόνα 4).⁷⁰

Η μέση διάρκεια της κρίσης σε ασθενείς με 1, 2 ή καμία μετάλλαξη ήταν 2,8/ 3,3/ και 2,5 μέρες, αντίστοιχα. Η συχνότητα των κρίσεων πριν την έναρξη της κολχικίνης ήταν περίπου 13, 14 και 16 φορές το έτος αντίστοιχα.

Αμυλοείδωση εμφάνισαν 2 ασθενείς, και οι 2 ομοζυγώτες για την μετάλλαξη M694V.

Εικόνα 4: Κλινικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τον αριθμό μεταλλάξεων



Κλινική εικόνα ανάλογα με την ηλικία έναρξης της νόσου

48,11 % (51 ασθενείς) εμφάνισαν το πρώτο επεισόδιο σε ηλικία >20 ετών.

Οι ασθενείς με ηλικία έναρξης νόσου < 20 ετών ήταν πιο πιθανό να έχουν πλευρίτιδα/πλευριτικού τύπου άλγος (πίνακας 5), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσο αφορά το γονότυπο (πίνακας 6).

Πινάκας 5.:Κλινικά χαρακτηριστικά ανάλογα με την ηλικία έναρξης της νόσου

Κλινικές εκδηλώσεις	Ασθενείς < 20 ετών (N=55)	Ασθενείς > 20 ετών (N=51)	P value
Πυρετός	45 (81,8%)	37 (72,5%)	0.25
Κοιλιακό άλγος	46 (83,6%)	48 (94,1)	0.09
Πλευρίτιδα	27 (49%)	4 (7,8%)	0.000003
Περικαρδίτιδα	1 (1,8%)	4 (7,8%)	0.15
Αρθρίτιδα	10 (18%)	7 (13,7%)	0,53
Εξάνθημα	1 (1,8%)	3 (5,8%)	0.27
Ιστορικό	28 (50,1%)	25 (49%)	0.84

Πινάκας 6: Γονότυπος ανάλογα με με την ηλικία έναρξης της νόσου

Γονότυποι	Ασθενείς < 20 ετών	Ασθενείς > 20 ετών	P value
M694V/M694V	2 (3,64)	3 (5,88)	0,58
M694V/E148Q	7 (12,72)	3(5,88)	0,23
M694V/V726A	2 (3,64)	0	
M694I/E148Q	10 (18,18)	3(5,88)	0.05
F479L/V726A	2 (3,64)	0	
M694V/-	15 (27,27)	23 (45,1)	0,06
M694I/-	2 (3,64)	0	
V726A/-	1 (1,82)	2 (3,92)	0,51
P396S/-	1(1,82)	1(1,96)	
A744S/-	1 (1,82)	0	
K695R/-	0	1(1,96)	
M680I/-	0	1(1,96)	
E148Q/-	3(5,45)	2 (3,92)	0,71
-/-	9 (16,36)	12 (23,54)	0,35
Total	55 (100)	51(100)	

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης συμμετείχαν 20 ασθενείς από την ομάδα παρακολούθησης στο ιατρείο αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων. Τα κλινικά χαρακτηριστικά και οι γονότυποι φαίνονται στον πίνακα 7. Εφτά ασθενείς ήταν διπλοί ετεροζυγώτες για τις μεταλλάξεις M694V, M694I και την E148Q, οκτώ ασθενείς ήταν ετεροζυγώτες για τις μεταλλάξεις M694V, και την E148Q, ενώ οι υπόλοιποι 4 ασθενείς δεν είχαν ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις αλλά πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια για τον FMF (Παράρτημα, Πίνακας 1).

Πίνακας 7.

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών (n=20) που συμμετείχαν στη μελέτη	
Φύλλο (γυναίκες)	12(60%)
Ηλικία	
Εμφάνισης νόσου	24±3
Κατά την εισαγωγή στη μελέτη	39±4
Κλινικές εκδηλώσεις	
Πυρετός	16 (80%)
Κοιλιακό άλγος	16(80%)
Πλευρίτιδα	7 (35%)
Περικαρδίτιδα	2 (10%)
Αρθρίτιδα	4 (20%)
Εξάνθημα	2 (10%)
Ιστορικό άσκοπης χειρουργικής επέμβασης στην κοιλιά	7 (35%)
Διάρκεια κρίσης (ημέρες)	2,6 ±0,3
Συχνότητα κρίσεων (ανά έτος)	18±4
Λήψη κολχικίνης (κατά την αιμοληψία)	16 (80%)
Εργαστηριακά ευρήματα (κατά την αιμοληψία)	
Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (ανά μ L)	
TKE	6335±461
CRP (mg/dl)	19±4
Creatinin ορού (mg/dl)	0,83±0,4
Πρωτεΐνη ούρων (mg/24ώρο)	1,0±0,1
	105±20
Γονότυποι	
E148Q/M694I	4(20%)
E148Q/wild-type	1 (5%)
M694V/E148Q	3(15%)
M694V/V726A	1 (5%)
M694V/ wild-type	7 (35%)
Χωρίς ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις	4 (20%)

Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως N (%) ή mean ± SEM.

2.3.1. Μειωμένα επίπεδα της NLRP3 και της ενεργοποιημένης κασπάσης-1 διαπιστώθηκαν στα απομονωμένα WBCs των ασθενών με FMF.

Το NLRP3 - φλεγμονόσωμα είναι σημαντικό για την παραγωγή της IL-1β από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας⁴⁶. Εξετάσαμε την ενδοκυττάρια έκφραση των πρωτεϊνών NLRP3, της κασπάσης -1 του φλεγμονοσώματος και της IL-1β σε φρέσκα απομονωμένα WBCs ασθενών με FMF (n=8) και υγιών ατόμων (n = 7).

Σε σχέση με την απομόνωση και καλλιέργεια ειδικών υποομάδων ανοσολογικών κυττάρων, η επεξεργασία του ολικού αίματος απαιτεί ελάχιστο χειρισμό δειγμάτων, λιγότερο χρόνο και είναι μία ακριβής μέθοδος για την εκτίμηση της παραγωγής της IL-1 και την μελέτη αυτοφλεγμονωδών διαταραχών⁴⁷.

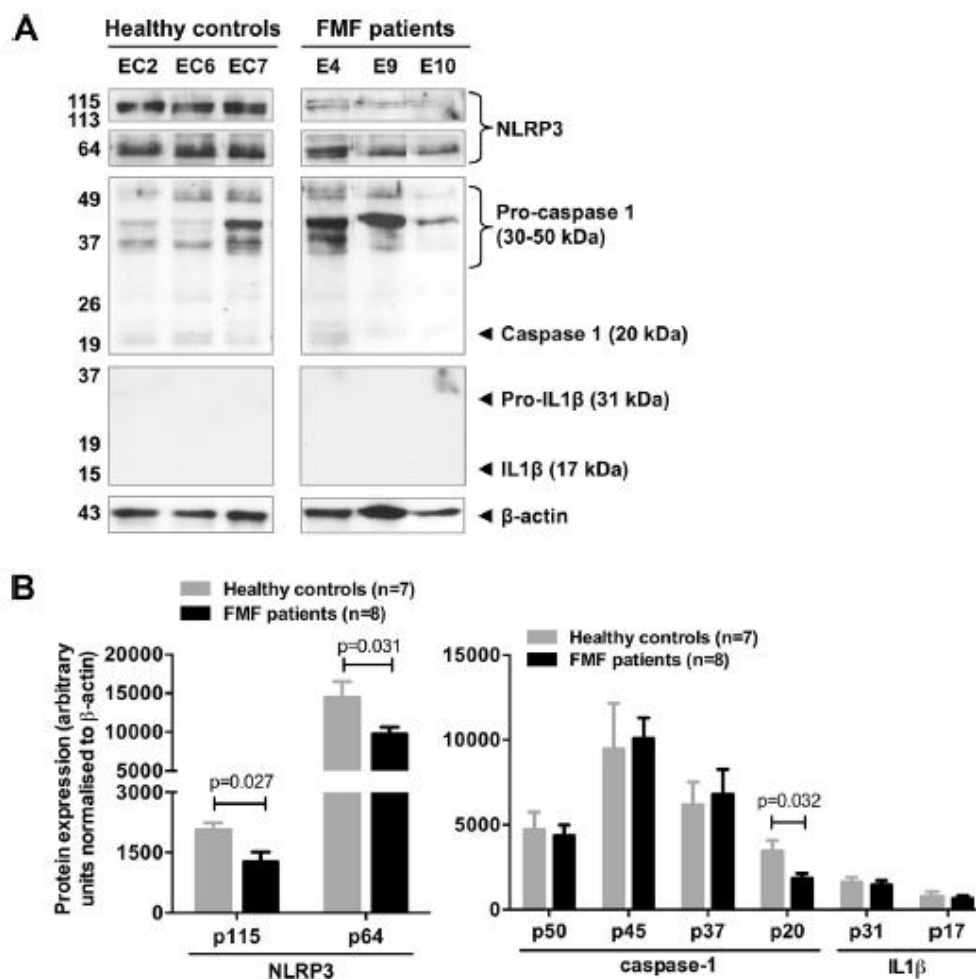
Ο τύπος των κυττάρων του ολικού αίματος έδειξε συγκρίσιμο αριθμό υποομάδων των λευκοκυττάρων μεταξύ των ασθενών και του υγιούς πληθυσμού. (Παράρτημα, Πίνακας 2).

Η ανοσοαποτύπωση του ολικού αίματος αποκάλυψε διακριτές μορφές 113–115 kDa και 64 kDa της NLRP3 (Εικόνα 5A).

Η κανονικοποιημένη έκφραση της NLRP3 πρωτεΐνης ήταν σημαντικά μικρότερη στα WBCs των ασθενών με FMF σε σχέση με τα WBCs των υγιών ατόμων (mean difference [95% CI] για p113–115: -798 [-1422 με -175], για p64:-4713 [-8939 με -487] (αυθαίρετες μονάδες έκφρασης [arbitrary units -AU]) (Εικόνες 5A και B).

Οι ισομορφές (isoforms) της κασπάσης -1 που σχετίζονται με την απόπτωση και την παραγωγή της IL-1β περιλαμβάνουν τις a, b, c και d ισομορφές κυρίως, οι οποίες παράγουν προϊόντα μεταξύ 30 και 50 kDa⁴⁸. Διαπιστώσαμε παρόμοια πρωτεϊνική έκφραση των ισομορφών της κασπάσης-1 μεταξύ των ασθενών και του υγιούς πληθυσμού. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα βασικά επίπεδα έκφρασης της κασπάσης-1 (p20) ήταν πολύ χαμηλά σε φρέσκα απομονωμένα WBCs. Οι ασθενείς με FMF είχαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα της p20 σε σχέση με τον υγιή πληθυσμό (mean difference [95% CI]: -1604 [-3051 με -157] AU) (Εικόνα 5B). Ο λόγος ενεργού/ προ-κασπάσης-1 (p20/ p45) ήταν $0,18 \pm 0,02$ σε WBCs ασθενών με FMF και $0,52 \pm 0,14$ ($p = 0.022$) σε WBCs υγιών ατόμων. Τα επίπεδα της προ-IL-1β (p31) και της ενεργοποιημένης IL-1β (p17) ήταν ελάχιστα και στις 2 ομάδες.

Εικόνα 5



Εικ 5. Ενδοκυττάρια έκφραση πρωτεϊνών του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε φρέσκα απομονωμένα WBCs ασθενών με FMF και υγιών ατόμων (A) έγινε ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κυτταρικού εκχυλίσματος χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι της κασπάσης -1 (p20, p37, p45, p50), της NLRP3 (p113-115, p64), της IL-1b (p31, p17) και της β-ακτίνης (p43) όπως έχει ήδη περιγραφεί. Φαίνονται αντιπροσωπευτικές εικόνες από 3 ασθενείς (E4,9,10) και 3 υγιή άτομα (EC2,6,7). (B) Η κανονικοποιημένη έκφραση των πρωτεϊνών υπολογίστηκε και σε κάθε στήλη φαίνεται η μέση τιμή ± SEM των πρωτεϊνών σε 8 ασθενείς με FMF και σε 7 υγιή άτομα

2.3.2. Ex vivo καλλιέργειες WBCs από ασθενείς με FMF εμφανίζουν μειωμένη NLRP3-επαγόμενη (mediated) παραγωγή IL-1β

Στη συνέχεια εξετάσαμε την λειτουργία του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε ex vivo καλλιέργεια WBCs από ασθενείς με FMF (n = 8) και από υγιή άτομα (n = 7).

Αν και η παρουσία του LPS (TLR4-ligand) μπορεί από μόνη της να ενεργοποιήσει την NLRP3 σε ανθρώπινα μονοκύτταρα⁴⁹, η ενεργοποίηση της NLRP3 και η παραγωγή της IL-1β απαιτεί δύο σήματα⁴⁶.

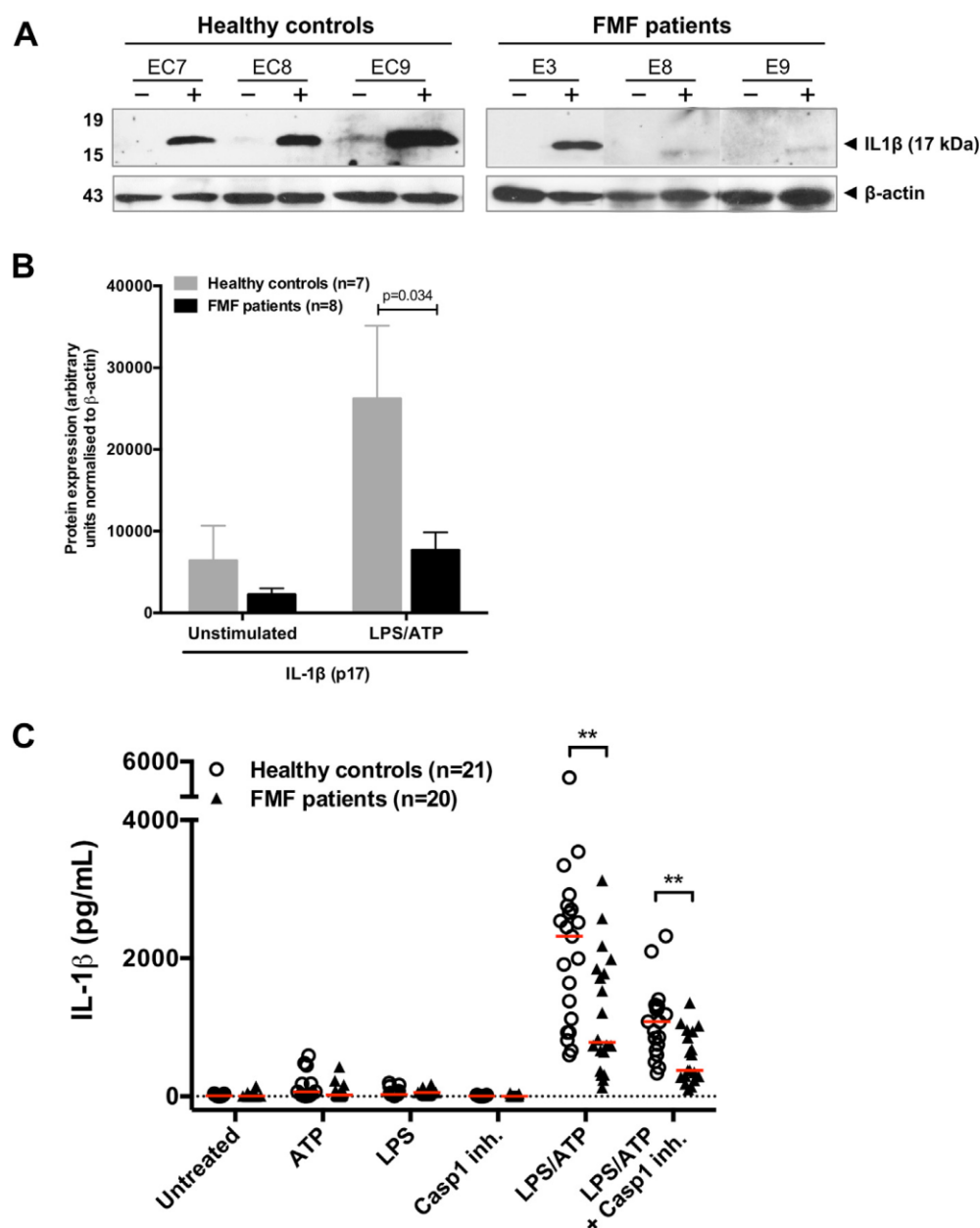
Βασισμένοι σε αυτά τα δεδομένα αφήσαμε απομονωμένα WBCs είτε μη ενεργοποιημένα, είτε προσθέσαμε χαμηλές συγκεντρώσεις LPS (250 pg/mL) για 2 ώρες (1^ο σήμα) και στη συνέχεια προσθέσαμε ATP για άλλα 20 λεπτά (2^ο σήμα) για να ενεργοποιήσουμε το NLRP3 φλεγμονόσωμα^{38, 46, 50}.

Ανοσοαποτύπωση (Immunoblotting) των κυτταρικών καλλιιεργειών έδειξε ότι η ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονόσωματος οδήγησε στην σημαντική αύξηση της ενδοκυττάριας έκφρασης της IL-1b p17 τόσο στους ασθενείς όσο και στην ομάδα ελέγχου (Εικόνα 6A). Όμως, αυτή η επίδραση ήταν λιγότερο σημαντική στους ασθενείς με FMF με αποτέλεσμα τα επίπεδα της p17 πρωτεΐνης να είναι σημαντικά χαμηλότερα στους ασθενείς σε σχέση με τα υγιή άτομα (mean difference [95% CI]: -18,541 [-33,333 με -3750] AU) (Εικόνα 6B). Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας σε φρέσκα απομονωμένα WBCs, τα επίπεδα της NLRP3 πρωτεΐνης στις κυτταρικές καλλιιεργειές ήταν μικρότερα στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς τόσο σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα (mean difference [95% CI]: -12,369 [-22,383 με -2355] AU), όσο και σε ενεργοποιημένα κύτταρα (mean difference [95% CI]: -13,177 [-21,522 με -4833] AU).

Post-hoc ανάλυση των δεδομένων από Western blot σε LPS/ATP-ενεργοποιημένα WBCs από ασθενείς με FMF και υγιή άτομα έδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ των ενδοκυττάριας επιπέδων της NLRP3 (p64) πρωτεΐνης και της IL-1b (p17) (correlation coefficient $r = 0.580$, $p = 0.007$). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο λόγο προ-/ ενεργοποιημένης κασπάσης-1 και στην έκφραση της pro-IL-1β μεταξύ των ασθενών και των υγιών ατόμων, ούτε στα ενεργοποιημένα και μη ενεργοποιημένα κύτταρα.

Για να μπορέσουμε να επεξεργαστούμε καλύτερα τα δεδομένα από την ανοσοαποτύπωση, κάναμε ex vivo ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονόσωματος σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (20) και υγιών ατόμων (21) και μετρήσαμε την IL-1β στο υπερκείμενο κυτταρικών καλλιιεργειών. Και στις δύο ομάδες η ενεργοποίηση με LPS/ATP είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της εκκρινόμενης IL-1b. Η απέκκριση της IL-1β αυξανόταν ελάχιστα μετά από τη ενεργοποίηση μόνο με LPS 250 pg/mL ή μόνο με ATP.

Εικόνα 6



Εικόνα 6. Μειωμένη παραγωγή IL-1β μετά από ενεργοποίηση του NLRP3 σε WBCs ασθενών με FMF. (A) η ενδοκυτάρια έκφραση της IL-1β εκτιμήθηκε με Western blot. Φαίνονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από 3 υγιή άτομα ελέγχου (EC7, 8, 9) και 3 ασθενών με FMF (E3, 8, 9). (B) υπολογίστηκε η κανονικοποιημένη ενδοκυτάρια έκφραση της IL-1β. Οι στήλες δείχνουν τη μέση τιμή± SEM σε 8 ασθενείς και 7 υγιή άτομα ελέγχου. (C) η απεκρινόμενη IL-1β εκτιμήθηκε με ELISA. Οι τελείες δείχνουν τα επίπεδα της IL-1β για κάθε ασθενή (n=20) και κάθε υγιή άτομο (n=21) χωριστά. Οι γραμμές δείχνουν τη μέση τιμή. **p < 0.01 μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα για την ενδοκυττάρια έκφραση των πρωτεϊνών, οι ασθενείς με FMF απέκκριναν σημαντικά μικρότερη ποσότητα IL-1β σε σχέση με τα υγιή άτομα (mean difference [95% CI]: -952 [-1586 to -317] pg/mL) (Εικόνα 6C).

Η προσθήκη αναστολέα της κασπάσης -1 (Ac-YVAD-CHO) μείωσε τη συγκέντρωση της IL-1b κατά $53 \pm 2\%$ στους ασθενείς με FMF και κατά $45 \pm 3\%$ στην ομάδα ελέγχου ($p = NS$), επιβεβαιώνοντας έτσι το ρόλο της κασπάσης -1 στη NLRP3-επαγόμενη παραγωγή της IL-1b στο ex vivo μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε.

Υποανάλυση μεταξύ των ασθενών που λάμβαναν ($n=14$) ή όχι ($N=6$) κολχικίνη κατά την περίοδο της αιμοληψίας δεν έδειξε διαφορά στα επίπεδα της εκκρινόμενης IL-1β (mean difference [95% CI] σε LPS/ATP- IL-1b: -542 [-1406–322] pg/mL), αν και ο μικρός αριθμός των ασθενών αποκλείει ασφαλή συμπεράσματα. Καταλήξαμε ότι τα WBCs από τους ασθενείς με FMF παράγουν μειωμένα επίπεδα IL-1β μετά από ενεργοποίηση του NLRP3- φλεγμονοσώματος με LPS/ ATP.

2.3.3. Οι μεταλλάξεις της πυρίνης που σχετίζονται με τον FMF σχετίζονται με απορρύθμιση της παραγωγής IL-1b.

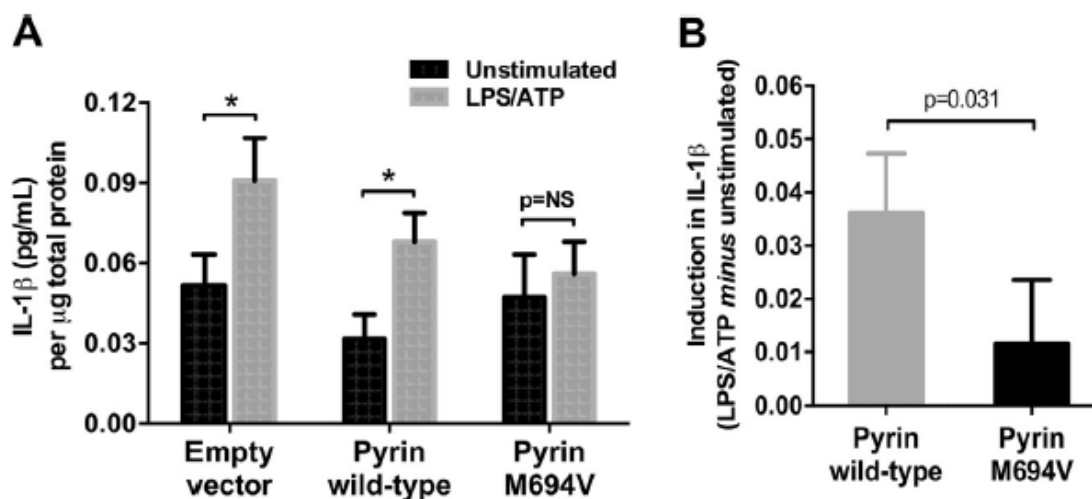
Αν και η πυρίνη ενδεχομένως αναστέλλει την παραγωγή της IL-1β μέσω απευθείας αλληλεπίδραση με το NLRP3 φλεγμονοσώμα^{38, 41, 43}, η επίδραση της μεταλλαγμένης πυρίνης στην ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος και την παραγωγή της IL-1β παραμένει αμφιλεγόμενη^{38, 41}. Επιπλέον δεδομένα που περιπλέκουν περισσότερο την σχέση των μεταλλάξεων της πυρίνης με την παθοφυσιολογία του FMF, δείχνουν ότι η πυρίνη μπορεί να σχηματίζει μαζί με την ASC και την κασπάση-1 ένα φλεγμονοσώμα που δεν σχετίζεται με τις NLRP πρωτεΐνες^{37, 42}, και επίσης μεταλλαγμένες μορφές της πυρίνης μπορούν να προάγουν την παραγωγή της IL-1β ανεξάρτητα από το NLRP3 φλεγμονοσώμα³¹. Για να εκτιμήσουμε την επίδραση της μη μεταλλαγμένης (wild-type) και της μεταλλαγμένης πυρίνης στην παραγωγή της IL-1β που επάγεται από την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος, κατηγοριοποιήσαμε καταρχήν τα αποτελέσματα της παραγωγής της IL-1β σύμφωνα με το γονότυπο των ασθενών με FMF. Η ενεργοποίηση με LPS/ ATP είχε ως αποτέλεσμα την σημαντικά μικρότερη παραγωγή της IL-1β στους ασθενείς με FMF σε σχέση με τα υγιή άτομα, άσχετα με τις μεταλλάξεις του *MEFV* γονιδίου που έφεραν. Επίσης στοιχεία από ανοσοαποτύπωση 8 ασθενών με FMF δεν έδειξαν σημαντική διαφορά στην ενδοκυττάρια έκφραση της NLRP3 πρωτεΐνης ή της IL-1β μεταξύ των ασθενών με διαφορετικές μεταλλάξεις.

Για να μελετήσουμε περαιτέρω την συσχέτιση μεταξύ της πυρίνης και της παραγωγής της IL-1b, σε ανθρώπινα THP-1 μονοκύτταρα, τα οποία παράγουν ενδογενώς πυρίνη, NLRP3, ASC, και κασπάση-1^{38, 49} πραγματοποιήσαμε πειράματα παροδικής διαμόλυνσης με wild-type και μεταλλαγμένη πυρίνη. Τα THP-1 κύτταρα που διαμολύθηκαν με άδειο όχημα (empty vector-transfected) κατόπιν έκθεσης στο PMA (PMA-primed) απέκκριναν μικρή ποσότητα IL-1β, η οποία αυξανόταν σημαντικά ($p =$

0.034) μετά από την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος με LPS/ATP (εικόνα 7A).

Η ενεργοποίηση με LPS/ATP αύξησε σημαντικά την παραγωγή της IL-1 β από τα THP-1 κύτταρα που υπερέκφραζαν την μη μεταλλαγμένη (wild-type) πυρίνη (mean difference [95% CI]: 0.036 [0.0073 - 0.0649] pg/mL/Ig ολικής πρωτεΐνης) αλλά όχι αυτά με την M694V μεταλλαγμένη πυρίνη (mean difference [95% CI]: 0.0096 [-0.0307 - 0.0498] pg/mL /Ig ολικής πρωτεΐνης).

Επίσης η αύξηση της απέκκρισης της IL-1 β μετά την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος ήταν $0,036 \pm 0,011$ στην wild-type σε σχέση με $0,012 \pm 0,012$ pg/mL ανά μ g ολικής πρωτεΐνης ($p = 0.031$) σε THP-1 κύτταρα που έφεραν την πυρίνη με την M694V μετάλλαξη (Εικόνα 7B). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι μετά από ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος με LPS/ATP, η πυρίνη που φέρει την μετάλλαξη M694V -η σχετιζόμενη με τον FMF- σχετίζεται με μικρότερη παραγωγή της IL-1 β .



Εικόνα 7. Επίδραση της πυρίνης που φέρει τη M694V μετάλλαξη που σχετίζεται με τον FMF στην επαγόμενη από LPS/ATP παραγωγή της IL-1 β από THP-1 cells. (A) Καλλιέργειες THP-1 κυττάρων διαμολύθηκαν με άδειο όχημα, με πυρίνη χωρίς μεταλλάξεις και με μεταλλαγμένη πυρίνη και καλλιεργήθηκαν απουσία και παρουσία LPS/ATP. Η απεκκρινόμενη IL-1 β εκιμήθηκε με ELISA. (B) Η επαγωγή της παραγωγής της IL-1 β υπολογίστηκε ως εξής: απεκκρινόμενη IL-1 β μετά από ενεργοποίηση με LPS/ATP μείον απεκκρινόμενη IL-1 β χωρίς ενεργοποίηση (A και B). Οι στήλες δείχνουν τη μέση τιμή \pm SEM από 5 πειράματα. * $p < 0.05$.

2.4.Συζήτηση

A. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τα κλινικά και γενετικά χαρακτηριστικά των ασθενών με FMF, την πιθανή συσχέτιση με το γονότυπο και την απάντηση στη θεραπεία. Σε ποσοστό 90% των ασθενών η πρώτη εκδήλωση εμφανίζεται σε ηλικία κάτω των 20 ετών⁵. Στην δική μας ομάδα παρακολούθησης 48,1% των ασθενών είχαν στην έναρξη των συμπτωμάτων ηλικία μεγαλύτερη των 20 ετών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι στο ιατρείο δεν εκτιμούνται ασθενείς μικρότεροι των 15 ετών. Οι Yasar Bilge et al⁷¹ περιέγραψαν μια ομάδα 2246 ασθενών μελετώντας τις διαφορές μεταξύ ασθενών με ηλικία έναρξης της νόσου μεγαλύτερη των 20 ετών (27,3%) σε σχέση με αυτούς με ηλικία έναρξης μικρότερη των 20 ετών. Πυρετός, περιτονίτιδα, πλευρίτιδα, εξάνθημα, οικογενειακό ιστορικό, αμυλοείδωση και η μετάλλαξη M694V παρατηρήθηκαν πιο συχνά στους ασθενείς μικρότερης ηλικίας. Η συχνότερη παρουσία πλευρίτιδας/ πλευριτικού τύπου άλγος ήταν η μόνη διαφορά που παρατηρήσαμε εμείς μεταξύ των δύο ομάδων. Ο μικρότερος αριθμός ασθενών που μελετήσαμε μπορεί να είναι η αιτία για τη μη ανίχνευση διαφορετικών εκδηλώσεων στις δύο ομάδες. Σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα η συχνότερα ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στους ασθενείς μας ήταν η M694V²². Ομοζυγώτες ή ετεροζυγώτες για την μετάλλαξη M694V εμφανίζουν σοβαρότερη κλινική εικόνα και αυξημένο κίνδυνο για αμυλοείδωση^{22,72}. Δύο ασθενείς εμφάνισαν αμυλοείδωση και οι δύο ήταν ομοζυγώτες για την μετάλλαξη M694V. 19,9% των ασθενών μας με τυπική κλινική εικόνα δεν είχαν ανιχνεύσιμη μετάλλαξη, όμως δεν εμφάνισαν διαφορετική κλινική εικόνα, εκτός από την αμυλοείδωση. Τέλος 77,7% των ασθενών είχαν καλή απάντηση στην κολχικίνη.

B. Επιπλέον μελετήσαμε την έκφραση πρωτεϊνών και τη λειτουργία του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε WBCs ασθενών με FMF και συσχέτισαμε την παραγωγή της IL-1β με την παρουσία μεταλλάξεων της πυρίνης που σχετίζονται με τον FMF. Η ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος από LPS/ATP είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή μικρότερης ποσότητας IL-1β από τους ασθενείς με FMF σε σχέση με τα υγιή άτομα. Επίσης η υπερέκφραση της πυρίνης που έφερε τη M694V μετάλλαξη σε THP-1 κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή IL-1β που επάγεται μέσω της ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος.

Υπάρχουν στοιχεία που εμπλέκουν την IL-1β στην παθογένεια του FMF^{26, 51}, τα οποία στοιχεία περιλαμβάνουν την κλινική και εργαστηριακή εικόνα φλεγμονής που χαρακτηρίζει τον FMF⁷, δεδομένα από in vivo μελέτες σε ζωικά μοντέλα^{31, 43, 44}, και τη θεραπευτική απάντηση των ασθενών ανθεκτικών στην κολχικίνη σε αναστολείς της IL-1^{16, 48}. Παρά το γεγονός αυτό, υπάρχουν λίγα δεδομένα όσον αφορά στη ρύθμιση της παραγωγής της IL-1β σε ασθενείς με FMF.

Είναι γνωστό ότι το NLRP3 φλεγμονόσωμα έχει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της IL-1β από τα κύτταρα^{36, 40, 46}. Έτσι μελετήσαμε την έκφραση και τη λειτουργία του NLRP3 φλεγμονοσώματος σε ασθενείς με FMF.

Σε σχέση με τα υγιή άτομα οι ασθενείς με FMF είχαν μικρότερη έκφραση πρωτεϊνών του NLRP3 φλεγμονοσώματος και της ενεργοποιημένης κασπάσης-1 τόσο στη βασική τους έκφραση όσο και μετά από ενεργοποίηση με LPS/ATP. Στους ανθρώπους η NLRP3 πρωτεΐνη εκφράζεται από μια ποικιλία κυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα⁵². Τα πειράματά μας έγιναν σε ολικό αίμα, ωστόσο οι ασθενείς με FMF είχαν παρόμοιο κυτταρικό τύπο με την ομάδα ελέγχου (παράρτημα, Πίνακας 2), γεγονός που μειώνει την πιθανότητα τα αποτελέσματά μας να επηρεάζονται από την υπέρ- ή υπο-έκφραση συγκεκριμένων υποομάδων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος⁵³.

Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με αυτά των Mitroulis et al.⁵⁴ οι οποίοι διαπίστωσαν μειωμένα επίπεδα NLRP3 mRNA σε πολυμορφοπύρρηνα ασυμπτωματικών ασθενών με FMF. Αυτό το εύρημα συσχετίστηκε με αναστολή του mTOR (mammalian target of rapamycin) και μειωμένη αυτοφαγία στον FMF^{54, 55}. Αυτό που έδειξαν ήταν ότι η αναστολή του mTOR με ραπαμυκίνη (αναστολέας mTOR), που προκαλεί μεταβολικό στρες, είχε σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση της NLRP3⁵⁴. Η μειωμένη βασική αυτοφαγία, η μειωμένη παραγωγή της NLRP3 και η μειωμένη παραγωγή της IL-1β μέσω ενεργοποίησης της NLRP3 ενδεχομένως αποτελούν μηχανισμούς προστασίας από τις κρίσεις του FMF⁵⁵, αν και χρειάζονται περισσότερα δεδομένα για να στηριχθεί αυτή η υπόθεση.

Επίσης σε συμφωνία με αυτά τα δεδομένα, έχουν βρεθεί μειωμένα μετάγραφα NLRP3 σε ισχαιμικό καρδιακό ιστό από ανθρώπους σε σχέση με μη ισχαιμικό καρδιακό ιστό⁵⁶.

Παρά ταύτα, λόγω απουσίας δεδομένων για την έκφραση της NLRP3 στα πειράματα διαμόλυνσης (transfection assays) θα χρειαστούν περαιτέρω μελέτες για να καθοριστεί η σχέση μεταξύ μειωμένης έκφρασης NLRP3 και IL-1β σε ασθενείς με FMF. Επίσης τα αποτελέσματά μας δεν αποκλείουν τον πιθανό παθοφυσιολογικό ρόλο της αυξημένης παραγωγής της IL-1β κατά τη διάρκεια των κρίσεων του FMF ή την πιθανή ύπαρξη υποομάδων ασθενών με FMF με διαφορετικές ικανότητες παραγωγής και απέκκρισης IL-1β. Εξάλλου είναι γνωστό ότι η NLRP3 έχει περίπλοκη ρύθμιση από ένα σημαντικό αριθμό μεταγραφικών και μη μηχανισμών⁵⁷, γεγονός που χρήζει περισσότερης έρευνας στα πλαίσια του FMF.

Η ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος απαιτεί 2 σήματα: το πρώτο προέρχεται από μικροβιακά ή ενδογενή σήματα που προκαλούν την έκφραση των pro-IL1b και NLRP3⁵⁸ και το δεύτερο ενεργοποιεί την NLRP3 μέσω παραγωγής μιτοχονδριακών ενεργών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species - ROS) ή αποσταθεροποίησης φαγοσωμάτων και κυτταρικής απόκρισης λυσοσωματικών καθεσινών^{46, 50}. Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση μόνο με LPS μπορεί να ενεργοποιήσει την NLRP3 σε μονοκύτταρα, δενδριτικά και άλλου τύπου κύτταρα.^{49, 59, 60} Ωστόσο, στα δικά μας ex vivo πειράματα σε ολικό αίμα παρατηρήσαμε αύξηση της παραγόμενης IL-1β μετά από ενεργοποίηση με LPS/ATP, ενώ η ενεργοποίηση

μόνο με LPS σε χαμηλή δόση προκάλεσε την απέκκριση μικρής ποσότητας IL-1β (εικόνα 6C). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι διαδοχική ενεργοποίηση με LPS/ATP έχει ως αποτέλεσμα την σημαντική ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος και την παραγωγή της IL-1 ακόμα και όταν χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις LPS. Βέβαια, προς το παρόν δεν έχει διευκρινιστεί τι προκαλεί την ενεργοποίηση του NLRP3/IL-1b στους ασθενείς με FMF, οπότε κάποιος θα μπορούσε να ισχυριστεί ότι η εξωγενής χορήγηση του LPS/ATP δρα ως 'artificial' ενεργοποιητής.

Τα ενδοκυττάρια επίπεδα των NLRP3, κασπάσης-1 και IL-1β δεν αυξήθηκαν σημαντικά μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί από την απελευθέρωση των στοιχείων του φλεγμονοσώματος στο υπερκείμενο, όπως έχει αναφερθεί⁴⁹.

Ένα σημαντικό εύρημα αυτής της μελέτης ήταν ότι η ενεργοποίηση του NLRP3 σε ολικό αίμα είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή και απέκκριση μικρότερης ποσότητας IL-1β στους ασθενείς με FMF σε σχέση με τα υγιή άτομα.

Η μικρότερη παραγωγή της IL-1β μέσω ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος μπορεί να οφείλεται, ως ένα βαθμό στην μικρότερη έκφραση της NLRP3 πρωτεΐνης στον FMF (Εικόνα 5). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της NLRP3 είναι περιοριστικός παράγοντας για την ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος από LPS/ATP⁵⁸.

Τα αποτελέσματα σε αυτή τη μελέτη διαφέρουν σε σχέση με αυτά των Chae et al.³¹ και των Omenetti et al.⁶² οι οποίοι έδειξαν αυξημένη παραγωγή IL-1β μετά από ενεργοποίηση με LPS σε μονοκύτταρα και μακροφάγα που προήλθαν από διαφοροποίηση μονοκυττάρων ασθενών με FMF. Οι διαφορετικές συνθήκες των πειραμάτων στις μελέτες ίσως είναι ο λόγος για τα διαφορετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, στα δικά μας πειράματα χρησιμοποιήσαμε ολικό αίμα ώστε να έχουμε καλύτερη απόδοση των *in vivo* συνθηκών⁴⁷, αντί να χρησιμοποιήσουμε υποπληθυσμό κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Επίσης, η ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος έγινε από εμάς σε δυο βήματα χρησιμοποιώντας και LPS και ATP, ενώ οι Omenetti et al.⁶² χρησιμοποίησαν μόνο LPS. Έπειτα, η συγκέντρωση του LPS που χρησιμοποιήσαμε για τη ενεργοποίηση των κυττάρων (250 pg/mL) ήταν πολύ μικρότερη από το 1 μg/mL που χρησιμοποιήθηκε στις άλλες δυο μελέτες. Η επιλογή να χρησιμοποιήσουμε μικρή δόση LPS στηρίχθηκε σε προκαταρκτικά αποτελέσματα δοσοεξαρτώμενης απάντησης και στην σκέψη ότι θα επέτρεπε την ανεύρεση μικρών διαφορών στην παραγωγή της IL-1β μεταξύ των ασθενών με FMF και των υγιών ατόμων. Τελευταία διαφορά ήταν ότι τόσο εμείς όσο και οι Chae et al.³¹ ανανεώσαμε το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας μετά την προσθήκη του LPS και η απεκκρινόμενη IL-1β μετρήθηκε στο νέο υπερκείμενο μετά από την προσθήκη του ATP. Εν αντιθέσει στη μελέτη των Omenetti et al.⁶² η απεκκρινόμενη IL-1β μετρήθηκε στο υπερκείμενο καλλιιεργειών μετά 18 ώρες επώαση με LPS. Αυτή η διαφορά στις μεθόδους θα μπορούσε να εξηγήσει την ελάχιστη αύξηση της παραγωγής της IL-1β

μετά από χρήση μόνο LPS και την μειωμένη παραγωγή της IL-1β στους ασθενείς σε σχέση με τα υγιή άτομα.

Η μειωμένη παραγωγή της IL-1β μέσω ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος στον FMF διαφέρει σε σχέση με τα CAPS, όπου gain-of-function μεταλλάξεις της NLRP3 έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή της IL-1β^{36, 63}. Όπως έχει ήδη ειπωθεί, η μικρότερη επαγωγή της παραγωγής της IL-1β στον FMF θα μπορούσε να εξηγηθεί από το υπερβολικό κυτταρικό στρες (μετά από κρίση ή χρόνια στρες) που έχει ως αποτέλεσμα την «εξάντληση» και τη μειωμένη έκφραση της NLRP3⁵⁴, ή και από την παρουσία άλλων μηχανισμών αρνητικής ρύθμισης της φλεγμονής. Η διαφορά στην ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος μεταξύ του FMF και των CAPS μπορεί επίσης να είναι το αποτέλεσμα διαφορετικής μοριακής παθοφυσιολογίας, καθώς ο FMF σχετίζεται με μεταλλάξεις στο *MEFV* γονίδιο, ενώ τα CAPS σε μεταλλάξεις της NLRP3²⁶.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η νόσος Crohn's, μια φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η οποία μπορεί να προσβάλει οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, έχει συσχετιστεί με ένα πολυμορφισμό (rs6672995) σε μια ρυθμιστική περιοχή της NLRP3 που σχετίζεται με μειωμένη έκφραση της NLRP3 και μειωμένη παραγωγή της IL-1β⁶⁴.

Αν και οι μεταλλάξεις του *MEFV* γονιδίου παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του FMF, δεν είναι διευκρινισμένο πώς η πυρίνη χωρίς μεταλλάξεις και η μεταλλαγμένη πυρίνη αλληλεπιδρούν με το NLRP3 φλεγμονόσωμα για την ρύθμιση της παραγωγής της IL-1β. Γεγονός που περιπλέκει περισσότερο το ρόλο της πυρίνης στον FMF είναι τα δεδομένα που υπάρχουν και τα οποία, ανάλογα με τα πειραματικά μοντέλα, αποδίδουν στην πυρίνη τόσο αντιφλεγμονώδεις δράσεις (μέσω άμεσης σύνδεσης και αναστολής του NLRP3 φλεγμονοσώματος^{38, 41, 43}) όσο και προφλεγμονώδεις δράσεις (μέσω δημιουργία φλεγμονοσώματος ανεξάρτητου από την NLRP3^{31, 37, 42}).

Λαμβάνοντας υπόψιν αυτά τα δεδομένα, τα δικά μας ex vivo πειράματα έδειξαν μειωμένη επαγωγή της απέκκρισης της IL-1β μετά από ενεργοποίηση με LPS/ATP από τα κύτταρα ασθενών με FMF ανεξάρτητα από τις μεταλλάξεις του *MEFV* γονιδίου που έφεραν. Είναι σημαντικό να τονίσουμε εδώ ότι η γονοτυπική ανάλυση των ασθενών που μετείχαν στην μελέτη έκφρασης και ενεργοποίησης του NLRP3 φλεγμονοσώματος είναι αντιπροσωπευτική της ομάδας που παρακολουθείται στο κέντρο μας αλλά συμφωνεί και με δεδομένα από την υπόλοιπη Ελλάδα⁶⁵⁻⁶⁷ και από άλλες εθνικότητες⁶⁸. Περίπου 1/3 των ασθενών με FMF φέρουν δύο μεταλλάξεις του *MEFV* γονιδίου (διπλοί ετεροζυγώτες ή ομοζυγώτες), 47% φέρουν μια μετάλλαξη του *MEFV* γονιδίου (ετεροζυγώτες) και στους υπόλοιπους 20% δεν ανιχνεύεται καμία μετάλλαξη του *MEFV* γονιδίου²⁴. Η πιο συχνή μετάλλαξη είναι η M694V, και ακολουθούν οι E148Q και M694I μεταλλάξεις ακόμα και σε ασθενείς με σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις. Λαμβάνοντας αυτό υπόψιν, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης

πιθανώς δεν μπορούν να γενικευτούν και σε άλλους πληθυσμούς με διαφορετική συχνότητα των μεταλλάξεων του *MEFV* γονιδίου.

Σε συμφωνία με τα *ex vivo* δεδομένα, η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης (M694V) πυρίνης σε THP-1 κύτταρα μείωσε την επαγόμενη από LPS/ATP παραγωγή της IL-1β σε σχέση με την υπερέκφραση μη μεταλλαγμένης πυρίνης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η υπερέκφραση της M694V - πυρίνης σχετίστηκε με αυξημένα βασικά επίπεδα της IL-1β, ακόμα και πριν από την διέγερση των κυττάρων. Αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η μειωμένη απάντηση των κυττάρων με την μεταλλαγμένη πυρίνη μετά από ενεργοποίηση με LPS/ATP μπορεί να σχετίζεται με εξάντληση της ικανότητας των κυττάρων αυτών να εκκρίνουν IL-1β, τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι η πυρίνη που φέρει μεταλλάξεις σχετιζόμενες με τον FMF έχει περισσότερες προφλεγμονώδεις ιδιότητες σε βασικές συνθήκες, ενώ σχετίζεται με μείωση της παραγωγής της IL-1β που επάγεται μέσω του NLRP3 φλεγμονοσώματος. Κατά πόσο αυτή η επίδραση οφείλεται στην δυσλειτουργία του φλεγμονοσώματος, στην επηρεασμένη σύνδεση της πυρίνης στο NLRP3 φλεγμονόσωμα, ή και στη μειωμένη έκφραση της NLRP3 είναι ερωτήματα που χρειάζονται περαιτέρω μελέτη.

2.5 ΣΥΜΕΡΑΣΜΑ

Στην ομάδα παρακολούθησης των ασθενών με FMF, η πιο συχνά ανιχνεύσιμη μετάλλαξη είναι η M694V (51,3%). Σε 19,9% των ασθενών με τυπική κλινική εικόνα FMF δεν ανιχνεύθηκε καμία μετάλλαξη. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην κλινική εικόνα και την απάντηση στη θεραπεία σε ασθενείς με 1,2 ή καμία μετάλλαξη. Αμυλοείδωση εμφάνισαν 2 ασθενείς ομοζυγώτες για την M694V. 51,8% των ασθενών εμφάνισαν το πρώτο επεισόδιο σε ηλικία < 20 ετών, με τους ασθενείς αυτούς να έχουν περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν πλευρίτιδα.

Τα κύτταρα από τους ασθενείς με FMF εμφάνισαν μειωμένη έκφραση της NLRP3 πρωτεΐνης και μείωση της παραγωγής της IL-1β επαγόμενης από το NLRP3 φλεγμονόσωμα. Το γεγονός αυτό συνδέεται με τη μεταλλαγμένη πυρίνη είτε μέσω άμεσης αλληλεπίδρασής της με το NLRP3 φλεγμονόσωμα είτε μέσω επαγωγής μεταβολικού κυτταρικού στρες που έχει ως αποτέλεσμα τα μειωμένα επίπεδα της NLRP3. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για να διευκρινιστεί αν η μειωμένη ενεργοποίηση του NLRP3 φλεγμονοσώματος στους ασθενείς με FMF αντιπροσωπεύει ένα μηχανισμό ελέγχου της φλεγμονής στον FMF ή σχετίζεται με την παθογένεσή του μέσω παθολογικών αντιμικροβιακών απαντήσεων.

3. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Γεώργιο Γουλιέλμο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κο Πρόδρομο Σιδηρόπουλο και τον Καθηγητή κο Δημήτριο Μπούμπα, για την υποστήριξη και καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της διατριβής μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω δύο ανθρώπους που δεν βρίσκονται στη ζωή, τον Ηρακλή Κρητικό και την Ελένη Πετράκη.

Ο Ηρακλής Κρητικός ήταν ένας από τους ανθρώπους που αποτέλεσε έμπνευση τόσο ως γιατρός, όσο και ως δάσκαλος και άνθρωπος και ήταν η αιτία για να ασχοληθώ με τον Οικογενή Μεσογειακό Πυρετό, όταν μου πρότεινε να οργανώσω και να αναλάβω το ιατρείο αυτοφλεγμονωδών νοσημάτων στο ΠΑΓΝΗ. Μαζί με τον κο Μπούμπα μου πρότειναν το θέμα της διατριβής μου και βοήθησαν στην αποπεράτωσή της.

Η Ελένη Πετράκη ήταν από τους πιο σημαντικούς συνεργάτες στην έναρξη αυτής της εργασίας, αφού ήταν υπεύθυνη για το πειραματικό κομμάτι, οργάνωσε και έκανε τα αρχικά πειράματα.

Επίσης δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την κα Χριστιάννα Χουλάκη και την κα Δέσποινα Βάσσου για την αμέριστη βοήθειά τους στην ολοκλήρωση των πειραμάτων.

Ευχαριστώ τον κο Γεώργιο Μπερτσιά για την συμβολή του στην δημοσίευση.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της Ρευματολογικής Κλινικής του ΠΑΓΝΗ για τη συνεργασία τους όλο αυτό τον καιρό.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stojanov S, Kastner DL. Familial autoinflammatory diseases: genetics, pathogenesis and treatment. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:586-99.
2. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 1999;97:133-44.
3. Kastner DL. Hereditary periodic fever syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:74-81.
4. Kastner DL, Aksentijevich I, Goldbach-Mansky R. Autoinflammatory disease reloaded: a clinical perspective. *Cell* 2010;140:784-90.
5. Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *N Engl J Med* 2001;345:1748-57.
6. Lidar M, Kedem R, Mor A, Levartovsky D, Langevitz P, Livneh A. Arthritis as the sole episodic manifestation of familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 2005;32:859-62.
7. Shohat M, Halpern GJ. Familial Mediterranean fever--a review. *Genet Med* 2011;13:487-98.
8. Lidar M, Livneh A. Familial Mediterranean fever: clinical, molecular and management advancements. *Neth J Med* 2007;65:318-24.
9. Lega JC, Khouatra C, Cottin V, Cordier JF. Isolated recurrent pleuritis revealing familial mediterranean Fever in adulthood. *Respiration* 2010;79:508-10.
10. Tunca M, Akar S, Onen F, et al. Familial Mediterranean fever (FMF) in Turkey: results of a nationwide multicenter study. *Medicine (Baltimore)* 2005;84:1-11.
11. Melikoglu M, Ozdogan H, Korkmaz C, et al. A survey of phenotype II in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2000;59:910-3.
12. Kallinich T, Haffner D, Niehues T, et al. Colchicine use in children and adolescents with familial Mediterranean fever: literature review and consensus statement. *Pediatrics* 2007;119:e474-83.
13. Cronstein BN, Molad Y, Reibman J, Balakhane E, Levin RI, Weissmann G. Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils. *J Clin Invest* 1995;96:994-1002.
14. Metyas S, Arkfeld DG, Forrester DM, Ehresmann GR. Infliximab treatment of Familial Mediterranean fever and its effect on secondary AA amyloidosis. *J Clin Rheumatol* 2004;10:134-7.
15. Seyahi E, Ozdogan H, Celik S, Ugurlu S, Yazici H. Treatment options in colchicine resistant familial Mediterranean fever patients: thalidomide and etanercept as adjunctive agents. *Clin Exp Rheumatol* 2006;24:S99-103.
16. Alpay N, Sumnu A, Caliskan Y, Yazici H, Turkmen A, Gul A. Efficacy of anakinra treatment in a patient with colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int* 2012;32:3277-9.
17. Gul A, Ozdogan H, Erer B, et al. Efficacy and safety of canakinumab in adolescents and adults with colchicine-resistant familial Mediterranean fever. *Arthritis Res Ther* 2015;17:243.
18. Pras E, Aksentijevich I, Gruberg L, et al. Mapping of a gene causing familial Mediterranean fever to the short arm of chromosome 16. *N Engl J Med* 1992;326:1509-13.
19. Centola M, Wood G, Frucht DM, et al. The gene for familial Mediterranean fever, MEFV, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000;95:3223-31.
20. Sarrauste de Menthiere 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.

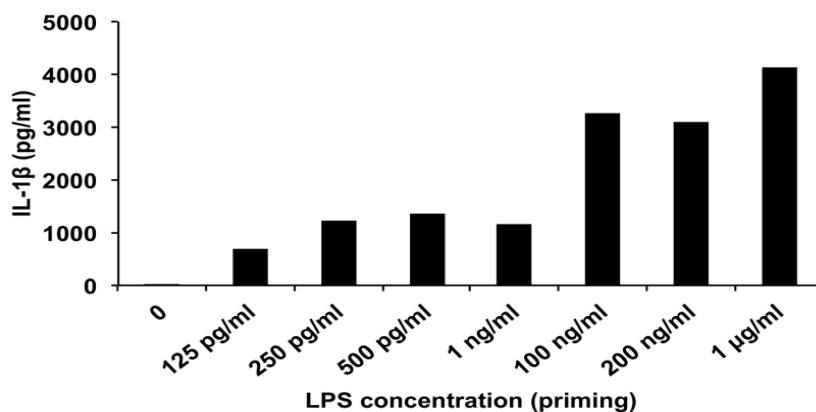
21. Marek-Yagel D, Berkun Y, Padeh S, et al. Clinical disease among patients heterozygous for familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 2009;60:1862-6.
22. Ozturk C, Halicioglu O, Coker I, et al. Association of clinical and genetical features in FMF with focus on MEFV strip assay sensitivity in 452 children from western Anatolia, Turkey. *Clin Rheumatol* 2012;31:493-501.
23. Padeh S, Shinar Y, Pras E, et al. Clinical and diagnostic value of genetic testing in 216 Israeli children with Familial Mediterranean fever. *J Rheumatol* 2003;30:185-90.
24. Fragouli E, Eliopoulos E, Petraki E, et al. Familial Mediterranean Fever in Crete: a genetic and structural biological approach in a population of 'intermediate risk'. *Clin Genet* 2008;73:152-9.
25. Booth DR, Gillmore JD, Lachmann HJ, et al. The genetic basis of autosomal dominant familial Mediterranean fever. *QJM* 2000;93:217-21.
26. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annu Rev Immunol* 2009;27:621-68.
27. Giancane G, Ter Haar NM, Wulffraat N, et al. Evidence-based recommendations for genetic diagnosis of familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2015;74:635-41.
28. Livneh A, Langevitz P, Zemer D, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum* 1997;40:1879-85.
29. Al-Haggar MS, Yahia S, Abdel-Hady D, Al-Saied A, Al-Kenawy R, Abo-El-Kasem R. Phenotype-genotype updates from familial Mediterranean fever database registry of Mansoura University Children' Hospital, Mansoura, Egypt. *Indian J Hum Genet* 2014;20:43-50.
30. Dewalle M, Domingo C, Rozenbaum M, et al. Phenotype-genotype correlation in Jewish patients suffering from familial Mediterranean fever (FMF). *Eur J Hum Genet* 1998;6:95-7.
31. Chae JJ, Cho YH, Lee GS, et al. Gain-of-function Pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1beta activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity* 2011;34:755-68.
32. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140:821-32.
33. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54 Pt 1:1-13.
34. Martinon F, Glimcher LH. Gout: new insights into an old disease. *J Clin Invest* 2006;116:2073-5.
35. Sidiropoulos PI, Goulielmos G, Voloudakis GK, Petraki E, Boumpas DT. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1382-9.
36. Park H, Bourla AB, Kastner DL, Colbert RA, Siegel RM. Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2012;12:570-80.
37. Yu JW, Wu J, Zhang Z, et al. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ* 2006;13:236-49.
38. Chae JJ, Wood G, Masters SL, et al. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1beta production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9982-7.
39. Martinon F, Hofmann K, Tschopp J. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol* 2001;11:R118-20.
40. Goulielmos GN, Fragouli E, Aksentijevich I, Sidiropoulos P, Boumpas DT, Eliopoulos E. Mutational analysis of the PRYSPRY domain of pyrin and implications for familial mediterranean fever (FMF). *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:1326-32.

41. Papin S, Cuenin S, Agostini L, et al. The SPRY domain of Pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1beta processing. *Cell Death Differ* 2007;14:1457-66.
42. Seshadri S, Duncan MD, Hart JM, Gavrillin MA, Wewers MD. Pyrin levels in human monocytes and monocyte-derived macrophages regulate IL-1beta processing and release. *J Immunol* 2007;179:1274-81.
43. Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell* 2003;11:591-604.
44. Hesker PR, Nguyen M, Kovarova M, Ting JP, Koller BH. Genetic loss of murine pyrin, the Familial Mediterranean Fever protein, increases interleukin-1beta levels. *PLoS One* 2012;7:e51105.
45. Balci-Peynircioglu B, Waite AL, Hu C, et al. Pyrin, product of the MEFV locus, interacts with the proapoptotic protein, Siva. *J Cell Physiol* 2008;216:595-602.
46. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 2013;13:397-411.
47. Yang B, Pham TH, Goldbach-Mansky R, Gadina M. Accurate and simple measurement of the pro-inflammatory cytokine IL-1beta using a whole blood stimulation assay. *J Vis Exp* 2011.
48. Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis* 2012;3:e338.
49. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009;113:2324-35.
50. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440:228-32.
51. Meinzer U, Quartier P, Alexandra JF, Hentgen V, Retornaz F, Kone-Paut I. Interleukin-1 targeting drugs in familial Mediterranean fever: a case series and a review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* 2011;41:265-71.
52. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* 2007;55:443-52.
53. Ahsen A, Ulu MS, Yuksel S, et al. As a new inflammatory marker for familial Mediterranean fever: neutrophil-to-lymphocyte ratio. *Inflammation* 2013;36:1357-62.
54. Mitroulis I, Kourtzelis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Ritis K. Evidence for the involvement of mTOR inhibition and basal autophagy in familial Mediterranean fever phenotype. *Hum Immunol* 2011;72:135-8.
55. Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, et al. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1beta-mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann Rheum Dis* 2016;75:269-77.
56. Hermansson C, Lundqvist A, Wasslavik C, Palmqvist L, Jeppsson A, Hulten LM. Reduced expression of NLRP3 and MEFV in human ischemic heart tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;430:425-8.
57. Chen S, Sun B. Negative regulation of NLRP3 inflammasome signaling. *Protein Cell* 2013;4:251-8.
58. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009;183:787-91.
59. He Y, Franchi L, Nunez G. TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1beta production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *J Immunol* 2013;190:334-9.

60. Kahlenberg JM, Dubyak GR. Differing caspase-1 activation states in monocyte versus macrophage models of IL-1beta processing and release. *J Leukoc Biol* 2004;76:676-84.
61. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* 2012;287:36617-22.
62. Omenetti A, Carta S, Delfino L, Martini A, Gattorno M, Rubartelli A. Increased NLRP3-dependent interleukin 1beta secretion in patients with familial Mediterranean fever: correlation with MEFV genotype. *Ann Rheum Dis* 2014;73:462-9.
63. Aksentijevich I, Kastner DL. Genetics of monogenic autoinflammatory diseases: past successes, future challenges. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:469-78.
64. Villani AC, Lemire M, Fortin G, et al. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2009;41:71-6.
65. Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, et al. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clin Genet* 2007;71:458-67.
66. Konstantopoulos K, Kanta A, Deltas C, et al. Familial Mediterranean fever associated pyrin mutations in Greece. *Ann Rheum Dis* 2003;62:479-81.
67. Konstantopoulos K, Kanta A, Lilakos K, Papanikolaou G, Meletis I. Familial Mediterranean fever and E148Q pyrin gene mutation in Greece. *Int J Hematol* 2005;81:26-8.
68. Kishida D, Nakamura A, Yazaki M, Tsuchiya-Suzuki A, Matsuda M, Ikeda S. Genotype-phenotype correlation in Japanese patients with familial Mediterranean fever: differences in genotype and clinical features between Japanese and Mediterranean populations. *Arthritis Res Ther* 2014;16:439.
69. Repa et al Familial Mediterranean Fever (FMF): A Single Center Clinical-Genetic Study *Annals of the Rheumatic Diseases* Jun 2014
70. Repa et al Clinical Characteristics and NLRP3 Expression and Function in Cretan Patients with Familial Mediterranean Fever (FMF): A Single Center Experience *Clin Exp Rheumatol* 2014 Vol.32, N°4 - Suppl.83
71. Yasar Bilge NS et al Comparison of early versus late onset familial Mediterranean fever. *Int J Rheum Dis.* 2018 Apr;21(4):880-884
72. Mukhin NA et al Predictors of AA amyloidosis in familial Mediterranean fever. *Rheumatol Int.* 2015

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

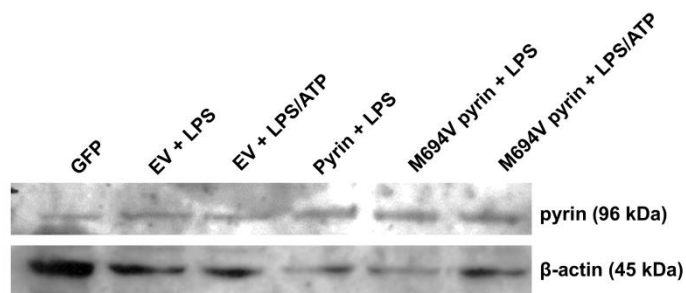
Εικόνα 1.



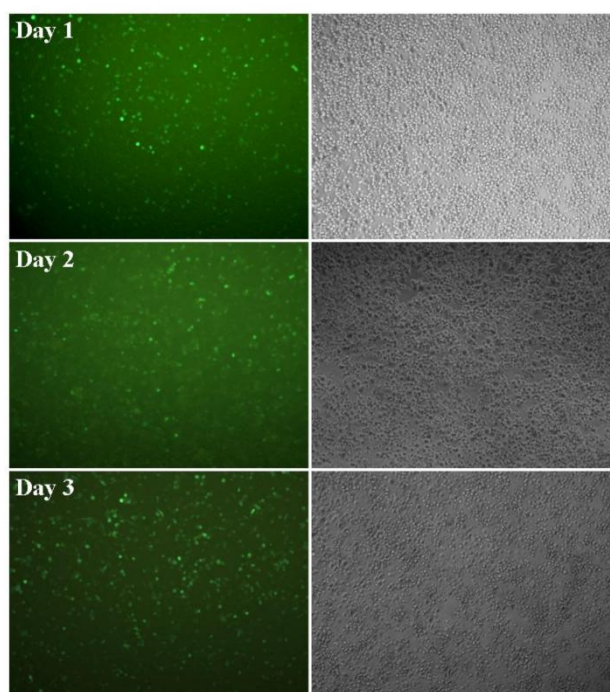
Εικόνα 1. Τα WBCs καλλιεργήθηκαν ($0.5 \times 10^6/\text{mL}$) στους 37°C σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων LPS. Μετά 2 ώρες, αφαιρέθηκε το culture supernates, και προστέθηκε νέο υπόστρωμα εμπλουτισμένο με ATP (5 mM) για ακόμα 20 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθεί η NRLP3. Η παραγόμενη IL-1β ποσοτικοποιήθηκε με ELISA όπως περιγράφεται στις Μεθόδους.

Εικόνα 2

A



B



Εικόνα 2.

(A) Τα THP-1 κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με άδεια οχήματα (EV) ή με πυρίνη χωρίς μεταλλάξεις και πυρίνη με τη M694V μετάλλαξη όπως περιγράφεται στη μέθοδο. Μετά τη λύση των κυττάρων έγινε ανοσοαποτύπωση στα κυτταρικά εκχυλίσματα για την πυρίνη (p96) και τη β -ακτίνη (p45).

(B) Θετική ομάδα ελέγχου με vector pmaxGFP, που κωδικοποιούν για πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της βιωσιμότητας THP-1 κυττάρων και την αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης των κυτταρικών καλλιεργειών (ημέρα 1-3).

Πίνακας 1

ID Ασθενούς	Αριθμός διαγνωστικών κριτηρίων του Tel Hashomer			MEFV
	Major	Minor	Supportive	
E16	2	2	3	M694V/wt
E6	1	2	5	wt/wt
E9	1	2	3	M694V/wt
E14	1	3	4	wt/wt
E7	2	3	5	E148Q/M694I
E2	1	1	4	M694V/wt
EM13	2	2	4	M694V/wt
M15	0	3	5	M694V/wt
M16	1	1	5	M694V/wt
E4	2	1	4	E148Q/M694I
62C	1	3	6	E148Q/M694V
62D	0	3	4	E148Q/M694V
E1	0	3	3	E148Q/wt
M14	1	3	6	E148Q/M694V
E5	1	3	6	M694V/V726A
E8	2	2	4	M694V/wt
M10	2	2	1	wt/wt
E3	1	1	4	wt/wt
E10	2	2	4	E148Q/M694I
E15	2	3	4	E148Q/M694I

Πίνακας 2. Τύπος κυττάρων ασθενών με FMF ($n = 20$) και υγιούς πληθυσμού ($n = 21$)

	Ολικά WBCs	Ουδετερόφιλα	Λεμφοκύτταρα	Μονοκύτταρα
	(per μ L)	(per μ L)	(per μ L)	(per μ L)
FMF ασθενείς	6335 \pm 461	3976 \pm 317	2253 \pm 155	607 \pm 67
Υγιής πληθυσμός [#]	6272 \pm 241	3428 \pm 193	2350 \pm 81	494 \pm 37

[#] $p > 0.05$ για όλες τις τιμές

Πίνακας 3: Ταξινόμηση αντιφλεγμονωδών νοσημάτων

Current name of the disorder and additional names	Proposed nomenclature
CAPS—Cryopyrin-associated periodic fever syndrome²²	<i>NLRP3</i>-associated autoinflammatory disease (<i>NLRP3</i>-AID)
CINCA—Chronic infantile neurological, cutaneous and articular syndrome, ¹⁹	Severe
NOMID—Neonatal onset multisystem inflammatory disease	
MWS—Muckle-Wells syndrome ²⁰	Moderate
FCAS—Familial cold autoinflammatory syndrome ²¹	Mild
<i>CARD14</i>-associated disease	<i>CARD14</i>-associated psoriasis
PRP—Familial pityriasis rubra pilaris ³²	
CAMPS— <i>CARD14</i> -mediated pustular psoriasis ³³	
Cherubism⁴⁵	<i>SH3BP2</i> deficiency with multilocular cystic disease of the mandibles (SDCM)
Familial multilocular cystic disease of the jaws ⁴⁶	
Cherubism—familial fibrous dysplasia of the jaws ⁴⁷	
CGCL—Central giant cell lesion ⁴⁸	
CRMO—Chronic recurrent multifocal osteomyelitis³¹	Chronic non-bacterial osteomyelitis (CNO)—(when the gene is known it should be added)
Majeed syndrome, ²⁸ congenital dyserythropoietic anaemia and chronic recurrent multifocal osteomyelitis ⁵⁰	
<i>LIPIN2</i>-associated disease²⁹	<i>LIPIN2</i>-CNO
DIRA—Deficiency of the IL-1 receptor antagonist²⁶	(No change)
DITRA—Deficiency of the IL-36 receptor antagonist²⁷	(No change)
FCAS2—Familial cold autoinflammatory syndrome 2³⁶	<i>NLRP12</i>-associated autoinflammatory disease (<i>NLRP12</i>-AID)
Guadeloupe fever, NALP12 periodic fever syndrome ³⁶	
	Pyrin-associated autoinflammatory disease (PAAD)
FMF—Familial Mediterranean fever⁹	(No change)
Benign paroxysmal peritonitis, ⁶ periodic disease, ⁷ Armenian disease, periodic disease 'Maladie periodique', ⁸ FMF, ⁹ recurrent polyserositis, ¹⁰ familial paroxysmal polyserositis ¹¹	
PAAND—Pyrin-associated autoinflammation with neutrophilic dermatosis¹²	(No change)
JMP	Proteasome-associated autoinflammatory syndrome (PRAAS)
Joint contractures, muscle atrophy, microcytic anaemia and panniculitis-induced lipodystrophy,⁴⁰	<i>PSMB8</i>-PRAAS, <i>PSMB4/PSMB9</i>-PRAAS, <i>PSMB4/PSMB9</i>-PRAAS, <i>PSMA3/PSMB8</i>-PRAAS
Chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature (CANDLE) syndrome, ³⁹ Nakajo-Nishimura syndrome (NNS) ⁴¹	
Mevalonate kinase disease (deficiency)^{15,16}	Mevalonate kinase deficiency (MKD)
HIDS—Hyper IgD syndrome¹⁷	Mild
Mevalonic aciduria	Severe
Dutch type periodic fever ¹⁸	(Add porokeratosis or retinitis pigmentosa when present)
IL-10 deficiency	IL-10 deficiency-associated inflammatory bowel disease
IBD—IL-10R-associated very early ³⁴	
Infantile colitis ³⁵	
<i>NOD2</i> <i>CARD15</i>-associated disease	<i>NOD2</i>-associated granulomatous disease (Optional: add Blau syndrome or IBD according to the main clinical features)
Blau syndrome, ²³ early onset sarcoidosis, ²⁴ familial Crohn's disease ²⁵	
PAPA/Pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum and acne syndrome^{37,38}	<i>PSTPIP1</i>-associated arthritis, pyoderma gangrenosum and acne (PAPA)
PFAPA—Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis	(No change)
Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis or periodic fever aphthous pharyngitis and cervical adenopathy ⁴³	
Marshall's syndrome ⁴⁴	
Schnitzler syndrome⁴²	(No change)
PUPAP—Periodic fever with urticaria and paraprotein	
TRAPS—TNF receptor-associated periodic fever syndrome³	(No change)
Familial Hibernian fever ¹³	
Familial autosomal-dominant periodic fever ¹⁴	

Ben-Chetrit E, et al. *Ann Rheum Dis* 2018



Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Dysregulated production of interleukin-1 β upon activation of the NLRP3 inflammasome in patients with familial Mediterranean fever

Argyro Repa^{a,b}, George K. Bertias^{a,b}, Eleni Petraki^{c,1}, Christianna Choulaki^{a,b}, Despoina Vassou^d, Konstantinos Kambas^e, Dimitrios T. Boumpas^{b,f,g}, George Goulielmos^c, Prodromos Sidiropoulos^{a,b,*}

^aRheumatology, Clinical Immunology and Allergy, Faculty of Medicine, University of Crete, 71003 Iraklion, Greece

^bDivision of Infections and Immunity, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH, Nikolaou Plastira 100, 70013 Iraklion, Greece

^cLaboratory of Molecular Medicine and Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Crete, 71003 Iraklion, Greece

^dDivision of Nano-biotechnology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH, Nikolaou Plastira 100, 70013 Iraklion, Greece

^eLaboratory of Molecular Hematology, Democritus University of Thrace, 68100 Alexandroupolis, Greece

^fThird Department of Medicine, Rheumatology-Clinical Immunology Unit, "Sotiria" General Hospital of Thoracic Diseases, 152 Mesogion Avenue, 11527 Athens, Greece

^gBiomedical Research Foundation of the Academy of Athens, 4 Soranou Ephessiou, 115 27 Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 August 2014

Revised 8 March 2015

Accepted 2 June 2015

Available online xxx

Keywords:

Innate immunity

Inflammasome

Cytokine

Autoinflammatory disorders

ABSTRACT

Familial Mediterranean fever (FMF) is caused by mutations in pyrin, a protein expressed in innate immune cells that interacts with caspase-1 and other inflammasome components to regulate interleukin (IL)-1 β maturation. Since NLRP3 inflammasome represents major source of IL-1 β , we studied its protein expression and function in FMF. We isolated peripheral white blood cells (WBCs) from 20 symptoms-free FMF patients and 21 healthy individuals. Intracellular protein expression of NLRP3, caspase-1, IL-1 β at baseline and after LPS/ATP sequential treatment for NLRP3 activation was assessed by immunoblotting. Secreted IL-1 β was quantified by ELISA. THP-1 cells were transfected with wild-type or mutant pyrin and IL-1 β secretion was measured. FMF WBCs exhibited lower NLRP3 and active caspase-1 protein expression compared to healthy individuals, and LPS/ATP treatment resulted in significantly lower intracellular IL-1 β levels in FMF patients. Likewise, LPS/ATP induced caspase-1-dependent IL-1 β release at significantly lower amounts in the FMF group (1182 \pm 192 versus 2134 \pm 245 pg/mL in controls, p = 0.004). Consistently, THP-1 cells transfected with FMF-associated M694V mutant pyrin displayed lower LPS/ATP-induced IL-1 β compared with wild-type pyrin-transfected cells. FMF WBCs demonstrate reduced NLRP3-mediated IL-1 β production. Additional studies are needed to define whether this finding represents a compensatory mechanism to control inflammation or is directly linked to disease pathogenesis.

© 2015 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

FMF² is the prototype hereditary autoinflammatory disorder characterized by recurrent self-limited episodes of fever, articular

and serosal inflammation, and accumulation of polymorphonuclear cells into affected tissues [1]. The disease is caused by mutations in the *MEFV* gene, which encodes for pyrin, a protein predominantly expressed in innate immune cells [2]. Although it is considered autosomal recessive disease, a sizeable number of patients have a single mutated *MEFV* allele, thus raising the possibility for dominant modes of inheritance [3]. FMF is prevalent among populations of the eastern Mediterranean region with estimated carrier frequency of mutant alleles as high as 1:3–1:5 (reviewed in [4,5]). We have previously reported mutant *MEFV* carrier frequency of 1:17 in the Cretan population [6], thus placing it into the intermediate-risk population.

Although the inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) has been implicated in the pathophysiology of FMF [7,8], there is scarce evidence of dysregulated IL-1 β production by FMF patients. IL-1 β exists in the cytosol in precursor (pro-IL-1 β) 33-kD form and

* Corresponding author at: Rheumatology, Clinical Immunology and Allergy, Faculty of Medicine, University of Crete, 71003 Iraklion, Greece. Tel./fax: +30 2810 39 2024.

E-mail addresses: arropa2002@yahoo.gr (A. Repa), gbert@med.uoc.gr (G.K. Bertias), choulaki@med.uoc.gr (C. Choulaki), dvassou@imbb.forth.gr (D. Vassou), kkampas@hotmail.com (K. Kambas), boumpasd@med.uoc.gr (D.T. Boumpas), goulielmos@med.uoc.gr (G. Goulielmos), sidiropp@med.uoc.gr (P. Sidiropoulos).

¹ Deceased.

² FMF, Familial Mediterranean fever; NLR, NOD-like receptor; CAPS, cryopyrin-associated periodic fever syndromes; WBC, white blood cell; FBS, fetal bovine serum.

is processed mainly by inflammasome-activated caspase-1 into the bioactive 17-kD form [9]. Inflammasomes are intracellular multi-protein complexes consisting of a NLR, such as the NLRP proteins, the adaptor protein ASC and pro-caspase-1 [9]. The NLRP3 inflammasome is the best characterized inflammasome for its capacity to produce IL-1 β in response to microbial and metabolic stimuli [10]. Mutations in *NLRP3* (cryopyrin, *CIAS1*) are linked to a group of autoinflammatory diseases collectively named CAPS [11].

The physiologic role of pyrin and how its mutations contribute to FMF inflammation remain elusive. Pyrin interacts with ASC, pro-caspase-1 and other inflammasome components, including NLRP3, to regulate IL-1 β maturation [12–16]. Both pro- and anti-inflammatory functions have been suggested for pyrin and the effects of FMF-associated mutants remain controversial as well. In HEK-293T cells expressing ASC and pro-caspase-1, over-expression of wild-type pyrin enhanced caspase-1 activation and IL-1 β production but this effect was not augmented by mutated pyrin [15,16]. In support of a pro-inflammatory role of pyrin, peripheral blood monocytes had increased pyrin expression and secreted more IL-1 β in response to LPS compared to monocyte-derived macrophages [15]. On the other hand, pyrin-deficient mice were hypersensitive to LPS administration [17] and macrophages from these mice exhibited enhanced IL-1 β production [17,18]; these results favor an anti-inflammatory role of pyrin. *In vitro* studies have also suggested that the interaction of the B30.2 domain of pyrin with ASC, caspase-1 and NLRP3 inhibits IL-1 β maturation [13,14,17]; this effect may be attenuated with the mutant forms of pyrin [13,17]. More recently, Chae et al. [7] showed that knock-in mice homozygous for murine pyrin fused to the human B30.2 domain containing FMF-associated mutations exhibited spontaneous FMF-like inflammation. Knock-in macrophages had constitutively activated caspase-1 and secreted IL-1 β in response to TLR ligands alone, independent of NLRP3 [7]. Together, the aforementioned results suggest that, depending on the inflammatory context, pyrin and its mutant forms may regulate IL-1 β production through both NLRP3-dependent and independent pathways [7].

In this context, there is lack of evidence regarding the expression of NLRP3 inflammasome and NLRP3-mediated IL-1 β production in patients with FMF. We therefore studied the protein expression and function of NLRP3 inflammasome in WBCs from FMF patients and healthy individuals. Our results demonstrate reduced IL-1 β production following NLRP3 activation in FMF, corresponding to reduced amounts of intracellular NLRP3 protein. Consistent with this, THP-1 monocytic cells transfected with mutant FMF-associated pyrin displayed reduced IL-1 β production in response to NLRP3 activation.

2. Materials and methods

2.1. Patients and controls

The patients enrolled in this study ($n=20$) are part of the University of Crete FMF cohort, which includes more than 100 well-characterized patients who are followed-up at the Department of Rheumatology, University Hospital of Heraklion [6,19]. All patients were diagnosed according to the Tel Hashomer diagnostic criteria, requiring the presence of at least 1 of 4 major criteria, 2 of 5 minor criteria, or 1 minor criterion plus 5 of all 10 supportive criteria for definite FMF diagnosis [6,20], and their clinical and genotype characteristics are shown in Table 1. Genetic analysis with the ViennaLab FMF Strip^{Assay} for 12 common *MEFV* mutations (E148Q, P369S, F479L, M680I [G > C, G > A], I692 del, M694V, M694I, K695R, V726A, A744S, R761H) could confirm clinical diagnosis for a single patient who had the

Table 1

Demographic and clinical characteristics of the FMF patients ($n=20$) included in the study.^a

Gender (female)	12 (60%)
Age (years)	
First attack	24 \pm 3
At present	39 \pm 4
Clinical manifestations (during attack)	
Fever	16 (80%)
Abdominal pain	16 (80%)
Pleurisy	7 (35%)
Pericarditis	2 (10%)
Arthritis	4 (20%)
Rash	2 (10%)
History of abdominal surgery	7 (35%)
Duration of attack (days)	2.6 \pm 0.3
Frequency of attacks (per year)	18 \pm 4
Laboratory tests (at the time of sampling)	
White blood cell count (per μ L)	6335 \pm 461
Erythrocyte sedimentation rate (mm/h)	19 \pm 4
C-reactive protein (mg/dL)	0.83 \pm 0.40
Serum creatinine (mg/dL)	1.0 \pm 0.1
Proteinuria (mg/24-h)	105 \pm 20
Colchicine treatment	16 (80%)
MEFV genotype	
E148Q/M694I	4 (20%)
E148Q/wild-type	1 (5%)
M694V/E148Q	3 (15%)
M694V/V726A	1 (5%)
M694V/wild-type	7 (35%)
No identified mutation	4 (20%)

^a Data are expressed as N (%) or mean \pm SEM.

M694V/V726A genotype. Seven patients were compound heterozygous for the M694V, M694I, E148Q mutations, eight patients were heterozygous for the M694V or the E148Q mutation, and the remaining four patients had no identified mutations, yet they fulfilled the diagnostic criteria for FMF (Supplementary Table 1). Disease activity was assessed based on clinical features and laboratory tests (including erythrocyte sedimentation rate and serum C-reactive protein levels), and all patients were studied in a symptoms-free period. Twenty-one age and gender-matched healthy individuals were included. The study was in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Heraklion, University of Crete School of Medicine, and all participants gave informed consent.

2.2. Ex vivo activation of NLRP3 inflammasome in WBCs

Heparin anti-coagulated whole blood was collected and immediately processed after red blood cells lysis in ammonium persulfate buffer. Cell viability assessed by trypan blue staining was >90% and did not differ between patients and healthy individuals. To assess the function of NLRP3 inflammasome, WBCs were first cultured (0.5×10^6 /mL) at 37 °C (5% CO₂) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS in absence or presence of TLR4-ligand (LPS, Calbiochem) (priming phase). We used suboptimal concentration of LPS (250 pg/mL) based on initial dose-response experiments (Supplementary Fig. 1) and in order to reduce the possibility that small differences in IL-1 β production go undetected due to more potent LPS treatment. After 2 h, cultures were washed, and fresh medium was added in absence or presence of ATP (5 mM, Sigma) for another 20 min to activate NLRP3. Caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-CHO (10 μ M, Calbiochem) was added 15 min prior to ATP pulse and for 10 min to determine caspase-1 dependency of IL-1 β production.

2.3. Western blot analysis

Intracellular protein expression of NLRP3, caspase-1, and IL-1 β was assessed by immunoblotting in lysates from freshly isolated WBCs and also from WBCs cultured in medium alone or in presence of LPS/ATP as described above. Cells were lysed with 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton-X 100 in presence of complete mini EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Protein concentration was determined by the Bradford method using the Bio-Rad protein assay kit (Hercules, CA). Lysates were subjected to SDS-PAGE using 10–15% polyacrylamide gels, and were subsequently transferred to 0.2 μ m nitrocellulose membrane. The membrane was blocked for 1 h at room temperature followed by incubation overnight at 4 °C with antibodies against human NALP3 (Alexis Biochemicals #ALX-804-819), caspase-1 (Cell Signaling #2225), anti-IL-1 β (Cell Signaling #2022), pyrin (Santa-Cruz sc-30421), and β -actin. Afterwards, the blots were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. The blots were developed with electro-chemiluminescence. Protein densitometry was assessed using Image J and the intensity of the protein of interest was normalized to β -actin expression.

2.4. Cytokine detection

Concentrations of secreted IL-1 β in cell culture supernatants were quantified by ELISA (e-Bioscience Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!, #88-7010-88; sensitivity 4 pg/mL) according to the manufacturer's instructions.

2.5. THP-1 cell culture and plasmid constructs

THP-1 human monocytic cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, penicillin (5000 IU/mL)/streptomycin (5000 μ g/mL) (all from GIBCO), and 0.5 mM β -mercaptoethanol (Sigma) in 5% CO₂ at 37 °C. The pCMV-Tag3a plasmid vector (Invitrogen) was used for cloning full-length pyrin (both wild type and mutant form), thus generating the Pyrin(wt)/pCMV-Tag3A and Pyrin(M694V)/pCMV-Tag3A constructs, encoding for the c-myc-pyrin fusion protein (Dr. Deborah Gumucio, University of Michigan, Ann Arbor, MI) [21]. pCMV-Tag3A empty vector was used as a negative control.

2.6. Transfection studies and THP-1 stimulation for IL-1 β production

THP-1 cells were transiently transfected with constructs for wild-type and M694V mutated pyrin using the Amaxa nucleofection. Briefly, cells (2×10^6 per condition) were resuspended in 100 μ L Nucleofector kit V solution (Lonza group LTD., Switzerland). Cell suspension was mixed with 1.5 μ g total plasmid DNA and nucleofection was performed using the Y-001 program for human monocytes. Subsequently, cells were transferred into 12-well plates each containing 1.5 mL complete medium. Immunoblotting showed comparable pyrin protein expression between wild-type and mutated pyrin-transfected cells (Supplementary Fig. 2A). Positive control vector pmaxGFP, which encodes for the green fluorescent protein, was used to monitor cell viability and transfection efficiency (Supplementary Fig. 2B). Transfected cells were differentiated into macrophage-like cells by adding PMA 100 nM (Promega) in culture medium for 72 h. Afterwards, cells were transferred into fresh culture medium and were cultured in presence of LPS (100 ng/mL) for 2 h. ATP was added at 5 mM and cells were incubated for another 20 min. Culture supernatants were collected and assayed in duplicate for IL-1 β by ELISA, and cell pellets were lysed for total protein

quantification (Bio-Rad protein assay kit, Hercules, CA). IL-1 β concentration (pg/mL) normalized by 1 μ g cells protein lysate.

2.7. Statistical analysis

Results are shown as mean \pm standard error (SEM) or mean (95% confidence interval [95% CI]) difference between two groups. Differences between groups were analyzed by independent or paired samples *t*-test as appropriate, using the Statistical Package for Social Sciences software version 20.0 (SPSS, Inc.). *p*-value ≤ 0.05 (two-tailed) was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Reduced NLRP3 and active caspase-1 levels in freshly isolated WBCs of FMF patients

Since NLRP3 inflammasome is important for IL-1 β maturation by innate immunity cells [10], we examined the intracellular protein expression of the inflammasome components caspase-1 and NLRP3 and of IL-1 β in freshly isolated WBCs from FMF patients ($n = 8$) and healthy individuals ($n = 7$). Compared to isolation and culture of specific immune cell populations, the whole blood assay requires minimal sample manipulation, is less labor intensive, and provides an accurate method for estimating IL-1 β production and elucidating autoinflammatory disorders [22]. Differential blood cell count analysis showed comparable proportions of leukocyte subpopulations between FMF patients and controls (Supplementary Table 2). Immunoblotting analysis in WBC lysates revealed distinct 113–115 kDa and 64 kDa forms of NLRP3 (Fig. 1A) [23]. Normalized NLRP3 protein expression was significantly lower in FMF than control WBCs (mean difference [95% CI] for p113–115: $-798 [-1422$ to $-175]$, for p64: $-4713 [-8939$ to $-487]$ arbitrary units [AU]) (Fig. 1A and B). Caspase-1 isoforms related to apoptosis and IL-1 β maturation include mainly the α , β , γ and δ isoforms which produce products between 30 and 50 kDa [24]. We found comparable protein expression of pro-caspase-1 isoforms between FMF and healthy individuals. As expected, baseline levels of active caspase-1 (p20) were very low in freshly isolated WBCs; nevertheless, FMF patients displayed significantly lower p20 levels than healthy individuals (mean difference [95% CI]: $-1604 [-3051$ to $-157]$ AU) (Fig. 1B). The active/pro-caspase-1 (p20/p45) ratio was in 0.18 ± 0.02 in FMF versus 0.52 ± 0.14 ($p = 0.022$) in control WBCs (data not shown). Levels of pro-IL-1 β (p31) and active IL-1 β (p17) were minimal in both groups.

3.2. Ex vivo cultured WBCs from FMF patients demonstrate reduced NLRP3-mediated IL-1 β production

We next investigated the function of NLRP3 inflammasome in *ex vivo* culture of WBCs obtained from FMF patients ($n = 8$) and healthy individuals ($n = 7$). Although LPS (TLR4-ligand) stimulation alone could activate NLRP3 in human monocytes [25], robust NLRP3 activation and IL-1 β production requires two signals [10]. To this end, isolated WBCs were left untreated or were primed with sub-optimal concentration of LPS (250 pg/mL) for 2 h (signal 1) followed by ATP for another 20 min (signal 2) to activate NLRP3 inflammasome [10,13,26]. Immunoblotting in cultured cells showed that NLRP3 activation induced significant intracellular IL-1 β p17 expression in both patients and controls (Fig. 2A). However, the effect was less pronounced in FMF patients and consequently, p17 protein levels were significantly lower than those in healthy individuals (mean difference [95% CI]: $-18,541 [-33,333$ to $-3750]$ AU) (Fig. 2B). In agreement with our results in freshly isolated WBCs, NLRP3 protein levels in cultured cells were lower

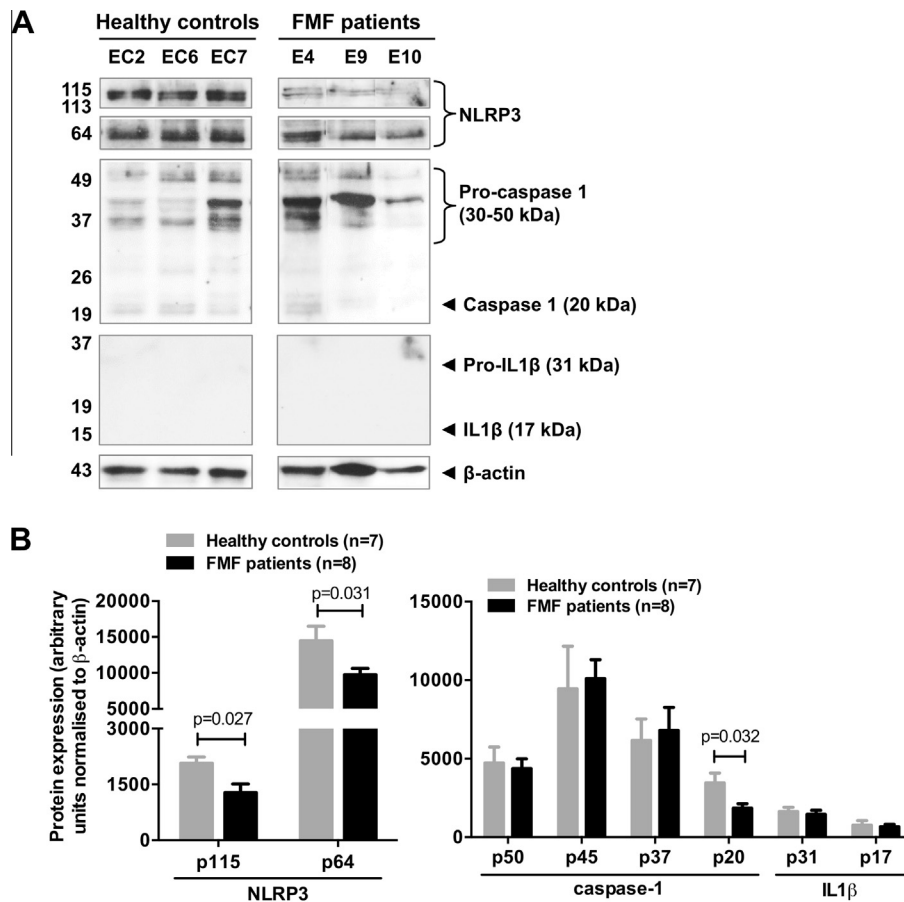


Fig. 1. Intracellular expression of NLRP3 inflammasome components in freshly isolated WBCs from FMF patients and healthy individuals. (A) Whole cell protein lysates were obtained from freshly isolated WBCs of FMF patients and healthy individuals. Immunoblotting was performed using specific antibodies against caspase-1 (p20, p37, p45, p50), NLRP3 (p113-115, p64), IL-1 β (p31, p17), and β -actin (p43) as described in Section 2. Representative images from $n = 3$ healthy controls (EC2,6,7) and $n = 3$ FMF patients (E4,9,10) are shown. (B) Protein densitometry was assessed and the normalized expression of each protein of interest was calculated. Bars represent the mean \pm SEM of protein expression in $n = 8$ FMF patients and $n = 7$ healthy individuals.

in FMF compared to controls, both in untreated state (mean difference [95% CI]: $-12,369$ [$-22,383$ to -2355] AU) and after stimulation (mean difference [95% CI]: $-13,177$ [$-21,522$ to -4833] AU) (*data not shown*). Post-hoc analysis of the Western blot data in LPS/ATP-activated WBCs from FMF patients and controls showed significant association between intracellular NLRP3 (p64) and IL-1 β (p17) protein levels (correlation coefficient $r = 0.580$, $p = 0.007$) (*data not shown*). There was no difference in pro-/active caspase-1 or pro-IL-1 β expression between FMF patients and healthy individuals either in untreated or in stimulated cells.

To elaborate on our immunoblotting data, we performed *ex vivo* NLRP3 activation assays in greater number of FMF patients ($n = 20$) and healthy controls ($n = 21$) and measured IL-1 β in cell culture supernatants. In both groups, LPS/ATP caused a significant increase in secreted IL-1 β , whereas IL-1 β was minimally induced by LPS 250 pg/mL or ATP stimulation alone. Consistent with the intracellular protein expression results, FMF WBCs secreted significantly lower amounts of IL-1 β compared to healthy WBCs (mean difference [95% CI]: -952 [-1586 to -317] pg/mL) (Fig. 2C). Addition of caspase-1 inhibitor (Ac-YVAD-CHO) reduced IL-1 β concentrations by $53 \pm 2\%$ in FMF patients and by $45 \pm 3\%$ in controls ($p = \text{NS}$), therefore confirming the role of caspase-1 in NLRP3-mediated IL-1 β secretion in our *ex vivo* system. Sub-group analysis between patients who were receiving colchicine ($n = 14$) or not ($n = 6$) at the time of blood sampling showed no difference in secreted IL-1 β levels (mean difference [95% CI] in LPS/ATP-induced IL-1 β : -542

[-1406 – 322] pg/mL) (*data not shown*), although the relatively small sample size precludes any definitive conclusions. We conclude that WBCs from FMF patients demonstrate reduced IL-1 β levels upon NLRP3 activation with LPS/ATP.

3.3. FMF pyrin mutations are associated with dysregulated IL-1 β production

Although pyrin may inhibit IL-1 β maturation through direct interaction with the NLRP3 inflammasome [13,14,17], the effect of mutated pyrin on NLRP3 activation and IL-1 β production remains controversial [13,14]. This is further complicated by evidence suggesting that pyrin can form, together with ASC and caspase-1, its own inflammasome [15,16], and that mutant forms of pyrin are able to induce IL-1 β independent of NLRP3 [7]. To assess the effect of wild-type and mutated pyrin on NLRP3-mediated IL-1 β production, we first categorized IL-1 β secretion results according to *MEFV* genotype in our cohort of FMF patients. LPS/ATP stimulation resulted in significantly lower IL-1 β levels in FMF patients compared to controls, irrespectively of *MEFV* genotype (*data not shown*). Our immunoblotting data in FMF patients ($n = 8$) also suggested no significant variation in intracellular NLRP3 or IL-1 β protein expression according to *MEFV* (*data not shown*).

To further explore the association between pyrin and IL-1 β production, we employed human THP-1 monocytic cells, which endogenously express pyrin, NLRP3, ASC, and caspase-1 [13,25],

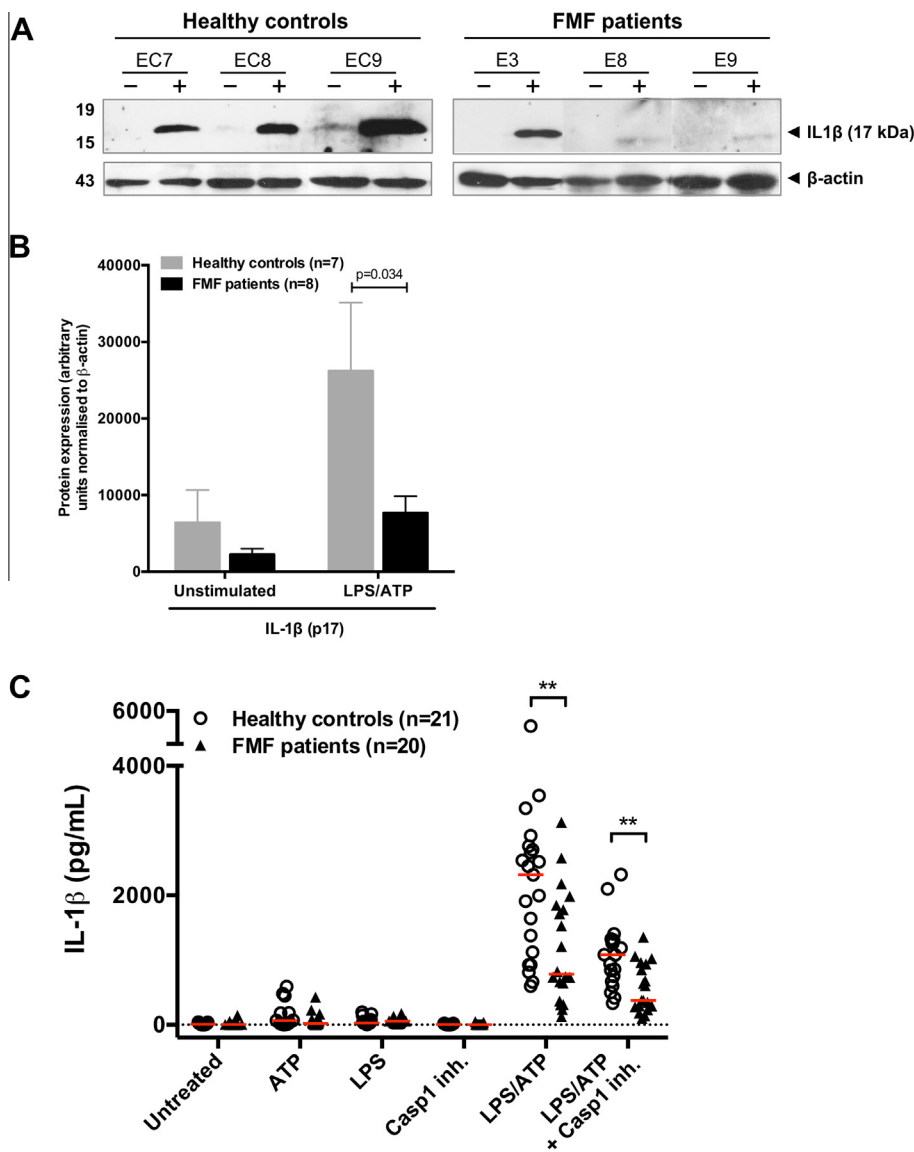


Fig. 2. Reduced IL-1 β release following NLRP3 activation in WBCs from FMF patients. (A) WBCs were cultured (0.5×10^6 /mL) at 37 °C (5% CO₂) in RPMI-1640 complete medium in absence (*minus sign*) or presence of TLR4 ligand (LPS, 250 μ g/mL). After 2 h, culture supernates were collected from LPS-treated wells and fresh medium was added in presence of ATP (5 mM) for another 20 min to activate NLRP3 (*plus sign*). Cell pellets were collected and Western blot analysis for intracellular IL-1 β expression was performed as described in Section 2. Representative images from $n = 3$ healthy controls (EC7,8,9) and $n = 3$ FMF patients (E3,8,9) are shown. (B) Protein densitometry was assessed and the normalized expression of intracellular IL-1 β was calculated. Bars represent the mean \pm SEM of protein expression in $n = 8$ FMF patients and $n = 7$ healthy individuals. (C) Concentrations of secreted IL-1 β in WBC culture supernatants were quantified by ELISA as described in Section 2. Dot plots of individual IL-1 β levels in $n = 20$ FMF patients and $n = 21$ healthy individuals. Lines represent median values. ** $p < 0.01$ for the comparison between FMF patients and healthy individuals.

and performed transient transfection assays with wild-type and mutant pyrin. PMA-primed empty vector-transfected THP-1 cells secreted low amounts of IL-1 β that were significantly ($p = 0.034$) induced after NLRP3 activation with LPS/ATP (Fig. 3A). LPS/ATP stimulation caused a significant increase in IL-1 β production by THP-1 cells overexpressing the wild-type pyrin (mean difference [95% CI]: 0.036 [0.0073–0.0649] pg/mL/ μ g total protein) but not the FMF-associated M694V mutated pyrin (mean difference [95% CI]: 0.0096 [–0.0307–0.0498] pg/mL/ μ g total protein). Accordingly, induction in secreted IL-1 β after NLRP3 activation was 0.036 ± 0.011 in wild-type- versus 0.012 ± 0.012 pg/mL per μ g total protein ($p = 0.031$) in M694V pyrin-transfected THP-1 cells (Fig. 3B). These findings suggest that following NLRP3 activation with LPS/ATP, the FMF-associated M694V mutated pyrin is associated with lower IL-1 β production.

4. Discussion

In this study, we assessed the protein expression and function of NLRP3 inflammasome in WBCs of FMF patients and correlated IL-1 β production with the presence of FMF-associated mutated pyrin. LPS/ATP activation of NLRP3 induced lower amounts of IL-1 β in FMF patients as compared to healthy individuals. Consistently, over-expression of M694V mutated pyrin in THP-1 cells reduced NLRP3-mediated IL-1 β release.

Although IL-1 β has been implicated in FMF pathogenesis [8,27], suggested by the inflammatory nature of clinical and laboratory features [1], findings from *in vivo* animal studies [7,17,18], and the therapeutic efficacy of IL-1 β blockade in colchicine-resistant disease [24,28], there is limited evidence of dysregulated IL-1 β production in patients with FMF. Since the NLRP3 inflammasome

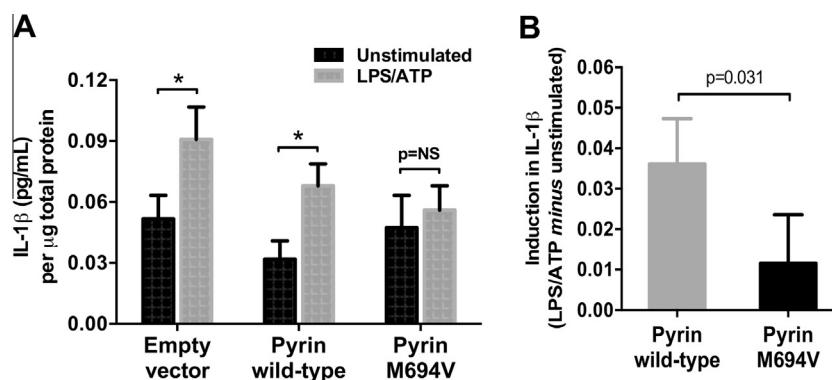


Fig. 3. Effect of M694V FMF-associated pyrin mutation on LPS/ATP-induced IL-1b production by THP-1 cells. (A) PMA-primed THP-1 cells were transfected with plasmid constructs containing empty vector, wild-type pyrin, or mutated pyrin harboring the FMF-associated M694V mutation, and were cultured in medium alone or in presence of LPS/ATP as described in Section 2. Culture supernatants were collected and assayed for IL-1 β by ELISA and cell pellets were lysed for total protein quantification. IL-1 β concentration (pg/mL) normalized by 1 μ g cells protein lysate. (B) Induction in IL-1 β was calculated as: secreted IL-1 β after LPS/ATP stimulation *minus* secreted IL-1 β under unstimulated conditions. (A and B) Bars represent mean \pm SEM from $n = 5$ independent experiments. * $p < 0.05$ for pairwise comparisons.

represents the major cell machinery for IL-1 β production [9–11], we examined its expression and function in the disease. Compared to healthy individuals, WBCs from FMF patients demonstrated lower NLRP3 and active caspase-1 protein levels in basal, unstimulated conditions, and also reduced NLRP3 protein expression following LPS/ATP stimulation. In humans, NLRP3 is expressed by a variety of primary immune cells, including neutrophils, monocytes, macrophages, conventional dendritic cells, and lymphocytes [23]. Although our assays were done using unseparated WBCs, FMF patients had similar differential blood cell counts with the control group (Supplementary Table 2), therefore minimizing the risk that our results are due to over-/under-presentation of certain circulating immune cell subsets [29].

Our results agree with those of Mitroulis et al. [30], who found reduced *NLRP3* mRNA levels in polymorphonuclear cells from symptoms-free FMF patients. This finding was associated with mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibition and reduced autophagy status in FMF [30,31]; indeed, treatment with rapamycin (mTOR inhibitor) to simulate metabolic stress conditions led to reduced NLRP3 expression [30]. Reduced basal autophagy, NLRP3 expression, and NLRP3-mediated IL-1 β production in FMF WBCs could represent a compensatory mechanism to protect from disease attacks [31], although further studies will be required to validate this hypothesis. In line with this, NLRP3 transcripts were found markedly decreased in human ischemic heart tissue compared to non-ischemic heart tissue [32]. However, in the absence of NLRP3 expression data from our transfection assays, additional studies are needed to establish the association between lower NLRP3 and IL-1 β expression in FMF. Moreover, our results do not preclude a possible pathophysiologic role of augmented IL-1 β production during FMF attacks or the possible existence of subtypes of FMF patients with different IL-1 β secretory capacities. To this end, NLRP3 receives complex regulation by a number of transcriptional and non-transcriptional mechanisms [33], which deserve further investigation in the context of FMF.

Activation of the NLRP3 inflammasome requires two signals: one delivered by microbial or endogenous stimuli that induce *proIL1 β* and *NLRP3* expression [34], and a second which activates NLRP3 through K^+ efflux, mitochondrial reactive oxygen species generation, or phagosomal destabilization and cytosolic release of lysosomal cathepsins [10,26]. Although it has been reported that LPS alone may stimulate NLRP3 in monocytes, dendritic cells, and other cell types [25,35,36], in our *ex vivo* WBC culture system, we observed induction of IL-1 β following stimulation with LPS/ATP, whereas LPS alone at sub-optimal concentration released low

IL-1 β amounts (Fig. 2C). This finding confirms that sequential LPS/ATP leads to robust NLRP3 activation and IL-1 β production, even when WBCs priming is performed with suboptimal LPS concentration. Nevertheless, the physiologic stimulus to trigger NLRP3/IL-1 β activation in patients with FMF still remains unknown and thus, it could be argued that exogenous LPS/ATP acts as 'artificial' activator.

Intracellular levels of NLRP3, caspase-1, and pro-IL-1 β were not significantly induced (*data not shown*), possibly due to the reported release of the inflammasome components into the supernatant [25]. Moreover, signal 1 (i.e., LPS) might mediate non-transcriptional priming of NLRP3 by stimulating its deubiquitination [37].

An important finding of the study was that NLRP3 activation in total WBCs resulted in lower intracellular and secreted IL-1 β levels in FMF patients compared to healthy individuals. Lower NLRP3-mediated IL-1 β production might be driven – at least in part – by lower NLRP3 protein expression in FMF (Fig. 1). Indeed, previous work has suggested that NLRP3 expression is the limiting factor for NLRP3 inflammasome activation by LPS/ATP [34]. Our results differ from those of Chae et al. [7] and Omenetti et al. [38] who reported increased LPS-induced IL-1 β production by monocytes and monocyte-derived macrophages of FMF patients. Differences in the experimental systems used may account for this discrepancy. Specifically, in our study we stimulated total WBCs to better reflect the *in vivo* conditions [22], as opposed to studying specific subsets of immune cells. Second, a 'two-step' protocol with LPS and ATP was used for NLRP3 activation, whereas Omenetti et al. [38] stimulated cells with LPS alone. Next, the LPS concentration we used for WBCs priming (250 pg/mL) is much lower than the 1 μ g/mL concentration that was used in the two other studies; the selection of sub-optimal LPS stimulation was based on preliminary dose-response experiments and on the assumption it would enable the detection of small differences in IL-1 β production between FMF patients and healthy controls. Finally, both in our study and in the study of Chae et al. [7], culture medium was renewed after LPS priming and secreted IL-1 β was quantified in the new supernates following addition of ATP. Instead, in the study by Omenetti et al. [38] secreted IL-1 β was measured in culture supernates collected at the end of 18-h stimulation with LPS. These experimental diversions in our study could explain the minimal induction of IL-1 β with LPS alone and the downregulated production of IL-1 β in FMF patients compared to controls.

The decreased NLRP3-mediated IL-1 β production in FMF diverges from the findings in CAPS, where *NLRP3* gain-of-function mutations result in IL-1 β hyper-production [5,11]. As discussed

above, lower induction of IL-1 β in FMF could be explained by excessive (post-attack or chronic) cellular stress leading to 'exhaustion' and reduced NLRP3 expression [30], and/or operation of other negative feedback mechanisms to reduce inflammation. The difference in NLRP3 inflammasome activation status between FMF and CAPS might also be the result of distinct molecular pathophysiology, as FMF is associated with mutations in the *MEFV* gene (see also below) [5,27]. Interestingly, Crohn's disease, a chronic inflammatory disease that may affect any part of the gastrointestinal tract, has been associated with a polymorphism (rs6672995) in a regulatory region downstream of *NLRP3* linked to reduced *NLRP3* expression and IL-1 β production [39].

Although mutations in the *MEFV* gene are a major cause of FMF pathophysiology, it is not clear how wild-type and mutated pyrin may interact with NLRP3 inflammasome to regulate IL-1 β production. This is complicated by the fact that, depending on the experimental setting, pyrin has been shown to exert both anti-inflammatory (through direct binding and inhibition of the NLRP3 inflammasome [13,14,17]) and pro-inflammatory (through generation of its own inflammasome [7,15,16]) functions. To this end, our *ex vivo* assays showed reduced LPS/ATP-induced IL-1 β release by FMF WBCs irrespective of the *MEFV* genotype (*data not shown*). Notably, the genotyping data of the included patients are well representative of the adult FMF patients in Crete [6,19] but also in Greece [40–42] and in other ethnic groups [43], with nearly one-third of the patients harboring *MEFV* compound heterozygosity or homozygosity, 47% harboring single-copy *MEFV* mutations (heterozygous), and the remaining 20% having no identified *MEFV* mutation [6,19]. Next to M694V, the E148Q and M694I mutations are quite prevalent even among patients with severe clinical phenotypes [6,19]. In this respect, our study findings and conclusions may not be generalized to other FMF populations with different prevalence of *MEFV* genotypes.

In line with the *ex vivo* data, over-expression of FMF-causing (M694V) mutated pyrin in THP-1 cells reduced LPS/ATP-induced IL-1 β production compared to the effect of normal (wild-type) pyrin. Of note, over-expression of M694V pyrin was associated with increased IL-1 β levels under basal, unstimulated conditions (Fig. 3A). Although one cannot exclude the possibility that poor response of the cells transfected with mutant pyrin to LPS/ATP could be related to exhaustion of their IL-1 β secretory capacity, these results could suggest that FMF-associated pyrin mutants gain pro-inflammatory properties under basal conditions, whereas they are linked to suppressed NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β production. Whether these effects are due to disturbed inflammasome activity of the mutated pyrin, altered binding to NLRP3 inflammasome, and/or reduced NLRP3 expression, or they are also mediated by NLRP3-independent pathways, will require further investigation.

In conclusion, WBCs from FMF patients demonstrate reduced protein expression of NLRP3 and reduced NLRP3-mediated IL-1 β production. These aberrancies seem to be linked to mutant pyrin either by altered physical interaction with NLRP3 inflammasome, or by induction of metabolic cell stress leading to decreased NLRP3 levels. Additional studies will be needed to define whether reduced activation of NLRP3 inflammasome in FMF represents a compensatory mechanism to control inflammation or is linked to its pathogenesis through defective anti-microbial responses.

Acknowledgements

This paper is dedicated to the memory of our colleague, Eleni Petraki, who passed away.

The work was funded by the Hellenic Society of Rheumatology, the "Synergasia" Action "Investigation of new inflammatory mechanisms in chronic autoinflammatory & autoimmune diseases" of

the Operational Programme "Education and Lifelong Learning" (co-funded by the European Social Fund [ESF] and National Resources), and the Pancretan Health Association. We are grateful to Drs Ioannis Mitroulis and Konstantinos Ritis for their critical review of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2015.06.007>.

References

- [1] Shohat M, Halpern GJ. Familial Mediterranean fever – a review. *Genet. Med.* 2011;13:487.
- [2] Centola M, Wood G, Frucht DM, Galon J, Aringer M, Farrell C, et al. The gene for familial Mediterranean fever, *MEFV*, is expressed in early leukocyte development and is regulated in response to inflammatory mediators. *Blood* 2000;95:3223.
- [3] Booty MG, Chae JJ, Masters SL, Remmers EF, Barham B, Le JM, et al. Familial Mediterranean fever with a single *MEFV* mutation: where is the second hit? *Arthritis Rheum.* 2009;60:1851.
- [4] Chae JJ, Aksentjevich I, Kastner DL. Advances in the understanding of familial Mediterranean fever and possibilities for targeted therapy. *Br. J. Haematol.* 2009;146:467.
- [5] Aksentjevich I, Kastner DL. Genetics of monogenic autoinflammatory diseases: past successes, future challenges. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011;7:469.
- [6] Fragouli E, Eliopoulos E, Petraki E, Sidiropoulos P, Aksentjevich I, Galanakis E, et al. Familial Mediterranean fever in Crete: a genetic and structural biological approach in a population of 'intermediate risk'. *Clin. Genet.* 2008;73:152.
- [7] Chae JJ, Cho YH, Lee GS, Cheng J, Liu PP, Feigenbaum L, et al. Gain-of-function pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 β activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity* 2011;34:755.
- [8] Meinzer U, Quartier P, Alexandra JF, Hentgen V, Retornaz F, Kone-Paut I. Interleukin-1 targeting drugs in familial Mediterranean fever: a case series and a review of the literature. *Semin. Arthritis Rheum.* 2011;41:265.
- [9] Schroder K, Tschoep J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140:821.
- [10] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13:397.
- [11] Park H, Bourla AB, Kastner DL, Colbert RA, Siegel RM. Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2012;12:570.
- [12] Goulielmos GN, Fragouli E, Aksentjevich I, Sidiropoulos P, Boumpas DT, Eliopoulos E. Mutational analysis of the PRYSPRY domain of pyrin and implications for familial Mediterranean fever (FMF). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;345:1326.
- [13] Chae JJ, Wood G, Masters SL, Richard K, Park G, Smith BJ, et al. The B30.2 domain of pyrin, the familial Mediterranean fever protein, interacts directly with caspase-1 to modulate IL-1 β production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006;103:9982.
- [14] Papin S, Cuenin S, Agostini L, Martinon F, Werner S, Beer HD, et al. The SPRY domain of pyrin, mutated in familial Mediterranean fever patients, interacts with inflammasome components and inhibits proIL-1 β processing. *Cell Death Differ.* 2007;14:1457.
- [15] Seshadri S, Duncan MD, Hart JM, Gavrilin MA, Wewers MD. Pyrin levels in human monocytes and monocyte-derived macrophages regulate IL-1 β processing and release. *J. Immunol.* 2007;179:1274.
- [16] Yu JW, Wu J, Zhang Z, Datta P, Ibrahim I, Taniguchi S, et al. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF- κ B, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ.* 2006;13:236.
- [17] Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol. Cell* 2003;11:591.
- [18] Hesker PR, Nguyen M, Kovarova M, Ting JP, Koller BH. Genetic loss of murine pyrin, the Familial Mediterranean fever protein, increases interleukin-1 β levels. *PLoS One* 2012;7:e51105.
- [19] Repa A, Bertias G, Fragouli E, Fanouraki A, Kabouraki E, Goulielmos G, et al. Familial Mediterranean fever (FMF): a single-center clinical-genetic study. *Ann. Rheum. Dis.* 2014;73:309.
- [20] Livneh A, Langevitz P, Zemer D, Zaks N, Kees S, Lidar T, et al. Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1879.
- [21] Balci-Peynircioglu B, Waite AL, Hu C, Richards N, Staubach-Grosse A, Yilmaz E, et al. Pyrin, product of the *MEFV* locus, interacts with the proapoptotic protein, Siva. *J. Cell. Physiol.* 2008;216:595.
- [22] Yang B, Pham TH, Goldbach-Mansky R, Gadina M. Accurate and simple measurement of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β using a whole blood stimulation assay. *J. Vis. Exp.* 2011.
- [23] Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J. Histochem. Cytochem.* 2007;55:443.

- [24] Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis.* 2012;3:e338.
- [25] Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA, Opitz B, van der Meer JH, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009;113:2324.
- [26] Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006;440:228.
- [27] Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27:621.
- [28] Cetin P, Sari I, Sozeri B, Cam O, Birlik M, Akkoc N, et al. Efficacy of interleukin-1 targeting treatments in patients with familial mediterranean fever. *Inflammation* 2015;38:27.
- [29] Ahsen A, Ulu MS, Yuksel S, Demir K, Uysal M, Erdogan M, et al. As a new inflammatory marker for familial mediterranean fever: neutrophil-to-lymphocyte ratio. *Inflammation* 2013.
- [30] Mitroulis I, Kourtzelis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Ritis K. Evidence for the involvement of mTOR inhibition and basal autophagy in familial Mediterranean fever phenotype. *Hum. Immunol.* 2011;72:135.
- [31] Apostolidou E, Skendros P, Kambas K, Mitroulis I, Konstantinidis T, Chrysanthopoulou A, et al. Neutrophil extracellular traps regulate IL-1beta-mediated inflammation in familial Mediterranean fever. *Ann. Rheum. Dis.* 2014.
- [32] Hermansson C, Lundqvist A, Wasslavik C, Palmqvist L, Jeppsson A, Hulten LM. Reduced expression of NLRP3 and MEFV in human ischemic heart tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013;430:425.
- [33] Chen S, Sun B. Negative regulation of NLRP3 inflammasome signaling. *Protein Cell* 2013;4:251.
- [34] Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* 2009;183:787.
- [35] Kahlenberg JM, Dubyak GR. Differing caspase-1 activation states in monocyte versus macrophage models of IL-1beta processing and release. *J. Leukoc. Biol.* 2004;76:676.
- [36] He Y, Franchi L, Nunez G. TLR agonists stimulate Nlrp3-dependent IL-1beta production independently of the purinergic P2X7 receptor in dendritic cells and in vivo. *J. Immunol.* 2013;190:334.
- [37] Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 2012;287:36617.
- [38] Omenetti A, Carta S, Delfino L, Martini A, Gattorno M, Rubartelli A. Increased NLRP3-dependent interleukin 1beta secretion in patients with familial Mediterranean fever: correlation with MEFV genotype. *Ann. Rheum. Dis.* 2013.
- [39] Villani AC, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, et al. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 2009;41:71.
- [40] Giaglis S, Papadopoulos V, Kambas K, Doumas M, Tsironidou V, Rafail S, et al. MEFV alterations and population genetics analysis in a large cohort of Greek patients with familial Mediterranean fever. *Clin. Genet.* 2007;71:458.
- [41] Konstantopoulos K, Kanta A, Deltas C, Atamian V, Mavrogianni D, Tzioufas AG, et al. Familial Mediterranean fever associated pyrin mutations in Greece. *Ann. Rheum. Dis.* 2003;62:479.
- [42] Konstantopoulos K, Kanta A, Lilakos K, Papanikolaou G, Meletis I. Familial Mediterranean fever and E148Q pyrin gene mutation in Greece. *Int. J. Hematol.* 2005;81:26.
- [43] Kishida D, Nakamura A, Yazaki M, Tsuchiya-Suzuki A, Matsuda M, Ikeda S. Genotype-phenotype correlation in Japanese patients with familial Mediterranean fever: differences in genotype and clinical features between Japanese and Mediterranean populations. *Arthritis Res. Ther.* 2014;16:439.