



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE**

## **CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO XXX CICLO**

### **PROFILO FUNZIONALE DI PAZIENTI CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO E CORRELAZIONE CON I MECCANISMI COINVOLTI IN DIVERSE FORME MONOGENICHE DELLA MALATTIA**

Settore scientifico-disciplinare  
PEDIATRIA GENERALE E SPECIALISTICA

DOTTORANDA  
ALESSANDRA TESSER

COORDINATORE  
PROF. ALESSANDRO VENTURA

SUPERVISORE DI TESI  
PROF. ALBERTO TOMMASINI

**ANNO ACCADEMICO 2016/2017**

# RIASSUNTO

Il lupus eritematoso sistemico rappresenta una complessa patologia multisistemica, all'interno del cui universo si possono spesso individuare eventi patogenetici diversi ma riconducibili a quadri clinici sovrapponibili. Una possibile caratteristica comune può considerarsi l'utilizzo improprio della risposta immunitaria agli acidi nucleici. Per comprendere il ruolo di questo tipo di risposta, ci siamo concentrati sullo studio delle Interferonopatie di tipo I, un gruppo di malattie monogeniche di recente definizione, causate da alterazioni nel meccanismo di riconoscimento e metabolismo degli acidi nucleici e caratterizzate da un'aberrante stimolazione della via degli interferoni di tipo I. Queste malattie sono clinicamente eterogenee ma mostrano alcune sovrapposizioni con il lupus, la sindrome di Aicardi-Goutières ed alcune infezioni virali congenite. Lo studio di questi modelli monogenici risulta di grande interesse soprattutto per indirizzare il trattamento terapeutico verso l'utilizzo di farmaci attivi a livello della via dell'interferone.

Nel nostro laboratorio è stato descritto il caso di Simone, nato con una grave epatopatia risoltasi poi spontaneamente, che ha successivamente sviluppato alcuni sintomi *lupus-like* quali artrite, glomerulonefrite, lipodistrofia, anticorpi anti-DNA e geloni. Le analisi genetiche condotte per le più comuni malattie auto-infiammatorie sono risultate negative, e solo in seguito ad analisi di esoma è stata identificata una nuova mutazione nel gene *DNASI2*. Questo gene codifica per un'endonucleasi lisosomiale, il cui deficit porta alla mancata digestione degli acidi nucleici, che persistono all'interno della cellula e causano la continua attivazione della via interferonica. Esistono infatti numerose evidenze a dimostrazione del ruolo causale della DNAsi2 nella patologia di Simone, e, insieme alle prove funzionali eseguite grazie alla collaborazione con Yanick Crow, che ha descritto la stessa malattia in una seconda famiglia, abbiamo dimostrato che il difetto di DNAsi2 rappresenta una nuova interferonopatia monogenica. In seguito a questa conoscenza, è stata rimodulata la terapia con farmaci indirizzati verso il meccanismo patogenetico: l'inibitore di JAK1/2, Ruxolitinib, è stato utilizzato in combinazione con due antimalarici, Mepacrina ed Idrossiclorochina, portando ad un generale miglioramento della qualità di vita di Simone.

La scelta dell'inibitore di JAK1/2 è stata dettata dalla conoscenza circa la trasduzione del segnale dell'interferone nella cellula bersaglio, che avviene per mezzo dell'attivazione della chinasi JAK. Gli antimalarici sono invece giustificati dal loro decennale impiego nel trattamento del lupus, grazie al loro effetto anti-infiammatorio. Il meccanismo d'azione, di recente identificazione, vede questi

farmaci come inibitori del sensore citosolico cGAS, attraverso il loro legame con il DNA, interrompendo quindi il segnale che porta la produzione di interferone.

Durante questo studio, inoltre, sono stati messi a punto due strumenti che risultano interessanti per la valutazione e l'ottimizzazione di trattamenti attivi nella via interferonica: l'analisi della *signature* interferonica, che misura nel sangue periferico l'espressione dei geni indotti dall'interferone, permettendo di capire se ci troviamo in presenza di un'alterazione interferonica e quindi di un'interferonopatia, ed il test di infezione di fibroblasti con *E. coli*, attraverso cui si può valutare l'attivazione della via in seguito ad un sovraccarico di DNA batterico.

Considerando le conoscenze acquisite durante questo studio, e la crescente disponibilità di farmaci attivi a livello della via interferonica, abbiamo condotto uno *screening* con SI per identificare altri soggetti con patologie dipendenti dall'eccesso di risposta interferonica. La nostra proposta si riassume in una traccia di "protocollo diagnostico terapeutico assistenziale" per lo studio delle interferonopatie all'interno dell'IRCCS Burlo Garofolo.

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1 IL LUPUS</b>	<b>1</b>
1.1.1 LUPUS MONOGENICO	2
<b>1.2 ACIDI NUCLEICI, INTERFERONE ED INTERFERONOPATIE</b>	<b>5</b>
1.2.1 RISPOSTA IMMUNITARIA AGLI ACIDI NUCLEICI	5
1.2.2 COMPONENTI MOLECOLARI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AGLI ACIDI NUCLEICI	7
1.2.2.1 SORGENTI DI ACIDI NUCLEICI NEL CITOPLASMA	8
1.2.2.2 SMALTIMENTO DEGLI ACIDI NUCLEICI	8
1.2.2.3 TRASDUZIONE DEL SEGNALE DAL <i>SENSING</i> DI ACIDI NUCLEICI	9
1.2.2.4 PRODUZIONE DI INTERFERONE ED AZIONE SU CELLULE BERSAGLIO	9
1.2.2.5 PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA COMUNE: LA <i>SIGNATURE</i> INTERFERONICA	9
1.2.3 INTERFERONOPATIA ASSOCIATA A DNAsi2 (D2I)	10
1.2.3.1 DNAsi2 ED INTERFERONE	11
1.2.3.2 DNAsi2 E MALATTIA	13
<b>2. OBIETTIVI</b>	<b>15</b>
<b>2.1 DEFINIZIONE DEL DIFETTO DI DNAsi2</b>	<b>15</b>
<b>2.2 SCREENING CON <i>SIGNATURE</i> INTERFERONICA</b>	<b>15</b>
<b>2.3 PROPOSTA DI PROTOCOLLO PER LO STUDIO DELLE INTERFERONOPATIE</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>17</b>
<b>3.1 DIMOSTRAZIONE FUNZIONALE DEL DIFETTO DI DNAsi2</b>	<b>17</b>
3.1.1 COLTURA DI FIBROBLASTI E STIMOLAZIONE	17
3.1.2 PREPARAZIONE <i>E. COLI</i> , DETERMINAZIONE MOI BATTERICO ED INFEZIONE DEI FIBROBLASTI	18
3.1.3 COLORAZIONE INTRACELLULARE PER FOSFO-TBK1 E LETTURA CITOFLUORIMETRICA	19
3.1.4 ANALISI DEI DATI	19
<b>3.2 <i>SIGNATURE</i> INTERFERONICA</b>	<b>20</b>
3.2.1 COLLEZIONE DEI CAMPIONI, ESTRAZIONE DI RNA TOTALE E RETRO-TRASCRIZIONE	20

3.2.2 QUANTIFICAZIONE RELATIVA TRAMITE REAL-TIME PCR DEI GENI INDOTTI DALL'INTERFERONE DI TIPO I	20
<b>3.3 SELEZIONE DEI PAZIENTI PER LO STUDIO DI INTERFERONOPATIE</b>	<b>23</b>
3.3.1 CRITERI DI INCLUSIONE	23
3.3.2 CRITERI DI SCELTA PER ANALISI GENETICA	23
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>24</b>
<b>4.1 DIMOSTRAZIONE FUNZIONALE DEL DIFETTO DI DNAs<sub>2</sub></b>	<b>24</b>
4.1.1 ATTIVAZIONE DEL SEGNALE INTERFERONICO IN FIBROBLASTI INFETTATI CON <i>E. COLI</i>	25
<b>4.2 SIGNATURE INTERFERONICA</b>	<b>28</b>
<b>5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE</b>	<b>34</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>38</b>
<b>7. APPENDICE</b>	<b>43</b>
7.1 GLOSSARIO	43

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 IL LUPUS

Il termine “lupus” è stato introdotto anticamente per definire ulcere cutanee profonde che ricordavano i morsi inferti da un lupo, e per molto tempo è stato utilizzato principalmente per descrivere queste lesioni, in particolare quella tubercolare al volto (“*lupus vulgaris*”), ma senza nessuna associazione con gli aspetti sistemici della malattia. La classica distribuzione “a farfalla” della lesione al volto è stata descritta per la prima volta solo a metà dell’800 da Ferdinand von Hebra, che, insieme a Moritz Kohn Kaposi, ha definito il “lupus” come la stessa malattia che Ippocrate chiamava “*herpes esthiomenos*”. Nel 1872, Kaposi ha identificato la natura sistemica della malattia, distinguendo due diverse forme di lupus eritematoso: una discoide, solo cutanea, ed una seconda con caratteristiche sistemiche, indicata come “*lupus erythematosus disseminatus et aggregatus*” [1], che per la prima volta ricordava il lupus eritematoso sistemico (LES) così come è inteso oggi [2].

Il lupus è attualmente considerato una malattia multisistemica ad eziologia multifattoriale e con natura sia autoimmune sia auto-infiammatoria, come suggerito dalla classificazione di McGonagle e McDermot del 2006 [3]. Esso è caratterizzato da un ampio spettro di manifestazioni cliniche che variano da individuo ad individuo e coinvolgono quasi tutti gli organi e tessuti, anche se vi sono alcune manifestazioni più caratteristiche come *rash* cutanei, artrite, alterazioni renali ed ematologiche [4,5].

Negli ultimi anni si è registrato un notevole progresso nella comprensione del LES, grazie all’identificazione di nuove varianti genetiche associate alla malattia, a studi su modelli murini, di espressione genica e di epigenetica. Questo ha permesso di descrivere i principali meccanismi coinvolti nella patogenesi della malattia, che inducono una disfunzione del sistema immunitario, quali difetti di *clearance* di immuno-complessi, acidi nucleici e cellule apoptotiche, generazione di auto-anticorpi, cellule T auto-reattive ed alterazione nelle vie di produzione dell’interferone. La disregolazione di questi processi si traduce in una perdita di tolleranza immunitaria e in una reciproca amplificazione di fenomeni autoimmuni e infiammatori, responsabili del danno tessutale [5-9]. Gli studi su forme monogeniche di LES possono permettere di studiare individualmente i

principali meccanismi coinvolti nella patogenesi della malattia, e in tal modo possono rivelarsi utili per la comprensione di questa patologia complessa, e sperabilmente per lo sviluppo di strategie terapeutiche di precisione.

### 1.1.1 LUPUS MONOGENICO

Diversi studi condotti sul lupus familiare e ad esordio pediatrico hanno permesso l'identificazione di alcune delle cause monogeniche della malattia, che risultano di grande interesse per la comprensione della patogenesi e dei meccanismi molecolari che portano alla perdita della tolleranza immunitaria [10].

Le principali circostanze in cui risulta lecito pensare ad una forma monogenica della malattia sono sostanzialmente i casi con sintomi atipici o di lupus multifattoriale ad esordio precoce, oppure casi che non rispondono al trattamento farmacologico, o che presentano un'eredità mendeliana o consanguineità tra i genitori [11].

È possibile ipotizzare che in alcuni casi di lupus multifattoriale prevalga l'interessamento di uno dei tre principali meccanismi patogenetici riconosciuti alla base delle forme monogeniche della malattia (Tabella 1). Riconoscere questa eventualità potrebbe avere utili ripercussioni sulle scelte terapeutiche laddove sia possibile attuare trattamenti mirati a singoli meccanismi patogenetici. Ad esempio, è stata recentemente dimostrata l'esistenza di sottogruppi di pazienti con LES che presentano un'aumentata *signature* interferonica (SI): questa conoscenza trova un corrispettivo pratico nell'osservazione che proprio i soggetti con aumentata SI rispondono meglio al blocco del recettore degli IFN di tipo I per mezzo dell'anticorpo monoclonale Anifrolumab [12].

Tuttavia, ci son pochi studi che analizzano in grandi casistiche di LES la componente genetica e funzionale su questi versanti, per capire quale sia il peso genetico e funzionale nei tre ambiti patogenetici descritti.

<b>Meccanismo alterato</b>	<b>Proteina coinvolta</b>	<b>Manifestazioni cliniche</b>
Sistema del complemento	C1q	Fotosensibilità, coinvolgimento del sistema nervoso centrale, nefriti
	C1r/C1s	Nefriti
	C2	Fotosensibilità, coinvolgimento neurologico, cardiaco, e articolare, lieve coinvolgimento renale
	C3	<i>Rash</i> malarico, fotosensibilità, artralgia
	C4	Glomerulonefriti e coinvolgimento di più organi
Apoptosi	PKC $\delta$ (chinasi coinvolta nella delezione di cellule B autoreattive)	Linfoadenopatia, splenomegalia ed auto-anticorpi
Metabolismo acidi nucleici	TREX1 (esonucleasi cellulare)	Geloni, calcificazione intracerebrali
	DNASI1 (endonucleasi cellulare)	Lupus sistemico, alti livelli di anticorpi anti-nucleari
	DNASI1L3 (endonucleasi extra-cellulare)	Lupus a insorgenza precoce, anticorpi anti-nucleari, anti- dsDNA
	SAMHD1 (dNTP trifosfoidrolasi, trifosfatasi e con attività ribonucleasica)	Geloni, calcificazioni intracerebrali e ritardo mentale

Tabella 1. Principali cause di lupus monogenico [13-15].

Un aspetto comune a diversi meccanismi patogenetici riguarda l'esposizione del sistema immune a acidi nucleici, rilasciati in modo abnorme in seguito a disturbi nella rimozione dei corpi apoptotici o in seguito ad un difetto di metabolismo da parte di nucleasi. Numerose sono le evidenze circa il ruolo chiave di questo processo in soggetti affetti da LES, unitamente alla presenza di anticorpi anti-DNA, quali:

- presenza contemporanea di anticorpi diretti contro molteplici componenti nucleari che si producono o si liberano in seguito a processi apoptotici;
- nel siero dei soggetti affetti da lupus si possono trovare i NETs (*neutrophil extracellular traps*), ovvero delle reti composte da materiale nucleare e proteine, normalmente estruse dai granulociti neutrofili come meccanismo per intrappolare ed eliminare patogeni non fagocitabili. Un eccessivo rilascio o una difettosa rimozione di queste strutture si associa allo sviluppo di auto-anticorpi che riconoscono sia il DNA che le proteine ad esso complessate [16,17];
- grazie ad analisi genetiche su larga scala (*genome wide association studies*, GWAS), negli ultimi anni sono state identificate in pazienti affetti da LES diverse varianti a carico di geni coinvolti nel metabolismo di DNA, sia intracellulare che extracellulare.

Ad esempio, alcuni casi di lupus monogenico sono associati a mutazioni nel gene *DNASE1*, che codifica per un'endonucleasi coinvolta nella degradazione del DNA durante l'apoptosi. Il difetto di questa proteina è stato studiato in modelli murini *knock-out* (KO), in cui si rileva un'elevata produzione di anticorpi anti-nucleari e la deposizione di immuno-complessi a livello glomerulare [18,19]. Anche mutazioni nel gene *DNASE1L3*, che codifica per una proteina omologa alla DNase I con localizzazione extracellulare, portano all'elevata produzione di anticorpi anti-DNA ed anti-nucleo [6,13,20]. L'esempio più comune di lupus monogenico è dato alla mutazione autosomica dominante nel gene *TREX1*, che codifica per un'esonucleasi intracellulare coinvolta nella degradazione del DNA. Grazie a studi nei topi KO per il gene *TREX1*, è stato dimostrato come il difetto a carico di questa proteina porti all'accumulo di DNA intracellulare [21], determinando l'attivazione di sensori di DNA citosolico come il recettore *toll-like receptor 9* (TLR9) e l'enzima cGAS e la produzione di IFN di tipo I, con conseguente reclutamento del sistema immunitario adattativo [13,20,22,23]. La mutazione in *TREX1* non è però coinvolta solo nella patogenesi del lupus monogenico, ma è presente anche in alcuni soggetti affetti dalla sindrome di Aicardi-Goutières (AGS), caratterizzati da un quadro clinico più precoce e complesso rispetto al lupus familiare [13,24,25]. Questa evidenza suggerisce come il meccanismo patogenetico della ridotta capacità di eliminare il DNA intracellulare sia coinvolto anche nella patogenesi di disordini più

complessi del lupus monogenico, che però condividono con esso alcuni aspetti clinici e patogenetici.

## 1.2 ACIDI NUCLEICI, INTERFERONE ED INTERFERONOPATIE

L'osservazione che quadri clinici in buona parte sovrapponibili possono esser legati ad eventi patogenetici profondamente diversi può indurre a considerare il LES come una costellazione clinica complessa il cui comune denominatore potrebbe essere rappresentato dall'utilizzo improprio degli strumenti immunitari di rimozione e riconoscimento degli acidi nucleici. Per questo motivo, non sorprende che tutt'oggi non si disponga di veri e propri criteri diagnostici per il LES, ma unicamente di criteri classificativi che permettono di parlare di lupus di fronte a condizioni cliniche abbastanza eterogenee.

Per meglio comprendere la relazione tra risposta immunitaria ed acidi nucleici, dobbiamo fare alcune premesse:

1. Perché abbiamo degli “strumenti” che inducono la risposta immunitaria agli acidi nucleici?
2. Quali sono le componenti molecolari di questa risposta?

### 1.2.1 RISPOSTA IMMUNITARIA AGLI ACIDI NUCLEICI

Il riconoscimento immunitario dei microrganismi patogeni quali batteri e funghi si basa su “modelli” altamente conservati, rappresentati da strutture microbiche facilmente distinguibili dall'organismo ospite [26]. Ciò non si verifica, però, per i virus, che sono normalmente strutturati con componenti derivati dall'ospite, e spesso riescono a modificare alcune strutture cellulari che li caratterizzano. In assenza di un “modello” strutturale da riconoscere, i recettori deputati al riconoscimento virale si sono a loro volta evoluti sviluppando una strategia per individuare l'unica caratteristica condivisa da tutti i virus: il genoma (sia a DNA che a RNA) [27].

Il riconoscimento di acidi nucleici citoplasmatici induce un meccanismo a cascata che culmina nella produzione di IFN di tipo I, considerato come un fisiologico e conservato meccanismo di difesa contro le infezioni virali. Questo strumento è inoltre utilizzato per il riconoscimento di batteri che abbiano già invaso la cellula.

La strategia di difesa descritta, però, può rappresentare un'arma a doppio taglio, poiché introduce la possibilità di risposta verso acidi nucleici *self*, e quindi dell'instaurarsi di disordini autoimmuni ed auto-infiammatori [28]. Infatti, la capacità di discriminare il *self* dal *non self* non è propria solo dell'immunità adattativa, ma già a livello dell'immunità innata esistono dei sensori che permettono di identificare componenti molecolari estranei al mondo eucariotico. In particolare, si sottolinea:

1. l'impiego di recettori denominati *pattern-recognition receptors* (PRRs), costitutivamente espressi da tutte le cellule, che riconoscono componenti strutturali o acidi nucleici microbici [29]. Classico esempio è dato dal TLR9, recettore intracellulare presente a livello delle membrane endo-lisomiali, che riconosce DNA con una caratteristica chimica scarsamente riscontrabile nei genomi di mammifero ma abbondante in quelli microbici, ovvero sequenze CpG di DNA sottometilate [30,31]. Altro esempio è dato dal recettore RIG-I, che riconosce RNA virale grazie alla caratteristica assenza del rivestimento all'estremità 5'-trifosfato [32];
2. la rimozione di possibili ligandi *self* per prevenire la loro intercettazione da parte dei sensori dell'immunità innata, e quindi lo scatenarsi di reazioni autoimmuni. Acidi nucleici *self* liberi possono derivare da cellule apoptotiche, o dai NETs estrusi dai neutrofili, perciò assume fondamentale rilevanza la loro degradazione a livello extra ed intra-cellulare ad opera delle diverse DNAsi, e l'eliminazione di cellule apoptotiche da parte delle cellule macrofagiche [33,34].

I componenti molecolari coinvolti nell'identificazione e nella conseguente risposta ai virus sono stati individuati solo negli ultimi 20 anni, anche se questo meccanismo difensivo era noto già a partire dagli anni '60: il nome "interferone" infatti è stato introdotto in seguito agli esperimenti di Isaacs e Lindenmann (1957), i quali osservarono come il surnatante di cellule incubate con il virus dell'influenza, inattivato col calore, contenesse qualcosa che "interferiva" con l'infezione virale, se aggiunto ad un'altra coltura cellulare. Questa scoperta ha portato alla descrizione dei primi interferoni, definiti di tipo I (interferone- $\alpha$  e interferone- $\beta$ ) [35], mentre qualche anno più tardi venne identificata un'altra proteina, l'interferone di tipo II (interferone- $\gamma$ ), che però presenta caratteristiche differenti in termini di stimolo induttore e produzione [36].

## 1.2.2 COMPONENTI MOLECOLARI DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA AGLI ACIDI NUCLEICI

Per comprendere il ruolo dei diversi attori molecolari coinvolti in questo tipo di risposta immunitaria, si può partire dall'osservazione di un gruppo di malattie monogeniche di recente definizione, le "Interferonopatie di tipo I", che ci permettono di definire le funzioni di ciascun componente attraverso l'osservazione delle conseguenze del suo difetto nella clinica. Queste patologie sono dovute ad alterazioni nel meccanismo di riconoscimento e metabolismo degli acidi nucleici (Figura 1), che si traducono in un'aberrante stimolazione della via degli IFN di tipo I con conseguente instaurarsi di malattia.

Le interferonopatie rappresentano un gruppo di patologie clinicamente eterogenee, con alcune sovrapposizioni fenotipiche con il lupus, la sindrome di Aicardi-Goutières ed alcune infezioni virali congenite (HIV-1) [37]. Lo studio di queste malattie e dei meccanismi molecolari coinvolti risulta di grande interesse anche perché potrebbe fornire dei modelli preziosi per la valutazione preclinica di diverse molecole che agiscono a livello della via dell'IFN.

Considerando i diversi "livelli" che caratterizzano questo tipo di risposta immunitaria, a partire dalla presenza e riconoscimento di acidi nucleici intracellulari, per procedere con la trasduzione del segnale fino alla produzione di IFN, possiamo selezionare e descrivere alcune interferonopatie che risultano strettamente connesse con ciascuno dei passaggi citati.

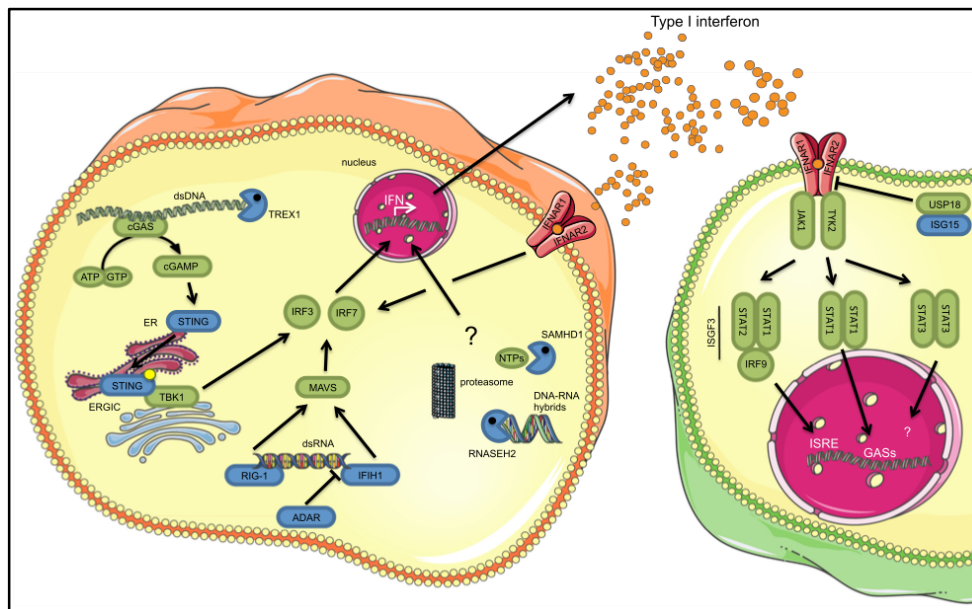


Figura 1. Componenti molecolari della risposta interferonica agli acidi nucleici (in blu sono riportate alcune delle proteine mutate nelle interferonopatie di tipo I) [14].

### 1.2.2.1 SORGENTI DI ACIDI NUCLEICI NEL CITOPLASMA

Il gene *POLA1* codifica per la subunità catalitica del complesso della DNA polimerasi- $\alpha$ , e risulta necessaria per la replicazione del DNA e per il controllo della concentrazione citoplasmatica di ibridi RNA:DNA. Un'ipotesi circa la funzione di questi ibridi vuole che rappresentino dei ligandi che “sequestrano” i sensori degli acidi nucleici senza attivarli, per prevenire una loro inappropriata stimolazione in seguito a legame con altri acidi nucleici. È stato dimostrato come mutazioni che riducono la funzionalità della proteina POLA1 portino ad una riduzione di ibridi RNA:DNA intracellulari cui conseguirebbe l'attivazione costitutiva della via interferonica. Questo meccanismo si trova alla base della sindrome XLPDR (*X-linked pigmentary reticulate disorder*), una malattia in realtà più complessa di quanto atteso sulla sola interpretazione come interferonopatia e caratterizzata da una distintiva iper-pigmentazione cutanea diffusa secondo uno schema reticolare, deposizioni di melanina ed amiloide e generale infiammazione in diversi organi [38].

### 1.2.2.2 SMALTIMENTO DEGLI ACIDI NUCLEICI

La sindrome di Aicardi-Goutières [24], prima condizione patologica associata al nome di “interferonopatia”, rappresenta una malattia genetica rara dovuta a mutazioni che compromettono la funzione di enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici: le nucleasi TREX1 ed il complesso RNASEH2, degradano rispettivamente DNA e molecole ibride RNA:DNA [39-41]; SAMHD1, proteina che diminuisce la disponibilità di deossinucleotidi nel citoplasma [42,43]; ADAR1, deputato all'editing dell'RNA [44,45], ed IFIH1, recettore citosolico di RNA [46,47]. La perdita di funzione di queste proteine provoca l'accumulo intracellulare di acidi nucleici che vengono riconosciuti dai sensori dell'immunità innata, attivando la risposta patogenetica dell'IFN di tipo I [48]. Infatti, elevati livelli di IFN- $\alpha$  si possono misurare sia a livello delle cellule del sangue periferico sia nel liquido cerebrospinale di questi pazienti [48,49].

La AGS si manifesta nelle prime settimane di vita con un'encefalopatia infiammatoria e ricorda le caratteristiche di un'infezione virale contratta a livello uterino, anche se in assenza di un agente esogeno scatenante (fa parte in questo senso delle cosiddette sindromi simil-TORCH). I pazienti con AGS possono inoltre mostrare alcuni sintomi osservati anche in soggetti affetti da lupus, tra cui lesioni cutanee, artriti, anticorpi anti-nucleo, riduzione del complemento sierico ed anomalie ematologiche [48].

### 1.2.2.3 TRASDUZIONE DEL SEGNALE DAL *SENSING* DI ACIDI NUCLEICI

Un esempio di patologia correlata ad un elemento trasduttore del segnale interferonico è la SAVI (vasculopatia con insorgenza infantile associata a STING), dovuta ad una mutazione “*gain of function*” nel gene *STING* che induce un’attivazione costitutiva della proteina, indipendentemente quindi dalla presenza di uno stimolo, con la conseguente over-produzione di IFN di tipo I [14,50]. La patologia è caratterizzata da scarsa crescita, anemia cronica, episodi febbrili, malessere, lesioni cutanee localizzate soprattutto sul volto, e coinvolgimento polmonare.

### 1.2.2.4 PRODUZIONE DI INTERFERONE ED AZIONE SU CELLULE BERSAGLIO

Un meccanismo diverso si può analizzare nel caso del deficit di ISG15, proteina coinvolta nel meccanismo soppressivo che regola la cascata dell’interferone di tipo I: mutazioni che ne compromettono la funzionalità si traducono in un mancato “spegnimento” del segnale interferonico [51]. Questa interferonopatia è caratterizzata da calcificazioni intracraniche, epilessia, elevata suscettibilità alle infezioni micobatteriche, auto-anticorpi ed elevati livelli di IFN.

### 1.2.2.5 PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA COMUNE: LA *SIGNATURE* INTERFERONICA

Caratteristica condivisa da tutte le interferonopatie è quindi la disregolazione della via dell’IFN di tipo I, sia essa dovuta ad un’aumentata disponibilità di acidi nucleici intracellulari, oppure ad un’attivazione costitutiva di recettori di acidi nucleici e/o mediatori, oppure ancora ad una mancata soppressione del segnale. La disregolazione interferonica si traduce poi in un’over-espressione dei geni indotti a valle, portando alla determinazione della SI come un profilo di espressione genica che risulta comune alla gran parte dei pazienti affetti da interferonopatia.

Questa analisi è stata proposta da Yanick Crow [52], considerato come il maggior esperto di AGS, il cui lavoro è partito da studi precedenti effettuati nel lupus, che analizzavano un profilo di espressione più ampio [53]. Crow ha inizialmente testato i livelli di espressione di 15 geni indotti dall’interferone in una coorte di pazienti con AGS e in controlli sani; in seguito, ha ristretto il campo a soli 6 geni (*IFI27*, *IFI44L*, *IFIT1*, *ISG15*, *RSAD2*, *SIGLEC1*) la cui over-espressione risultava caratteristica nei pazienti rispetto ai controlli, definendo quindi i geni che descrivono la cosiddetta *signature* interferonica come oggi la conosciamo (Figura 2).

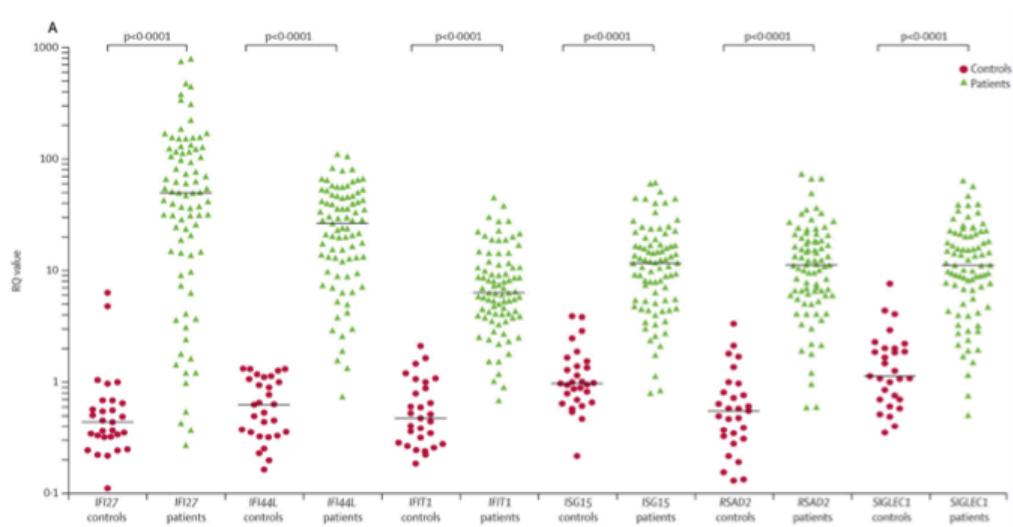


Figura 2. Geni della “signature interferonica” selezionati da Y. Crow che presentano over-espressione caratteristica nei pazienti con Aicardi-Goutières (in verde) rispetto ai controlli sani (in rosso) [52].

Il metodo proposto da Crow prevede inoltre il calcolo di un punteggio, denominato “*interferon score*”, che viene assegnato ad ogni paziente, ed è fornito dalla mediana delle quantificazioni relative dei sei geni analizzati. Questo punteggio può risultare positivo o negativo rispetto al valore soglia calcolato a partire dai controlli sani (2.446), e quindi permette di individuare, rispettivamente, se la via dell’interferone risulta attivata o meno [52].

L’analisi della SI rappresenta quindi un valido strumento per l’identificazione di condizioni patologiche con sospetta attivazione della via interferonica e per indirizzare il trattamento verso un approccio terapeutico di precisione con farmaci diretti alla modulazione di questa risposta.

### 1.2.3 INTERFERONOPATIA ASSOCIATA A DNASI2 (D2I)

In questo ambito si inserisce la nuova interferonopatia dovuta a mutazione biallelica nel gene della *DNASI2*, che codifica per una nucleasi lisosomiale coinvolta nella degradazione di DNA esogeno ed endogeno all’interno di lisosomi o autofagosomi. La patologia è caratterizzata da un diffuso stato auto-infiammatorio con una preponderante componente interferonica.

La malattia è stata per la prima volta descritta in Simone, oggi ragazzo diciottenne, figlio di genitori non consanguinei. Il suo quadro clinico risultava di difficile interpretazione sin dalla sua nascita, per la presenza di una grave citopenia multilineare ed epatite colestatica, che hanno però mostrato uno spontaneo, ma inaspettato, miglioramento nei primi mesi di vita. Successivamente, il paziente

ha manifestato crisi infiammatorie febbrili e, a partire dai 5 anni, ha sviluppato un'artrite poli-articolare accompagnata da scarsa crescita. Dopo pochi anni, si è instaurato un quadro clinico più complesso, con sviluppo di glomerulonefrite, anticorpi anti-DNA (nonostante i livelli sierici di complemento non risultavano ridotti, come avviene normalmente in casi di lupus), lipodistrofia, geloni, *rash* cutaneo ed ulcere in un quadro di lupus pernicio. Nell'insieme, i sintomi non suggerivano nessuna chiara diagnosi e il bambino veniva trattato dapprima con terapie sintomatiche e successivamente con cortisonici in associazione a diversi immunosoppressori e farmaci biologici (Methotrexate, Mofetil Micofenolato, Azatioprina, Etanercept, Anakinra, Infliximab, Canakinumab), senza mai raggiungere un completo controllo dei sintomi. Data la mancanza di diagnosi, Simone è stato sottoposto a numerose indagini genetiche per i geni correlati a malattie auto-infiammatorie rare (MKD, FMF, TRAPS, CIAS1patie, CANDLE), tutte risultate negative. Il punto di svolta è arrivato grazie all'analisi dell'esoma, che ha permesso di identificare una mutazione *missense* in omozigosi nell'esone 4 del gene *DNASI2*, che induce un cambiamento aminoacidico da Aspartato a Valina. Questa mutazione non è descritta nei database online ed è predetta come patogenetica.

#### 1.2.3.1 DNAsI2 ED INTERFERONE

Il gene della Deossiribonucleasi 2 (*DNASI2* o *DNASI II*), localizzato sul cromosoma 19p13.2, e lungo 5.2 Kb, codifica per un'endonucleasi lisosomiale la cui funzione si esplica a pH acido (4.5 – 5.5) ed in assenza di cationi divalenti [54]. L'enzima DNAsI2 presenta una distribuzione ubiquitaria a livello tissutale, e svolge un ruolo chiave nella frammentazione del DNA esogeno ed endogeno prodotto in seguito a fagocitosi, rispettivamente di agenti patogeni o cellule apoptotiche. L'enzima è attivo anche in autofagosomi dove vengono eliminati residui di elementi cellulari danneggiati come i mitocondri o acidi nucleici rilasciati dal nucleo cellulare.

Se il DNA non viene digerito a causa di una mancata funzione della DNAsI2, è possibile che frammenti dello stesso fuoriescano dal lisosoma nel citoplasma ed interagiscano con il sensore cGAS, inducendo la formazione di cGAMP, ovvero un dinucleotide ciclico non-canonico di-GMP-AMP [23]. Questo secondo messaggero attiva la proteina adattatrice STING, che a sua volta induce la propagazione del segnale attraverso la chinasi TBK1, portando alla fosforilazione del fattore IRF3 ed alla sua conseguente dimerizzazione e traslocazione nel nucleo per indurre la trascrizione di interferone di tipo I [55], considerato quindi il maggior responsabile della malattia infiammatoria. Il legame dell'interferone con una subunità del suo recettore (IFNAR1 e IFNAR2) [56,57] sulle

cellule bersaglio ne induce la dimerizzazione, con successiva fosforilazione ed attivazione delle chinasi relativamente associate, TYK2 e JAK1, che inducono la fosforilazione di STAT1 e STAT2, ed il successivo il reclutamento di IRF9 [58]. Il risultante complesso STAT1-2/IRF9 trasloca nel nucleo dove lega specifiche sequenze di DNA che determinano la trascrizione dei geni indotti dall'interferone (*Interferon Stimulated Genes*, ISGs) [59] (Figura 3).

Osservando lo schema di Figura 3, il difetto di DNAsi2 si pone similmente a quello di TREX1 a monte del sensore cGAS. Si potrebbe arguire da questa considerazione che le due malattie abbiano un fenotipo sovrapponibile, e questo in parte sembra vero. Tuttavia, la diversa localizzazione dei due enzimi all'interno della cellula e dei tessuti può spiegare alcune delle differenze cliniche tra le due malattie.

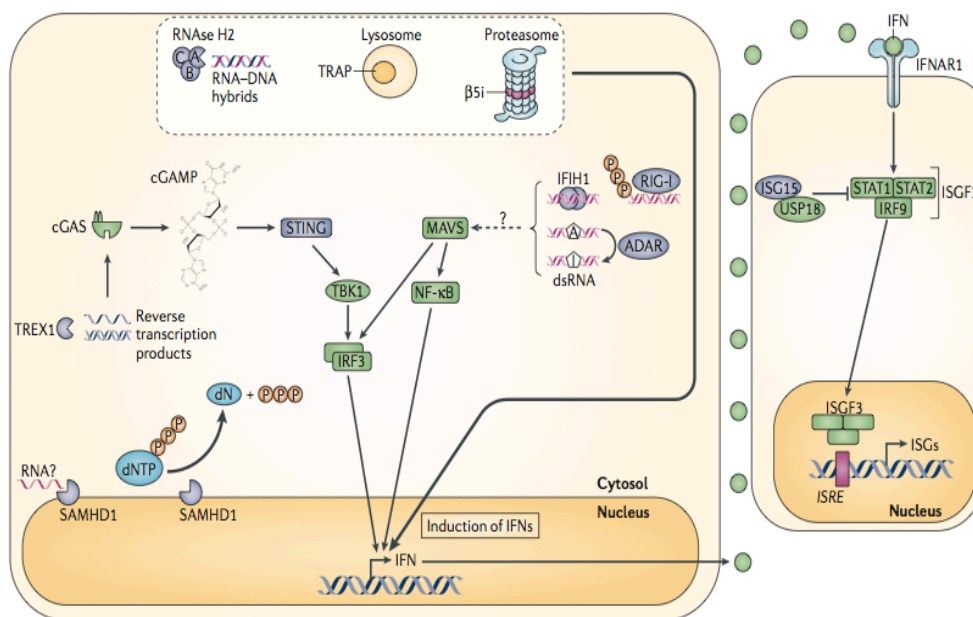


Figura 3. Via di segnalazione che induce la produzione di interferone di tipo I [60].

La proteina cGAS è attualmente considerata come il principale sensore di DNA citosolico per la produzione di IFN di tipo I, in modo indipendente dalla sequenza presente di DNA [61] ma dipendente dalla sua lunghezza: l'attivazione del sensore avviene infatti in modo regolato, in seguito al riconoscimento anche di basse concentrazioni di DNA con lunghezza superiore a qualche decina di nucleotidi, in modo tale da non indurre attivazione della risposta immunitaria in seguito a riconoscimento di piccoli frammenti di acidi nucleici che possono accumularsi durante la

replicazione cellulare o meccanismi di riparo del DNA. La risposta immunitaria verso questi piccoli frammenti si accende invece solo qualora fossero presenti in alte concentrazioni [62].

L'importanza di questo sensore è supportata soprattutto dallo studio di modelli murini  $cGAS^{-/-}$ , le cui le cellule (fibroblasti, macrofagi e cellule dendritiche) non producono IFN ed altre citochine antivirali in seguito ad una trasfezione di DNA o infezione di virus a DNA [63].

### 1.2.3.2 DNAsi2 E MALATTIA

Fondamentale evidenza a sostegno del ruolo causale della mutazione in DNAsi2 nel nostro paziente è fornita dai modelli murini KO ( $DNAsi2^{-/-}$ ): i topi muoiono in utero a causa di un'epatopatia infiammatoria dominata dalla produzione di IFN ed anemia [64]. Durante le prime fasi dello sviluppo, infatti, l'eritropoiesi avviene nel fegato, dove la DNAsi2 è deputata allo smaltimento dei nuclei dei globuli rossi espulsi durante il processo di maturazione. Nei modelli KO, la mancanza dell'enzima causa un accumulo di DNA non digerito e la conseguente iperproduzione di citochine, tra cui interferoni, con effetto tossico sui precursori degli eritrociti e quindi anemia [54,65]. Questa caratteristica dei modelli murini è concorde, con le dovute proporzioni, con il fenotipo del paziente con difetto di DNAsi2 (ma non KO come i topi), che ha mostrato un'epatopatia neonatale. Il progressivo miglioramento del quadro epatico nei mesi successivi può essere spiegato dal fisiologico spostamento della sede dell'eritropoiesi dal fegato al midollo [66].

Ulteriori informazioni circa il ruolo della DNAsi2 e di altre molecole ad essa correlate sono poi fornite da altri modelli murini, in cui il fenotipo letale dei topi  $DNAsi2^{-/-}$  viene revertito grazie al *knock-out* contemporaneo (*double knock-out*, DKO) per il gene del recettore dell'IFN di tipo I (IFNAR): i topi sopravvivono, ma sviluppano una forma di poliartrite cronica, oltre all'attivazione della cascata cellulare che porta alla produzione di IFN ed il blocco della maturazione dei linfociti T e della produzione dei globuli rossi [54,67].

Altre evidenze sono state fornite da modelli tripli *knock-out* di  $DNAsi2^{-/-}$   $IFNAR^{-/-}$  e  $STING^{-/-}$  che dimostrano come l'assenza della proteina STING previene lo sviluppo dell'artrite, anche se presentano comunque un'elevata produzione di auto-anticorpi [68]. Infine, un controllo più completo della malattia si osserva solo nel modello DKO  $DNAsi2^{-/-}$  e  $cGAS^{-/-}$ : questi topi sopravvivono, senza mostrare segni di artrite, né presenza di auto-anticorpi anti-DNA e, se infettati da DNA virale, non producono IFN. Inoltre, è interessante notare che un controllo discreto del fenotipo infiammatorio può essere ottenuto anche con la sola aploinsufficienza di cGAs. Queste osservazioni hanno fornito ulteriori prove a supporto della tesi secondo cui cGAS possa esser

considerato come mediatore fondamentale nell'instaurarsi di malattie infiammatorie/autoimmuni causate da difetti nella *clearance* del DNA, e quindi associate ad un'elevata produzione di IFN [69]. Nonostante tutti questi elementi siano coerenti con l'ipotesi da noi formulata riguardo ad una ridotta funzionalità della DNAsi2 nella patologia di Simone, alcune prove determinanti risultano ancora mancanti (Tabella 2):

<b>Elementi presenti</b>	<b>Elementi mancanti</b>
Variante patogenetica emersa da analisi di ESOMA	Altre famiglie non correlate con difetto di DNAsi2
Analogie con modelli murini DNAsi2 <sup>-/-</sup>	Prova di ridotta funzionalità dell'enzima

Tabella 2. Elenco degli elementi acquisiti e mancanti a sostegno del ruolo causale della DNAsi2 nella patologia di Simone.

Il lavoro di tesi si propone quindi di assimilare le prove mancanti per confermare con certezza che la patologia di Simone è causata dal difetto genetico identificato. Inoltre, partendo dall'estremo di una malattia monogenica esemplare, sarà possibile applicare strumenti conoscitivi e analitici innovativi per definire e analizzare l'impatto dei disturbi da infiammazione interferonica nella pratica clinica pediatrica.

## 2. OBIETTIVI

### 2.1 DEFINIZIONE DEL DIFETTO DI DNAsI2

Sulla base di elementi clinici, del riscontro della mutazione nel gene *DNAsI2*, del fenotipo nei topi *DNAsI2<sup>-/-</sup>* e della *signature* interferonica (SI) analizzata *in vivo* nel paziente, ipotizziamo che il difetto di DNAsI2:

1. rappresenti un'interferonopatia monogenica;
2. dipenda da una inefficiente digestione di DNA nel sistema fagocitico/auto-fagocitario. La nostra ipotesi di lavoro è che il fenotipo clinico della malattia possa essere sostenuto, tra l'altro, dall'incapacità di digerire appropriatamente il DNA derivante da corpi apoptotici fagocitati nelle cellule macrofagiche, o DNA derivante da processi di mitofagia o da infezione virale o batterica intracellulare in qualsiasi tipo di cellula.

### 2.2 SCREENING CON *SIGNATURE* INTERFERONICA

Osservazioni aneddotiche mostrano che le interferonopatie monogeniche si possono avvantaggiare di terapie mirate a contrastare l'eccesso di risposta interferonica, anche con farmaci utilizzati al di fuori delle indicazioni previste come gli inibitori delle JAK chinasi. Per questo motivo, abbiamo valutato quanto lo screening con SI possa aiutarci ad identificare altri soggetti con patologie dipendenti da questo meccanismo.

In particolare, ci siamo proposti di:

1. eseguire il test della SI in soggetti con potenziale disturbo infiammatorio di tipo interferonico;
2. eseguire test genetici nei soggetti con SI positiva e sospetto di malattia monogenica.

## 2.3 PROPOSTA DI PROTOCOLLO PER LO STUDIO DELLE INTERFERONOPATIE

Considerando le conoscenze acquisite durante questo progetto, sia cliniche che laboratoristiche, e la crescente disponibilità di farmaci attivi a livello della via interferonica, ci proponiamo anche di proporre un protocollo clinico per lo studio delle interferonopatie all'interno dell'IRCCS Burlo Garofolo, sulla base di:

1. risultati di questo lavoro di tesi;
2. spunti presenti in letteratura.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 DIMOSTRAZIONE FUNZIONALE DEL DIFETTO DI DNAsi2

Analisi preliminari mediante Real-Time PCR e analisi citofluorimetrica ci hanno permesso di dimostrare che la proteina DNAsi2 è espressa nel nostro paziente. In base a questo risultato, dobbiamo ipotizzare che la proteina sia presente ma abbia una ridotta attività enzimatica.

In seguito a questa evidenza, ci siamo dedicati allo studio funzionale della proteina per valutare se, in seguito a stimolazione con un sovraccarico di acidi nucleici, sia rilevabile un'attivazione della via interferonica. Il test prevede, come indicatore precoce di attivazione del segnale interferonico, la misurazione dell'espressione della proteina intracellulare fosfo-TBK1 (pTBK1). Per ottenere una migliore standardizzazione e ripetibilità in condizioni indipendenti da stato di malattia ed utilizzo di farmaci, abbiamo deciso di sviluppare un test funzionale su fibroblasti. Dato che non si tratta di cellule specializzate nella fagocitosi, abbiamo sfruttato il meccanismo dell'infezione batterica con *Escherichia coli*, come sorgente di acidi nucleici da digerire.

#### 3.1.1 COLTURA DI FIBROBLASTI E STIMOLAZIONE

I fibroblasti utilizzati per il test funzionale sono stati ottenuti da biopsia cutanea del paziente con difetto di DNAsi2, mentre i fibroblasti dei controlli sani sono stati ottenuti da biopsia di prepuzio di 2 donatori sani a seguito di intervento per fimosi, e da biopsia cutanea da altri 2 donatori. Per permettere la crescita di queste cellule, le biopsie sono state triturate finemente e messe in coltura in diversi pozzetti di una piastra da 6 pozzetti, e mantenute in adesione con l'aiuto di un vetrino con terreno RPMI completo, supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS), 2mM di L-glutamina, 100 U/mL di penicillina, 0,1 mg/mL di streptomina (tutti reagenti EuroClone), e Normocina (100 ug/ml, InvivoGen). Dopo circa 15 giorni, i primi fibroblasti si sono diramati a partire dai bordi dei frammenti biotici; successivamente sono stati eliminati i vetrini, ed i fibroblasti sono stati staccati con Tripsina (EuroClone)-EDTA e trasferiti in flask T25 per colture cellulari in adesione (Corning). Per l'espletamento dei vari esperimenti, i fibroblasti sono stati mantenuti in coltura alla densità di circa  $1-2 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> in terreno RPMI completo. I fibroblasti

del paziente e del controllo sano sono stati seminati il giorno prima dell'esperimento ad una densità di  $10^4$  cellule/cm<sup>2</sup> in terreno di coltura RPMI completo.

### 3.1.2 PREPARAZIONE *E. COLI*, DETERMINAZIONE MOI BATTERICO ED INFEZIONE DEI FIBROBLASTI

Il giorno prima dell'esperimento, è stata preparata una coltura batterica liquida in 3 mL di Luria-Bertani (LB) Broth (Sigma) senza antibiotici a partire dallo stock di glicerolo di *E. coli* (ATCC, ceppo 25922), lasciato crescere a 37°C in agitazione per 16-18h.

Il giorno seguente, la coltura batterica è stata diluita in LB Broth fresco (1:30) e fatta crescere a 37°C in agitazione per 1h. I batteri sono stati recuperati tramite centrifugazione a 13000 xg per 20 secondi, il surnatante è stato eliminato ed il pellet di batteri è stato risospeso in 1 mL di fisiologica. Misurando la densità ottica (OD) della coltura batterica a 500 nm (Perkin Elemer Lambda 40 UV/VIS Spectrometer), è stata determinata la concentrazione batterica (*Colony-forming unit/ml*, CFU/ml) tramite interpolazione con la retta di taratura precedentemente settata (Figura 4):

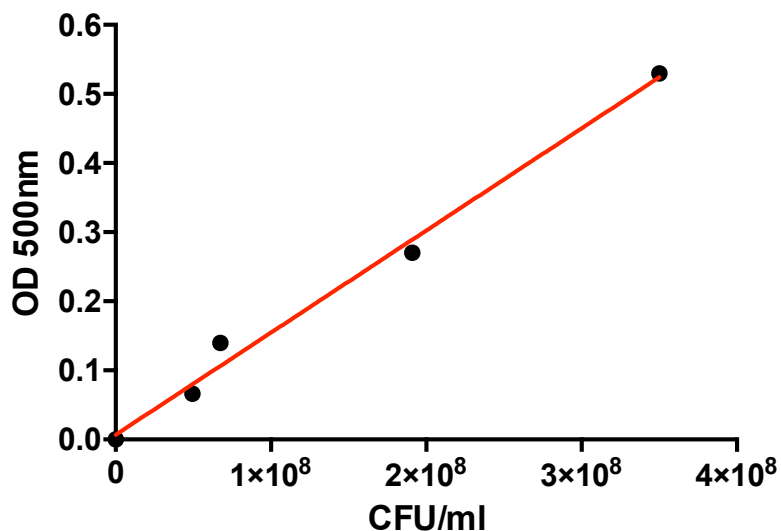


Figura 4. Retta di taratura per la determinazione della concentrazione batterica (*Colony-forming unit/ml*, CFU/ml) attraverso l'interpolazione del valore di densità ottica (OD) misurata per la coltura batterica a 500 nm.

I batteri sono stati quindi diluiti alle concentrazioni volute in terreno RPMI privo di antibiotici per procedere all'infezione dei fibroblasti con MOI (*Multiplicity of Infection*) pari a 10, 20, 120 e 400 per 1h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.1.3 COLORAZIONE INTRACELLULARE PER FOSFO-TBK1 E LETTURA CITOFLUORIMETRICA

Trascorso il tempo di infezione, le cellule sono state recuperate con Tripsina (EuroClone)-EDTA e centrifugate 300 xg per 10 minuti a temperatura ambiente (*room temperature*, RT). Le cellule sono state quindi trattate per la colorazione intracellulare per la proteina pTBK1. In breve, le cellule sono state fissate tramite incubazione con PBS w/o Ca/Mg con 4% Paraformaldeide per 10 minuti a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e, dopo aver raffreddato per un minuto la sospensione in ghiaccio, sono state centrifugate a 300 xg per 10 minuti a RT per eliminare la Paraformaldeide. Il pellet di cellule è stato poi risospeso in 500 uL di Metanolo (freddo) al 90% ed incubate per 30 minuti in ghiaccio. Al termine, sono stati eseguiti due lavaggi con *Incubation Buffer* (PBS w/o Ca/Mg 0.5% BSA) centrifugando a 300xg per 10 minuti a RT. Al termine, le cellule sono state marcate con l'anticorpo anti-pTBK1 PE (4 ug/mL, riconosce la serina 172 fosforilata) o con il controllo isotipico (rabbit, DA1E, mAb IgG XPR, PE, 4 ug/mL) (entrambi gli anticorpi sono Cell Signaling Technology), incubando per 1 h al buio a RT.

Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate con *Incubation Buffer* centrifugando a 300 xg per 10 minuti a RT, e successivamente risospese in PBS w/o Ca/Mg per l'acquisizione al citofluorimetro (MacsQuant 10, Miltenyi Biotec).

L'attivazione della via interferonica è stata considerata come percentuale di cellule positive a pTBK1 rispetto al controllo isotipico, utilizzato quindi per confermare la specificità del legame dell'anticorpo diretto contro la proteina di interesse.

### 3.1.4 ANALISI DEI DATI

Al fine di confermare i dati ottenuti, il test è stato replicato 3 volte confrontando i fibroblasti del paziente con i fibroblasti ottenuti dai donatori sani.

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software GraphPad Prism 6, ed i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SEM dell'espressione di pTBK1 rispetto al controllo isotipico.

## 3.2 SIGNATURE INTERFERONICA

La *signature* interferonica è stata condotta per la prima volta su Simone nel 2014 da Yanick Crow (Insitut Imagine, Parigi). La metodica è stata poi acquisita dai laboratori dell'IRCCS G. Gaslini (Genova), e nel 2016 trasportata all'IRCCS Burlo Garofolo (Trieste).

### 3.2.1 COLLEZIONE DEI CAMPIONI, ESTRAZIONE DI RNA TOTALE E RETRO-TRASCRIZIONE

Per la raccolta dei campioni e l'estrazione di RNA totale è stato utilizzato il sistema "PAXgene Blood RNA" (PreAnalytiX). Il sangue intero periferico è stato raccolto in "PAXgene Blood RNA Tubes", che contengono al loro interno degli stabilizzanti (6.9 mL) cui si aggiunge il campione di sangue periferico (2.5 mL).

Per la successiva estrazione di RNA è stato impiegato il "PAXgene Blood RNA Kit". I campioni di RNA sono stati quantificati con "QIAxpert" (Qiagen) e conservati a -80 °C fino all'analisi. La retrotrascrizione di RNA (fino ad 1 ug) in cDNA è stata condotta usando il kit "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche), ed i cDNA ottenuti sono stati conservati a -20 °C.

### 3.2.2 QUANTIFICAZIONE RELATIVA TRAMITE REAL-TIME PCR DEI GENI INDOTTI DALL'INTERFERONE DI TIPO I

L'analisi della *signature* interferonica consiste nella quantificazione relativa dell'espressione di 6 geni indotti dall'interferone (*IFI27*, *IFI44L*, *IFIT1*, *ISG15*, *RSAD2*, *SIGLEC1*) in Real Time PCR (qPCR), attraverso l'utilizzo di sonde "UPL Probes" (Roche), TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) ed il sistema AB 7500 Real Time PCR.

Le sonde utilizzate fanno parte della "Universal ProbeLibrary" (UPL), che dispone di sole 165 sonde per coprire l'intero trascrittoma (copertura al 99%). Grazie alla loro ridotta lunghezza (8-9 nucleotidi), ogni sonda lega circa 7000 trascritti, ed ogni trascritto è riconosciuto da circa 16 sonde differenti. Nella reazione di qPCR viene però rilevato un unico trascritto grazie all'abbinamento di una coppia di primer specifici. Attraverso l'utilizzo del software di analisi online (<https://lifescience.roche.com>, "Universal ProbeLibrary Assay Design Center"), sono state scelte le combinazioni sonda - *primer* specifici come riportato in Tabella 3.

Gene	Sonda (UPL)	Primer fw	Primer rv
<i>IFI27</i>	Probe n. 21	gtggccaaagtggcagg	ccaatcacaactgtagcaatcc
<i>IFI44L</i>	Probe n. 15	tgacactatggggctagatgg	ttggtttacgggaattaaactgat
<i>IFIT1</i>	Probe n. 82	tccacaagacagaatagccagat	gctccagactatccttgacctg
<i>ISG15</i>	Probe n. 76	gaggcagcgaactcatcttt	agcatcttcaccgtcaggtc
<i>RSAD2</i>	Probe n. 76	acaaatgcggtctctgtttc	gaaatggctctccacctgaa
<i>SIGLEC1</i>	Probe n. 76	ctgcctgcaagtctcta	cagcagtggtcactgtc
<i>HPRT1</i>	Probe n. 73	tgacctgattattttgcatacc	cgagcaagacgttcagtctt
<i>G6PD</i>	Probe n. 82	gcaaacagagtgagcccttc	gagttgctgggcaaagaagt

Tabella 3. Sonde “UPL” (Roche) e primers (Eurofins Genomics) per l’analisi della *signature* interferonica tramite qPCR.

Le sonde UPL sono caratterizzate dalla presenza di “LNA” (*Locked Nucleic Acid*), ovvero nucleotidi in cui l’anello di ribosio è bloccato tramite un ponte di metilene che collega il 2’-O al 4’-O (Figura 5). Questa peculiarità favorisce l’impaccamento delle basi, aumentando la stabilità termica e permettendo l’instaurarsi di un legame molto più forte con le basi complementari rispetto ad una sonda normale.

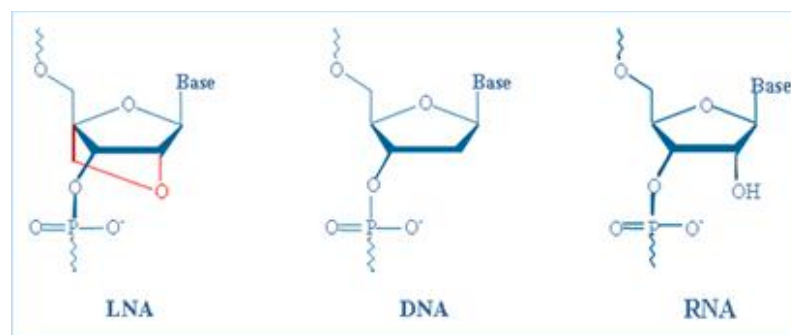


Figura 5. Paragone tra LNA (*Locked Nucleic Acid*) con l’anello di ribosio “bloccato” ed i classici DNA e RNA (fonte: <https://lifescience.roche.com>, “Universal ProbeLibrary System Technology”).

Le reazioni di pPCR sono state allestite in triplicato, sia per i campioni che per il controllo calibratore, in piastre da 96 pozzetti (AB Analitica) ed un volume totale di 20 ul a reazione, di cui:

1. 10 ul TaqMan Gene Expression Master Mix
2. 0.4 ul UPL probe (10 uM)
3. 0.4 ul Primer fw (20 uM)
4. 0.4 ul Primer rv (20 uM)
5. 3.8 ul Acqua
6. 5 ul cDNA (1 ng/ul)

Il protocollo termico utilizzato con lo strumento AB 7500 Real Time PCR è il seguente:

1. 50°C, 2 minuti
2. 95°C, 10 minuti

e 40 cicli di

1. 95°C, 15 secondi
2. 60°C, 1 minuto

Una volta condotta la qPCR, i dati sono stati analizzati con il software di analisi 7500 SDS (Applied Biosystems). Per la normalizzazione, sono stati utilizzati i due geni *housekeeping* *HPRT1* e *G6PD*. La quantificazione relativa è stata condotta secondo il metodo  $2^{(-DDCt)}$  di Livak (Livak, PMID: 11846609) utilizzando una miscela di cDNA di 10 controlli sani (campione “calibratore”). È stata poi calcolata la mediana dei valori di espressione relativa dei sei geni, che rappresenta il “punteggio” (*Interferon Score*) assegnato ad ogni paziente per definire come positiva o negativa la *signature* analizzata (utilizzando il livello soglia suggerito da Y. Crow, ovvero 2.466 [52]), e, rispettivamente, se la via dell’IFN risulta attivata o meno.

## 3.3 SELEZIONE DEI PAZIENTI PER LO STUDIO DI INTERFERONOPATIE

### 3.3.1 CRITERI DI INCLUSIONE

A partire da settembre 2016, sono stati analizzati soggetti afferenti agli ambulatori della Clinica Pediatrica dell'Ospedale Materno Infantile IRCCS Burlo Garofolo di Trieste con patologia infiammatoria non diagnosticata che presentasse una o più delle seguenti caratteristiche cliniche:

- Citopenia TORCH-*like*
- Epatopatia neonatale
- Encefalopatia con coinvolgimento cutaneo
- Leucodistrofia senza diagnosi specifica
- Encefalopatia subacuta con calcificazione dei gangli basali nei primi anni di vita
- Dermatomiosite amiotrofica
- Fenomeno di Raynaud
- Panniculite/lipodistrofia
- Febbri ricorrenti inspiegate
- Artrite idiopatica giovanile con prevalente coinvolgimento infiammatorio periarticolare

### 3.3.2 CRITERI DI SCELTA PER ANALISI GENETICA

I pazienti che presentano una *signature* interferonica elevata in almeno due test indipendenti, utilizzando il livello soglia suggerito da Yanick Crow (2.466), saranno considerati per analisi genetica per interferonopatia con una richiesta di consulenza da parte di uno specialista.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 DIMOSTRAZIONE FUNZIONALE DEL DIFETTO DI DNAsI2

L'espressione della proteina DNAsI2 nel paziente è stata dimostrata sia tramite Real-Time PCR che analisi citofluorimetrica (dati preliminari, non riportati), facendo ipotizzare che la mutazione identificata si ripercuota sull'attività enzimatica più che sulla quantità di proteina.

La presenza di una spiccata *signature* interferonica (Figura 6), unitamente ai risultati ottenuti dallo studio funzionale condotto nelle cellule di Simone, hanno permesso ipotizzare che il difetto di DNAsI2 sia responsabile di un'interferonopatia di tipo I.

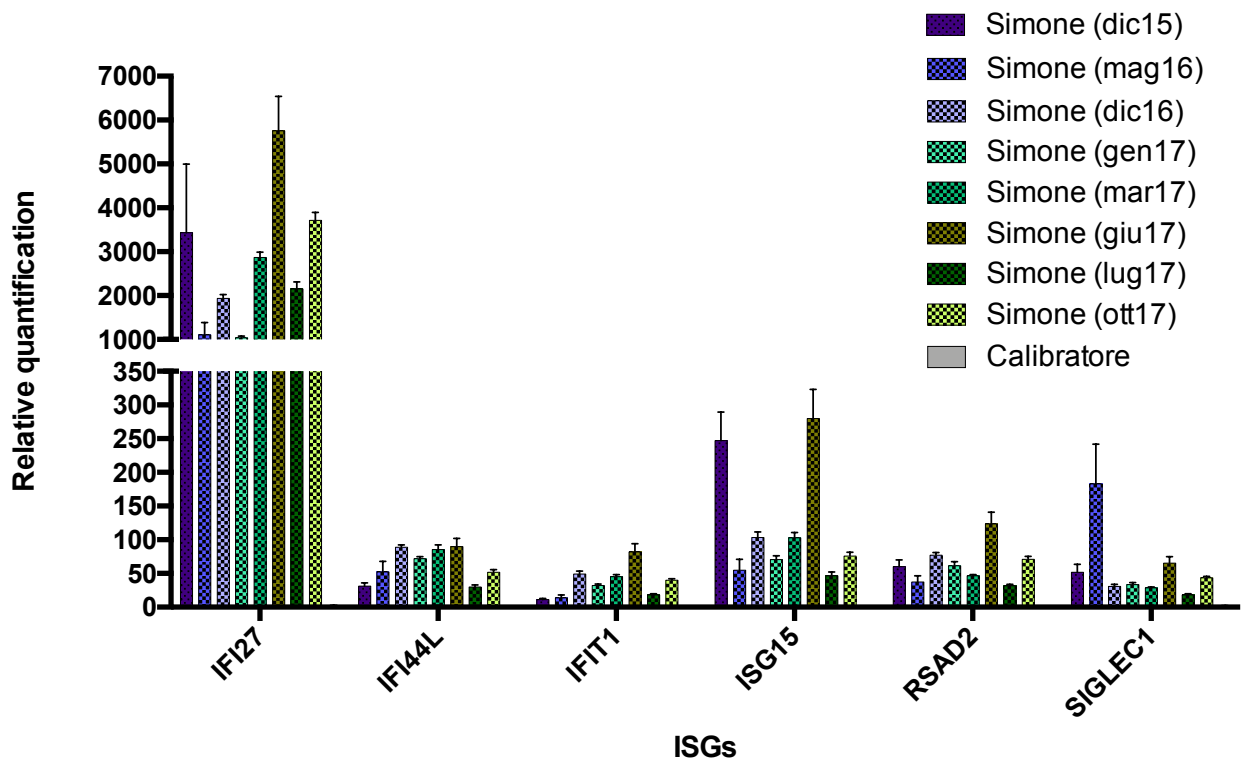


Figura 6. Rappresentazione grafica della *signature* interferonica del paziente rispetto ai controlli sani (calibratore). L'analisi è stata ripetuta più volte, confermandosi sempre come positiva: tutti i sei geni studiati risultano largamente over-espresi in Simone rispetto ai controlli sani (il campione calibratore presenta valore di espressione dei sei geni pari a 1 e non risulta visibile nel grafico).

L'ipotesi di lavoro definita per lo sviluppo del test funzionale prevede che la mutazione in DNAsi2 porti ad una ridotta efficienza nello smaltimento di DNA, con conseguente attivazione della via di segnalazione dell'IFN. Data l'espressione lisosomiale della proteina in questione, ed il suo ruolo chiave nello smaltimento di DNA incontrato in seguito a meccanismi di fagocitosi, avremmo dovuto concentrarci nello studio di macrofagi e monociti. Queste cellule però dovevano essere ottenute ogni volta dal paziente, cosa piuttosto invasiva considerate le sue condizioni. Inoltre, i monociti periferici risentirebbero troppo della condizione infiammatoria e dei trattamenti al momento del prelievo e, essendo cellule terminali, sarebbero difficili da mantenere *ex vivo* per colture a medio termine.

Abbiamo effettuato alcune prove per valutare la fattibilità e la riproducibilità di test di fagocitosi in monociti di soggetti sani, ma i risultati ottenuti non sono stati favorevoli.

La nostra scelta è ricaduta quindi sull'utilizzo dei fibroblasti del paziente, cellule stabili e facili da maneggiare. Tuttavia, non essendo queste delle cellule fagocitiche, abbiamo sfruttato due meccanismi diversi per indurre in modo fisiologico l'attivazione della via interferonica:

1. Stimolo endogeno basato su eliminazione di mitocondri danneggiati in vescicole autofagiche;
2. Stimolo esogeno basato infezione batterica con *E. coli* (concettualmente più facile e controllabile).

Il primo dei due si è rivelato di difficile esecuzione, in quanto il danno mitocondriale si può associare a gravi lesioni cellulari che rendono più difficile lo studio dei fenomeni successivi. Abbiamo quindi optato per il più semplice metodo basato sull'infezione batterica.

#### 4.1.1 ATTIVAZIONE DEL SEGNALE INTERFERONICO IN FIBROBLASTI INFETTATI CON *E. COLI*

Nonostante si pensi che l'attivazione interferonica rappresenti un meccanismo prettamente di risposta antivirale, è noto da tempo come la risposta verso i batteri intracellulare sia in grado di attivare le stesse vie di segnalazione con produzione di IFN di tipo I, almeno per quanto riguarda l'attivazione del sensore di DNA citosolico cGAS. Prendendo ispirazione da un recente lavoro [70], abbiamo quindi messo a punto il modello di stimolazione attraverso l'infezione con *E. coli* a diverse concentrazioni (MOI 10, 20, 120 e 400) sia nei fibroblasti del paziente sia nei controlli sani.

Come parametro indicatore dell'attivazione interferonica, abbiamo utilizzato la fosforilazione della proteina TBK1, misurabile per mezzo di colorazione intracellulare con un anticorpo specifico e

successiva lettura in citometria di flusso: la fosforilazione della proteina, e quindi la sua attivazione, è un evento indispensabile per la trasduzione del segnale dopo il riconoscimento del DNA intracellulare, che conduce alla sintesi di IFN di tipo I.

Dall'analisi in citofluorimetria, abbiamo osservato che i fibroblasti del paziente si attivano già in presenza di basse concentrazioni di batteri (MOI 10 e MOI 20) (Figura 7a) rispetto ai fibroblasti di controllo, il quale mostra invece un livello minimale di attivazione solo alla carica batterica più elevata (Figura 7b). Inoltre, nel paziente l'attivazione della via di segnale risulta dipendente dal MOI batterico, mentre nel controllo sano l'aumento del MOI non determina un aumento dell'attivazione di pTBK1 (Figura 8).

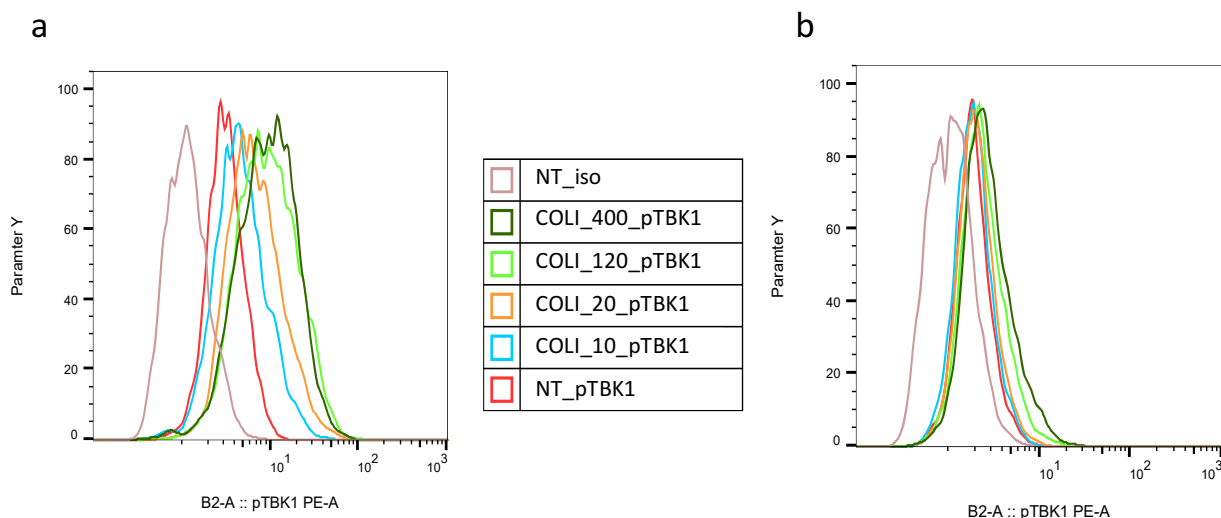


Figura 7a. Analisi rappresentativa dell'attivazione di pTBK1 sui fibroblasti del paziente dopo infezione con *E. coli*, in cui si può osservare il continuo spostamento del picco di attivazione di pTBK1 all'aumento della carica infettiva.

Figura 7b. L'attivazione di pTBK1 sui fibroblasti del controllo sano dopo infezione con *E. coli* non risulta paragonabile a quella del paziente, e nemmeno dose-dipendente.

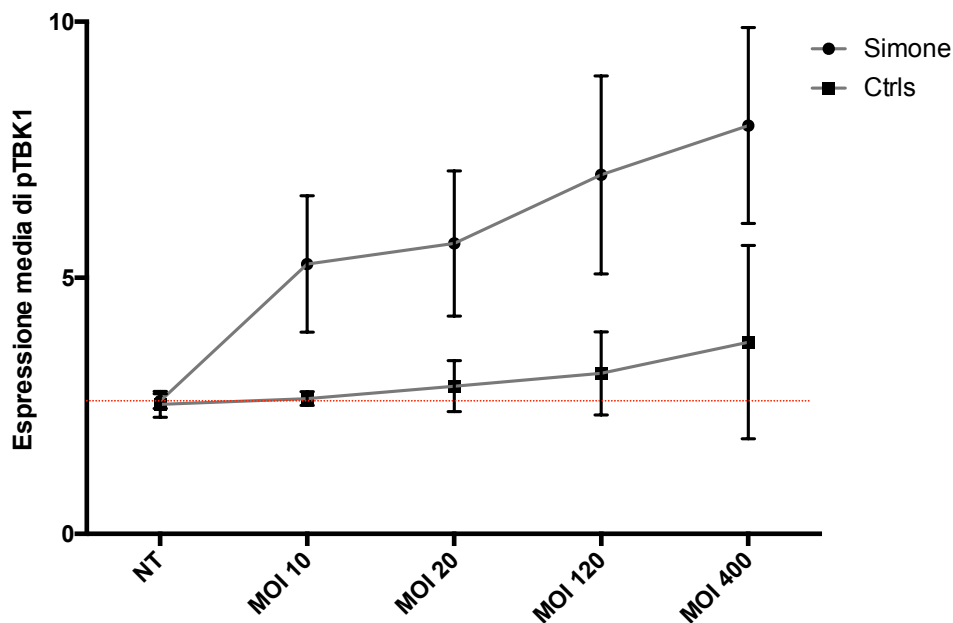


Figura 8. Valutazione dell'attivazione interferonica attraverso la misurazione di pTBK1.

I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM dell'espressione di pTBK1 rispetto al controllo isotipico dopo stimolazione con *E. coli* a diverse *Multiplicity of Infection* (MOI 10, 20, 120, 400).

La linea tratteggiata rossa rappresenta l'intensità del segnale nei campioni non trattati (NT). I risultati del paziente rappresentano la media di 3 esperimenti replicati, mentre quelli del controllo rappresentano la media di misurazioni indipendenti su 4 controlli sani.

Il confronto grafico dei risultati mostra che nel paziente la via interferonica si attiva molto di più rispetto ai controlli ed in maniera dose-dipendente già a partire della più bassa concentrazione batterica.

Nonostante il materiale di partenza (frammento biotico) da cui si coltivano i fibroblasti venga ottenuto a partire dal donatore per mezzo di una tecnica invasiva, ovvero tramite biopsia, l'utilizzo di queste cellule per lo sviluppo del test funzionale ha comportato numerosi vantaggi: come già accennato, queste cellule sono molto stabili e facilmente maneggiabili, ed inoltre non subiscono gli effetti dell'attività di malattia al momento del prelievo, permettendo quindi lo sviluppo di un test riproducibile e di facile interpretazione.

Infine, grazie al monitoraggio dell'attivazione della via interferonica, il test potrebbe fornire un utile modello per la valutazione dell'effetto di farmaci attivi a livello dei meccanismi coinvolti nella *clearance* degli acidi nucleici.

## 4.2 SIGNATURE INTERFERONICA

La misura della *signature* interferonica è stata utilizzata come strumento di screening per identificare possibili disregolazioni nella via di produzione dell'IFN di tipo I, a partire da soggetti che presentavano patologie infiammatorie non diagnosticate o malattie infiammatorie con aspetti atipici con una o più caratteristiche cliniche tipiche delle interferonopatie. La possibile utilità dello studio risiede nella possibilità di indirizzare il trattamento terapeutico verso l'utilizzo di farmaci attivi nella via di segnalazione responsabile della malattia.

Lo studio delle diverse SI, riportate in Tabella 4, è stata così condotta:

1. analisi dei valori di espressione di ognuno dei sei geni della SI, gene per gene, in tutti i soggetti studiati. I valori relativi ad ogni gene sono stati quindi divisi in sestili sulla base del valore maggiore di espressione registrato;
2. raggruppamento dei pazienti (37 in totale) sulla base del tipo di patologia presentato.

	IFI27	IFIT1	IFI44L	ISG15	RSAD2	SIGLEC1
<b>Interferonopatie</b>	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red
	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Yellow
	Yellow	Red	Yellow	Green	Yellow	Red
<b>AGS-like</b>	Green	Yellow	Yellow	Red	Red	Yellow
	Red	Green	Green	Green	Green	Green
<b>LES</b>	Yellow	Red	Red	Yellow	Red	Yellow
	Yellow	Red	Yellow	Yellow	Red	Yellow
<b>AIG</b>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow
	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow
	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<b>Febbri ricorrenti</b>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green
	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<b>Altre</b>	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
	Green	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Green
	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	Green	Green	Green	Green	Green	Green
	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green

Tabella 4. Analisi delle SI raggruppate in base alla patologia. Per favorire il riconoscimento visivo immediato, i valori di espressione di ogni gene sono stati suddivisi in sestili e rappresentati in scala cromatica: dal verde scuro (valore minore di espressione), al rosso scuro (valore maggiore).

I risultati ottenuti in seguito al raggruppamento effettuato sono riassunti in Tabella 5:

<b>Tipo di patologia</b>	<b>N° soggetti analizzati</b>	<b><i>Signature</i> interferonica (SI)</b>	<b>Coerenza SI con ipotesi clinica</b>	<b>Successiva indagine genetica</b>
Febbri ricorrenti	10	Negativa	Si	No
AIG (artrite idiopatica giovanile)	9	Negativa	Si	No
LES (lupus eritematoso sistemico)	2	Positiva	Si	No
Quadri complessi con elementi suggestivi di interferonopatia	4	Positiva	Si	Si
AGS (Aicardi-Goutières) <i>-like</i>	2	Positiva	Si	Si

Tabella 5. Raggruppamento dei pazienti per cui è stata analizzata la SI: in tabella sono riportati i soggetti suddivisi in base alla patologia presentata, le relative numerosità, i risultati della *signature* interferonica, la coerenza con quanto atteso in base al sospetto, e l'esecuzione di eventuali indagini genetiche di approfondimento.

Complessivamente, il test della SI si è rivelato estremamente riproducibile ed affidabile per quanto riguarda la concordanza con i dati presenti in letteratura (soggetti con LES presentano SI positive, mentre pazienti con febbri ricorrenti ed AIG non mostrano un apparente coinvolgimento interferonico). Per questo motivo, riteniamo l'analisi della SI un valido strumento per l'identificazione di possibili interferonopatie di tipo I.

Tra i soggetti con SI positiva, sono di seguito descritti i casi che presentano dei sintomi AGS-*like*:

1. Rithik, nel primo anno di vita ha sviluppato un quadro di ritardo neuromotorio ed episodi febbrili ricorrenti riconducibili alla PFAPA. Successivamente, è subentrato anche un ritardo del linguaggio. È stata eseguita l'analisi di *SNPs-array* per indagare eventuali CNVs (*copy number variants*) come microdelezioni/inserzioni nel DNA, da cui però non è emerso alcun

dato utile alla comprensione del fenotipo. È stata avviata quindi l'analisi di *target sequencing* di un pannello di geni per disabilità cognitiva isolata, senza condurre ad alcun risultato utile. Nell'ultimo anno però è stato registrato un miglioramento clinico, poiché il bambino non ha più presentato episodi febbrili ed ha migliorato le capacità di linguaggio, non rendendo necessario alcun trattamento terapeutico specifico. È possibile che il bambino abbia avuto un episodio acuto durante il quale la *signature* interferonica è risultata mediamente positiva, perciò si ritiene necessario ripetere il test in un momento di benessere. Questa ipotesi potrebbe essere avvalorata dalla presenza di un profilo atipico della SI con valori modesti del gene IFI27.

2. Giacomo, ha sviluppato poco dopo la nascita una citopenia multilineare in assenza di un'infezione virale evidente. L'unico rilevato è stato il virus HHV-6 (*human herpesvirus 6*), che risultava integrato e proliferante, ereditato dal padre. Durante il suo primo, ed unico, mese di vita ha sviluppato un'epatopatia ed è deceduto con un quadro di insufficienza multiorgano. È stata quindi eseguita l'analisi di esoma per cercare un'interferonopatia TORCH-like o un difetto immunitario che rendesse clinicamente evidente l'infezione da parte di un virus che fino ad oggi non è mai stato ritenuto responsabile di una patologia tale. Dall'analisi però non è per ora emerso nessun dato significativo.

Degli altri soggetti, solamente quelli che presentano caratteristiche cliniche che rientrano nel quadro delle interferonopatie sono stati sottoposti ad indagini genetiche. In particolare, sono stati considerati elementi suggestivi di interferonopatia in un soggetto con positività agli indici di flogosi:

- febbri inspiegate non responsive al cortisone;
- leucodistrofia;
- noduli dolorosi e lipodistrofia;
- lesioni cutanee simili al lupus eritematoso sistemico in assenza di diagnosi di lupus;
- citopenia ed epatopatia neonatale in assenza di infezione virale.

La prima interferonopatia identificata è il difetto di DNAsi2, già descritto in precedenza. Ci siamo quindi concentrati nello studio degli altri tre possibili casi:

1. Laura, ragazza di 19 anni con manifestazioni cliniche peculiari delle interferonopatie, quali dermatomiosite amiotrofica, manifestazioni cutanee (lipodistrofia) ed articolari (artrite) mostrati fin dai primi anni di vita, con la comparsa, negli ultimi anni, di caratteristiche

lupus-like quali ulcerazioni a mani e piedi. Tutti i farmaci assunti (da classici anti-infiammatori ed immunosoppressori, fino ad Anakinra ed antimalarici come Idrossiclorochina) non hanno mai sortito grandi benefici. Ad oggi, ha iniziato il trattamento con Tofacitinib (inibitore di JAK1/3, assunto in dosaggio 10 mg due volte al dì), che ha portato ad una buona risposta per quanto riguarda la normalizzazione dei valori dell'emoglobina e la scomparsa dei noduli panniculitici.

Il quadro clinico, la refrattarietà ai trattamenti convenzionali e la *signature* interferonica positiva ci convincono a parlare di interferonopatia. La ragazza è stata sottoposta ad analisi di esoma e si attende l'analisi definitiva dei dati ottenuti per individuare possibili varianti causative della malattia. Un possibile gene candidato in cui è stata identificata una mutazione è *RECQL5*, che codifica per un'elicasi che svolge un ruolo fondamentale durante la replicazione, la trascrizione ed il riparo del DNA. La variante è presente in altri due membri della famiglia (il padre Moreno e la cugina Silvia) che hanno sintomi compatibili con un'interferonopatia e SI positiva.

Per cercare di chiarire il quadro clinico, abbiamo analizzato la *signature* interferonica anche nei componenti della famiglia di Laura. Membri che presentano caratteristiche cliniche rilevanti sono soprattutto il padre, che presenta spondiloartrite e geloni, e la cugina Silvia, con geloni e lipodistrofia. In seguito a questo studio, sono però emerse alcune problematiche per quanto riguarda l'interpretazione di concordanza/discordanza tra clinica e risultato della *signature*, come si può vedere dalla Figura 9: la sorella Marta mostra *signature* positiva, anche in assenza di sintomi clinici, mentre lo zio Bruno presenta *signature* negativa, nonostante una debole artrite.

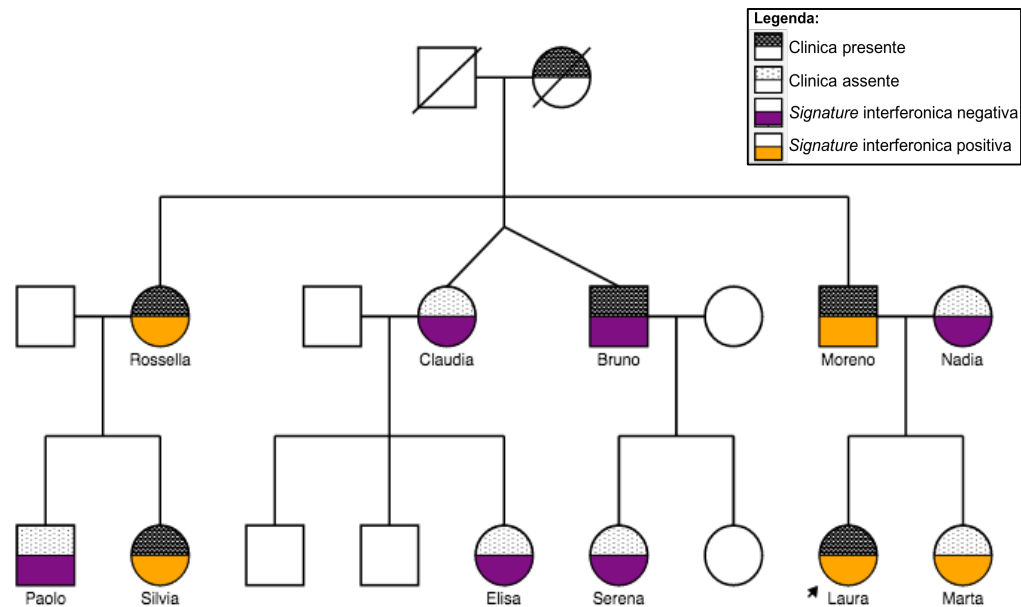


Figura 9. Ramo paterno dell'albero genealogico della famiglia di Laura (il ramo materno non è stato incluso perché nessun componente presenta manifestazioni cliniche). Sono riportati i soggetti affetti (la cugina Silvia, il papà Moreno e gli zii Bruno e Rossella), i soggetti sani (altri membri della famiglia), ed i risultati della *signature* interferonica (viola quando negativo, giallo quando positivo).

Una possibile interpretazione della discordanza tra clinica e SI misurata è che possa dipendere dalla presenza di un fattore condiviso all'interno della famiglia che porta all'alterata produzione interferonica, ma a diversi tipi di patologia, sulla base della contemporanea presenza di uno o più fattori non noti genetici e/o componenti ambientali.

2. Daniele, bambino di 2 anni con leucoencefalopatia, ritardo psicomotorio e febbri ricorrenti in cui si sospetta fortemente un'interferonopatia grazie anche alla positività del test della SI, confermata ad ogni prelievo. È stato sottoposto ad analisi genetica con *SNPs-array* (ILLUMINA) per lo screening dei geni coinvolti nel ritardo psicomotorio, da cui è emersa una delezione di circa 1.34 Mb nella regione p13.11 del cromosoma 16, confermata anche nella madre. In diversi casi, sono state associate delle CNVs nel cromosoma 16p13.11, che si verificano soprattutto nel genere maschile, con disordini neurologici quali autismo, disabilità mentale ed epilessia [71]. Inoltre, nel 2015 è stata fatta la prima associazione tra la delezione 16p13.11 e la "Sindrome da emiconvulsioni-emiplegia-epilessia" [72], che condivide con il nostro paziente alcune caratteristiche quali le convulsioni febbrili.

La delezione rilevata porta alla perdita del gene *RRN3*, che codifica per un fattore di trascrizione essenziale per la corretta funzionalità della RNA polimerasi I. Questo gene, che non risulta attualmente associato a nessuna patologia, potrebbe considerarsi come uno dei possibili responsabili della malattia di Daniele. L'ipotesi che ci sia più di un gene coinvolto è supportata dall'evidenza che la madre, seppur condivida la stessa delezione del figlio, presentava in gioventù solo episodi di epilessia, ma non lo stesso importante quadro clinico descritto in Daniele. Attualmente, siamo in attesa dell'analisi genetica del sequenziamento *target* di un set di geni coinvolti nelle più comuni malattie auto-infiammatorie, per decidere poi come procedere con aggiuntive analisi genetiche. Il bambino assume solo del cortisone durante le crisi febbrili, ma con limitato beneficio. È quindi in corso di valutazione l'avvio di un trattamento continuativo anti-infiammatorio con Idrossiclorochina o Colchicina.

3. Aurora, ragazza di 13 anni, presenta alla nascita epatopatia acuta, e successivamente sviluppa splenomegalia, anemia, lipodistrofia, ed aree gliotiche cerebrali. Queste caratteristiche cliniche, estremamente simili a quelle di Simone, hanno indirizzato l'analisi genetica verso il sequenziamento dell'enzima lisosomiale DNAsi2, attraverso cui è stata identificata una nuova mutazione in eterozigosi, che porta alla produzione della proteina tronca. La variante è stata confermata anche nel padre, che però risulta asintomatico. La proteina, invece, risulta over-espressa in Aurora rispetto ai genitori, sia in seguito ad analisi di Real-Time PCR che di citofluorimetria. Saranno necessarie altre indagini genetiche per chiarire il fenotipo clinico, anche se non sembra plausibile che la variante identificata non giochi un ruolo causale nella patologia. Attualmente, la ragazza si trova in un'apparente stazionarietà del quadro clinico, perciò assume solo Insulina e Metformina per il trattamento del diabete.

## 5. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Al termine di questo lavoro, sono stati identificati e prodotti diversi elementi fortemente in sostegno della nostra tesi secondo cui il difetto di DNAsi2 rappresenterebbe la causa della malattia di Simone.

In particolare:

- il fenotipo clinico, con la caratteristica epatopatia è reminiscente del fenotipo descritto nei modelli murini DNAsi2<sup>-/-</sup>;
- il test della *signature* interferonica, analizzata più volte e sempre confermata come positiva;
- la dimostrazione che il carico di DNA nei fibroblasti del paziente porta ad una disregolazione della via interferonica significativamente differente rispetto ai controlli sani analizzati.

Altri dati importanti a provare la responsabilità della DNAsi2 in questa malattia provengono dalla descrizione da parte di Yanick Crow di una seconda famiglia con la stessa patologia. La ridotta attività della DNAsi2 nella digestione di DNA è stata dimostrata sia nelle cellule dei pazienti (fibroblasti), che in HEK293 tramite espressione di plasmidi recanti l'enzima mutato. Inoltre, in plasma e siero dei pazienti sono stati registrati elevati livelli di IFN- $\alpha$ , mentre nel sangue periferico è stata riscontrata l'over-espressione degli ISGs. Tutti i risultati ottenuti sono stati confermati dall'esperimento di *knockdown* della DNAsi2 tramite siRNA in fibroblasti di controllo, che mostrano una diminuita attività enzimatica della DNAsi2, ed un'over-espressione degli ISGs. L'esecuzione di questi test funzionali ed il confronto degli aspetti clinici nei diversi pazienti ha quindi permesso di convalidare il ruolo della DNAsi2 in questa interferonopatia [66].

L'identificazione di un'interferonopatia in soggetti con malattia reumatologica risulta di grande interesse poiché permette di identificare il meccanismo alla base della patologia, ovvero la disregolazione interferonica, e quindi di direzionare la scelta terapeutica. La classificazione del difetto di DNAsi2 come interferonopatia ha quindi permesso di rimodulare il trattamento terapeutico con farmaci mirati per agire con maggior specificità su questo tipo di infiammazione (Ruxolitinib, Mepacrina ed Idrossiclorochina), portando ad un generale miglioramento della qualità di vita di Simone, con la possibilità di ridurre il dosaggio cortisonico.

La scelta del Ruxolitinib, inibitore della tirosin chinasi JAK1/2 coinvolta nella trasmissione del segnale del recettore dell'IFN di tipo I, è stata incoraggiata anche dai risultati preliminari

soddisfacenti ottenuti da diversi *trials* che prevedono l'utilizzo di JAK inibitori (Ruxolitinib e Baricitinib) in pazienti con interferonopatie quali CANDLE e SAVI [73,74].

Il trattamento prevede anche l'utilizzo di due antimalarici, Idrossiclorochina e Mepacrina. Gli antimalarici sono farmaci noti sin dall'800, quando si estraeva il chinino dalla corteccia dell'albero Chincona per la sua efficacia nel trattamento della malaria. L'effettivo impiego degli antimalarici risale però agli anni '40 quando venne sintetizzata la Mepacrina (conosciuta anche come Quinacrina e commercializzata come Atabrina) come trattamento di profilassi per i soldati americani in seguito all'esposizione alla malaria [75,76]. L'effetto "collaterale" scoperto grazie all'utilizzo massivo di questa molecola era di tipo anti-infiammatorio, diretto soprattutto contro artrite e lesioni cutanee, ovvero contro le manifestazioni tipiche delle malattie reumatiche. Per questo motivo, da decenni gli antimalarici sono impiegati per il trattamento del lupus [77,78] e, nei casi più difficili e refrattari al trattamento, era abitudine comune a molti reumatologi l'affiancamento del secondo antimalarico. I diversi meccanismi d'azione di questi farmaci, chiariti in parte solo a partire dagli anni 2000, si traducono in un globale effetto anti-infiammatorio. Il più interessante, di solo recente identificazione, spiega come questi farmaci agiscano direttamente sul sensore cGAS: grazie ad analisi cristallografica della struttura di questa proteina, sono stati identificati i due siti di legame dell'enzima, quello catalitico e quello regolatorio, entrambi target per Mepacrina ed Idrossiclorochina, che si legano al solco minore del DNA ed impediscono quindi il legame con cGAS. Questo previene la produzione di cGAMP e quindi l'attivazione del segnale che porta alla produzione di IFN di tipo I [75].

Tutte queste evidenze raccolte sugli antimalarici, in aggiunta alla loro semplicità di assunzione e al profilo piuttosto sicuro d'azione, ci permettono di considerarli come interessanti farmaci per il trattamento delle interferonopatie di tipo I.

Gli strumenti messi a punto durante questo progetto, quali l'analisi della *signature* interferonica ed il test di infezione di fibroblasti con *E. coli*, possono poi risultare estremamente utili per la valutazione e l'ottimizzazione di trattamenti attivi nella via interferonica.

- La *signature* interferonica permette di capire se ci troviamo in presenza di una disregolazione nella via di segnale dell'IFN di tipo I, e quindi di un'interferonopatia, attraverso la valutazione dell'espressione nel sangue periferico di un gruppo di geni indotti dall'interferone (*Interferon Stimulated Genes*, ISGs). Importante sottolineare che con questo test, veloce e di semplice esecuzione, possiamo ottenere una "fotografia" dell'azione

dell'interferone a livello sistemico e al giorno d'oggi, difatti, viene preferito rispetto al classico dosaggio degli interferoni nei liquidi biologici.

- Il test funzionale sviluppato sui fibroblasti permette una misura quantitativa della cinetica di risposta allo stimolo batterico (determinato dalla presenza di DNA esogeno ed altri componenti pro-infiammatori), seppur si tratti di una misurazione indiretta poiché dedotta dai livelli di attivazione della proteina TBK1. La metodica mostra grande riproducibilità e informatività, avvantaggiandosi della stabilità dei fibroblasti primari, e della semplice e chiara lettura citometrica.

Per maggior rigore, consideriamo utile validare ulteriormente il modello, valutando se la ricostituzione della DNAsi2 con un vettore di espressione lentivirale contenente il gene *wild type* sia in grado di normalizzare i livelli di pTBK1, ovvero di condurre ad una correzione del fenotipo patologico (studio in fase di svolgimento in collaborazione con la SISSA, prof. Mallamaci).

Alla luce di tutte queste evidenze, concludiamo dicendo che riteniamo appropriato:

1. identificare un'interferonopatia, anche su base genetica, per permettere l'utilizzo di farmaci attivi nella via interferonica, e quindi più indirizzati verso il particolare tipo di infiammazione responsabile della patologia in questione;
2. proporre a diversi livelli una traccia di "protocollo diagnostico terapeutico assistenziale" (PDTA) che tenga conto del complesso universo delle interferonopatie sia in ambito neonatologico, che neurologico e reumatologico (Figura 8):

<p style="text-align: center;"><b>PERCHE' PENSARCI</b></p> <p>Aumenta la disponibilità di farmaci che potrebbero contenere l'infiammazione interferonica e migliorare la prognosi. Questi includono gli antimalarici, i nuovi inibitori di JAK1 e gli anticorpi monoclonali anti IFNAR.</p> <p style="text-align: center;"><b>QUANDO PENSARCI</b></p> <p><b>In neonatologia:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Citopenia TORCH-like</li> <li>- Epatopatia neonatale</li> <li>- Encefalopatia con coinvolgimento cutaneo</li> </ul> <p><b>In neurologia:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Leucodistrofia senza diagnosi specifica, specie se associata a sintomi febbrili, geloni, e/o citopenia</li> <li>- Encefalopatia subacuta con calcificazione dei gangli basali nei primi anni di vita, specie se con episodi febbrili e tendenza a sviluppare microcefalia</li> </ul> <p><b>In reumatologia:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dermatomiosite amiotrofica</li> <li>- Fenomeno di Raynaud</li> <li>- Panniculite/lipodistrofia</li> <li>- Febbri ricorrenti inspiegate</li> <li>- Tanta infiammazione con poca PCR</li> </ul>	<h2 style="text-align: center;">INTERFERONOPATIE</h2> <p style="text-align: center;"><b>UN AIUTO PER LA DIAGNOSI</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- La signature interferonica</li> <li>- Il profilo LRTE (pannello PID)</li> <li>- Dosaggio biomarcatori (CXCL9, PV1)</li> <li>- Pannelli genetici interferonopatie</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>CHE COSA FARE</b></p> <p><b>Prelievi:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sangue eparina (per pannello PID)</li> <li>- Siero (per biomarcatori)</li> <li>- Provetta PaxTube (per signature)</li> <li>- Provetta EDTA (per genetica)</li> </ul> <p><b>In caso di rachicentesi o biopsia cutanea</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Analisi signature su cellule</li> <li>- Coltura fibroblasti</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>CHI CONTATTARE</b></p> <p style="text-align: center;">Lab dr. Tommasini int 422 Breve 666.220</p>
--	---

Figura 8. Proposta di PDTA per lo studio delle interferonopatie all'IRCCS Burlo Garofolo.

Tuttavia, prima di poter utilizzare il test della *signature* interferonica con un consolidato valore diagnostico, sarà necessario affrontare alcune sue limitazioni:

1. non rappresenta una metodica standardizzata tra i diversi centri ospedalieri che ne fanno utilizzo (Trieste, Genova, Brescia, Roma), poiché, in ogni laboratorio, i campioni di controllo impiegati nell'analisi sono diversi. Questo si traduce in un difficile confronto dei risultati ottenuti tra i diversi laboratori interessati. Attualmente, si sta lavorando per la standardizzazione del metodo della SI, proponendo l'impiego di un plasmide (contenente la sequenza di tutti i geni analizzati), da condividere tra i diversi centri. Il beneficio si riscontra nella possibilità di utilizzare una quantità nota di ogni gene da considerare come riferimento per l'analisi dell'espressione genica dei pazienti, superando quindi il limite dettato dall'utilizzo di controlli differenti;
2. non disponiamo di valori predittivi positivi e negativi per ogni patologia, perciò dovremo allargare i parametri di riferimento in soggetti completamente sani o in specifiche condizioni morbose per comprendere i valori di specificità, sensibilità e valori predittivi.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Smith CD, Cyr M: **The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler.** *Rheum Dis Clin North Am* 1988, **14**:1-14.
2. Lisnevskaja L, Murphy G, Isenberg D: **Systemic lupus erythematosus.** *Lancet* 2014, **384**:1878-1888.
3. McGonagle D, McDermott MF: **A proposed classification of the immunological diseases.** *PLoS Med* 2006, **3**:e297.
4. Tsokos GC: **Systemic lupus erythematosus.** *N Engl J Med* 2011, **365**:2110-2121.
5. Mok CC, Lau CS: **Pathogenesis of systemic lupus erythematosus.** *J Clin Pathol* 2003, **56**:481-490.
6. Al-Mayouf SM, Sunker A, Abdwani R, Abrawi SA, Almurshedi F, Alhashmi N, Al Sonbul A, Sewairi W, Qari A, Abdallah E, et al.: **Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus.** *Nat Genet* 2011, **43**:1186-1188.
7. Dörner T, Giesecke C, Lipsky PE: **Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**:243.
8. Tsokos GC, Lo MS, Costa Reis P, Sullivan KE: **New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus.** *Nat Rev Rheumatol* 2016, **12**:716-730.
9. Moulton VR, Suarez-Fueyo A, Meidan E, Li H, Mizui M, Tsokos GC: **Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective.** *Trends Mol Med* 2017, **23**:615-635.
10. Mina R, Brunner HI: **Pediatric lupus - Are there differences in presentation, genetics, response to therapy, and damage accrual compared with adult lupus?** *Rheum Dis Clin North Am* 2010, **36**:53-80, vii-viii.
11. Costa-Reis P, Sullivan KE: **Monogenic lupus: it's all new!** *Curr Opin Immunol* 2017, **49**:87-95.
12. Furie R, Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, Kalunian K, Brohawn P, Illei GG, Drappa J, Wang L, Yoo S, et al.: **Anifrolumab, an Anti-Interferon- $\alpha$  Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus.** *Arthritis Rheumatol* 2017, **69**:376-386.
13. Belot A, Cimaz R: **Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis.** *Pediatr Rheumatol Online J* 2012, **10**:21.
14. Volpi S, Picco P, Caorsi R, Candotti F, Gattorno M: **Type I interferonopathies in pediatric rheumatology.** *Pediatr Rheumatol Online J* 2016, **14**:35.
15. Malattia C, Martini A: **Paediatric-onset systemic lupus erythematosus.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2013, **27**:351-362.
16. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science* 2004, **303**:1532-1535.
17. Yu Y, Su K: **Neutrophil Extracellular Traps and Systemic Lupus Erythematosus.** *J Clin Cell Immunol* 2013, **4**.
18. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Möröy T: **Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice.** *Nat Genet* 2000, **25**:177-181.
19. Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, Tsukamoto H, Hashimura C, Urushihara M, Kuroda Y: **Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus.** *Nat Genet* 2001, **28**:313-314.
20. Lo MS: **Monogenic Lupus.** *Curr Rheumatol Rep* 2016, **18**:71.

21. Yang YG, Lindahl T, Barnes DE: **Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease.** *Cell* 2007, **131**:873-886.
22. Stetson DB, Ko JS, Heidmann T, Medzhitov R: **Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity.** *Cell* 2008, **134**:587-598.
23. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ: **Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway.** *Science* 2013, **339**:786-791.
24. Aicardi J, Goutières F: **A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis.** *Ann Neurol* 1984, **15**:49-54.
25. Rice G, Patrick T, Parmar R, Taylor CF, Aeby A, Aicardi J, Artuch R, Montalto SA, Bacino CA, Barroso B, et al.: **Clinical and molecular phenotype of Aicardi-Goutières syndrome.** *Am J Hum Genet* 2007, **81**:713-725.
26. Janeway CA: **Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989, **54 Pt 1**:1-13.
27. Stetson DB, Medzhitov R: **Type I interferons in host defense.** *Immunity* 2006, **25**:373-381.
28. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM: **Nucleic acid recognition by the innate immune system.** *Annu Rev Immunol* 2011, **29**:185-214.
29. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell* 2006, **124**:783-801.
30. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B: **Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution.** *Eur Cytokine Netw* 2000, **11**:362-371.
31. Krieg AM: **CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.** *Annu Rev Immunol* 2002, **20**:709-760.
32. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T: **The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.** *Nat Immunol* 2004, **5**:730-737.
33. Lee-Kirsch MA: **Nucleic acid metabolism and systemic autoimmunity revisited.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**:1208-1212.
34. Nagata S, Hanayama R, Kawane K: **Autoimmunity and the clearance of dead cells.** *Cell* 2010, **140**:619-630.
35. Isaacs A, Lindenmann J: **Virus interference. I. The interferon.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957, **147**:258-267.
36. Wheelock EF: **Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin.** *Science* 1965, **149**:310-311.
37. Crow YJ, Black DN, Ali M, Bond J, Jackson AP, Lefson M, Michaud J, Roberts E, Stephenson JB, Woods CG, et al.: **Cree encephalitis is allelic with Aicardi-Goutières syndrome: implications for the pathogenesis of disorders of interferon alpha metabolism.** *J Med Genet* 2003, **40**:183-187.
38. Starokadomskyy P, Gemelli T, Rios JJ, Xing C, Wang RC, Li H, Pokatayev V, Dozmorov I, Khan S, Miyata N, et al.: **DNA polymerase- $\alpha$  regulates the activation of type I interferons through cytosolic RNA:DNA synthesis.** *Nat Immunol* 2016, **17**:495-504.
39. Grieves JL, Fye JM, Harvey S, Grayson JM, Hollis T, Perrino FW: **Exonuclease TREX1 degrades double-stranded DNA to prevent spontaneous lupus-like inflammatory disease.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2015, **112**:5117-5122.
40. Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, Robins P, Leitch A, Ali M, Black DN, van Bokhoven H, Brunner HG, Hamel BC, et al.: **Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus.** *Nat Genet* 2006, **38**:917-920.

41. Crow YJ, Leitch A, Hayward BE, Garner A, Parmar R, Griffith E, Ali M, Semple C, Aicardi J, Babul-Hirji R, et al.: **Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection.** *Nat Genet* 2006, **38**:910-916.
42. Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, Groom HC, Rice GI, Christodoulou E, Walker PA, Kelly G, Haire LF, Yap MW, et al.: **HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase.** *Nature* 2011, **480**:379-382.
43. Rice GI, Bond J, Asipu A, Brunette RL, Manfield IW, Carr IM, Fuller JC, Jackson RM, Lamb T, Briggs TA, et al.: **Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response.** *Nat Genet* 2009, **41**:829-832.
44. Liddicoat BJ, Piskol R, Chalk AM, Ramaswami G, Higuchi M, Hartner JC, Li JB, Seeburg PH, Walkley CR: **RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself.** *Science* 2015, **349**:1115-1120.
45. Rice GI, Kasher PR, Forte GM, Mannion NM, Greenwood SM, Szykiewicz M, Dickerson JE, Bhaskar SS, Zampini M, Briggs TA, et al.: **Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature.** *Nat Genet* 2012, **44**:1243-1248.
46. Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, et al.: **Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations.** *Am J Hum Genet* 2014, **95**:121-125.
47. Rice GI, Del Toro Duany Y, Jenkinson EM, Forte GM, Anderson BH, Ariaudo G, Bader-Meunier B, Baildam EM, Battini R, Beresford MW, et al.: **Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling.** *Nat Genet* 2014, **46**:503-509.
48. Lee-Kirsch MA, Wolf C, Günther C: **Aicardi-Goutières syndrome: a model disease for systemic autoimmunity.** *Clin Exp Immunol* 2014, **175**:17-24.
49. Lebon P, Badoual J, Ponsot G, Goutières F, Hémeury-Cukier F, Aicardi J: **Intrathecal synthesis of interferon-alpha in infants with progressive familial encephalopathy.** *J Neurol Sci* 1988, **84**:201-208.
50. Liu Y, Jesus AA, Marrero B, Yang D, Ramsey SE, Sanchez GAM, Tenbrock K, Wittkowski H, Jones OY, Kuehn HS, et al.: **Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome.** *N Engl J Med* 2014, **371**:507-518.
51. Zhang X, Bogunovic D, Payelle-Brogard B, Francois-Newton V, Speer SD, Yuan C, Volpi S, Li Z, Sanal O, Mansouri D, et al.: **Human intracellular ISG15 prevents interferon- $\alpha/\beta$  over-amplification and auto-inflammation.** *Nature* 2015, **517**:89-93.
52. Rice GI, Forte GM, Szykiewicz M, Chase DS, Aeby A, Abdel-Hamid MS, Ackroyd S, Allcock R, Bailey KM, Balottin U, et al.: **Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study.** *Lancet Neurol* 2013, **12**:1159-1169.
53. Yao Y, Higgs BW, Morehouse C, de Los Reyes M, Trigona W, Brohawn P, White W, Zhang J, White B, Coyle AJ, et al.: **Development of Potential Pharmacodynamic and Diagnostic Markers for Anti-IFN- $\alpha$  Monoclonal Antibody Trials in Systemic Lupus Erythematosus.** *Hum Genomics Proteomics* 2009, **2009**.
54. Evans CJ, Aguilera RJ: **DNase II: genes, enzymes and function.** *Gene* 2003, **322**:1-15.
55. Schafer SL, Lin R, Moore PA, Hiscott J, Pitha PM: **Regulation of type I interferon gene expression by interferon regulatory factor-3.** *J Biol Chem* 1998, **273**:2714-2720.
56. Novick D, Cohen B, Rubinstein M: **The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning.** *Cell* 1994, **77**:391-400.

57. de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ: **Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions.** *J Biol Chem* 2007, **282**:20053-20057.
58. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA: **The JAK/STAT signaling pathway.** *J Cell Sci* 2004, **117**:1281-1283.
59. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM: **Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses.** *Annu Rev Immunol* 2014, **32**:513-545.
60. Crow YJ, Manel N: **Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies.** *Nat Rev Immunol* 2015, **15**:429-440.
61. Li X, Shu C, Yi G, Chaton CT, Shelton CL, Diao J, Zuo X, Kao CC, Herr AB, Li P: **Cyclic GMP-AMP synthase is activated by double-stranded DNA-induced oligomerization.** *Immunity* 2013, **39**:1019-1031.
62. Luecke S, Holleufer A, Christensen MH, Jønsson KL, Boni GA, Sørensen LK, Johannsen M, Jakobsen MR, Hartmann R, Paludan SR: **cGAS is activated by DNA in a length-dependent manner.** *EMBO Rep* 2017, **18**:1707-1715.
63. Li XD, Wu J, Gao D, Wang H, Sun L, Chen ZJ: **Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects.** *Science* 2013, **341**:1390-1394.
64. Yoshida H, Okabe Y, Kawane K, Fukuyama H, Nagata S: **Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA.** *Nat Immunol* 2005, **6**:49-56.
65. Lan YY, Londoño D, Bouley R, Rooney MS, Hacohen N: **Dnase2a deficiency uncovers lysosomal clearance of damaged nuclear DNA via autophagy.** *Cell Rep* 2014, **9**:180-192.
66. Rodero MP, Tesser A, Bartok E, Rice GI, Della Mina E, Depp M, Beitz B, Bondet V, Cagnard N, Duffy D, et al.: **Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency.** *Nat Commun* 2017, **8**:2176.
67. Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, Yoshikawa H, Nagata S: **Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages.** *Nature* 2006, **443**:998-1002.
68. Baum R, Sharma S, Carpenter S, Li QZ, Busto P, Fitzgerald KA, Marshak-Rothstein A, Gravalles EM: **Cutting edge: AIM2 and endosomal TLRs differentially regulate arthritis and autoantibody production in DNase II-deficient mice.** *J Immunol* 2015, **194**:873-877.
69. Gao D, Li T, Li XD, Chen X, Li QZ, Wight-Carter M, Chen ZJ: **Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**:E5699-5705.
70. McCormack R, de Armas LR, Shiratsuchi M, Ramos JE, Podack ER: **Inhibition of intracellular bacterial replication in fibroblasts is dependent on the perforin-like protein (perforin-2) encoded by macrophage-expressed gene 1.** *J Innate Immun* 2013, **5**:185-194.
71. Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJ, Breen G, Rucker J, Dixit A, Pal DK, McGuffin P, Farmer A, White PS, et al.: **Male-biased autosomal effect of 16p13.11 copy number variation in neurodevelopmental disorders.** *PLoS One* 2013, **8**:e61365.
72. Miteff CI, Smith RL, Bain NL, Subramanian G, Brown JE, Kamien B: **16p13.11 microdeletion in a patient with hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome: a case report.** *J Child Neurol* 2015, **30**:83-86.
73. Frémond ML, Rodero MP, Jeremiah N, Belot A, Jeziorski E, Duffy D, Bessis D, Cros G, Rice GI, Charbit B, et al.: **Efficacy of the Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in the treatment of vasculopathy associated with TMEM173-activating mutations in 3 children.** *J Allergy Clin Immunol* 2016, **138**:1752-1755.

74. Montealegre G, Reinhardt A, Brogan P, Berkun Y, Zlotogorski A, Brown D, Gao L, Dare J, Schalm S, Klausmeier T, et al.: **Preliminary response to Janus kinase inhibition with Baricitinib in chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperatures (CANDLE).** *Annals of the Rheumatic Diseases* 2016, **75**:398-399.
75. An J, Minie M, Sasaki T, Woodward JJ, Elkon KB: **Antimalarial Drugs as Immune Modulators: New Mechanisms for Old Drugs.** *Annu Rev Med* 2017, **68**:317-330.
76. Piscianz E, Cuzzoni E, Sharma R, Tesser A, Sapra P, Tommasini A: **Reappraisal of Antimalarials in Interferonopathies: New Perspectives for Old Drugs.** *Curr Med Chem* 2017.
77. Page F: **Treatment of lupus erythematosus with mepacrine.** *Lancet* 1951, **2**:755-758.
78. Conner SK: **Systemic lupus erythematosus; a report on twelve cases treated with quinacrine (atabrine) and chloroquine (aralen).** *Ann Rheum Dis* 1957, **16**:76-81.

# 7. APPENDICE

## 7.1 GLOSSARIO

ADAR: adenosine deaminase acting on RNA

AGS: Aicardi-Goutières syndrome

CANDLE: chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature

CNVs: copy-number variations

cGAMP: cyclic-GMP-AMP

cGAS: cyclic GMP-AMP Synthase

CIAS1pathies: cryopyrinopathies

DKO: double knock-out

DNAse: deoxyribonuclease

FMF: familial mediterranean fever

G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase

GWAS: genome wide association studies

HIV: human immunodeficiency virus

HPRT: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

IRFs: interferon regulatory factors

IFI27: interferon alpha inducible protein 27

IFI44L: interferon induced protein 44 Like

IFIH1: interferon induced with helicase C domain 1

IFIT1: interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1

IFN: interferon

IFNAR: type I interferon receptor

ISGs: interferon stimulated genes

ISGF: IFN-stimulator gene factor

ISRE: IFN-sensitive response element

JAK: Janus chinasi

KO: knock-out

LES: lupus eritematoso sistemico

MKD: mevalonate kinase deficiency  
MOI: multiplicity of infection  
NETs: neutrophil extracellular traps  
NIH: National Institute of Health  
OD: optical density  
PFAPA: periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis  
POLA1: DNA polymerase alpha 1  
PRKC $\delta$ : protein kinase C delta type  
PRRs: pattern-recognition receptors  
RECQL5: RecQ like helicase 5  
RIG-I: retinoic acid-inducible gene I  
RNASIH2: ribonuclease H2  
RSAD2: radical s-adenosyl methionine domain containing 2  
SAMHD1: SAM domain and HD domain-containing protein 1  
SAVI: STING-associated vasculopathy with onset in infancy  
SI: signature interferonica  
SIGLEC1: sialic acid binding Ig like lectin 1  
STAT: signal transducer and activator of transcription  
STING: stimulator of interferon genes  
TBK1: TANK binding kinase 1  
TORCH: Toxoplasma, "Others", Rosolia, Citomegalovirus, Herpes  
TYK2: tyrosine kinase 2  
TLR: toll-like receptor  
TRAPS: TNFR-associated periodic syndrome  
TREX1: three prime repair exonuclease 1  
XLPDR: X-linked pigmentary reticulate disorder