



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE

CICLO XXX

**IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI GENETICI DI
SUSCETTIBILITA' ALLA FIBROSI RETROPERITONEALE
MEDIANTE IMMUNOCHIP**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Riccardo Bonadonna

Tutore:

Chiar.mo Prof. Antonio Percesepe

Dottorando:

Dott. Francesco Bonatti

ANNI 2014-2017

INDICE

Riassunto	1
1. Introduzione	3
<i>1.1 Fibrosi Retroperitoneale</i>	3
Epidemiologia	5
Aspetti anatomico-patologici	5
Clinica	7
Diagnosi	8
Eziologia e patogenesi	9
Caratteristiche genetiche della Fibrosi Retroperitoneale	12
Associazioni con altre malattie autoimmuni	14
Trattamento	14
<i>1.2 Locus HLA ed autoimmunità</i>	15
2. Obiettivi dello studio	18
3. Pazienti e metodi	20
Pazienti e controlli	20
Estrazione DNA genomico	21
Misurazione della concentrazione del DNA	21
ImmunoChip: overview, vantaggi e limiti	21
Genotipizzazione molecolare	23
Analisi statistica	25
Imputazione e meta-analisi negli studi GWAS	26
4. Risultati	28

Associazioni HLA	28
Associazioni non-HLA	33
Analisi sui subfenotipi	33
5. Discussione	35
6. Bibliografia	40

RIASSUNTO

Background ed obiettivi dello studio. La fibrosi retroperitoneale (FR) è una patologia rara, con una prevalenza di 1.4 casi/100,000 abitanti, caratterizzata dalla presenza di un tessuto fibro-infiammatorio che circonda l'aorta e si estende nello spazio retroperitoneale, coinvolgendo le strutture adiacenti. Diversi elementi clinici, laboratoristici (presenza di positività per diversi auto-anticorpi) ed immunogenetici (associazione con *HLA-DRB1*03*) suggeriscono un'eziologia autoimmune. Inoltre, spesso la FR si associa ad altre patologie autoimmuni, tra cui le vasculiti e l'artrite reumatoide. Scopo del presente studio è investigare il background genetico in soggetti affetti da FR ed identificare la presenza di fattori genetici di suscettibilità a questa malattia mediante studio caso-controllo.

Pazienti e Metodi. Nello studio sono stati tipizzati 302 pazienti affetti da FR (241 con forma idiopatica (FRI) e 61 con forma perianeurismatica (FRP)) e 2,443 controlli. La coorte più ampia (discovery cohort) è stata reclutata presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma ed è costituita da 251 casi e 1,270 controlli; i restanti 51 pazienti e 1,173 controlli sono di origine olandese e costituiscono la coorte di replicazione dello studio. La metodica utilizzata per l'analisi genetica è stata ImmunoChip (Illumina) che consente di tipizzare simultaneamente circa 200,000 varianti genetiche che mappano, per la maggior parte, sul locus HLA e su altri geni implicati nei meccanismi immunitari. Le frequenze alleliche in pazienti e controlli sono state confrontate per individuare le varianti genetiche associate alla FR. Successivamente sono stati valutati i residui amminoacidici relativi alle varianti identificate per evidenziare eventuali implicazioni a livello della sequenza della

proteina. Infine, sono stati confrontati i dati genetici dei pazienti con FRP e FRI per valutare differenze nei background genetici tra queste due forme di FR.

Risultati. Varianti genetiche con livello di associazione genome-wide con la FR sono state riscontrate esclusivamente nel locus HLA (cromosoma 6). I segnali più significativi sono stati riscontrati negli alleli *HLA-DRB1**0301 ($p=8.25E^{-14}$, OR [95% CI]=2.45 [1.93-3.09]) e *HLA-DQB1**0201 ($p=2.62E^{-14}$, OR [95% CI]=2.44 [1.94-3.07]), caratterizzati da un Linkage Disequilibrium (LD) quasi completo ($r^2=0.96$).

In aggiunta, sono stati individuati ulteriori dieci polimorfismi singolo nucleotide (SNPs) in LD con *HLA-DRB1**0301 a livello dei geni *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* ed *HLA-DRB1* con livelli di significatività simili a quelli dell'allele classico *HLA-DRB1**0301. Il gene *HLA-DRB1* codifica per la proteina HLA-DR β che lega peptidi antigenici derivanti dalle cellule che presentano l'antigene (APC) e li presenta sulla superficie cellulare per il riconoscimento da parte dei linfociti CD4+. Considerando la sequenza della proteina HLA-DR β , gli amminoacidi in posizione 77 (Asn77) e 74 (Arg74) risultano essere associati alla FR ($p=5.02E^{-14}$, OR [95% CI]=2.46 [1.95-3.11]).

Conclusioni. Questo studio ha permesso di identificare molteplici varianti genetiche del locus HLA associate con la FR, dimostrando che questo sistema genico potrebbe ricoprire un ruolo importante nella suscettibilità alla FR e che le diverse forme alleliche del gene potrebbero avere un ruolo nei processi patogenetici alla base di questa malattia. Inoltre il forte legame tra la FR e la presenza dell'allele *HLA-DRB1**03, strettamente associato a numerose condizioni autoimmuni, è a supporto dell'ipotesi che la FR potrebbe appartenere a questa classe di patologie.

1. INTRODUZIONE

1.1 FIBROSI RETROPERITONEALE

La fibrosi retroperitoneale (FR) è una patologia caratterizzata dalla presenza di un tessuto fibro-infiammatorio a livello retroperitoneale, che si sviluppa di solito attorno alla porzione infrarenale dell'aorta addominale ed alle arterie iliache, coinvolgendo spesso anche strutture adiacenti come, ad esempio, gli ureteri e la vena cava inferiore (Figura 1).

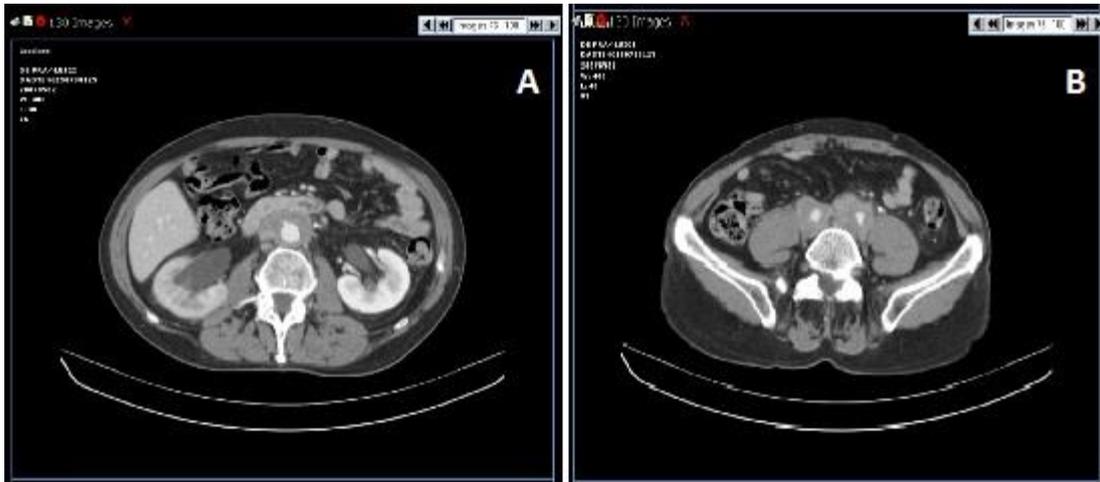


Figura 1: Immagini TAC con mezzo di contrasto in pazienti affetto da fibrosi retroperitoneale idiopatica. (A) L'aorta addominale, di diametro normale, appare circondata da un manicotto di tessuto isodenso rispetto al muscolo. (B) Immagine TAC con mezzo di contrasto in paziente affetto da fibrosi idiopatica retroperitoneale. Il manicotto di tessuto, isodenso rispetto al muscolo, circonda le arterie iliache.

La FR può essere localizzata a livello del retro peritoneo oppure insorgere in pazienti affetti da altre patologie a carattere autoimmune quali vasculiti, artrite reumatoide, tiroidite autoimmune, configurando un disordine sistemico.

La prima descrizione della FR viene attribuita all'urologo Albarran che, nel 1905, ha descritto il trattamento chirurgico di un processo espansivo a livello retroperitoneale, che determinava ostruzione ureterale [1]. A partire dagli anni settanta la FR veniva classificata nell'ambito della periaortite cronica, insieme all'aneurisma infiammatorio dell'aorta addominale (IAAA) ed alla fibrosi retroperitoneale perianeurismatica (FRP) [2]. Infatti, queste tre entità presentano caratteristiche istopatologiche simili quali assottigliamento della tonaca media dell'aorta addominale, aterosclerosi avanzata, marcata fibrosi e flogosi cronica coinvolgente l'avventizia aorto-iliaca ed il circostante retroperitoneo; l'infiltrato infiammatorio che caratterizza queste condizioni è costituito da linfociti, macrofagi, plasmacellule ed eosinofili, all'interno di un tessuto fibroso, costituito da collagene di tipo I, fibroblasti e miofibroblasti.

Nella FR il tessuto fibro-infiammatorio si sviluppa attorno all'aorta, che può presentare dilatazione. Esso può portare a complicanze di tipo ostruttivo a carico delle strutture circostanti. La FRP e gli IAAA sono ora raggruppati nelle cosiddette forme aneurismatiche di periaortite cronica, mentre la FRI rappresenta la forma non-aneurismatica.

Recentemente, alcuni ricercatori [3] hanno proposto l'inquadramento della FR nell'ambito delle malattie autoimmuni IgG4-correlate, riscontrando nel siero di un numero non trascurabile di pazienti un aumento dei livelli delle immunoglobuline IgG4 ed un'infiltrazione tissutale da parte di plasmacellule IgG4⁺. La definizione "malattia autoimmune IgG4-correlata" identifica in realtà un gruppo eterogeneo di malattie, accomunate dalla presenza di infiltrato infiammatorio ricco di linfociti, eosinofili e plasmacellule secernenti IgG4 a livello degli organi coinvolti (in

particolare pancreas, dotti biliari, retroperitoneo, ghiandole salivari, tiroide), associato ad un aumento della concentrazione sierica di questa sottoclasse anticorpale, che fisiologicamente viene riscontrata nel siero in concentrazioni più basse.

Epidemiologia

La FR è una malattia rara con un'incidenza annua di 0.1 casi su centomila persone ed una prevalenza di 1,38 casi su 100,000 abitanti [4]. Un recente studio olandese ha in realtà evidenziato che l'incidenza annua della malattia può essere fino a 10 volte superiore a quella precedentemente riportata [5]. Questo apparente aumento dell'incidenza della malattia sembra essere in relazione ad un miglioramento delle tecniche diagnostiche (in particolare ad un più diffuso utilizzo di TAC e RMN) e ad una più ampia diffusione delle conoscenze su questa rara condizione.

La malattia colpisce prevalentemente il sesso maschile, con un rapporto tra maschi e femmine variabile da 2:1 a 3:1.

In media, la FR interessa maggiormente soggetti in età compresa tra i cinquanta e i sessant'anni; relativamente alla popolazione pediatrica, l'incidenza della FR è estremamente bassa, essendo più frequenti manifestazioni di fibrosi retroperitoneale secondarie ad altre patologie sistemiche, autoimmuni o neoplastiche [6].

Aspetti anatomo-patologici

La FR si presenta come una placca fibrotica di consistenza dura e colore bianco-grigiastro, che infiltra il tessuto retroperitoneale, avvolgendo l'aorta addominale e le arterie iliache, estendendosi solitamente dall'origine dell'arteria renale fino alla

biforcazione dei vasi iliaci comuni [7]. In genere, il margine anteriore di tale massa è ben delimitato, a differenza del margine posteriore, che è più frastagliato e si confonde con le strutture adiacenti. Di solito la massa ha estensione cranio-caudale tra l'emergenza delle arterie renali e la biforcazione delle iliache comuni in interne ed esterne; frequentemente determina medializzazione e stenosi degli ureteri. Qualora vi sia il coinvolgimento peri-vascolare dell'aorta toracica ed estensione nel circostante spazio mediastinico, si determina il quadro della fibrosi così detta mediastinica, in cui il processo fibro-infiammatorio può causare compressione della vena cava superiore, del pericardio e dell'emergenza dei vasi epi-aortici [8].

Da un punto di vista microscopico, il tessuto retroperitoneale mostra la coesistenza di una componente infiammatoria e di una fibrotica, in proporzione variabile in base allo stadio della malattia. Nello stadio precoce, il tessuto appare spesso, edematoso e largamente vascolarizzato, infiltrato da un gran numero di cellule mononucleate (tipiche dell'infiammazione cronica), fibroblasti, fibre collagene, cellule istiocitarie, e raramente cellule giganti multinucleate. L'infiltrato infiammatorio include linfociti T e B, macrofagi e plasmacellule, e spesso sparsi eosinofili.

Queste componenti si organizzano in un *pattern* bifasico: perivascolare e diffuso. Il primo consiste nella formazione di strutture pseudofollicolari che circondano i vasi di piccolo calibro, caratterizzati centralmente dalla presenza di linfociti B e circondato perifericamente da linfociti T. Il secondo è caratterizzato, invece, da un infiltrato formato prevalentemente da linfociti T, che coinvolge lo spazio interstiziale compreso tra le bande di fibre collagene [9]. Viceversa, nella fase avanzata/cronica il tessuto diventa prevalentemente sclerotico, avascolare, con diffuse calcificazioni e la sua quota infiammatoria appare nettamente ridotta [10]. La sclerotizzazione tissutale

consiste in spessi fasci di collagene irregolarmente distribuiti all'interno della lesione che circondano i piccoli vasi ed i nervi [11].

Clinica

La diagnosi clinica della FR può risultare complessa e tale complessità consiste nella non specificità delle manifestazioni cliniche d'esordio. I segni e i sintomi che precedono l'esordio della FR sono sia di natura *locale*, cioè dovuti alla presenza della massa e dei suoi effetti meccanici e compressivi, che *sistemica*, come espressione della reazione infiammatoria di fase acuta che caratterizza le fasi iniziali della patologia [3].

I sintomi locali includono in genere la presenza di dolore a livello addominale, lombare, spesso irradiato al fianco, con carattere persistente, non esacerbato dal movimento o dalla palpazione; occasionalmente può essere colico e presentarsi in forma acuta, in caso di coinvolgimento ureterale. Si possono riscontrare anche edema agli arti inferiori e trombosi venosa profonda, probabilmente causati da una compressione dei vasi linfatici retroperitoneali e delle vene profonde; possono essere frequentemente presenti idrocele e varicocele, dovuti probabilmente ad un coinvolgimento dei vasi gonadici.

I sintomi sistemici sono invece rappresentati da febbre, perdita di peso, anoressia, affaticamento, mialgie [12]. In caso di uropatia ostruttiva bilaterale, presente nel 50% circa dei casi, può prevalere il quadro clinico dell'insufficienza renale acuta, caratterizzata da ipertensione, squilibri idro-elettrolitici, anemia, nausea e vomito.

Diagnosi

Le più importanti anomalie che si riscontrano negli esami di laboratorio all'esordio della FR sono quelle tipiche di una patologia infiammatoria: aumento della VES, della proteina C reattiva e delle α -2 globuline. Questi parametri vengono costantemente monitorati al fine di valutare l'evoluzione clinica della patologia, dal momento che possono rappresentarne l'espressione dell'attività infiammatoria [13, 14].

Inoltre, in caso di ostruzione ureterale bilaterale, gli esami di laboratorio possono evidenziare il grado di disfunzione renale, definito dall'incremento degli indici di ritenzione azotata quali creatinina ed urea. Spesso si riscontra anche un'anemia moderata, legata alla natura infiammatoria della malattia ed all'insufficienza renale, qualora sia presente [12].

Tra gli esami immunologici, i test che più frequentemente risultano positivi sono gli anticorpi antinucleo (fino al 60% dei pazienti), mentre in rari casi è stata segnalata una positività di fattore reumatoide, anticorpi anti-muscolo liscio, anticorpi anti-citoplasma dei neutrofili (ANCA) ed anti-DNA. I titoli di questi anticorpi spesso sono bassi e non specifici per la FRI, tuttavia la loro positività può suggerire la presenza di una malattia autoimmune associata alla FR o comunque essere testimonianza di un'origine autoimmune della malattia [15, 16, 17].

La malattia autoimmune che più spesso si associa alla FR è la tiroidite autoimmune, che viene diagnosticata mediante il riscontro di anticorpi anti-tireoglobulina e anti-tireoperossidasi nel siero [18, 19, 20]. Gli esami strumentali sono indispensabili per la diagnosi e per il *follow-up* dei pazienti affetti da FR e la biopsia del tessuto retroperitoneale viene effettuata solo nei casi di localizzazione atipica della malattia

o quando vi sia il sospetto di una sottostante lesione di natura infettiva o neoplastica [21].

Le indagini di primo livello sono rappresentate essenzialmente dall'ecografia addominale e dall'urografia. L'ecografia non sempre permette di rilevare la FR, tuttavia può apprezzare la presenza di una massa ipoecogena periaortica e l'eventuale presenza di idronefrosi. Inoltre permette di valutare la dilatazione dell'aorta e la sua entità [22]. L'esame considerato come *gold standard* per la diagnosi e il follow-up della FR è la TAC o la RMN addominale. La TAC mostra la presenza di un tessuto isodenso rispetto al muscolo, che circonda l'aorta senza dar segni di compressione di quest'ultima, ma che può portare a una medializzazione degli ureteri e a una compressione della vena cava. La RMN fornisce informazioni analoghe a quelle evidenziate dalla TAC, definendo nello specifico la massa rispetto ai tessuti molli circostanti, con il vantaggio di non far uso del mezzo di contrasto nefrotossico usato per l'esame TAC [23].

La biopsia retroperitoneale, indicata come sopra menzionato per casi di atipica localizzazione della massa retroperitoneale, o in presenza di un sospetto di sottostanti patologie infettive o neoplastiche, può essere eseguita per via percutanea sotto guida TAC, o più comunemente per via chirurgica, laparoscopica o laparotomica. In studi recenti, la percentuale di pazienti sottoposti a biopsia retroperitoneale non supera il 50% [24].

Eziologia e patogenesi

L'eziologia della FR rimane ad oggi poco conosciuta, in quanto i fattori che possono contribuire alla patogenesi sono molteplici e non sempre è chiaro il loro ruolo nello

sviluppo della malattia. In meno del 25% dei casi, la FR è secondaria a neoplasie primitive o metastasi a livello retroperitoneale, infezioni (tubercolosi, actinomicosi), uso di farmaci (β -bloccanti, ergotamina, metildopa) [25], radioterapia, traumi o interventi chirurgici addominali maggiori (linfadenectomie, colectomie).

Dal punto di vista patogenetico, la FR può essere considerata una malattia complessa, in cui fattori di suscettibilità di carattere genetico e di esposizione ambientale possono cooperare nello sviluppo della malattia. In merito ai fattori ambientali è probabile che il fumo di sigaretta e alcune esposizioni professionali, come ad esempio quella all'asbesto, siano associati a un rischio maggiore di sviluppare la malattia, anche se i precisi meccanismi patogenetici rimangono per la maggior parte oscuri [26, 27, 28, 29].

Le ipotesi relative alla patogenesi della FR si basano sulla teoria sviluppata da Parums e Mitchinson, i quali sostenevano la teoria di una reazione infiammatoria locale verso antigeni presenti a livello delle placche arteriosclerotiche dell'aorta addominale come ad esempio le lipoproteine a bassa densità ossidate (LDL-ossidate) e il ceroide. Le LDL-ossidate ed il ceroide assumono il ruolo di antigeni, scatenando una reazione infiammatoria localizzata a livello della parete aortica. Nello specifico, nei casi di aterosclerosi avanzata, la tonaca media risulta assottigliata e può presentare soluzioni di continuità, attraverso le quali i lipidi ossidati vengono presentati dai macrofagi presenti nelle placche ai linfociti B e T ed alle plasmacellule presenti a livello avventiziale. In questo modo inizia una reazione infiammatoria, che si sviluppa prevalentemente a livello della media e dell'avventizia aortica e, di seguito, nel retroperitoneo circostante, inducendo un'abnorme reazione fibrosante.

Da un punto di vista istologico, gli elementi a supporto di questa teoria sono tre: la presenza, in biopsie di pazienti con FR, di IgG e talvolta IgM in prossimità delle placche ateromatose [30]; in secondo luogo l'osservazione di macrofagi carichi di frammenti di ceroidi, di linfociti T e B con *pattern* di attivazione e proliferazione, nell'avventizia e nei linfonodi circostanti [31]; infine, il riscontro mediante tecnica PCR di numerose citochine infiammatorie (ad esempio: interferon γ , interleuchina 1 α , interleuchina 2 con il rispettivo recettore, interleuchina 4) nelle sezioni della parete aortica [32].

Il limite di questa teoria è quello di presupporre che prerequisito essenziale per lo sviluppo della FR sia l'aterosclerosi di grado avanzato, benché ciò non venga confermato dall'evidenza clinica e non spieghi la patogenesi della FRI nei casi, seppure rari, sorti nella popolazione pediatrica [33]. Inoltre, l'aterosclerosi non sembra spiegare la complessa presentazione clinica della FRI, con frequenti manifestazioni sistemiche e con significativo overlap con altre malattie autoimmuni [11].

Studi recenti hanno avanzato l'ipotesi che la FR sia la manifestazione locale di un disordine autoimmune a carattere sistemico, piuttosto che una risposta immunologica locale, e che nella patogenesi della malattia sia implicato un processo vasculitico dei piccoli e medi vasi della parete aortica e del retroperitoneo. In particolare è ipotizzabile che il processo vasculitico dei *vasa vasorum* aortici, espandendosi in senso centrifugo, possa andare a stimolare la flogosi a livello dell'avventizia che porta poi alla reazione fibro-infiammatoria del retroperitoneo [11].

Questa teoria è anche supportata dall'analogia istologica tra la FR e alcune vasculiti dei grandi vasi, come l'arterite giganto-cellulare (GCA) e la arterite di Takayasu

(TA). Infatti, analogamente alle vasculiti dei grandi vasi, nella FR si riscontra frequentemente la flogosi dei vasa vasorum dell'avventizia aortica e dei piccoli vasi retroperitoneali periaortici. Inoltre in alcuni pazienti il processo infiammatorio vascolare non è solo localizzato a livello dell'aorta addominale e delle arterie iliache comuni ma può coinvolgere l'aorta toracica e le sue branche, analogamente a quanto avviene nella GCA [10] e nella TA [34].

Un'ulteriore teoria recentemente sviluppata vede la FR come una delle manifestazioni cliniche della malattia sistemica IgG4-correlata (*IgG4-related disease*, IgG4-RD). La IgG4-RD è caratterizzata da elevati livelli di IgG4 nel siero e dalla presenza in vari organi di plasmacellule IgG4⁺ nel contesto di un'intensa reazione fibrotica. Nel 2002 uno studio su tre pazienti affetti da FRI, mostrava elevati livelli di IgG4 nel siero dei pazienti e la presenza di plasmacellule IgG4⁺ nelle biopsie effettuate a livello retroperitoneale e pancreatico [35].

Ad oggi, si sta valutando se i soggetti affetti da FR con elevati livelli di IgG4 nel plasma (FR IgG4-correlata), presentino un diverso andamento della patologia rispetto ai pazienti con livelli normali di IgG4 (FR non IgG4-correlata). La FR IgG4-correlata si contraddistingue per il coinvolgimento sistemico o multisistemico a livello pancreatico, tiroideo o delle ghiandole salivari, e per una miglior responsività alla terapia steroidea [36].

Caratteristiche genetiche della FRI

Le piattaforme di genotipizzazione di nuova generazione hanno permesso di poter studiare ampie porzioni del genoma con una drastica riduzione dei costi e dei tempi di analisi rispetto alle tecniche classiche di genetica molecolare. Queste tipologie di

analisi genetiche hanno permesso di identificare marcatori molecolari di suscettibilità ad un grande numero di patologie, sia monogeniche e complesse, dal momento che sono in grado di identificare la presenza di loci-malattia anche per quelle patologie per le quali la caratterizzazione clinica non permette un chiaro collegamento con il gene che la causa. Per questo, negli ultimi anni, studi di associazione che vedono coinvolte coorti molto ampie di pazienti sono stati utilizzati per cercare di identificare le varianti genetiche coinvolte nella suscettibilità allo sviluppo di alcune patologie rare e complesse.

Lo studio degli aspetti genetici della FR risulta particolarmente difficoltoso per due ragioni: in primo luogo la rarità della patologia rende complesso l'allestimento di coorti numericamente significative. In secondo luogo per la mancanza quasi totale di casi familiari, che potrebbero aiutare ad identificare alleli-malattia che segregano negli affetti della famiglia. [37, 38]. Per questi motivi sono noti in letteratura solo un esiguo numero di lavori che abbiano indagato le basi genetiche della FR.

Alcuni studi hanno dimostrato come varianti genetiche dei geni HLA (*Human Leucocyte Antigen*) possano ricoprire un ruolo di primo piano nella suscettibilità alla FR: in particolare, uno studio caso-controllo ha messo in luce l'evidente prevalenza degli alleli *HLA-DRB1*03* e *HLA-B*08* nei pazienti affetti da FR, rispetto ai controlli. I loci HLA sono chiamati in causa anche in numerose altre malattie di origine autoimmune, come ad esempio il diabete mellito tipo 1, il lupus eritematoso sistemico (LES), la tiroidite autoimmune e la miastenia grave, suggerendo l'ipotesi di un background patogenetico comune [39].

Nel 2012 è stata inoltre evidenziata un'associazione tra l'aplotipo TTCCAT del gene *CCL11* e la FRI (p -value = 0.0005) in una ricerca comprendente 142 soggetti affetti e 214 controlli [40].

Associazioni con malattie autoimmuni

Fin dalle prime caratterizzazioni la FR è stata descritta in associazione con diversi tipi di malattie autoimmuni o infiammatorie. Sebbene la frequenza di queste associazioni non sia tuttora nota, i più frequenti reports mostrano casi di FRI in pazienti affetti da vasculiti sistemiche ANCA-positive, come la Granulomatosi con Poliangeite (GPA) [41, 42]. In uno studio condotto su 49 pazienti con FR [43], cinque (10.2%) presentavano una forma di artrite infiammatoria, nella maggior parte dei casi un'artrite reumatoide sieropositiva. Tra le malattie reumatiche, frequenti sono le associazioni anche con la spondilite anchilosante [44]. Esistono inoltre segnalazioni di associazione con il LES, con le uveiti, con la psoriasi [45].

Trattamento

Il trattamento della FR mira a risolvere, qualora presenti, le complicanze ostruttive ureterali, ed inoltre a indurre una regressione della massa retroperitoneale. L'ostruzione ureterale è di solito trattata con il posizionamento di tubi nefrostomici o *stent* pielo-vescicali o, nei casi più severi o refrattari alla terapia medica, con ureterolisi chirurgica [14]. Una volta derivata l'ostruzione ureterale viene generalmente intrapresa la terapia farmacologica.

La terapia medica della FR si basa sull'uso di corticosteroidi, farmaci in grado di indurre una rapida remissione dei sintomi e della massa retroperitoneale. La terapia

steroidica è intrapresa in genere con dosi di prednisone intorno a 1 mg/kg/die o dosi equivalenti di altri glucocorticoidi [14]; la durata del trattamento è in genere non inferiore ai 9-12 mesi. In un recente *trial* randomizzato l'efficacia del prednisone è stata confrontata con quella del tamoxifen, altro farmaco frequentemente utilizzato nel trattamento della FR; il prednisone si è dimostrato superiore al tamoxifen nell'indurre durature remissioni della FR, ed una più marcata regressione volumetrica della massa. Nonostante ciò, nel *follow-up* post-trattamento (mediana 57 mesi nel braccio prednisone), circa un terzo dei pazienti sviluppava recidive di malattia [13].

Altre opzioni terapeutiche vedono un'associazione tra corticosteroidi ed immunosoppressori, quali azatioprina, methotrexate, e micofenolato mofetil. In particolare, quest'ultimo sembra di particolare efficacia: in un recente studio prospettico non randomizzato condotto su 28 pazienti con FR, l'associazione tra micofenolato mofetil e prednisone si è mostrata efficace e ben tollerata, e con un basso tasso di recidiva (circa 10%) dopo la sospensione del trattamento [24].

1.2 LOCUS HLA ED AUTOIMMUNITA'

Il locus HLA è costituito dall'insieme dei geni, i quali mappano sul braccio piccolo del cromosoma 6 (6p21.1-p21.3) che codificano per proteine situate sulla superficie delle cellule che sono responsabili della regolazione del sistema immunitario nell'uomo [46].

I geni HLA sono il corrispettivo nell'uomo dei geni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) che si trovano nella maggior parte dei vertebrati e costituiscono elementi essenziali per la funzione immunitaria. Il sistema HLA è

formato da oltre 200 geni ed è caratterizzato da elevato polimorfismo in quanto esistono numerose forme alleliche per ogni gene [47].

Inoltre gli alleli sono caratterizzati da codominanza, in quanto in ogni individuo sono espressi i prodotti di entrambi gli alleli (di origine materna e paterna).

Le proteine codificate dai geni del complesso HLA sono suddivise in 3 classi a seconda della loro funzione:

- Le molecole HLA di classe I, denominate A, B, e C sono presenti su tutte le cellule nucleate ed hanno la funzione di presentare peptidi intracellulari (ad esempio frammenti di proteine virali) sulla superficie della cellula stessa, in modo che la cellula possa essere riconosciuta e distrutta dal sistema immunitario ed in particolare dalle cellule CD8+. Questi peptidi lunghi circa 9 amminoacidi sono prodotti da proteine digerite che sono decomposte nei proteasomi [48].
- Le molecole HLA di classe II, denominate DP, DM, DOA, DOB, DQ e DR, sono espresse sulla membrana delle cellule che presentano l'antigene (APC) ed hanno il compito di presentare antigeni esogeni ai linfociti T. Questi antigeni particolari stimolano la moltiplicazione di cellule T-helper, che a loro volta inducono i linfociti B a produrre anticorpi contro questo antigene specifico [49].
- La regione HLA di classe III contiene 12 geni che codificano per proteine non correlate all'immunità cellulo mediata ma modulano e regolano la risposta immune ad esempio tramite il Tumor Necrosis factor (TNF) e le proteine del complemento C2 e C4.

I geni del locus HLA mappano in posizioni molto vicine tra loro sul cromosoma 6. Nonostante possa verificarsi un fenomeno di ricombinazione anche nella regione HLA (*crossing-over*), molti alleli tendono ad essere ereditati insieme con frequenza maggiore rispetto a quanto è atteso casualmente, dando vita al fenomeno noto come linkage-disequilibrium [50].

Negli ultimi anni è stato ampiamente dimostrato da numerosi studi come alcuni alleli HLA siano associati allo sviluppo di numerose patologie autoimmuni-infiammatorie [51, 52].

Si tratta in genere di malattie a decorso sub-acuto o cronico, multifattoriali, al cui determinismo cioè concorrono fattori ereditari e fattori ambientali. Ad oggi, resta poco chiaro se gli alleli HLA associati con malattia siano i reali responsabili del fenotipo patologico, o se il loro ruolo sia indiretto, e se l'associazione con queste malattie sia quindi determinata da uno stretto linkage-disequilibrium con la variante genetica causativa, che può mappare internamente o esternamente rispetto al locus HLA.

Alcuni esempi di malattie associate ad HLA sono Diabete di tipo 1 (*HLA-DR3, DR4, DQ8*), celiachia (*HLA-DQ2, DQ8*), lupus eritematoso sistemico (*HLA-DR3, HLA-DR2*), sclerosi multipla ed artrite reumatoide (*HLA-DRB1*) [53, 54, 55, 56, 57].

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo scopo principale di questo lavoro è stato valutare le associazioni che intercorrono tra le varianti genetiche e suscettibilità alla FR. In particolare, le varianti testate in questo studio mappano a livello del locus HLA e di altri geni implicati nei processi immunitari.

La scelta di testare geni legati all'immunità è basata sull'osservazione di frequenti associazioni tra FR e patologie autoimmunitarie, tra cui le vasculiti e l'artrite reumatoide. Inoltre, precedenti studi hanno mostrato un'associazione tra la FR e specifici alleli dei geni HLA, in particolare con *HLA-DRB1*03*, seppure su coorti di pazienti numericamente piccole.

Per questo studio è stata effettuata la genotipizzazione di marcatori polimorfici del DNA utilizzando un modello di studio caso-controllo, per valutare e confrontare le frequenze alleliche delle varianti genetiche in pazienti e controlli.

Gli obiettivi principali dello studio sono quindi:

- Individuazione di marcatori genetici associati con la FR, fornendo nuove conoscenze sull'eziologia di questa malattia complessa.
- In base alla componente molecolare, studiare il ruolo degli amminoacidi coinvolti, al fine di comprendere le modificazioni strutturali e funzionali delle proteine interessate per individuare i meccanismi patogenetici alla base della FR.
- Evidenziare eventuali differenze molecolari che intercorrono tra le forme di FR, in particolare tra fibrosi retroperitoneale idiopatica (FRI) e

perianeurismatica (FRP), e tra le forme caratterizzate da normali ed alti livelli di IgG4.

Riguardo i marcatori molecolari, sono stati studiati in larga parte i polimorfismi singolo Nucleotide (SNPs), che consistono in variazioni a livello di una sequenza di acidi nucleici che si presenta tra individui della stessa specie, caratterizzata da una differenza a carico di un singolo nucleotide.

Gli SNPs costituiscono il 90% di tutte le variazioni genetiche umane. SNPs con minor frequenza allelica pari a circa $\geq 1\%$ sono presenti ogni circa 100-300 paia di basi lungo l'intero genoma. Lo studio degli SNPs è molto utile poiché variazioni anche di singoli nucleotidi possono influenzare lo sviluppo delle patologie, la risposta ai patogeni, agli agenti chimici ed ai farmaci. Per tale motivo gli SNPs possono avere una grande importanza nella suscettibilità alle malattie, in quanto si possono considerare fattori predisponenti per il loro sviluppo. In particolare, questo accade nel caso di malattie complesse, come la FR, in cui il background genetico e l'esposizione ambientale ad un determinato agente possono innescare lo sviluppo della patologia.

3. PAZIENTI E METODI

Pazienti e controlli

Nello studio sono stati inclusi un totale di 302 pazienti affetti da FR e 2,443 controlli da due coorti europee indipendenti. I soggetti italiani (251 casi e 1,270 controlli) sono stati reclutati nel periodo 2005-2017 dall'Unità Operativa di Nefrologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, che costituisce il centro di riferimento italiano per lo studio di questa malattia, alla quale sono afferiti soggetti affetti da diversi centri del nord Italia. Le principali caratteristiche cliniche dei pazienti FR inclusi nello studio è riportata in Tabella 1.

<i>Età media (+/- SD)</i>		58.7 +/- 10.7
<i>F: n (%)</i>		128 (42.6)
<i>Tipo di FR: n (%)</i>	Idiopatica	241 (79.8)
	Perianeurismatica	61 (20.2)
<i>Localizzazione: n (%)</i>	Tipica (peri-aortoiliaca/pericavale)	241 (79.8)
	Atipica (pelvica/peripancreatica)	61 (20.2)
<i>Coinvolgimento vasi toracici: n (%)</i>		67 (22.1)
<i>Ostruzione uretrale: n (%)</i>		202 (66.9)
<i>Alti livelli di IgG4: n (%)</i>		78 (25.7)
<i>Biopsia retroperitoneale: n (%)</i>		108 (35.8)

Tabella 1: principali caratteristiche cliniche dei pazienti con FR inclusi nello studio.

Tutti i centri partecipanti hanno inviato in ghiaccio secco le provette di sangue periferico in EDTA (circa 5ml ognuno) all'Unità di Genetica Medica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma (Dipartimento di Medicina e Chirurgia). Le provette di sangue sono state conservate a -80°C fino al processamento.

La seconda coorte indipendente, di origine olandese, comprende 51 casi e 1,173 controlli. Lo studio è stato sottoposto ed approvato dal comitato etico per la provincia di Parma.

Estrazione DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue periferico trattato con EDTA (3ml di sangue per ogni soggetto studiato), utilizzando il kit commerciale QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Valencia, CA, USA) e conservato a -20°C fino all'utilizzo.

Misurazione della concentrazione del DNA

Per ogni campione di DNA è stata misurata la concentrazione mediante Nanodrop (NP1000, Thermo Lab); si tratta di uno spettrofotometro, che consente la misurazione della concentrazione degli acidi nucleici e proteine a partire da volumi molto piccoli di campione (1µl) e senza l'utilizzo di cuvette.

ImmunoChip: overview, vantaggi e limiti

La piattaforma utilizzata per l'analisi genetica è stata Illumina Infinium ImmunoArray-24 v.2 BeadChip Kit (ImmunoChip). ImmunoChip è una piattaforma di tipizzazione molecolare che contiene i saggi per l'analisi contemporanea di

196.524 varianti genetiche (718 inserzioni/delezioni di piccole dimensioni e 195.806 polimorfismi di singolo nucleotide), distribuite in tutto il genoma, appartenenti ai loci implicati nel sistema immunitario con particolare riferimento al locus HLA.

ImmunoChip offre una densa copertura di 186 loci genomici e contiene inoltre saggi per la tipizzazione di polimorfismi risultati associati a 11 malattie a carattere autoimmune-infiammatorio.

Uno dei vantaggi di ImmunoChip è il basso costo di analisi, circa il 10% rispetto ad una classica analisi genome-wide, ed il rapporto costo/varianti analizzate per campione risulta molto buono rispetto ad altri saggi. L'analisi genome-wide è estesa a tutto il genoma ed il numero di varianti identificato per soggetto è significativamente più alto rispetto a ImmunoChip. Gli studi genome-wide association studies (GWAS) identificano un numero di varianti molto elevato e per questo è richiesto un alto numero di soggetti da testare. Per lo studio delle malattie rare immuno-mediate, in cui risulta difficile costituire coorti di pazienti ampie, l'approccio mediante ImmunoChip può risultare più idoneo, dal momento che esamina un numero di varianti più limitato rispetto ad un genome-wide.

Nonostante i numerosi vantaggi, ImmunoChip possiede dei limiti:

- La piattaforma è focalizzata sull'individuazione di SNPs ma non sull'identificazione di varianti strutturali del genoma.
- Il chip non analizza tutto il genoma ma solo geni prestabiliti che sono implicati nei processi immunitari. In questo modo, le varianti genetiche di geni non compresi nella piattaforma ImmunoChip non vengono identificate. Inoltre le varianti associate con patologia identificate mediante ImmunoChip,

potrebbero essere in realtà frutto di linkage-disequilibrium con la variante che causa malattia, non compresa nel pannello genico.

- Circa il 10% degli SNP analizzati mediante ImmunoChip fallisce la tipizzazione molecolare. La costruzione di primers che riescano a discriminare specificatamente un allele rispetto ad un altro risulta estremamente difficile, sia per l'alto polimorfismo di queste regioni (che può determinare un mancato annealing delle probes e quindi il fallimento del saggio), sia per l'elevata omologia di sequenza che intercorre tra questi geni.
- Il design della piattaforma ImmunoChip è basato sull'identificazione di SNPs caratteristici di individui di origine europea; le varianti genetiche presenti in popolazioni di origine non europea sono poco rappresentate in questa piattaforma.
- Con l'avvento dei sequenziatori di nuova generazione, che producono grandi quantità di dati genetici in coorti molto ampie, molto spesso vengono identificati nuovi loci genetici associati con specifici fenotipi clinici. Essendo ImmunoChip disegnato e costruito nel 2015, esso non comprende le varianti genetiche associate a fenotipi autoimmuni-infiammatori identificate negli ultimi due anni e necessita quindi di progressivi aggiornamenti.

Genotipizzazione molecolare

La metodica richiede un quantitativo iniziale di DNA genomico pari a 200 ng. Il DNA viene successivamente denaturato ed amplificato isotermicamente in uno step overnight. Mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione, il DNA amplificato viene frammentato in siti specifici, riconosciuti dagli enzimi di restrizione.

I frammenti di DNA così ottenuti vengono raccolti mediante precipitazione con isopropanolo e centrifugazione refrigerata (4°C) ed in seguito risospesi e reidratati mediante l'utilizzo di un buffer. Il DNA così preparato viene fatto ibridare al BeadChip, mediante una incubazione overnight all'interno di un termostato a temperatura controllata. Con un successivo lavaggio, vengono eliminate le molecole di DNA in eccesso che non si sono ibridate. Il BeadChip è costituito da un supporto in plastica, o vetro, in cui sono presenti circa 1.000.000 di micropozzetti in cui sono alloggiati altrettante biglie di silice. Ogni biglia rappresenta una variante genetica ed ha adese 2 sonde oligonucleotidiche di 50bp complementari alla regione di DNA in cui mappa lo SNP da tipizzare. I frammenti di DNA precedentemente preparati vanno ad ibridarsi a livello di queste sonde e avviene una reazione di amplificazione in cui vengono aggiunti i nucleotidi complementari al DNA stampo. I nucleotidi sono marcati con un prodotto fluorescente e ogni volta che un nucleotide viene incorporato viene emesso un segnale fluorescente, diverso tra le due forme alleliche che costituiscono lo SNP. L'intensità della fluorescenza viene misurata per ogni allele di ogni SNP ed in base ad essa viene assegnato il genotipo corretto.

L'intensità di fluorescenza per ogni allele viene prodotta e misurata mediante HiScan (Illumina) che utilizza un laser per eccitare i fluorofori ibridati ai nucleotidi che vengono aggiunti nella reazione di amplificazione. Successivamente, lo scanner rileva con un livello di risoluzione molto alto l'intensità della fluorescenza emessa per ogni Bead.

Le fluorescenze emesse sono valutate mediante il software *Illumina Genome Studio* che rielabora i dati emessi da HiScan determinando il genotipo per ogni SNP.

Analisi statistica

Per l'imputazione degli SNPs, degli alleli classici HLA e degli amminoacidi polimorfici appartenenti alla regione del complesso maggiore di istocompatibilità, è stato utilizzato il metodo SNP2HLA con il pacchetto software Beagle e un pannello di riferimento costituito dal Type 1 Diabetes Genetics Consortium che comprende i dati genetici di 5,225 individui di origine europea.

Le analisi di associazione sono state effettuate mediante PLINK v.1.7 ed il software R. PLINK è un insieme di strumenti open-source per gli studi di associazione, che permettono lo studio di grandi dataset di genotipi e fenotipi. PLINK è stato sviluppato nel 2007 per rispondere alla necessità di analizzare grandi volumi di dati provenienti dai microarray SNP. Inizialmente ogni associazione caso/controllo è stata analizzata indipendentemente mediante regressione logistica.

Al fine di rilevare specifiche associazioni con le caratteristiche cliniche più rilevanti della FR, i pazienti sono stati stratificati a seconda della forma della malattia (FRI vs FRP) e di altre caratteristiche cliniche fondamentali (presenza o assenza di coinvolgimento dei vasi toracici, di ostruzione ureterale e di alto livello sierico di IgG4).

Per individuare gli amminoacidi possibilmente rilevanti per la suscettibilità alla malattia è stato utilizzato un test omnibus [58].

Considerando che Immunochip è basato su una densa genotipizzazione di un alto numero di loci-malattia, è stata stabilita una appropriata threshold statistica basata sulla correzione di Bonferroni per test multipli utilizzando il software Genetic type error calculator (GEC) [59] il quale permette di calcolare il numero effettivo di test

indipendenti. Mediante ciò è stata ottenuta una soglia di significatività di 8.04×10^{-7} ed i valori di p inferiori a questa threshold sono stati considerati significativi.

Per calcolare il potere statistico dello studio è stato utilizzato il software CaTS Power Calculator for Genetic Studies [60].

Il presunto effetto regolatorio delle varianti associate, così come quello relativo alle varianti in linkage-disequilibrium con esse ($r^2 > 0.8$), è stato indagato usando Haploreg v4.1, uno strumento che include dati di funzionalità relativi ai progetti Roadmap Epigenomics (www.roadmapepigenomics.org/) ed ENCODE (www.encodeproject.org/).

Haploreg v4.1 contiene anche dati relativi ai progetti GTEx (www.gtexportal.org) e Geuvadis (www.geuvadis.org) relativi ai expression quantitative traits locus (eQTL).

Imputazione e meta-analisi negli studi GWAS

Gli studi genetici effettuati con tecniche di analisi di nuova generazione, come i GWAS, hanno portato i ricercatori a condividere e combinare informazioni genetiche provenienti da diversi studi al fine di individuare nuovi geni di suscettibilità per le malattie complesse. Per poter combinare i dati genetici è necessario che gli studi GWAS siano stati condotti utilizzando piattaforme che prendano in considerazione le stesse varianti genetiche e questo non è spesso realizzabile. Tramite tecniche di imputazione è possibile cercare di predire le frequenze genotipiche per i marcatori non direttamente analizzati e condurre su questi l'analisi di associazione.

La *genotype imputation* risulta quindi molto utile per rendere paragonabili studi GWAS condotti utilizzando piattaforme che utilizzano diversi set di SNP e permette

quindi di valutare l'associazione del fenotipo con marcatori genetici non direttamente caratterizzati nello studio.

Una procedura di imputazione consente in definitiva di stimare il genotipo di ogni individuo per un determinato marcatore non caratterizzato, sfruttando le informazioni dei marcatori caratterizzati ed adiacenti.

Per l'imputazione di uno SNP viene generalmente sfruttato il parametro genetico definito linkage-disequilibrium che indica la presenza di associazione statistica tra specifici alleli relativi a due o più loci, che costituiscono di solito un particolare aplotipo ancestrale.

L'imputazione è particolarmente utilizzata per la combinazione di informazioni genetiche provenienti da differenti GWAS nella costituzione di una meta-analisi. Le meta-analisi dei GWAS hanno lo scopo di combinare il supporto statistico dei diversi GWAS per caratterizzare l'associazione genotipo-fenotipo. Tramite le meta-analisi è possibile identificare nuove associazioni non riportate dai singoli studi e determinare con maggior precisione l'effetto del fattore genetico sul fenotipo.

4. RISULTATI

Dopo aver scartato le alterazioni genetiche caratterizzate da bassa qualità, sono state identificate 403,081 varianti genetiche in 302 pazienti con FR e 2,443 controlli.

Associazioni HLA

Come mostrato in Figura 2, solo nella regione HLA sono state identificate varianti genetiche associate alla malattia con un livello di significatività stabilito per gli studi genome-wide (8.04×10^{-7}).

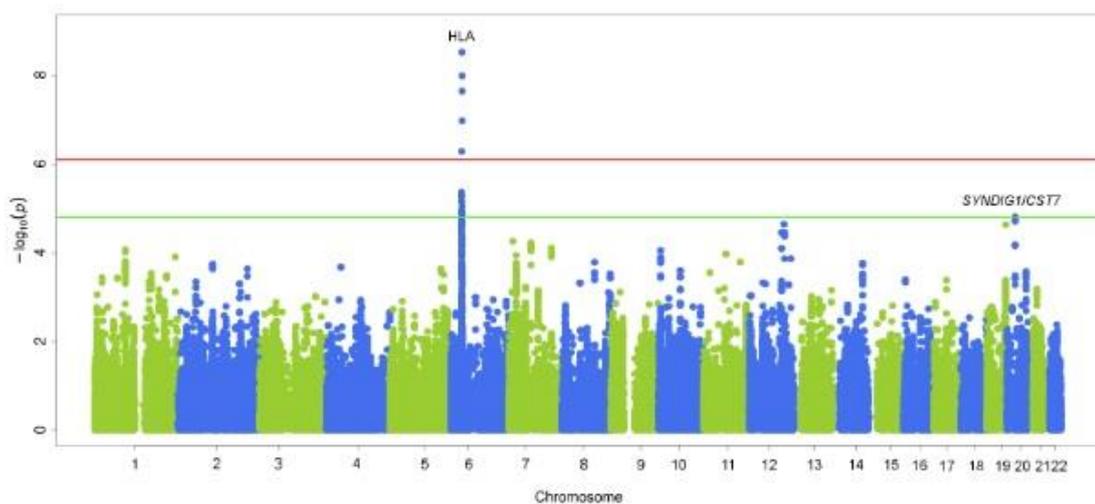


Figura 2: *Manhattan plot* relativo al totale delle varianti genetiche identificate con Immunochip. La threshold rossa corrisponde alla soglia di significatività genome-wide.

Il segnale più significativo è stato riscontrato negli alleli *HLA-DQB1**0201 ($p=2.62 \times 10^{-14}$, OR [95% CI]=2.44 [1.94-3.07]) e *HLA-DRB1**0301 ($p=8.25 \times 10^{-14}$, OR [95% CI]=2.45 [1.93-3.09]). Questi due geni sono caratterizzati da un Linkage-Disequilibrium quasi completo ($r^2=0.96$) (Figura 3A).

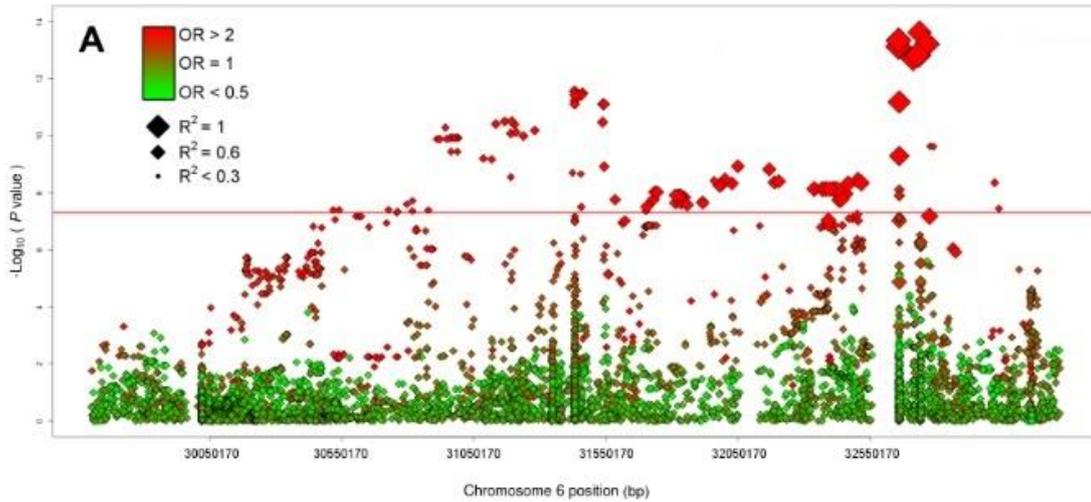


Figura 3A: *Manhattan plot* delle varianti genetiche individuate nel locus HLA; i quadrati rossi, in alto a destra rispetto alla figura, rappresentano i due alleli maggiormente associati (*HLA-DRB1**0301 e *HLA-DQB1**0201).

In aggiunta, numerosi SNPs in LD con *HLA-DRB1**0301 sono risultati associati alla FR, con livelli di significatività simili a quelli dell'allele classico *HLA-DRB1**0301, in particolare: rs2856674 ($p=6.75E^{-14}$, OR [95% CI]=2.45 [1.94-3.10]), rs3129716 ($p=6.75E^{-14}$, OR [95% CI]=2.45 [1.94-3.10]), rs2854275 ($p=1.65E^{-13}$, OR [95% CI]=2.42 [1.91-3.06]) ed rs9273327 ($p=1.65E^{-13}$, OR [95% CI]=2.42 [1.91-3.06]) che mappano sul gene *HLA-DQB1*; rs2187668 ($p=2.14E^{-13}$, OR [95% CI]=2.42 [1.91-3.05]) e rs2284189 ($p=2.14E^{-13}$, OR [95% CI]=2.42 [1.91-3.05]) del gene *HLA-DQA1*, rs1059615 ($p=8.25E^{-14}$, OR [95% CI]=2.45 [1.93-3.09]) a livello del gene *HLA-DRB1* ed altre 3 varianti, sempre appartenenti al gene *HLA-DRB1* in posizione genomica 32,659,917 ($p=5.02E^{-14}$, OR [95% CI]=2.46 [1.95-3.11]), 32,659,926 ($p=5.02E^{-14}$, OR [95% CI]=2.46 [1.95-3.11]) e 32657541 ($p=8.25E^{-14}$, OR [95% CI]=2.45 [1.93-3.09]). I valori di associazione sono riportati in Tabella 2.

		MAF							
		Italia		Olanda		META-ANALISI (non condizionata)		META ANALISI (condizionata)	
Variante	r2 con <i>DRBI*0301</i>	FR	HC	FR	HC	<i>p</i> -value	OR [95% CI]	<i>p</i> -value	
Alleli classici									
<i>HLA-DQB1*0201</i>	0,96	0,20	0,08	0,24	0,15	2,62E ⁻¹⁴	2,44 [1,94-3,07]	0,107	
<i>HLA-DRBI*03</i>	-	0,19	0,08	0,24	0,15	5,02E ⁻¹⁴	2,46 [1,95-3,11]	-	
<i>HLA-DRBI*0301</i>	-	0,19	0,08	0,24	0,15	8,25E ⁻¹⁴	2,45 [1,93-3,09]	-	
<i>HLA-B*08</i>	0,43	0,11	0,04	0,27	0,15	2,74E ⁻¹²	2,62 [2,00-3,43]	4,28E ⁻³	
<i>HLA-B*0801</i>	0,43	0,11	0,04	0,27	0,15	2,74E ⁻¹²	2,62 [2,00-3,43]	4,28E ⁻³	
Amminoacidi									
<i>HLA-DRBI Arg74</i>	1	0,19	0,08	0,24	0,15	5,02E ⁻¹⁴	2,46[1,95-3,11]	-	
<i>HLA-DRBI Asn77</i>	1	0,19	0,08	0,24	0,15	5,02E ⁻¹⁴	2,46 [1,95-3,11]	-	
<i>HLA-B Asp9</i>	0,43	0,11	0,04	0,27	0,15	3,77E ⁻¹²	2,60 [1,99-3,41]	4,93E ⁻⁰³	
<i>HLA-DRBI Tyr26</i>	0,91	0,19	0,08	0,24	0,17	6,53E ⁻¹²	2,24 [1,78-2,81]	0,223	
<i>HLA-DRBI Asn37</i>	0,43	0,28	0,17	0,39	0,32	1,26E ⁻⁰⁸	1,74 [1,44-2,11]	0,352	
SNPs									
SNP <i>DRBI</i> 32659917	1	0,19	0,08	0,24	0,15	5,02E ⁻¹⁴	2,46 [1,95-3,11]	-	
SNP <i>DRBI</i> 32659926	1	0,19	0,08	0,24	0,15	5,02E ⁻¹⁴	2,46 [1,95-3,11]	-	
rs2856674	0,99	0,19	0,08	0,24	0,15	6,75E ⁻¹⁴	2,45 [1,94-3,10]	-	
rs3129716	0,99	0,19	0,08	0,24	0,15	6,75E ⁻¹⁴	2,45 [1,94-3,10]	-	
rs1059615	1	0,19	0,08	0,24	0,15	8,25E ⁻¹⁴	2,45 [1,94-3,10]	-	
<i>DRBI</i> 32657541	1	0,19	0,08	0,24	0,15	8,25E ⁻¹⁴	2,45 [1,94-3,10]	-	
rs2854275	1	0,18	0,08	0,24	0,15	1,65E ⁻¹³	2,42 [1,91-3,06]	-	
rs9273327	1	0,18	0,08	0,24	0,15	1,65E ⁻¹³	2,42 [1,91-3,06]	-	

rs2187668	0,99	0,18	0,08	0,24	0,15	2,14E ⁻¹³	2,42 [1,91-3,06]	-
rs2284189	0,99	0,18	0,08	0,24	0,15	2,14E ⁻¹³	2,42 [1,91-3,06]	-

Tabella 2: Alleli HLA, Varianti amminoacidiche e SNP associati alla FR. *Legenda:* MAF: Frequenza allele minore; HC: controlli sani; OR:Odds ratio.

Al fine di valutare in maniera più approfondita l'associazione delle varianti genetiche che non si trovano in LD con *HLA-DRB1*03*, è stata effettuata un'analisi statistica definita *condizionata*, in cui non sono state prese in considerazione le varianti in stretto LD con questo allele. Come mostrato in Figura 3B, da questa analisi non sono emersi risultati statisticamente significativi (considerando la soglia genome-wide), confermando come l'allele *HLA-DRB1*03* possa considerarsi come la principale variante genetica associata alla FR.

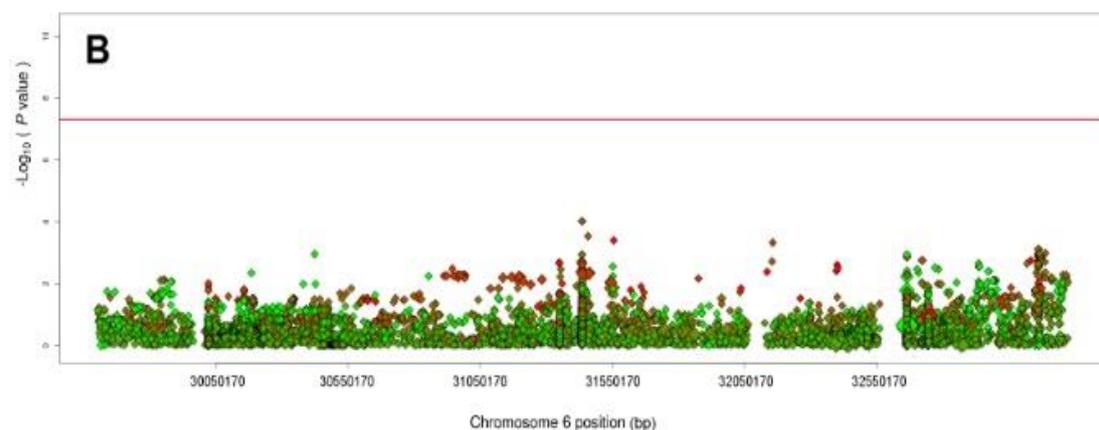


Figura 3B: Manhattan plot (condizionato su *HLA-DRB1*0301*) delle varianti genetiche individuate nel locus HLA.

Successivamente, è stata presa in considerazione la sequenza della proteina HLA-DR β per determinare mediante un test omnibus il contributo dato dai codoni

amminoacidici mutati nello sviluppo della FR. Dall'analisi statistica, le posizioni amminoacidiche 77 e 74 della molecola HLA-DR β appaiono i fattori di rischio maggiormente rilevanti ($p=3.68E^{-13}$ e $p=8.45E^{-13}$, rispettivamente). Tutte le rimanenti posizioni amminoacidiche risultate associate, sono legate alla presenza di linkage con HLA-DR β 77 e 74.

Ponendo l'attenzione sui residui interessati, in posizione 77 sono presenti due varianti amminoacidiche, una treonina (Thr) ed un'asparagina (Asn), mentre la posizione 74 ne ospita cinque, arginina (Arg), Alanina (Ala), Leucina (Leu), Acido glutammico (Glu) e glutammina (Gln). I residui Asn77 e Arg74, in completo linkage tra loro, risultano essere associati alla FR ($p=5.02E^{-14}$, OR [95% CI]=2.46 [1.95-3.11]) (Figura 4).

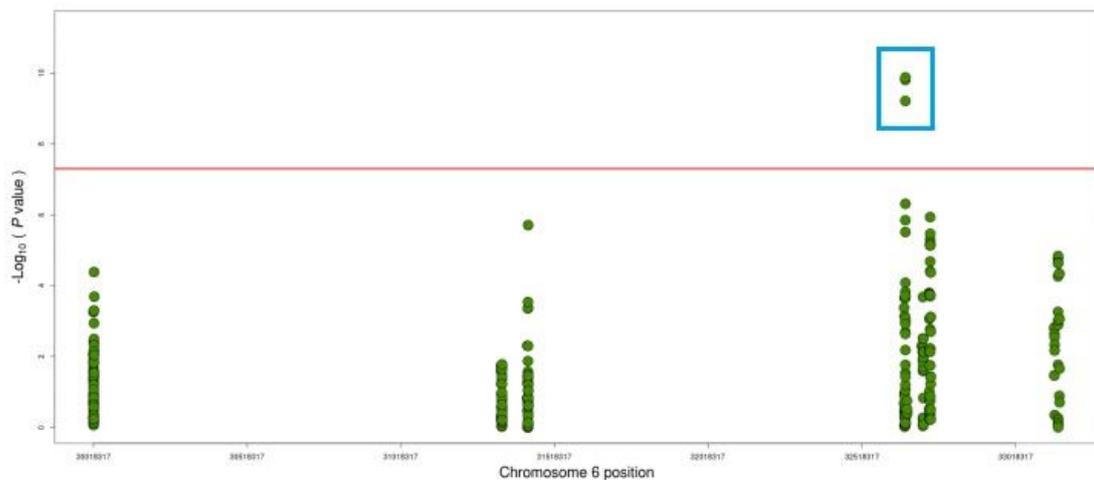


Figura 4: Residui associati con la FR. Il riquadro azzurro mostra gli amminoacidi in posizione 74 e 77.

Dato che la presenza di questi residui è in completo linkage con *HLA-DRB1**0301 ($r^2=1$ ed *HLA-DRB1**0302 ($r^2=0.96$), il contributo statistico di queste varianti amminoacidiche risulta indistinguibile da quello fornito dall'allele *DRB1**03 (OR=2.46).

Associazioni non-HLA

Al di fuori della regione HLA, nessuna variante genetica ha raggiunto la soglia di significatività genome-wide. Tuttavia, potrebbe risultare di particolare interesse l'associazione con una variante genetica presente a livello del cromosoma 20. Questa alterazione genetica segnale è il polimorfismo rs386813511 ($p=1.57E^{-05}$, OR [95% CI]=1.49 [1.24-1.78]) che mappa in una regione genomica situata tra i geni *SYNDIG1* e *CST7* (Tabella 3).

Chr	SNP	Locus	MAF		MAF		<i>p</i> -value
			Italia	Olanda	META-ANALISI		
			FR	HC	FR	HC	
20	rs386813511	<i>SYNDIG1/CST7</i>	0,37	0,27	0,42	0,36	1,57E ⁻⁵

Tabella 3: locus non-HLA associato con la FR; Human Genome Variantion Society (HGVS) name: NC_000020.10: g.24773930_24773931delCAinsTG.

Il polimorfismo intronico rs386813511 è risultato avere una frequenza dell'allele minore (MAF) dello 0.42 nei pazienti affetti da FRI e 0.36 nei controlli.

Analisi sui subfenotipi

Infine, è stata effettuata una stratificazione dei pazienti, a seconda delle forme più rilevanti della FR e ricercata un'analisi genotipo-fenotipo per evidenziare eventuali differenze nel background genetico in questi gruppi di pazienti. Il confronto tra pazienti con FRP (n=61) e con FRI (n=241) ha evidenziato un'associazione significativa con il polimorfismo rs3846947 ($p=5.61E-06$, OR [95% CI]=0.30 [0.18-0.51]), mentre quello tra pazienti con alti (n=38) o normali (n=110) livelli di IgG4 ha

fatto emergere un'associazione con lo SNP rs56115289 ($p=1.28E-05$, OR [95% CI]=43.51 [7.99-236.84]). Tuttavia, quando ognuno di questi gruppi è stato individualmente testato contro i controlli, non sono state evidenziate specifiche associazioni (Tabella 4).

META-ANALISI				
SNP	HGVS	Fenotipi comparati	<i>p</i> -value	OR [95%CI]
rs3846947	g.15066724T>C	FRP vs FRI	5,61E ⁻⁰⁶	0,30 [0,18-0,51]
		FRP vs Controlli	1,48E ⁻⁰³	0,53 [0,35-0,78]
		FRI vs Controlli	0,013	1,28 [1,05-1,55]
rs56115289	g.43077520G>A	H IgG4 vs normal IgG4	1,28E ⁻⁰⁵	43,51 [7,99-236,84]
		H IgG4 vs Controlli	5,90E ⁻⁰³	2,28 [1,27-4,10]
		Normal IgG4 vs Controlli	2,20E ⁻⁰³	0,28 [0,12-0,63]

Tabella 4: Risultati della meta-analisi (Italia – Olanda) dopo stratificazione dei pazienti FR nelle forma Perianeurismatica (n=61), Idiopatica (n=241), con alti (n=38) o bassi (n=110) livelli di IgG4. Legenda: H IgG4: alti livelli di IgG4; FRP: fibrosi retroperitoneale perianeurismatica; FRI: fibrosi retroperitoneale idiopatica.

5. DISCUSSIONE

I recenti sviluppi delle tecnologie di analisi genetica di nuova generazione hanno determinato l'abbattimento dei tempi e dei costi per l'esecuzione delle indagini molecolari. [61]. Negli ultimi anni, la loro applicazione ha permesso l'identificazione di varianti genetiche associate con fenotipi patologici anche per patologie caratterizzate da un'alta eterogeneità genetica e fenotipica, per le quali il contributo molecolare era poco conosciuto e di difficile individuazione con le tecniche classiche di analisi. In particolare, queste tecniche hanno permesso di indagare il ruolo di SNPs, i quali possono contribuire a regolare la predisposizione a una determinata patologia [62].

I test in questione vengono denominati studi di associazione e si propongono di confrontare il background genetico tra soggetti sani (controlli), e soggetti affetti (casi) da una specifica patologia che ha base genetica; questi test si basano sull'individuazione di differenze in termini di frequenza allelica degli SNPs nei due gruppi [63].

I test di associazione possono prendere in considerazione tutti gli SNPs presenti nel genoma (Genome-wide association studies, GWAS) o quelli relativi a geni candidati. L'approccio nell'utilizzo dell'una o dell'altra tecnica è giustificato dalla dimensione campionaria relativa ai gruppi dei casi e dei controlli. In linea generale, tanto più grande è la quantità di varianti genetiche che si prende in considerazione, tanto maggiore dovrà essere la dimensione campionaria [64].

Per le malattie rare, come la FR, per le quali risulta difficoltoso costituire coorti di pazienti di ampie dimensioni, l'approccio a geni candidati costituisce un metodo

efficace. In primo luogo, il numero di varianti identificate risulta minore rispetto ad uno studio GWAS, consentendo di ottenere un potere statistico più solido. Inoltre, dato che nella FR i meccanismi autoimmunitari contribuiscono significativamente allo sviluppo della malattia, la probabilità di identificare varianti associate con la FR nei geni implicati in questi meccanismi risulta più alta rispetto ad altre regioni genomiche. A sostegno dell'ipotesi di un'origine autoimmune della FR vi è la frequente associazione con altre malattie autoimmuni e con l'*HLA-DRB1*03*, il frequente riscontro di positività autoanticorpali [65], ed alcuni dati istologici quali la presenza di fenomeni vasculitici e la formazione di aggregati linfoidi con centri germinativi [66].

Va inoltre sottolineato che in letteratura non esiste nessun riferimento alla presenza di casi familiari di FR, che sarebbe stata utile nell'individuazione di varianti genetiche segreganti nei membri affetti di una famiglia.

In questo studio, la piattaforma scelta per lo studio del background genetico della FR è l'ImmunoChip, che permette di discriminare circa 200.000 varianti genetiche comprese nel locus che codifica per l'HLA ed in altri geni implicati nei processi immunitari e di evidenziare l'eventuale contributo di altri SNPs trovati associati ad altre patologie di carattere infiammatorio-autoimmune.

Questo approccio ha permesso di identificare molteplici varianti associate con la FR, che mappano a livello del locus genico *HLA* situato sul braccio piccolo del cromosoma 6 dimostrando che il sistema HLA potrebbe ricoprire un ruolo importante nella suscettibilità alla FR; sono state infatti identificate associazioni con significatività genome-wide con alleli HLA di classe II, *HLA-DQB1*0201* ed *HLA-DRB1*0301* che potrebbero avere implicazioni patogenetiche nello sviluppo della

malattia. L'allele *HLA-DRB1*03* è ben conosciuto essere un marker genetico di autoimmunità: questo allele infatti è risultato associato in studi precedenti a numerose malattie autoimmuni, inclusi il lupus eritematoso sistemico, il diabete mellito di tipo 1 e la tiroidite autoimmune [67]. Molti meccanismi immunologici mediati dal sistema HLA possono contribuire allo sviluppo di una patologia autoimmunitaria. Il sistema HLA, infatti, svolge un ruolo cruciale nella selezione positiva e negativa dei linfociti T a livello del timo, e conseguentemente particolari tipi di queste molecole potrebbero selezionare cloni di cellule T self-reattivi, determinando una reazione autoimmune contro le molecole self degli individui predisposti [68, 69]. Un altro meccanismo potrebbe essere costituito da un legame preferenziale delle molecole HLA con autoantigeni, che vengono conseguentemente presentati a linfociti T autoreattivi [69]. Inoltre, è stato dimostrato che pazienti con particolari alleli HLA, come *HLA-DRB1*03* e *HLA-B*08* sono soggetti ad un aumento spontaneo della produzione di $TNF\alpha$, che costituisce un regolatore essenziale nella sintesi di numerose citochine e di molecole di adesione; questo potrebbe innescare la fase acuta della risposta immunitaria in un meccanismo antigene-indipendente [70].

Il confronto tra i pazienti con forma perianeurismatica (FRP) ed idiopatica (FRI) ha identificato un'associazione col polimorfismo rs3846947; in riferimento alle forme IgG4 correlate, il confronto tra i pazienti con livelli normali ed alti di questa classe anticorpale ha mostrato un'associazione con il polimorfismo rs56115289; questi dati inducono ad ipotizzare un'origine patogenetica non comune per queste quattro differenti manifestazioni cliniche della FR; quando l'analisi genetica è stata condotta

confrontando le frequenze alleliche nei suddetti sottogruppi clinici vs controlli sani, non è stata evidenziata alcuna associazione.

Il gene *HLA-DRB1* codifica per la proteina DR β 1 la quale ha la funzione di legare peptidi derivanti da antigeni che vengono sottoposti ad endocitosi da parte delle Cellule Presentanti l'Antigene (APC) le quali espongono i peptidi antigenici sulla loro superficie per il riconoscimento da parte delle cellule T CD4+ [49].

Questo studio ha dimostrato un'associazione significativa della FR con i residui amminoacidici 74 e 77 della proteina DR β 1, in stretto linkage-disequilibrium ($r^2=1$) con l'allele *HLA-DRB1**0301. Mediante una ricostruzione tridimensionale della proteina, è stato osservato che questi due amminoacidi (in particolare l'arginina in posizione 74) costituiscono il sito di legame con i peptidi antigenici; è quindi plausibile che alterazioni genetiche a livello delle triplette che codificano per gli amminoacidi nelle suddette posizioni, possano condizionare il legame tra la proteina DR β 1 e i peptidi antigenici presentati dalle APC ed è possibile che ciò possa risultare determinante nei processi patogenetici della malattia.

In riferimento all'unica variante non-HLA associata con la FR, rs386813511, essa mappa in una posizione intergenica tra *SYNDIG1* e *CST7*. Dato che lo SNP è all'interno di una regione non codificante, è stato valutato il suo potenziale ruolo regolatorio mediante l'utilizzo di un tool online pubblico (Haploreg v4.1). Haploreg v4.1 ha permesso di capire che questa variante mappa in loci genomici definiti "Expression quantitative trait loci" (eQTLs), sequenze del DNA che contribuiscono a determinare la variabilità dei livelli di espressione degli mRNAs nei tessuti [71].

Questa variante genetica potrebbe quindi incidere negativamente sui livelli di espressione del gene *CST7* nel sangue. *CST7* codifica per una proteina definita

Cistatina F, un inibitore della cisteina proteasi che svolge un ruolo cruciale nel funzionamento del sistema immunitario [72, 73].

In conclusione, questo studio dimostra numerose associazioni tra varianti genetiche del gene HLA e la FR, suggerendo che queste forme alleliche potrebbero avere un ruolo determinante nei processi patogenetici alla base di questa malattia. Studi di replica su altre popolazioni e su coorti più ampie di pazienti saranno necessari per validare i risultati di questo studio e per investigare la correlazione tra il profilo HLA ed i dati clinici derivanti dai pazienti.

Il fatto che le associazioni siano state individuate sia nella coorte di pazienti italiana che in quella olandese dimostra che tali varianti genetiche non sono da considerarsi popolazione-specifiche, ma che siano comuni marcatori di suscettibilità per la FR. Inoltre il forte legame tra la FR e la presenza dell'allele *HLA-DRB1*03*, considerato un allele strettamente associato a numerose condizioni autoimmuni, è a supporto dell'ipotesi che la FR potrebbe appartenere proprio a questa categoria di patologie.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Albarran J. Retention Renale Par Periurerite; liberation externe de l'uretere. Ass Fr Urol 1905; 9: 511.
2. Parums DV. The spectrum of chronic periaortitis. Histopathology. 1990; 16(5): 423-31.
3. Khosroshahi A, Stone JH. A clinical overview of IgG4-related systemic disease. Curr Opin Rheumatol. 2011; 23(1): 57-66.
4. Uibu T, Järvenpää R, Hakomäki J, et al. Asbestos-related pleural and lung fibrosis in patients with retroperitoneal fibrosis. Orphanet J Rare Dis. 2008; 13: 3-29.
5. Van Bommel EF, Jansen I, Hendriksz TR, Aarnoudse AL. Idiopathic retroperitoneal fibrosis: prospective evaluation of incidence and clinicoradiologic presentation. Medicine (Baltimore). 2009; 88(4): 193-201.
6. Miller OF, Smith LJ, Ferrara EX, et al. Presentation of idiopathic retroperitoneal fibrosis in the pediatric population. J Pediatr Surg. 2003; 38(11):1685-8.
7. Mitchinson MJ. The pathology of idiopathic retroperitoneal fibrosis. J Clin Pathol 1970; 23(8): 681-9.
8. Amiya E, Ishizaka N, Watanabe A, et al. Retroperitoneal fibrosis with periaortic and pericardial involvement. Circ J. 2005; 69(6): 760-2.

9. Corradi D, Maestri R, Palmisano A, et al. Idiopathic retroperitoneal fibrosis: clinicopathologic features and differential diagnosis. *Kidney Int.* 2007; 72(6): 742-53.
10. Martínez-Valle F, Solans-Laqué R, Bosch-Gil J, Vilardell-Tarrés M. Aortic involvement in giant cell arteritis. *Autoimmun Rev.* 2010; 9(7): 521-4.
11. Vaglio A, Salvarani C, Buzio C. Retroperitoneal fibrosis. *Lancet.* 2006; 367 (9506): 241-51.
12. Vaglio A, Palmisano A, Corradi D, et al. Retroperitoneal fibrosis: evolving concepts. *Rheum Dis Clin North Am.* 2007; 33(4): 803-17, vi-vii.
13. Vaglio A, Palmisano A, Alberici F, et al. Prednisone versus tamoxifen in patients with idiopathic retroperitoneal fibrosis: an open-label randomised controlled trial. *Lancet.* 2011; 378 (9788): 338-46.
14. Van Bommel EF, Siemes C, Hak LE, et al. Long-term renal and patient outcome in idiopathic retroperitoneal fibrosis treated with prednisone. *Am J Kidney Dis.* 2007; 49 (5): 615-25.
15. Mavragani CP, Voulgarelis M. Retroperitoneal fibrosis and c-ANCA positivity. *Clin Rheumatol.* 2007; 26(1): 115-6.
16. Oshiro H, Ebihara Y, Serizawa H, et al. Idiopathic retroperitoneal fibrosis associated with immunohematological abnormalities. *Am J Med.* 2005; 118(7): 782-6.

17. Moroni G, Del Papa N, Moronetti LM, et al. Increased levels of circulating endothelial cells in chronic periaortitis as a marker of active disease. *Kidney Int.* 2005; 68(2): 562-8.
18. Vaglio A, Corradi D, Manenti L, et al. Evidence of autoimmunity in chronic periaortitis: a prospective study. *Am J Med* 2003; 114: 454-462.
19. Sanai T, Hirakawa M, Yokoyama M, et al. Idiopathic retroperitoneal fibrosis associated with Hashimoto's thyroiditis: a long-term follow-up. *Clin Nephrol.* 2006; 66 (6): 476-8.
20. Fatourehchi MM, Hay ID, McIver B, et al. Invasive fibrous thyroiditis (Riedel thyroiditis): the Mayo Clinic experience, 1976-2008. *Thyroid.* 2011; 21 (7): 765-72.
21. Ovidiu B, Victor M, Florin R, et al. The management of primitive retroperitoneal tumors-problems of clinical, imaging diagnosis, and treatment. *J Med Life.* 2008; 1(3): 334-42.
22. Geoghegan T, Byrne AT, Benfayed W, et al. Imaging and intervention of retroperitoneal fibrosis. *Australas Radiol.* 2007; 51(1): 26-34.
23. Vaglio A, Versari A, Fraternali A, et al. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the diagnosis and followup of idiopathic retroperitoneal fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2005; 53(1): 122-5.
24. Scheel PJ Jr, Feeley N, Sozio SM. Combined prednisone and mycophenolate mofetil treatment for retroperitoneal fibrosis: a case series. *Ann Intern Med.* 2011; 154 (1): 31-6.

25. Ahmad S. Association of metoprolol and retroperitoneal fibrosis. *Am Heart J.* 1996; 131(1): 202-3.
26. Uibu T, Oksa P, Auvinen A, et al. Asbestos exposure as a risk factor for retroperitoneal fibrosis. *Lancet.* 2004; 363 (9419): 1422-6.
27. Van Bommel EF, Jansen I, Hendriksz TR, Aarnoudse AL. Idiopathic retroperitoneal fibrosis: prospective evaluation of incidence and clinicoradiologic presentation. *Medicine (Baltimore).* 2009; 88 (4): 193-201.
28. Binder M, Uhl M, Wiech T, et al. Cyclophosphamide is a highly effective and safe induction therapy in chronic periaortitis: a long-term follow-up of 35 patients with chronic periaortitis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Aug 22.
29. Goldoni M, Bonini S, Urban ML, Palmisano A, De Palma G, Galletti E, Coggiola M, Buzio C, Mutti A, Vaglio A. Asbestos and smoking as risk factors for idiopathic retroperitoneal fibrosis: a case-control study. *Ann Intern Med.* 2014 Aug 5;161(3):181-8. doi: 10.7326/M13-2648. PubMed PMID: 25089862.
30. Parums DV, Chadwick DR, Mitchinson MJ. The localisation of immunoglobulin in chronic periaortitis. *Atherosclerosis.* 1986; 61(2): 117-23.
31. Mitchinson MJ. Insoluble lipids in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 1982; 45(1): 11-5.
32. Parums DV, Choudhury RP, Shields SA, Davies AH. Characterisation of inflammatory cells associated with "idiopathic retroperitoneal fibrosis". *Br J Urol.* 1991; 67 (6): 564-8.

33. Parums DV. The spectrum of chronic periaortitis. *Histopathology*. 1990; 16(5): 423-31.
34. Jghaimi F, Kabbaj A, Essaadouni L. Takayasu's arteritis and retroperitoneal fibrosis: a case report. *Rev Med Interne*. 2010; 31(3): 1-3.
35. Hamano H, Kawa S, Ochi Y, et al. Hydronephrosis associated with retroperitoneal fibrosis and sclerosing pancreatitis. *Lancet*. 2002; 359 (9315): 1403-4.
36. Stone JR. Aortitis, periaortitis, and retroperitoneal fibrosis, as manifestations of IgG4-related systemic disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23(1): 88-94.
37. Doolin EJ, Goldstein H, Kessler B, et al. Familial retroperitoneal fibrosis. *J Pediatr Surg*. 1987; 22(12): 1092-4.
38. Hatsiopoulou O, Irving S, Sharma SD. Retroperitoneal fibrosis in 2 brothers. *J Urol*. 2001; 165 (1): 182.
39. Martorana D, Vaglio A, Greco P, et al. Chronic periaortitis and HLA-DRB1*03: another clue to an autoimmune origin. *Arthritis Rheum*. 2006; 55(1): 126-30.
40. Mangieri D, Corradi D, Martorana D, Malerba G, Palmisano A, Libri I, Bartoli V, Carnevali ML, Goldoni M, Govoni P, Alinovi R, Buzio C, Vaglio A. Eotaxin/CCL11 in idiopathic retroperitoneal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Oct;27(10):3875-84. doi: 10.1093/ndt/gfs408. PubMed PMID: 23114905.

41. Levin A, Kasem S, Mader R, et al. Wegener granulomatosis with back pain, periaortitis, and dural inflammation developing while receiving monthly cyclophosphamide. *J Clin Rheumatol*. 2006; 12 (6): 294-7.
42. Vaglio A, Manenti L, Allegri L, et al. ANCA-positive periaortic vasculitis: does it fall within the spectrum of vasculitis? *J Intern Med*. 2002; 251 (3): 268-71.
43. Vaglio A, Palmisano A, Ferretti S, et al. Peripheral inflammatory arthritis in patients with chronic periaortitis: report of five cases and review of the literature. *Rheumatology*. 2008; 47 (3): 315-8.
44. LeBlanc CM, Inman RD, Dent P, et al. Retroperitoneal fibrosis: an extraarticular manifestation of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2002 15; 47 (2): 210-4.
45. Famularo G, Palmisano A, Afeltra A, et al. Retroperitoneal fibrosis associated with psoriasis: a case series. *Scand J Rheumatol*. 2009; 38 (1): 68-9.
46. Tripodis N, Mason R, Humphray SJ, Davies AF, Herberg JA, Trowsdale J, Nizetic D, Senger G, Ragoussis J. Physical map of human 6p21.2-6p21.3: region flanking the centromeric end of the major histocompatibility complex. *Genome Res*. 1998 Jun;8(6):631-43. PubMed PMID: 9647638; PubMed Central PMCID: PMC310739.
47. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep*. 2011 Dec;11(6):533-42. doi: 10.1007/s11892-011-0223-x. Review. PubMed PMID: 21912932; PubMed Central PMCID: PMC3233362.
48. Chelvanayagam G. A roadmap for HLA-A, HLA-B, and HLA-C peptide binding specificities. *Immunogenetics*. 1996;45(1):15-26. PubMed PMID: 8881033.

49. Chelvanayagam G. A roadmap for HLA-DR peptide binding specificities. *Hum Immunol.* 1997 Dec;58(2):61-9. PubMed PMID: 9475335.
50. Evseeva I, Nicodemus KK, Bonilla C, Tonks S, Bodmer WF. Linkage disequilibrium and age of HLA region SNPs in relation to classic HLA gene alleles within Europe. *Eur J Hum Genet.* 2010 Aug;18(8):924-32. doi: 10.1038/ejhg.2010.32. Epub 2010 Mar 31. PubMed PMID: 20354563; PubMed Central PMCID: PMC2987379.
51. Matzaraki V, Kumar V, Wijmenga C, Zernakova A. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol.* 2017 Apr 27;18(1):76. doi: 10.1186/s13059-017-1207-1. Review. PubMed PMID: 28449694; PubMed Central PMCID: PMC5406920.
52. Hviid TV, Christiansen OB. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G--possible implications for human reproduction and autoimmune disease. *Hum Immunol.* 2005 Jun;66(6):688-99. PubMed PMID: 15993714.
53. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med.* 2001 Aug 2;345(5):340-50. Review. PubMed PMID: 11484692.
54. Alshiekh S, Zhao LP, Lernmark Å, Geraghty DE, Nalwai ÅT, Agardh D. Different DRB1*03:01-DQB1*02:01 haplotypes confer different risk for celiac disease. *HLA.* 2017 Aug;90(2):95-101. doi: 10.1111/tan.13065. Epub 2017 Jun 5. PubMed PMID: 28585303.

55. Morris DL, Taylor KE, Fernando MM, Nititham J, Alarcón-Riquelme ME, Barcellos LF, Behrens TW, Cotsapas C, Gaffney PM, Graham RR, Pons-Estel BA, Gregersen PK, Harley JB, Hauser SL, Hom G; International MHC and Autoimmunity Genetics Network, Langefeld CD, Noble JA, Rioux JD, Seldin MF; Systemic Lupus Erythematosus Genetics Consortium, Criswell LA, Vyse TJ. Unraveling multiple MHC gene associations with systemic lupus erythematosus: model choice indicates a role for HLA alleles and non-HLA genes in Europeans. *Am J Hum Genet.* 2012 Nov 2;91(5):778-93. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.08.026. Epub 2012 Oct 18. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2015 Sep 3;97(3):501. PubMed PMID: 23084292; PubMed Central PMCID: PMC3487133.

56. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, Shah TS, Patsopoulos NA, Alfredsson L, Anderson CA, Attfield KE, Baranzini SE, Barrett J, Binder TMC, Booth D, Buck D, Celius EG, Cotsapas C, D'Alfonso S, Dendrou CA, Donnelly P, Dubois B, Fontaine B, Fugger L, Goris A, Gourraud PA, Graetz C, Hemmer B, Hillert J; International IBD Genetics Consortium (IBDGC), Kockum I, Leslie S, Lill CM, Martinelli-Boneschi F, Oksenberg JR, Olsson T, Oturai A, Saarela J, Søndergaard HB, Spurkland A, Taylor B, Winkelmann J, Zipp F, Haines JL, Pericak-Vance MA, Spencer CCA, Stewart G, Hafler DA, Ivinson AJ, Harbo HF, Hauser SL, De Jager PL, Compston A, McCauley JL, Sawcer S, McVean G. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet.* 2015 Oct;47(10):1107-1113. doi: 10.1038/ng.3395. Epub 2015 Sep 7. PubMed PMID: 26343388; PubMed Central PMCID: PMC4874245.

57. Weyand CM, Hunder NN, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. HLA-DRB1 alleles in polymyalgia rheumatica, giant cell arteritis, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994 Apr;37(4):514-20. PubMed PMID: 8147928.
58. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, Alfredsson L, Padyukov L, Klareskog L, Worthington J, Siminovitch KA, Bae SC, Plenge RM, Gregersen PK, de Bakker PI. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2012;44(3):291-6.
59. Li MX, Yeung JM, Cherny SS, Sham PC. Evaluating the effective numbers of independent tests and significant p-value thresholds in commercial genotyping arrays and public imputation reference datasets. *Hum Genet* 2012;131(5):747-56.
60. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006;38(2):209-13.
61. Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell.* 2015 May 21;58(4):586-97. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.004. Review. PubMed PMID: 26000844; PubMed Central PMCID: PMC4494749.
62. Carlton VE, Ireland JS, Useche F, Faham M. Functional single nucleotide polymorphism-based association studies. *Hum Genomics.* 2006 Jun;2(6):391-402. Review. PubMed PMID: 16848977; PubMed Central PMCID: PMC3525158.

63. Fan R, Knapp M. Genome association studies of complex diseases by case-control designs. *Am J Hum Genet.* 2003 Apr;72(4):850-68. Epub 2003 Mar 19. PubMed PMID: 12647259; PubMed Central PMCID: PMC1180349.
64. Hong EP, Park JW. Sample size and statistical power calculation in genetic association studies. *Genomics Inform.* 2012 Jun;10(2):117-22. Doi: 10.5808/GI.2012.10.2.117. Epub 2012 Jun 30. PubMed PMID: 23105939; PubMed Central PMCID: PMC3480678.
65. Kaipainen-Seppänen O, Jantunen E, Kuusisto J, Marin S. Retroperitoneal fibrosis with antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Rheumatol.* 1996 Apr;23(4):779-81. PubMed PMID: 8730147.
66. Littlejohn GO, Keystone EC. The association of retroperitoneal fibrosis with systemic vasculitis and HLA-B27: a case report and review of the literature. *J Rheumatol.* 1981 Jul-Aug;8(4):665-9. PubMed PMID: 6975379.
67. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 2001;345:340 – 50.
68. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol.* 2014 Jun;14(6):377-91. doi: 10.1038/nri3667. Epub 2014 May 16. Review. PubMed PMID: 24830344; PubMed Central PMCID: PMC4757912.
69. Thorsby E. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol* 1997;53:1–11.

70. Lio D, Candore G, Colombo A, Colonna Romano G, Gervasi F, Marino V, et al. A genetically determined high setting of TNF-alpha influences immunologic parameters of HLAB8,DR3 positive subjects: implications for autoimmunity. *Hum Immunol* 2001;62:705–13.
71. Kim H, Suh Y, Lee C. Common Expression Quantitative Trait Loci Shared by Histone Genes. *Int J Genomics*. 2017; 2017:6202567. doi: 10.1155/2017/6202567. Epub 2017 Aug 27. PubMed PMID: 28929106; PubMed Central PMCID: PMC5591967.
72. Magister S, Obermajer N, Mirković B, Svajger U, Renko M, Softić A, Romih R, Colbert JD, Watts C, Kos J. Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(5):391-401.
73. Hamilton G, Colbert JD, Schuettelkopf AW, Watts C. Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis. *EMBO J*. 2008 6;27(3):499-508.