

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E
FARMACEUTICHE



Corso di laurea magistrale in Medicina e Chirurgia

TESI DI LAUREA
**Inquadramento clinico e diagnostico di una
nuova classe di malattie:
le Interferonopatie**

Relatore:

Prof. Angelo Ravelli

Correlatore:

Prof. Stefano Volpi

Candidata:

Federica Cardone

Anno accademico 2019-2020

Indice

1. Malattie autoinfiammatorie sistemiche	4
2. Interferonopatie	12
2.1 Interferoni di tipo I	13
2.2 Via di segnalazione dell'interferone di tipo I	16
2.3 Difetti di regolazione della via dell'interferone di tipo I	17
2.4 Principali Interferonopatie di tipo I	21
2.4.1 Sindrome di Aicardi-Goutières (AGS)	21
2.4.2 Sindrome di Singleton-Merten	23
2.4.3 Sindromi autoinfiammatorie associate al proteasoma (PRAAS)	23
2.4.4 Sindrome SAVI (STING-associated vasculopathy with onset in infancy)	25
2.4.5 Sindrome COPA	27
2.4.6 Spondiloencondrodisplasia	28
2.4.7 Deficit di DNase1L3	29
2.4.8 Deficit di DNase2	30
2.5 Diagnosi	30
2.6 Terapia	32
3. Scopo dello studio	35
4. Pazienti e Metodi	37
4.1 Selezione dei pazienti e registro clinico EUROFEVER	37
4.2 Interferon Score	38
4.2.1 Metodo	40
4.2.2 Procedura	46
4.3 Indagine genetica	48
5. Risultati	58
5.1 Suddivisione dei pazienti	58
5.2 Analisi demografica	61
5.3 Manifestazioni cliniche	64
5.4 Analisi dell'Interferon Score	68
5.5 Diagnosi genetica	75
6. Discussione	98
7. Conclusioni	102
8. Bibliografia	103

1. Malattie autoinfiammatorie sistemiche

Le malattie autoinfiammatorie sistemiche (SAIDs) sono un gruppo di patologie caratterizzate da una abnorme attivazione dell'immunità innata dovuta, nella maggior parte dei casi, alla presenza di mutazioni a carico di geni che codificano per proteine che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della risposta infiammatoria. Si parla anche di "sindromi autoinfiammatorie monogeniche" in quanto la mutazione coinvolta nella genesi della malattia è a carico di un singolo gene.

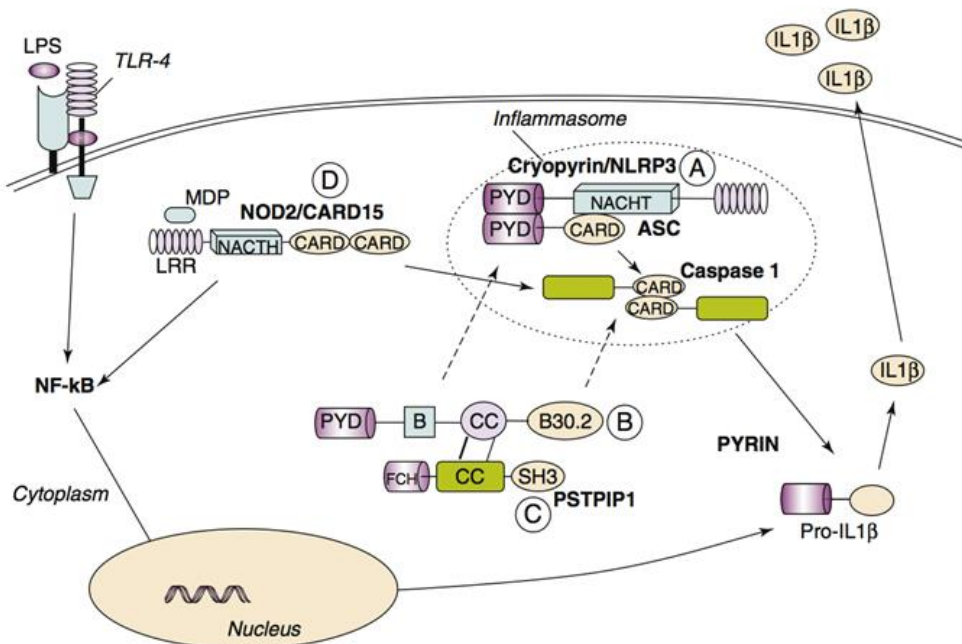


Figura 1. Rappresentazione schematica del ruolo funzionale dei geni coinvolti nelle malattie autoinfiammatorie nel controllo dell'attivazione di NF-kB e nella secrezione di IL-1β

Data la loro natura genetica, l'esordio clinico è precoce, solitamente nella prima decade di vita. Rari sono i casi di insorgenza in età adulta.

Essendo patologie piuttosto rare e di recente descrizione, è comune un ritardo nella diagnosi e, avendo un andamento cronico, molte di esse sono gravate da complicanze a lungo termine. Grazie ai recenti progressi nell'identificazione dei meccanismi patogenetici di tali condizioni, è stato possibile individuare dei farmaci in grado di ottenere un buon controllo di malattia. Pertanto, risulta fondamentale una diagnosi

precoce, al fine di avviare un approccio terapeutico adeguato, riducendo il rischio di sviluppare complicanze a lungo termine.

Dal punto di vista clinico le malattie autoinfiammatorie sono caratterizzate da episodi ricorrenti di infiammazione sistemica associati a un'elevazione degli indici di flogosi. Il quadro clinico può essere molto eterogeneo; infatti possono essere coinvolti diversi organi e apparati, quali quello mucocutaneo, osteoarticolare e gastrointestinale. Questi episodi sono solitamente intervallati da periodi di durata variabile di completo benessere clinico, normale accrescimento statuto-ponderale e, nella maggior parte dei casi, da una normalizzazione degli indici di flogosi sierici.

Sulla base delle principali manifestazioni cliniche è possibile raggruppare alcune delle patologie ad oggi note (Tabella 1).

La febbre mediterranea familiare (FMF, Familial Mediterranean Fever, OMIM 249100), l'iperimmunoglobulinemia D con febbre periodica, detta anche deficit di mevalonato kinasi, (MKD, Mevalonate Kinasi Deficiency, OMIM 260920) e la sindrome periodica associata al recettore 1 del TNF (Tumor Necrosi Factor) (TRAPS, TNFR-Associated Periodic Syndrome, OMIM 142680) sono accomunate dalla comparsa di episodi febbrili periodici.

Un'infiammazione sistemica dominata da un caratteristico rash orticarioide è tipica della sindrome autoinfiammatoria familiare da freddo (FCAS, Familial Cold Autoinflammatory Syndrome, OMIM 120100), della sindrome di Muckle-Wells (MWS, Muckle-Wells Syndrome, OMIM 191900) e della sindrome cronica infantile neurologica cutanea articolare (CINCA, Chronic Infantile Neurological Cutaneous Articular Syndrome, OMIM 607115). Queste rappresentano lo spettro fenotipico di diverse mutazioni a carico di uno stesso gene, NLRP3, che codifica per una proteina detta criopirina. Per questo motivo le suddette patologie sono anche dette criopirinopatie. Un quadro clinico analogo si può ritrovare anche nella sindrome autoinfiammatoria familiare da freddo di tipo 2 (FCAS2, OMIM 611762), dovuta invece alla mutazione a carico del gene NLRP12, caratterizzata da episodi febbrili scatenati dall'esposizione al freddo, cui si associano sintomi quali rash cutaneo, linfadenopatia, artromialgie (1,2). Di più recente identificazione è la sindrome da attivazione macrofagica legata a mutazione del gene NLRC4, in cui in alcuni casi, oltre

al coinvolgimento cutaneo e agli episodi di attivazione macrofagica, è presente interessamento intestinale e articolare (3,4).

Tra le patologie caratterizzate dallo sviluppo di un'inflammatione sterile a carico del distretto osteoarticolare e/o cutaneo la sindrome di Blau (BS, Blau Syndrome, OMIM 186580), dovuta a mutazioni del dominio NACHT del gene CARD15, si presenta con una triade sintomatologica tipica data da artrite, dermatite, uveite, secondaria allo sviluppo di granulomi infiammatori non caseosi. È di rilievo il fatto che mutazioni a carico dello stesso gene siano state associate alla malattia Crohn, un'altra malattia granulomatosa cronica. Un quadro infiammatorio dominato principalmente da disturbi piogenici si ritrova nella sindrome PAPA (Pyogenic sterile Arthritis, Pyoderma gangrenosum, Acne, OMIM 604416), associata a mutazioni a carico del gene PSTPIP1, nella sindrome di Majeed (OMIM 609628), dovuta a mutazioni a carico del gene LPIN2 e caratterizzata da osteomielite cronica multifocale, anemia congenita diseritropoietica e dermatosi neutrofila, nella osteomielite multifocale sterile con periostosi e pustolosi (DIRA, Deficiency of the interleukin-1 receptor antagonist, OMIM 612852), dovuta a mutazioni del gene IL1RN, nella sindrome DITRA (Deficiency of the interleukin-36 receptor antagonist, OMIM 614204), causata da mutazioni a carico del gene IL36RN, caratterizzata da episodi infiammatori cutanei ricorrenti, definiti dai dermatologi come psoriasi pustolosa, associati a quadri febbrili. Di più recente descrizione sono la sindrome CAMPS (CARD14-mediated psoriasis), legata a mutazione del gene CARD14 e associata alla comparsa di psoriasi pustolosa e pitiriasi rubra pilaris (5,6), e la sindrome COPA (OMIM 616414). I soggetti affetti da quest'ultima, in cui è stata descritta una mutazione a carico del gene COP α , sviluppano sintomi polmonari, artrite e disturbi renali (7).

La sindrome CANDLE (Chronic Atypical Neutrophilic Dermatosi with Lipodystrophy and Elevated temperature, OMIM 256040) e la sindrome ORAS (OTULIN-related autoinflammatory syndrome, OMIM 617099) sono accomunate da un'inflammatione a livello del tessuto adiposo sottocutaneo, sempre nel contesto di episodi febbrili.

Un processo vasculitico è invece tipico della sindrome DADA2 (Deficiency of Adenosine Deaminase 2, OMIM 615688) e della sindrome SAVI (STING-associated

vasculopathy with onset in infancy, OMIM 615934). Nella prima vi è un alto rischio di stroke a esordio precoce, sia ischemico sia emorragico (8), mentre nella seconda prevale l'interessamento cutaneo con geloni, oncodistrofia, lesioni ulcerative necrotizzanti, associato a pneumopatia interstiziale (9). Lesioni ulcerative orali e genitali si possono ritrovare anche nella sindrome da Aploinsufficienza di A20 (HA20, Haploinsufficiency of A20, OMIM 616744), dovuta a una mutazione a carico del gene TNFAIP3, coinvolto nella via di segnalazione di NF-kB; in questa patologia sono stati descritti anche processi infiammatori a carico del distretto oculare e osteoarticolare, con un quadro simil-Behçet (10).

Presentazione clinica	Malattia (gene)	Anno	Caratteristiche cliniche principali
Febbri periodiche	FMF (<i>MEFV</i>)	1997	Episodi di breve durata (24–48h). Sierosite, eritema erisipeloide. Risposta alla colchicina.
	MVK (<i>MVK</i>)	1999	Esordio precoce (<24 mesi). Durata degli episodi 4–5 giorni. Dolore addominale, vomito e diarrea, splenomegalia.
	TRAPS (<i>TNFRSF1A</i>)	1999	Episodi di lunga durata (6-21 giorni). Rash migrante, edema periorbitale, fascite. Risposta alla terapia con farmaci antagonisti di IL-1.
Infiammazione sistemica e rash orticarioide	FCAS/MWS/CINCA (<i>NLRP3</i>)	2001	FCAS: rash, febbre, artralgia dopo l'esposizione al freddo;
			MWS: rash orticarioide ricorrente o sub-cronico, sordità neurosensoriale;
		2002	CINCA: come MWS + ritardo mentale, meningite

			cronica asettica e malformazioni ossee.
	FCAS2 (<i>NLRP12</i>)	2008	Rash orticarioide, febbre e artralgia dopo l'esposizione al freddo.
	Malattia NLRC4-associata (<i>NLRC4</i>)	2014	Rash orticarioide, artralgie, enterocolite, sindrome da attivazione macrofagica ricorrente.
Infiammazione sterile delle articolazioni/ossa/cute	Sindrome di Blau (<i>CARD15</i>)	2001	Esordio precoce (< 5 anni). Poliartrite granulomatosa, uveite, rash cutaneo. Parziale risposta a terapia con anticorpi monoclonali bloccanti il TNF.
	PAPA (<i>PSTPIP1</i>)	2002	Artrite piogenica sterile, pioderma gangrenoso, acne. Buona risposta alla terapia con farmaci antagonisti di IL-1.
	COPA (<i>COPa</i>)	2014	Poliartrite ad esordio precoce, coinvolgimento polmonare infiammatorio (cisti, pneumopatia interstiziale), glomerulonefrite con deposito di immunocomplessi alla biopsia.
	Sindrome di Majeed (<i>LPIN2</i>)	2005	Osteomielite multifocale, anemia congenita diseritropoietica, dermatosi infiammatoria.
	DIRA (<i>IL1RN</i>),	2009	

			Osteomielite multifocale neonatale, periostite e pustolosi. Risposta drammatica all'Anakinra.
	DITRA (<i>IL36RN</i>)	2011	Psoriasi pustolosa generalizzata, febbre ricorrente.
	CAMPS (<i>CARD14</i>)	2012	Psoriasi pustolosa generalizzata o pitiriasi rubra pilaris.
Panniculite/lipodistrofia	CANDLE (<i>PSMB8, PSMA3, PSMB4, PMSB10</i>)	2011	Febbre ricorrente ad esordio precoce, facies sui generis, panniculite, lipodistrofia, miosite, artropatia.
	ORAS (<i>FAM105B</i>)	2016	Episodi febbrili ad esordio neonatale, diarrea, dermatite/panniculite neutrofilica, ritardo di crescita.
Malattia infiammatoria cronica intestinale	MICI ad esordio precoce (<i>IL10RA, IL10RB</i>)	2009	Malattia infiammatoria cronica intestinale ad esordio precoce (< 2 anni).
Poliarterite nodosa e stroke ad esordio precoce	Deficit di ADA2 (<i>CERCI</i>)	2014	Febbre ricorrente, livedo reticularis e stroke ad esordio precoce, vasculopatia tipo poliarterite nodosa, ipogammaglobulinemia.
Vasculopatia ed ulcere	SAVI (<i>TMEM173</i>)	2014	Esordio precoce di vasculopatia tipo poliarterite e pneumopatia interstiziale progressiva.
	Aploinsufficienza di A20 (<i>TNFAIP3</i>)	2016	Infiammazione sistemica ad esordio precoce, artralgia/artrite, ulcere orali e

			genitali e infiammazione oculare (tipo Behçet).
Autoinfiammazione ed immunodeficienza	Deficit di HOIL-1 (<i>RBCK1, HOIL-1</i>)	2012	Infiammazione sistemica ricorrente, epato-splenomegalia, aminopectinosi muscolare, miopatia, cardiomiopatia, linfadenopatia, risposta antibatterica e antivirale deficitaria.
	Deficit di HOIP (<i>HOIP</i>)	2015	Febbre ricorrente, splenomegalia, ritardo di crescita, diarrea, ulcere orali, linfopenia T con deficit proliferativo, ipogammaglobulinemia, linfangiectasia intestinale, atrofia muscolare con ipostenia.
	PLAID (<i>PLCγ2</i>)	2012	Orticaria da freddo, allergia, rash granulomatoso, tiroidite autoimmune, ANA, infezioni seno-polmonari, COVID.
	APLAID (<i>PLCγ2</i>)	2012	Lesioni cutanee cicatriziali, epidermiolisi bullosa infantile, cellulite, pneumopatia interstiziale aspecifica, artralgia, uveite, malattia infiammatoria cronica intestinale e immunodeficienza anticorpale variabile.

Tabella 1. Le malattie autoinfiammatorie sistemiche monogeniche

È necessario distinguere le forme monogeniche dalle “malattie autoinfiammatorie poligeniche”, dette anche multifattoriali, la cui patogenesi non è ben nota. Si tratta di un gruppo di patologie di cui non è stata identificata alcuna mutazione genica causativa; probabilmente giocano un ruolo importante nella genesi di queste anche fattori ambientali (11) (Figura 2). Avendo un quadro clinico molto simile, talvolta sovrapponibile, entrano in diagnosi differenziale con le forme monogeniche. Le principali sindromi autoinfiammatorie poligeniche sono la artrite idiopatica giovanile a esordio sistemico, la malattia di Behçet e la sindrome PFAPA (Periodic Fever, Aphthous stomatitis, Pharyngitis and Cervical Adenitis). Mentre la diagnosi delle forme monogeniche si avvale principalmente di test genetici e molecolari, risulta più complessa la diagnosi delle sindromi poligeniche, data la mancanza di una base genetica nota; in molti casi neanche criteri clinici risultano disponibili o applicabili (11).

In conclusione la diagnosi differenziale delle SAIDs è molto articolata, sia per il quadro clinico eterogeneo, i sintomi poco specifici e spesso sovrapponibili, sia per la mancanza di protocolli di screening universalmente accettati (12).

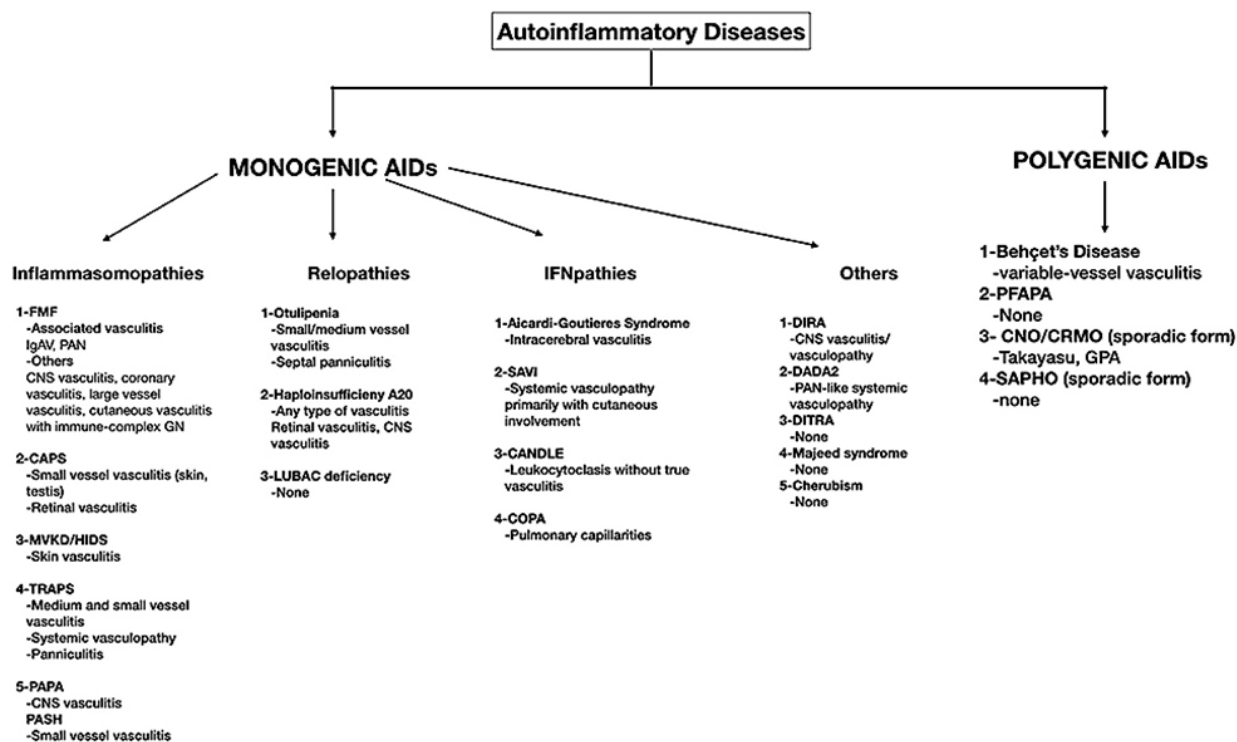


Figura 2. Classificazione patogenetica delle sindromi autoinfiammatorie

2. Interferonopatie

Le Interferonopatie sono un gruppo di malattie genetiche ad ereditarietà mendeliana che appartengono alla famiglia delle malattie autoinfiammatorie sistemiche (SAIDs); sono caratterizzate da una costitutiva e inappropriata attivazione della via degli interferoni (IFN) di tipo I.

Il termine “interferonopatie di tipo I” è stato utilizzato per la prima volta nel 2011 dal neurologo e genetista inglese Yanick Crow per indicare alcune malattie con componente neurologica e autoimmune, di cui aveva recentemente identificato la causa genetica (sindrome di Aicardi-Goutières) (13).

Trattandosi di patologie con un’ampia eterogeneità clinica, si ritiene che oggi le interferonopatie di tipo I debbano essere incluse nella diagnosi differenziale di pazienti pediatrici con patologie reumatologiche a presentazione atipica, soprattutto qualora manifestino quadri clinici caratterizzati dalla presenza di geloni, lipodistrofia, vasculopatia cutanea, artralgie e/o artrite, pneumopatia infiammatoria, ipertensione arteriosa polmonare e sintomi tipici di sindromi simil-influenzale e TORCH-like.

L’attivazione della via degli interferoni di tipo I rappresenta uno dei principali meccanismi cellulari di difesa dalle infezioni virali. La presenza di un virus viene riconosciuta dalle cellule dell’organismo tramite una serie di recettori citoplasmatici ed endosomiali in grado di legarsi agli acidi nucleici del patogeno; questo legame induce la produzione di specifiche citochine infiammatorie, gli IFN di tipo I. Questi ultimi vengono secreti nello spazio extracellulare e sono a loro volta in grado di legarsi al recettore IFN- α/β (IFNAR), presente su tutte le cellule nucleate, il quale attiva le Janus Chinasi (JAK) TYK2 e JAK1 e successivamente le proteine STAT1, STAT2 e STAT3, inducendo la trascrizione di diversi geni indotti dall’interferone (Interferon Stimulated Genes, ISGs). Esistono numerosi meccanismi regolatori che impediscono lo sviluppo di una reazione infiammatoria in assenza di infezione, come enzimi in grado di digerire gli acidi nucleici intracellulari ed extracellulari e proteine in grado di inibire il recettore dell’interferone o le molecole a valle nella cascata del segnale.

La disregolazione in senso attivatorio della suddetta via sembra avere un ruolo centrale nelle interferonopatie di tipo I (14). Recenti studi hanno individuato come meccanismi patogenetici principali: un'anomala risposta dell'organismo a frammenti di acidi nucleici, cui seguirebbe una inappropriata stimolazione della via di segnalazione dell'interferone, e la presenza di difetti nella regolazione del segnale del recettore dell'IFN e delle molecole a valle.

L'individuazione dei meccanismi patogenetici molecolari alla base di queste patologie risulta fondamentale per poter instaurare un efficace approccio terapeutico; come è accaduto per altre malattie autoinfiammatorie sistemiche, quali quelle legate a un deficit di regolazione dell'attività dell'interleuchina 1 β .

2.1 Interferoni di tipo I

Gli interferoni sono una classe di citochine infiammatorie coinvolte nell'attivazione e nella regolazione della risposta immunitaria; in particolare, rappresentano una delle prime linee di difesa contro gli agenti patogeni. Il termine "interferone" deriva, infatti, dalla loro capacità di "interferire" con l'infezione virale. Nel 1957 Isaacs e Lindenmann osservarono che il surnatante di cellule incubate con il virus dell'influenza, se aggiunto ad un'altra coltura cellulare, era in grado di proteggere le altre cellule dal patogeno (15). Negli anni successivi la comprensione del meccanismo di funzionamento dell'interferone fece luce su quella che è una delle principali risposte antivirali a disposizione del sistema immunitario. Il fatto che ogni cellula nucleata possa produrre interferone in risposta ad un'infezione virale, indica il determinante ruolo che questo ha nell'assunzione di uno "stato antivirale" da parte della cellula.

Esistono tre diverse classi di interferoni (I-II-III); tra questi gli IFN di tipo I rappresentano la famiglia più cospicua (15). Questa include diverse proteine, suddivise in: IFN α , di cui fanno parte 13 molecole, IFN β , IFN δ , IFN ϵ , IFN κ , IFN ζ , IFN τ e IFN ω . Le proteine sono codificate da diversi geni posti in serie sul cromosoma 9p e condividono la medesima via di segnale attraverso un recettore comune (16,17). Ad oggi sono stati presi in considerazione principalmente IFN α e IFN β nello studio patogenetico delle interferonopatie, mentre le altre molecole sono ancora poco citate in letteratura.

La produzione di IFN di tipo I è indotta dalla rilevazione degli acidi nucleici di patogeni virali e batterici da parte dei recettori PRRs (Pattern Recognition Receptors), che possono essere localizzati nel citoplasma o negli endosomi delle cellule infette. I PRRs includono i recettori Toll-like (TLR), i recettori RIG-I-like (RLR), i recettori NOD-like (NLR) e una famiglia crescente di recettori del DNA citoplasmatico come AIM2, GMP ciclico-AMP sintasi (cGAS) e la proteina 16 γ -IFN-inducibile (IFI16) (18). Il ruolo di tali sensori nella patogenesi delle interferonopatie di tipo I risulta ormai evidente. In particolare, è stato individuato come alterazioni degli RLRs (MDA5 e RIG-I) e anomalie delle vie attivate dal riconoscimento del DNA mediate da cGAS portino a severi quadri clinici infiammatori. Il segnale inviato da parte dei RLRs viene trasmesso dalla “proteina mitocondriale di segnalazione antivirale” (MAVS), mentre il segnale inviato da cGAS e IFI16 viene trasmesso dalla proteina STING. Il dsDNA citoplasmatico interagisce con l’enzima cGAS che catalizza la reazione di sintesi del dinucleotide ciclico GMP-AMP (cGAMP) (19). cGAMP lega e attiva la proteina STING, che, una volta attivata, trasloca dal reticolo endoteliale (ER) ai compartimenti intermedi ER-Golgi (ERGIC) (20), dove il segnale si propaga attraverso la fosforilazione della chinasi 1 legante TANK (TBK1) e di una famiglia di proteine chiamate “fattori regolatori dell’IFN” (IRF), in particolare IRF3, che traslocano nel nucleo e inducono la trascrizione di IFN β (21) e IRF7, che è responsabile dell’induzione di IFN α e dell’amplificazione della segnalazione autocrina mediata dagli IFN di tipo I (22) (Figura 3). Pertanto, un’eccessiva attivazione del sistema cellulare di recettori dei nucleotidi può comportare un aumento della produzione di interferone e, di conseguenza, uno stato infiammatorio inappropriato.

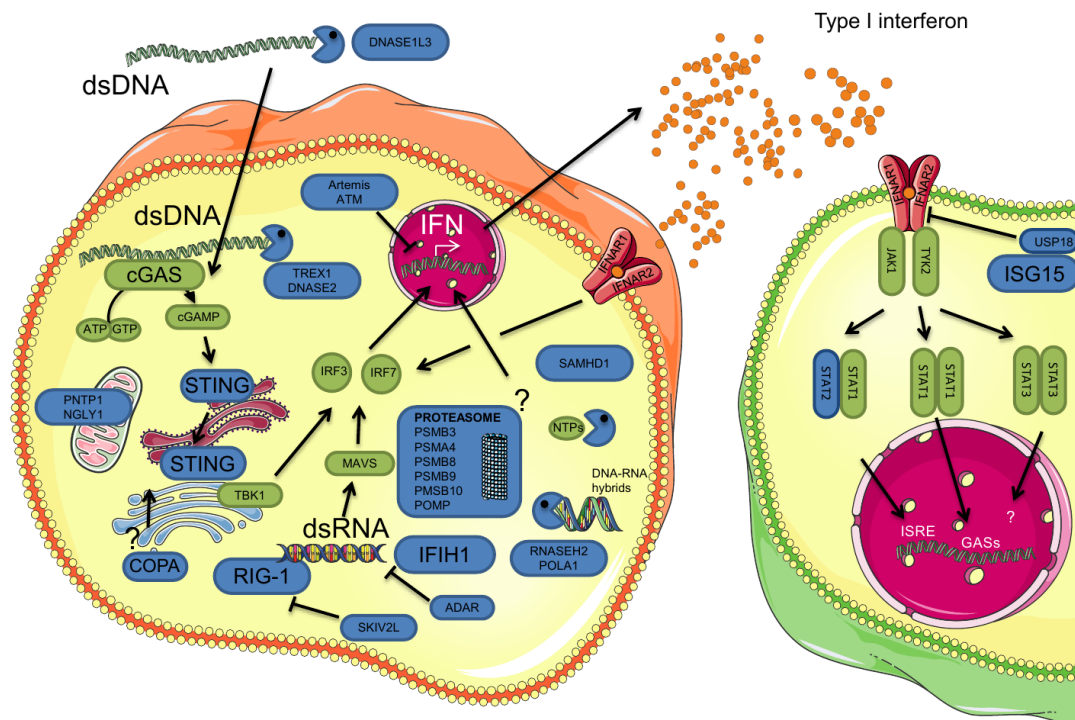


Figura 3. Schema del riconoscimento degli acidi nucleici a livello citoplasmatico, della secrezione dell'interferone di tipo I e attivazione autocrina e paracrina dei recettori IFNAR1-2, con conseguente attivazione della via di segnalazione dell'interferone. Quelle colorate in blu sono alcune delle proteine mutate nelle interferonopatie. cGAMP: cyclic di-GMP-AMP, cGAS: cyclic GMP-AMP synthase, ER: endothelial reticulum, ERGIC: endothelial reticulum-Golgi intermediate compartment, IFIH1: IFN-induced helicase C domain-containing protein 1 (anche definita MDA5), IFNAR: interferon- α receptor, ISG15: interferon-stimulated gene 15, MAVS: mitochondrial antiviral-signaling protein, RIG-I: retinoic acid-inducible gene 1, SAMHD1: deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAM domain and HD domain 1, STING: stimulator of interferon genes, TBK1: TANK-binding kinase 1, TREX1: DNA 3' repair exonuclease 1, USP18: ubiquitin-specific protease 18

Una produzione basale di IFN di tipo I è fondamentale per mantenere una condizione di “pronta risposta”. Ad oggi sono descritte due diverse funzioni della via dell'IFN di tipo I: l'attività antivirale e l'attività antiproliferativa. Il braccio effettore dell'attività antivirale coinvolge: le cellule dendritiche (DC), che, in seguito alla stimolazione da parte dell'IFN, maturano, migrano e aumentano la presentazione dell'antigene; le cellule natural killer (NK), che aumentano la loro attività citotossica e la secrezione di IFN γ ; i linfociti T, che aumentano l'espressione di MHC di classe I e, più in

particolare, le cellule T CD4+ e CD8+, che proliferano e differenziano verso il fenotipo Th1; i linfociti B, che si differenziano in cellule secernenti immunoglobuline. L'attività antiproliferativa, invece, è mediata dalla down-regolazione di c-myc, dall'attivazione delle vie di segnalazione di Crk e dall'induzione di chinasi ciclina-dipendenti (Cdk), che provoca l'arresto in fase G1 del ciclo cellulare. Mentre l'attività antivirale è mediata da tutti i tipi di IFN, anche a concentrazioni molto basse e nella maggior parte delle cellule, l'attività antiproliferativa è altamente cellulo-specifica e richiede un'elevata espressione di IFN e dei suoi recettori, oltre che un'adeguata affinità di legame fra questi. È comprensibile che, accertato l'elevato grado di conservazione della via dell'IFN di tipo I fra le specie, mutazioni germinali che ne compromettono le funzioni predispongano allo sviluppo di gravi malattie virali. Ne sono un esempio l'encefalite herpetica in pazienti con mutazioni di UNC93B, TL3, TRAF3, TRIF E TBK1 e una forma di influenza potenzialmente letale osservata in pazienti con mutazioni di IRF7 (23–25).

2.2 Via di segnalazione dell'interferone di tipo I

Le diverse molecole di interferone di tipo I legano lo stesso recettore eterodimerico, che è espresso da tutte le cellule nucleate ed è costituito da due subunità, IFNAR1 e IFNAR2. Il legame tra l'interferone e una subunità del recettore induce la dimerizzazione di IFNAR1 e IFNAR2, la fosforilazione delle Janus Chinasi (JAK), TYK2 e JAK1, e l'attivazione dei membri della famiglia STAT1 con la formazione di tre complessi principali: l'omodimero pSTAT1, l'omodimero pSTAT3 e l'eterodimero pSTAT1/pSTAT2. Quest'ultimo insieme a IRF9 attiva il fattore di trascrizione IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3), che, legandosi alle sequenze dell'IFN-stimulated response element (ISRE), induce la trascrizione di numerosi geni antivirali stimolati dall'interferone (ISGs). L'omodimero pSTAT1 è responsabile della regolazione di sequenze attivate da IFN γ (GASs) per la trascrizione di geni pro-infiammatori (26). L'omodimero pSTAT3 induce, invece, una soppressione della risposta mediata dall'interferone di tipo I. È stato osservato, infatti, che cellule STAT3- presentano una maggiore espressione genica e una maggiore attività virale in risposta all'interferone (27).

Le diverse funzioni effettrici dell'interferone di tipo I dipendono da:

- La diversa affinità del ligando alla subunità del recettore (28,29), che correla a sua volta con l'attivazione delle diverse molecole di segnalazione a valle;
- L'espressione del recettore da parte delle cellule bersaglio;
- L'espressione di IFN da parte dei tessuti: infatti, mentre sono rapidamente prodotti e secreti diversi tipi di IFN α , nel caso di infezioni dei tessuti linfoidei, quando sono interessate le mucose, la risposta antivirale è debole e lenta (30).

Sono queste alcune delle importanti modalità con cui viene modulata l'attività biologica della via dell'interferone di tipo I, nonostante la presenza di un unico recettore.

2.3 Difetti di regolazione della via dell'interferone di tipo I

Negli anni '70 Gresser e colleghi (31) furono i primi a suggerire l'esistenza di possibili effetti patogeni dell'interferone: topi ai quali alla nascita erano state iniettate alte dosi di interferone presentavano lo stesso quadro clinico di topi infettati da virus della coriomeningite linfocitaria (LCMV), con stesso grave ritardo di crescita, lesioni epatiche, glomerulonefrite e stessa mortalità. Queste analogie fecero pensare all'ipotesi che l'interferone fosse il responsabile della maggior parte delle lesioni indotte dal virus. Inoltre gli stessi autori evidenziarono come la terapia anticorpale con anti-IFN fosse in grado di prevenire lo sviluppo di glomerulonefrite nei topi infettati da LCMV (32).

La maggior parte delle mutazioni geniche implicate nella patogenesi delle interferonopatie sono a carico di geni coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici, nel riconoscimento di questi e nella trasduzione del segnale (Tabella 2). Vi sono, infatti, mutazioni a carico di enzimi che hanno il compito di evitare un accumulo di DNA, RNA e molecole ibride di DNA e RNA, tra cui la DNA 3'-repair exonuclease 1 (TREX1) e la ribonucleasi H2 (RNASEH2), che provvedono alla degradazione degli acidi nucleici (33,34), SAMHD1, che limita la disponibilità di deossinucleotidi citosolici (dNTP) (35), e l'adenosina deaminasi RNA-specifica 1 (ADAR1), che elabora il dsDNA endogeno, impedendone il riconoscimento da parte del recettore

citosolico IFIH1 (36). In questi casi la patologia è causata dall'innalzamento della soglia di rilevamento dei sensori di DNA cellulari. Sono state inoltre osservate mutazioni attivatorie dei recettori dell'acido nucleico IFIH1 e RIG-I (37,38), responsabili della sindrome di Aicardi-Goutières e della sindrome di Singleton-Merten, e mutazioni attivatorie di STING, alla base della sindrome SAVI (39). Nelle sopracitate sindromi la patologia è causata da un'attivazione costitutiva dei recettori o delle molecole a valle responsabili dell'amplificazione del segnale. Infine, alcune interferonopatie sono causate da mutazioni a carico di proteine che svolgono un'azione inibitoria nei confronti della risposta dell'interferone, col fine di prevenire la tossicità di un'eccessiva funzione delle molecole effettrici a valle; ne sono un esempio il deficit di ISG15 e il deficit di USP18. USP18 è una proteasi ubiquitina-specifica, che, essendo stabilizzata da ISG15, impedisce il legame fra JAK1 e la subunità IFNAR2 del recettore dell'interferone. Se queste due proteine risultano mutate ne consegue una incontrollata attivazione della via interferonica. Recentemente è stata osservata una nuova mutazione anch'essa responsabile di un difetto nella regolazione del segnale del recettore dell'interferone. Si tratta di una mutazione a carico di STAT2, proteina che, se alterata, non riesce a trasferire in modo adeguato USP18 a IFNAR2, impedendo quindi a USP18 di regolare negativamente la risposta di IFN I (40–42).

Presentazione	Gene	Trasmissione	Fenotipo Clinico	Elementi Caratteristici
<i>AGS e fenotipi con principale interessamento SNC</i>	<i>TREX1</i>	AR o AD	AGS	Calcificazioni cerebrali, RPM
	<i>SAMHD1</i>	AR	AGS, eventi cerebrovascolari	Calcificazioni cerebrali, RPM, geloni
	<i>IFIH1</i>	AD	AGS	Calcificazioni cerebrali, RPM artropatia deformante

	<i>ADARI</i>	AR	AGS, necrosi striatale bilaterale	Calcificazioni cerebrali, RPM
	<i>RNASEH2A</i>	AR	AGS	Calcificazioni cerebrali, RPM
	<i>RNASEH2B</i>	AR		
	<i>RNASEH2C</i>	AR		
	<i>ISG15</i>	AR	Calcificazioni cerebrali, MSMD	Calcificazioni cerebrali, micobatteriosi atipica
	<i>UPS18</i>	AR	Sindrome pseudo-TORCH	Calcificazioni cerebrali, RPM, cellulite necrotizzante
	<i>STAT2</i>	AR	AGS	Calcificazioni cerebrali, RPM, ulcere cutanee, HLH
	<i>PNPT1</i>	AR	Encefalopatia epilettica	
	<i>NGLY1</i>	AR	Encefalopatia epilettica	
<i>Paraplegia spastica</i>	<i>RNASEH2B</i>	AR	Paraplegia spastica	
	<i>ADARI</i>	AR	Paraplegia spastica	
	<i>IFIH1</i>	AD	Paraplegia spastica	
<i>Fenotipi con principale interessamento reumatologico</i>	<i>DNASE1L3</i>	AR	Orticaria vasculitica ipocomplemente mica, LES	LES, Artropatia deformante, orticaria vasculitica

				ipocompementem ica
	<i>ACP5</i>	AR	Spondiloencond rodipiasia, LES	Displasia scheletrica, encondromi, immunodisregola zione
	<i>Clq</i>	AR	LES	
	<i>SAMHD1</i>	AD	LES con geloni	
	<i>TREX1</i>	AD	LES con geloni	
	<i>COPA</i>	AD	Artrite poliarticolare, pneumopatia interstiziale, emorragia polmonare	Fattore reumatoide ad alto titolo
<i>Fenotipi con principale interessamento infiammatorio</i>	<i>PSMA3</i>	AR	PRAAS	Lipodistrofia, panniculite
	<i>PSMB4</i>	AR		
	<i>PSMB8</i>	AR		
	<i>PSMB9</i>	AR		
	<i>PSMB10</i>	AR		
	<i>POMP</i>	AD		
	<i>TMEM173</i>	AD	SAVI	Vasculopatia cutanea, pneumopatia interstiziale

<i>Sindrome di Singleton-Merten</i>	<i>IFIH1</i>	AD	Calcificazione aorta, glaucoma, alterazioni scheletriche e dentali	Psoriasi, iperlassità legamentosa
	<i>RIG-I</i>	AD	Calcificazione aorta, glaucoma, alterazioni scheletriche	Psoriasi
<i>Altri fenotipi clinici</i>	<i>POLA1</i>	AR	Disordini della pigmentazione retinica	
	<i>KRAS</i>	AR	RALD	
	<i>NRAS</i>	AR	RALD	
	<i>SHOC2</i>	AR	RALD	
	<i>SKIV2L</i>	AR	Sindrome tricoepatoenterica	

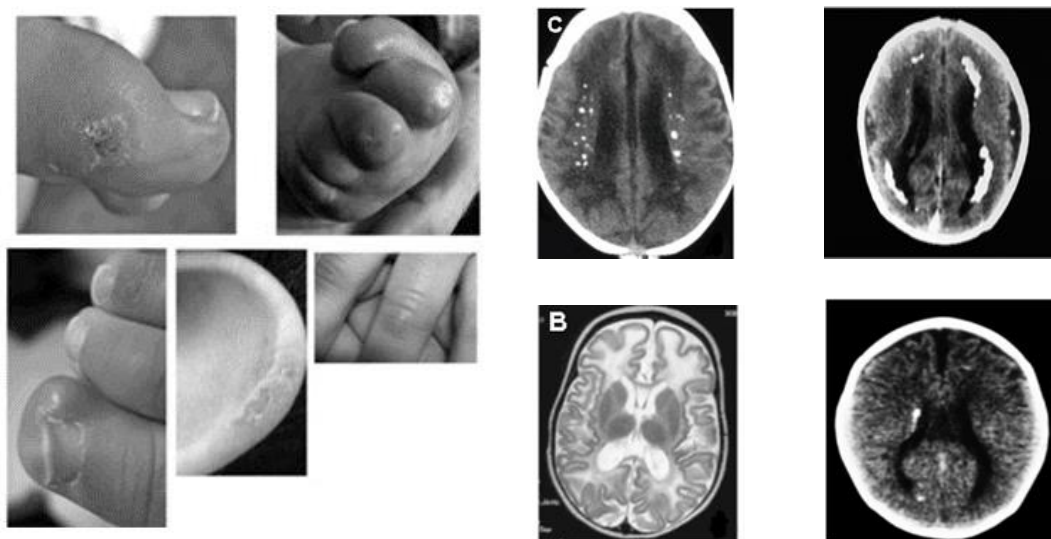
Tabella 2. Le interferonopatie di tipo I. AR, autosomica recessiva; AD, autosomica dominante; LES, Lupus Eritematoso Sistemico; TORCH, infezione congenita da Toxoplasma, Rosolia, Citomegalovirus, Herpes virus; RPM, ritardo psicomotorio; MSMD, suscettibilità mendeliana alla malattia da micobatteriosi; PRAAS, proteasome associated autoinflammatory syndrome; SAVI, STING-associated vasculopathy with onset in infancy; RALD, RAS associated Autoimmune Leukoproliferative Disease

2.4 Principali Interferonopatie di tipo I

2.4.1 Sindrome di Aicardi-Goutières (AGS)

La sindrome di Aicardi-Goutières è un'encefalopatia progressiva ad esordio precoce, che si caratterizza per la presenza di calcificazioni dei gangli della base, alterazioni della sostanza bianca e leucocitosi del liquido cerebrospinale (43). Oltre all'aumento della conta dei globuli bianchi, è stato osservato un aumento della concentrazione di $INF\alpha$ sia nel liquor cefalorachidiano che nel siero, in assenza di infezioni congenite (44). La presentazione clinica è molto simile a quella determinata dalle infezioni

acquisite per via transplacentare durante la gravidanza, tantoché in origine veniva definita sindrome pseudo-TORCH (Toxoplasma, Rosolia, Citomegalovirus, Herpes Simplex e Other, cioè Sifilide, Varicella-Zoster e Parvovirus B19). Il quadro clinico è dominato dal grave interessamento neurologico, con microcefalia, irritabilità, anomalie del movimento e del tono muscolare, convulsioni epilettiche, malnutrizione e ritardo psicomotorio; per le forme che insorgono dopo il primo anno di vita si registra, invece, la perdita delle precedenti acquisizioni. Inoltre, nel tempo i pazienti possono sviluppare glaucoma, geloni e caratteristiche autoimmuni simili a quelle riscontrate nel lupus eritematoso sistemico (45). Come suggerito da Gresser e colleghi (31), si pensa che l'interferone di tipo I giochi un ruolo fondamentale nella patogenesi della malattia, essendo stato riscontrato un significativo incremento della signature dell'interferone nel sangue periferico della maggior parte dei pazienti (46). I geni mutati nella AGS sono: TREX1 (AGS1, OMIM 225750), SAMHD1 (AGS5, OMIM 612952), RNASEH2A (AGS4, OMIM 610333) RNASEH2B (AGS2, OMIM 610181), RNASEH2C (AGS3, OMIM 610329), ADAR1 (AGS6, OMIM 615010), IFIH1 (AGS7, OMIM 615846). Come riportato precedentemente, le mutazioni descritte finora sono legate a meccanismi di rilevamento degli acidi nucleici nel citoplasma. Alcuni pazienti presentano un fenotipo meno grave caratterizzato dalla presenza di calcificazioni idiopatiche dei gangli della base (IBGC), convulsioni e positività agli autoanticorpi. Alla base di questo sono state rilevate mutazioni a carico del gene ISG15 (IMD38, OMIM 616126). Recentemente sono stati descritti due quadri clinici caratterizzati da calcificazioni cerebrali, ritardo psicomotorio e gravi manifestazioni infiammatorie a esordio neonatale dovuti a mutazioni di USP18 e STAT2 (OMIM 617397) (47). Queste ultime mutazioni, a differenza delle precedenti, sono implicate nei meccanismi di regolazione in senso inibitorio della via di segnalazione dell'interferone di tipo I. Studi recenti hanno riportato l'efficacia di farmaci antiretrovirali e di farmaci inibitori delle Janus Chinasi. I primi in alcuni sottogruppi di malattia ridurrebbero la concentrazione citoplasmatica di nucleotidi endogeni derivati dal retrotrascrizione di retroelementi fisiologicamente presenti nel DNA (48), mentre i secondi inibirebbero il signaling del recettore dell'interferone di tipo I (49). Altri lavori avrebbero dimostrato la capacità dell'aspirina di acetilare cGAS e quindi di inibire la risposta immune mediata da cGAS (50).



2.4.2 Sindrome di Singleton-Merten

La sindrome di Singleton-Merten (OMIM 182250) è una malattia autosomica dominante caratterizzata da anomalie dentarie (ritardo nella dentizione primaria, nell'eruzione dei denti permanenti e caduta dentale), calcificazioni dell'aorta e delle valvole cardiache, anomalie scheletriche (osteolisi distale degli arti, ampliamento della cavità midollare), psoriasi e glaucoma (51). I pazienti affetti sono portatori di una specifica mutazione missenso con guadagno di funzione di IFIH1 (52). Una condizione simile, chiamata Sindrome di Singleton-Merten atipica (OMIM 616298), ha un fenotipo sovrapponibile, ad esclusione delle anomalie dentali, presenti solo nella forma tipica. Questa è causata da mutazioni in senso attivatorio del gene DDX58 (53) ad ereditarietà autosomica dominante. I geni IFIH1 e DDX58 codificano per MDA5 e RIG-I, entrambi recettori per ds-DNA che attivano la via dell'IFN. Non sorprendentemente, sia i pazienti con la forma classica della sindrome di Singleton-Merten, che quelli con la forma atipica, presentano un aumento dell'attività dell'interferone nel sangue periferico (52,54).

2.4.3 Sindromi autoinfiammatorie associate al proteasoma (PRAAS)

Le sindromi autoinfiammatorie associate al proteasoma sono un gruppo di entità cliniche diverse che condividono una causa molecolare comune. Esse comprendono:

la “sindrome da contratture articolari, atrofia muscolare, anemia microcitica e lipodistrofia indotta dalla pannicolite (JMP)”, la sindrome di Nakajo-Nishimura (NNS, nota anche come sindrome autoinfiammatoria giapponese con lipodistrofia, JASL) e la sindrome “dermatosi neutrofilica atipica cronica con lipodistrofia ed elevata temperatura (CANDLE)”. Queste sindromi sono caratterizzate clinicamente dall’insorgenza di lesioni cutanee nodulari, simili ad un eritema pernio, violacee, con infiltrati neutrofilici atipici. Le altre peculiarità cliniche sono rappresentate da atrofia muscolare, lipodistrofia, ritardo di crescita e deformità delle estremità, conseguenti a contratture articolari. Suddette manifestazioni si associano a episodi febbrili ricorrenti e rialzo degli indici di flogosi. Ulteriori aspetti clinici comuni sono: l’epatosplenomegalia, l’addome prominente, le calcificazioni dei gangli della base, l’anemia ipocromica, l’aumento delle immunoglobuline G e l’assenza o la presenza intermittente di un basso titolo autoanticorpale; sono stati segnalati anche casi con acanthosis nigricans e ipertrigliceridemia (55–58). La prima forma di PRAAS è stata descritta nel 1939 da Nakajo nella popolazione giapponese come una patologia caratterizzata da osteoperiostosi ipertrofica secondaria e eritema pernio; in seguito poi fu riconosciuto come la lipodistrofia e l’infiammazione fossero elementi clinici distintivi (59–61). I primi casi descritti al di fuori del Giappone erano di origine spagnola o americana (caucasica o ispanica) e furono classificati come esempi di sindrome CANDLE (62). Solo nel 2010-2011 è stato individuato il meccanismo molecolare alla base delle varie sindromi: queste sarebbero dovute a mutazioni omozigoti del gene PSMB8, che codifica per la subunità $\beta 5I$ del proteasoma (56–58). Quest’ultima è una delle tre subunità catalitiche del proteasoma, insieme alla $\beta 1I$ e alla $\beta 2I$, isoforme costituzionalmente espresse nelle cellule ematopoietiche, e indotte da citochine infiammatorie, come l’ $IFN\gamma$, nelle altre linee cellulari. La variante del proteasoma che contiene le subunità $\beta 1I$, $\beta 2I$ e $\beta 5I$ viene definita immunoproteasoma. È interessante sottolineare che in due pazienti inizialmente descritti come eterozigoti affetti, sia stata successivamente individuata una seconda mutazione patogenetica in un’altra subunità del proteasoma, PSMA3. Nello stesso studio sono state descritte nuove mutazioni associate alla sindrome CANDLE a carico delle subunità PSMB4, PSMB9 e POMP. Studi più recenti hanno individuato altre mutazioni geniche responsabili di PRAAS: una mutazione omozigote a carico della subunità PSMB10

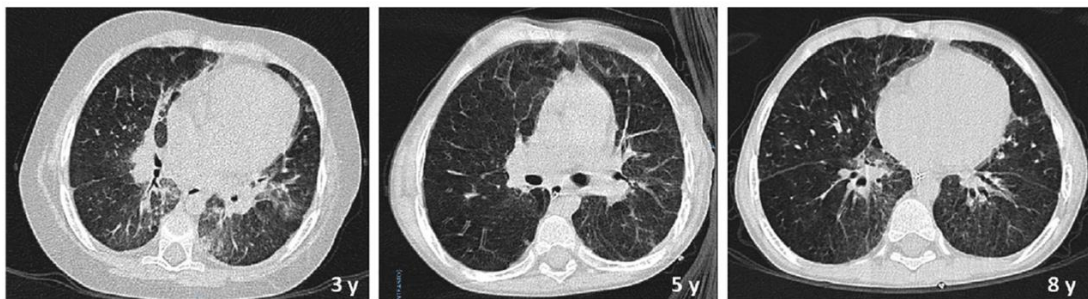
(β 2I) (63) e due mutazioni eterozigoti a carico del gene PSMG2, che codifica per PAC2, proteina chaperon coinvolta nell'assemblaggio del proteasoma (64). Dalla valutazione del profilo dell'espressione genica nel sangue periferico e dagli esperimenti in vitro *knock-down* sulle cellule prelevate dai pazienti affetti, emerge che le PRAAS sono chiaramente correlate all'induzione degli interferoni di tipo I. Il meccanismo responsabile dell'anomala attivazione della via dell'interferone sembra risiedere nell'accumulo di aggregati proteici a livello del reticolo endoplasmatico. Dal punto di vista terapeutico, i pazienti rispondono parzialmente alla somministrazione di steroidi ad alte dosi; traggono, invece, scarso beneficio dall'utilizzo dei comuni farmaci immunosoppressori e dei farmaci biologici, comunemente utilizzati nel trattamento di altre patologie autoinfiammatorie. Recentemente è stato proposto il trattamento con inibitori delle Janus Chinasi, già testato in altre interferonopatie; l'obiettivo sarebbe quello di inibire la risposta a valle del recettore e interrompere il loop autocrino legato alla continua produzione di interferone di tipo I (65).

2.4.4 Sindrome SAVI (STING-associated vasculopathy with onset in infancy)

La sindrome SAVI è un'interferonopatia causata da mutazioni eterozigoti a carico del gene TMEM173, recentemente rinominato STING1. Tale gene codifica per una proteina transmembrana del reticolo endoplasmatico, coinvolta nella produzione dell'interferone. La proteina STING è attivata dal legame con cGAMP (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate), un secondo messaggero sintetizzato dall'enzima cGAS (cyclic GMP-AMP synthase), a sua volta attivato dal riconoscimento di residui di dsDNA nel citoplasma cellulare; il legame fra STING e cGAMP porta alla formazione di un omodimero, che, una volta fosforilato dalla chinasi TKB1 (TANK-binding kinase 1), attiva il Fattore Regolatore dell'Interferone 3 (IRF-3), il quale determina la trascrizione del gene IFNB1 e quindi la produzione di interferone β . Le mutazioni alla base della sindrome SAVI conducono alla costitutiva attivazione di STING, indipendente dal legame con cGAMP. Ne deriva un continuo traffico, privo di regolazione, fra il reticolo endoplasmatico e il compartimento intermedio che si trova fra questo e il Golgi (ERGIC); questo porta ad una incontrollata ipersecrezione di interferone β (66). Le principali caratteristiche cliniche della sindrome sono rappresentate da: interessamento sistemico con accessi febbrili,

malessere, anemia cronica e disturbi della crescita; coinvolgimento cutaneo e interstiziopatia polmonare (9,67–70). La malattia esordisce precocemente, nelle prime settimane di vita; le prime manifestazioni cliniche sono rappresentate dalle lesioni cutanee. Interessano solitamente il volto, con un aspetto papulo-follicolare, e le estremità (dita, orecchie, punta del naso), dove si manifestano con una grande variabilità di presentazione: placche eritematose o purpuriche, noduli, livedo reticularis o lesioni ulcerative molto dolorose che evolvono in escare con perdita di tessuto, fino all'amputazione digitale su base vasculitica. Può essere presente anche coinvolgimento mucoso con manifestazioni che vanno dall'aftosi e ulcerazioni orali, fino alla perforazione del setto nasale. Sono comunemente osservati, inoltre, eritema periungueale e onicodistrofia, che potrebbero rappresentare i prodromi della patologia. Un'altra espressione dell'interessamento cutaneo, riscontrata in alcuni soggetti affetti, è rappresentata dal fenomeno di Raynaud, che, indagato alla capillaroscopia, mostra una tortuosità dei capillari ungueali, in assenza di un chiaro pattern sclerodermico. L'analisi istopatologica dei campioni bioptici cutanei rivela una diffusa infiammazione della parete capillare caratterizzata da infiltrati neutrofili e lesioni microtrombotiche. L'altro aspetto clinico più caratteristico della sindrome è l'interessamento polmonare: consiste nello sviluppo di un'interstiziopatia, inizialmente asintomatica, che, nel tempo, evolve verso fibrosi polmonare (9,67). La sintomatologia più frequentemente riportata è l'associazione di tosse e tachipnea, fino a dispnea per sforzi quotidiani o a riposo, con necessità di supplementazione di ossigeno nei casi più severi. In un caso incontrato nella nostra esperienza, la sovrapposizione di una polmonite virale al quadro polmonare ha scatenato un'insufficienza respiratoria acuta che presentava una forte analogia con una polmonite interstiziale linfocitaria. Dal punto di vista radiologico: la radiografia del torace mostra generalmente un'iperinflazione polmonare; la tomografia computerizzata, che rappresenta lo standard diagnostico per l'interstiziopatia polmonare (71), può mostrare un ampio spettro di lesioni, fra cui più frequentemente: ispessimento dei setti interalveolari, opacizzazioni a vetro smerigliato e bronchiectasie. Spesso, associata al quadro di interstiziopatia, si riscontra una linfadenopatia ilare e paratracheale. I campioni bioptici di tessuto polmonare mostrano infiltrati infiammatori misti disseminati. Il profilo laboratoristico è rappresentato da: una positività autoanticorpale a basso titolo (anticorpi antinucleo,

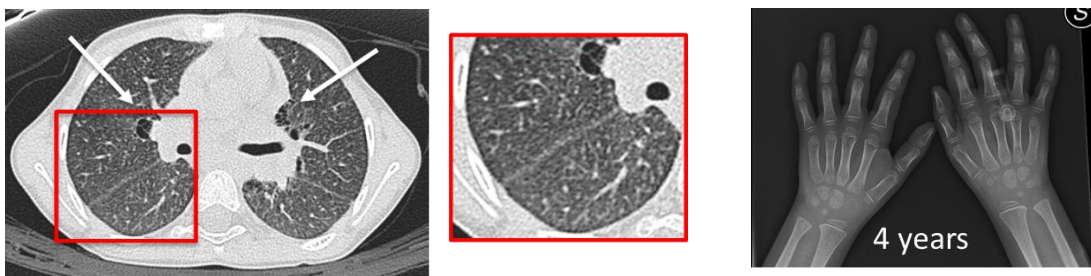
anticardiolipina e anti β 2-glicoproteinaI); una positività per gli anticorpi contro il citoplasma dei neutrofili diretti contro la proteinasi 3 (cANCA), di notevole importanza nella diagnostica differenziale con forme di granulomatosi con poliangioite ad esordio infantile. Ad oggi non esistono protocolli terapeutici validati per il controllo della malattia. I pazienti descritti in letteratura sono stati trattati con steroide ad alte dosi e ed immunoglobuline endovena durante le fasi acute; è risultata invece insoddisfacente la somministrazione di Metotrexato, Micofenolato mofetile, antimalarici, Infliximab e Rituximab (9,68,69). alcuni pazienti sono stati trattati con inibitori di Janus chinasi, ottenendo una buona risposta clinica, che ha permesso la sospensione del trattamento di fondo con steroide (65,69,72,73).



2.4.5 Sindrome COPA

La sindrome COPA è una malattia autoinfiammatoria che colpisce prevalentemente l'apparato respiratorio e l'apparato articolare. Nel 2015 Watkin e colleghi focalizzarono i loro studi su diverse famiglie con numerosi componenti affetti da un quadro precoce di artrite poliarticolare fattore reumatoide positiva associata ad un severo interessamento polmonare, caratterizzato da pneumopatia interstiziale ed episodi di emorragia (74). Alle indagini radiologiche è risultata patognomonica la presenza di cisti polmonari a contenuto aereo. Le manifestazioni articolari esordiscono tipicamente nell'infanzia e circa l'80% dei pazienti ha un titolo degli autoanticorpi antinucleo francamente positivo (74). In alcuni casi è stato rilevato anche un coinvolgimento renale. L'analisi genetica ha riscontrato la presenza di mutazioni eterozigoti missenso con trasmissione autosomica dominante a penetranza incompleta a carico del gene che codifica per la subunità alfa del complesso coatomer I ($COP\alpha$), proteina coinvolta nel trasporto molecolare tra l'apparato di Golgi e il reticolo endoplasmatico. La compromissione del trasporto vescicolare porterebbe a una

maggiore sintesi proteica e, quindi, a stress del reticolo endoplasmatico. Questo esiterebbe in disfunzioni del sistema immunitario, tuttavia non è ad oggi noto il preciso meccanismo patogenetico alla base della malattia (74). La sindrome COPA, dunque, è caratterizzata da disfunzioni del sistema immunitario; quest'ipotesi è sostenuta, oltre che dalla dimostrazione della presenza di autoanticorpi, anche da alcuni studi in vitro, che hanno rilevato un'eccessiva attività dei linfociti Th17. Nonostante la spiccata attività di questi ultimi, è interessante notare che i pazienti affetti da sindrome COPA identificati fino ad oggi non presentino psoriasi o malattia infiammatoria cronica intestinale, entrambe manifestazioni Th17-associate (75). La sovrapposizione di alcune caratteristiche cliniche con la sindrome SAVI (interessamento polmonare e articolare, esordio precoce) e le simili funzioni delle proteine COPA e STING, entrambe coinvolte nel trasporto molecolare tra Golgi, reticolo endoplasmatico e comparti intermedi (66), hanno posto il sospetto di un ruolo dell'interferone nella patogenesi della malattia. A riprova di questa ipotesi, l'Interferon Score su sangue periferico si è dimostrato elevato in tutti i pazienti testati fino ad oggi (76). Sulla base di ciò, ci si è orientati verso un possibile utilizzo di inibitori delle Janus Chinasi per il trattamento della malattia. Un recente studio ha descritto un caso trattato con JAK inibitori con una buona risposta clinica, in particolare della sfera polmonare, sottolineando tuttavia la necessità di dosaggi maggiori rispetto a quelli proposti per il trattamento dell'artrite (77).



2.4.6 Spondiloencondrodisplasia

La Spondiloencondrodisplasia (SPENCD) è una patologia causata da mutazioni omozigoti del gene ACP5, che codifica per la fosfatasi acida tartrato-resistente TRACP (78,79). Si tratta di una sindrome immuno-ossea, originariamente descritta come displasia scheletrica, della quale, nel tempo, sono stati individuati nuovi aspetti clinici caratterizzanti. Il coinvolgimento scheletrico è rappresentato principalmente da

platispondilia di grado variabile e da encondromatosi metafisaria e diafisaria, che spesso esita in una bassa statura. L'interessamento neurologico è stato osservato in un minor numero di pazienti. Tipicamente include le calcificazioni cerebrali, soprattutto a livello dei gangli della base, che si manifestano con una variabilità di sintomi neurologici fra cui spasticità, epilessia e un moderato ritardo dello sviluppo. Invece l'elevata frequenza di manifestazioni autoimmuni è stata confermata, quando, nel 2011, è stata identificata l'associazione fra la patologia e la mutazione del gene ACP5 (78,79); queste comprendono: la porpora trombocitopenica autoimmune, l'anemia emolitica autoimmune, la sindrome di Sjögren, la tiroidite e, di particolare interesse, casi di LES, con elevato titolo di anticorpi antinucleo, positività degli anticorpi antifosfolipidi, degli anticorpi anti ds-DNA e ipocomplementemia. Il primo caso fu descritto in un paziente con LES giovanile e anomalie ossee. La patogenesi della malattia non è ancora completamente nota. Sapendo che la mutazione di ACP5 esita in una diminuita espressione di TRACP e nella perdita della sua attività sia nel siero sia a livello dei leucociti (78,79), si è ipotizzato che l'assenza dell'attività fosfatase conduca a una ridotta defosforilazione dell'osteopontina, proteina substrato di TRACP coinvolta nella via di segnalazione del TLR9 per la produzione di INF- α da parte delle cellule dendritiche plasmacitoidi (80,81). Quindi l'eccessiva attivazione dell'osteopontina sarebbe responsabile di una iperproduzione di INF- α . Quest'ipotesi è supportata dalla dimostrazione di elevati livelli di INF- α e di un incremento dell'Interferon Score nel sangue periferico dei pazienti con mutazioni omozigoti di ACP5 (78). Inoltre è stato osservato un aumento dell'espressione dell'osteopontina e un'importante produzione di citochine Th1 da parte delle cellule dendritiche (79).

2.4.7 Deficit di DNase1L3

L'enzima DNase1L3 è un'endonucleasi coinvolta nella degradazione del DNA, nella frammentazione della cromatina durante la morte cellulare e nella clearance dei detriti cellulari residui. Uno studio recente ha sottolineato un ruolo specifico dell'enzima nella degradazione del DNA a livello delle microparticelle (82), ovvero particelle circolanti che derivano da qualsiasi tipo di cellula e contenenti cromatina, DNA, RNA, glicoproteine di superficie o altre molecole sulla base della loro cellula d'origine. È stato evidenziato che il deficit dell'enzima DNase1L3 si associa a un aumento del DNA plasmatico e alla presenza di autoanticorpi anti-dsDNA (82). Le mutazioni della

proteina DNase1L3 descritte sono correlate a forme monogeniche familiari di lupus eritematoso sistemico (83) e alla sindrome da vasculite orticarioide ipocomplementica (HUVS) (84). Quest'ultima è una malattia autoimmune caratterizzata da episodi ricorrenti di orticaria e ipocomplementemia, nel contesto di segni e sintomi sistemici variabili, come dolore addominale, artralgia o artrite, astenia, febbre, aumento degli indici di flogosi. A differenza di altre interferonopatie, l'Interferon Score non risulta costantemente elevato in questi pazienti (85).

2.4.8 Deficit di DNase2

La proteina DNase2 è un enzima lisosomiale coinvolto nella digestione degli acidi nucleici giunti a livello dei lisosomi in seguito a fagocitosi di nuclei o detriti di cellule apoptotiche o a degradazione dei mitocondri danneggiati. Il deficit di DNase2 nel topo risulta incompatibile con la vita; infatti in questi animali è stata osservata la morte in utero dovuta a epatite infiammatoria associata ad anemia. Durante lo sviluppo fetale l'eritropoiesi avviene nel fegato ed è proprio la DNase2 ad occuparsi della degradazione lisosomiale dei nuclei degli eritroblasti, dopo che questi vengono fagocitati dalle cellule di Kupffer. Il deficit di DNase2, quindi, causa accumulo dei nuclei all'interno delle cellule di Kupffer e attivazione della via dell'interferone di tipo I, che porta allo sviluppo di epatite infiammatoria e di uno stato di anemia che risulta fatale per l'animale (86). Allo stesso modo nell'uomo la malattia si presenta con una sindrome pseudo-TORCH, severa anemia neonatale e un quadro di epatopatia che tende a migliorare nei primi mesi di vita (verosimilmente per l'interruzione dell'eritropoiesi a livello del fegato) (87). Successivamente compaiono varie manifestazioni come un'artrite deformante non erosiva, simile all'artropatia di Jaccoud tipica del lupus, e aspetti infiammatori a carico di cute, rene, pancreas. Dal punto di vista laboratoristico viene riscontrata leucopenia e presenza di anticorpi antinucleo (87).

2.5 Diagnosi

Le interferonopatie di tipo I sono, come già detto, malattie genetiche piuttosto rare e di recente descrizione. Per questi motivi, ad oggi non è stato ancora delineato un

percorso univocamente riconosciuto ed efficace nel giungere alla diagnosi. Altra difficoltà da considerare nella formulazione di una diagnosi è la presentazione clinica assai variabile e talvolta aspecifica. Questa, difatti, può spaziare da un esordio fetale con severa compromissione neurologica già evidente nelle prime settimane di vita, come accade nella sindrome di Aicardi-Goutières, a forme in cui predominano manifestazioni reumatologiche, fino a quadri con prominente fenotipo infiammatorio cutaneo e pneumologico. Pur tenendo in considerazione questo ampio spettro di quadri clinici, vi sono alcuni segni clinici e radiologici che sembrano ricorrere nelle varie forme di interferonopatie. Tra questi è necessario ricordare episodi febbrili ricorrenti associati a infiammazione sistemica ed elevazione degli indici di flogosi, la presenza di calcificazioni cerebrali, soprattutto a livello dei gangli della base, l'interessamento cutaneo, con manifestazioni quali geloni, lipodistrofia e panniculite, e l'interstiziopatia polmonare. Questi elementi possono, quindi, guidare il clinico verso il sospetto diagnostico e indirizzarlo verso ulteriori approfondimenti.

Dal punto di vista laboratoristico, la misurazione diretta dell'interferone di tipo I non è possibile tramite le metodiche standard di laboratorio, a causa della sua bassissima concentrazione nel sangue periferico. Sono però in studio metodiche sperimentali che permettano di registrare concentrazioni attomolari di interferone di tipo I (88). Uno degli esami di laboratorio di maggior aiuto nella diagnosi delle interferonopatie di tipo I è rappresentato dall'analisi dell'espressione su sangue periferico di alcuni geni indotti dall'interferone (IGSs). Questo test viene definito "firma interferonica" e permette di ricavare un valore detto Interferon Score (IS) (89). Si tratta di un esame dotato di buona sensibilità, ovvero un'elevata probabilità che i soggetti affetti da patologia risultino positivi, e buona specificità, ovvero un'elevata probabilità che i soggetti sani risultino negativi. Il suo limite maggiore è dato dalla mancata standardizzazione fra i diversi centri. Pertanto, sono state sviluppate alcune varianti del test in grado di superare questa limitazione, tra cui un nuovo sistema di punteggio basato sulla tecnologia NanoString (90–92). In realtà la "firma interferonica" non è un test specifico delle interferonopatie di tipo I, in quanto risulta alterato anche nei disturbi caratterizzati da iperproduzione di interferone di tipo II (IFN γ). Nella maggior parte dei casi è possibile distinguere queste condizioni grazie alla presenza di elementi clinici e laboratoristici

caratteristici, quali la linfoistocitosi, l'iperferritinemia e l'aumento della PCR più che della VES.

Trattandosi di disordini genetici, la diagnosi definitiva dovrebbe essere confermata con sequenziamento genico. Nella maggior parte dei centri vengono utilizzati pannelli diagnostici basati su tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), contenenti i principali geni noti responsabili di malattie autoinfiammatorie. In centri selezionati, invece, è possibile ricorrere al sequenziamento dell'intero esoma (WES).

2.6 Terapia

Il trattamento delle interferonopatie risulta alquanto complesso, sia per la grande variabilità di presentazione clinica sia per la resistenza alle terapie convenzionali. I pazienti affetti da questa classe di malattie autoinfiammatorie, difatti, rispondono poco ai farmaci comunemente utilizzati in ambito reumatologico. Traggono solo un parziale beneficio dalla somministrazione di corticosteroidi, a meno che non si ricorra a dosaggi molto elevati, come nel caso delle fasi acute di malattia. Tra i DMARDs (Disease modifying antirheumatic drugs) Metotrexato, Azatioprina e i principali biologici, fra cui Etanercept, Anakinra, Infliximab, si sono dimostrati inefficaci nella maggior parte dei casi, con eccezione di Tocilizumab, che sembra aver apportato beneficio nei casi di neuropatia da deficit di SAMHD1 (93), e di Rituximab, utile nei casi associati allo sviluppo di rilevante autoimmunità anticorpale. Micofenolato mofetile è stato utilizzato in casi caratterizzati dalla presenza di nefrite e pneumopatia, come nella sindrome COPA (94), in analogia a quanto già dimostrato per il trattamento del lupus eritematoso sistemico e della dermatomiosite (95–99). Tra i farmaci antimalarici, idrossiclorochina e mepacrina, essendo in grado di modulare le fasi iniziali della cascata di produzione di interferone di tipo I attraverso l'inibizione di TLR7 e TLR9 e la modulazione dell'attività di cGAS, possono avere un ruolo nel trattamento delle interferonopatie, se somministrati in combinazione con altri farmaci (100,101).

La conoscenza più approfondita dei meccanismi patogenetici responsabili delle interferonopatie ha permesso una maggiore comprensione delle vie attraverso cui

l'organismo rileva la presenza anomala di acidi nucleici a livello cellulare e innesca una risposta articolata con la sintesi di interferone e altre citochine. L'approfondimento di questi sistemi ha aperto la strada a nuove opzioni terapeutiche, basate sull'utilizzo di farmaci già in commercio per il trattamento di altre patologie o sull'uso di farmaci ancora in fase di sperimentazione. Difatti, come già riportato, la disregolazione della via dell'interferone è stata riconosciuta come meccanismo patogenetico fondamentale e comune di queste patologie. Perciò oggi possiamo affermare, basandoci su esperimenti in vitro su cellule prelevate da individui affetti, che l'inibizione di tale via rappresenta la strategia terapeutica più promettente. In particolare, la strategia terapeutica che sembra ad oggi la più promettente è rappresentata dal blocco del segnale del recettore IFNAR attraverso l'inibizione delle Janus Chinasi. I JAK inibitori sono piccole molecole somministrabili per bocca, in grado, appunto, di fermare il segnale interferonico. Attualmente sono disponibili in commercio svariate molecole, ognuna caratterizzata da una specifica selettività per le diverse proteine appartenenti alla famiglia delle Janus Chinasi. I JAK inibitori che si sono dimostrati utili nel trattamento delle interferonopatie sono Tofacitinib, Ruxolitinib e Baricitinib, tutti specifici per JAK1 e JAK2. Tofacitinib agisce principalmente su JAK1 e JAK3 con una minor selettività su JAK2; Ruxolitinib inibisce JAK1 e JAK2 con una lieve selettività su TYK2 ed è già autorizzato per la terapia di patologie mieloproliferative; Baricitinib agisce solamente su JAK1 e JAK2 ed è già autorizzato nell'adulto per il trattamento dell'artrite reumatoide (102). Essendo le Janus Chinasi implicate in numerose altre vie di segnalazione, gli effetti indesiderati di questa classe di farmaci possono essere svariati. I principali eventi avversi descritti sono rappresentati da infezioni delle vie respiratorie superiori, gastroenterite, infezione da Poliomavirus, VZV e dislipidemia (65). Per questo motivo è necessario ricorrere a dosaggi tali da non inibire completamente l'attività delle citochine bersaglio. I livelli sierici raggiunti con la posologia raccomandata permettono, comunque, un blocco dell'attività superiore al 50% per alcune ore al giorno. Data la gravità delle interferonopatie, i JAK inibitori mantengono un favorevole rapporto costo/benefici, anche a dosaggi maggiori rispetto a quelli prescrivibili nella terapia dell'artrite reumatoide (40,42,65,72,103). Per poter utilizzare dosaggi più maneggevoli è stata proposta l'associazione di altri farmaci attivi sulla cascata interferonica. Ad oggi la somministrazione di JAK inibitori

ha apportato una buona risposta clinica in alcuni soggetti affetti da sindrome di Aicardi-Goutières (49), in alcuni casi di sindrome CANDLE (65) e in un singolo caso di sindrome COPA (77). Alcuni soggetti affetti da sindrome SAVI in seguito alla somministrazione di inibitori di JAK1/2 sono riusciti a ridurre e sospendere la terapia di fondo con steroide (65,69,72,73).

Un'altra opzione terapeutica attualmente in studio è rappresentata dall'utilizzo di farmaci antiretrovirali. Questi, diminuendo i nucleotidi citoplasmatici derivati da retroelementi, trovano indicazione razionale nel trattamento della sindrome di Aicardi-Goutières. Sono stati pubblicati i primi risultati di un trial che ha coinvolto 8 pazienti affetti da mutazioni in cui è dimostrato un ruolo patogenetico dei retroelementi dipendente dalla trascrittasi inversa (TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1) (NCT02363452) (48). I pazienti hanno assunto per 12 mesi tre analoghi nucleosidici della trascrittasi inversa (Zidovudina, Lamivudina, Abacavir) al dosaggio standard pediatrico. L'endpoint primario dello studio era la riduzione dell'Interferon Score; durante il trattamento è stata registrata una diminuzione dell'Interferon Score, della concentrazione di IFN α nel siero e dell'espressione di ISGs, che sono ritornati ai valori originari nei sei mesi successivi alla sospensione del trattamento. È in corso uno studio simile basato sulla somministrazione di Tenofovir e Emtricitabina (NCT03304717) (104).

Sono in fase di sperimentazione, inoltre, anticorpi monoclonali diretti contro IFN α (Sifalimumab) e IFNAR (Anifrolumab), rispettivamente in fase 2 e in fase 3 di trial clinici che vedono la partecipazione di soggetti affetti da lupus eritematoso sistemico (105,106).

Un'ultima potenziale strategia è quella di modulare la degradazione di IFNAR. Difatti, è stato dimostrato che l'enzima HDAC11 (Histone Deacetylase 11) regola indirettamente la via di segnalazione dell'interferone di tipo I. HDAC11 ha come substrato SHMT2, che modula l'ubiquitinazione di IFNAR e, quindi, la sua espressione a livello cellulare. Uno studio ha evidenziato che la deplezione di HDAC11 porta a una ridotta degradazione di IFNAR per mancata deacetilazione di SHMT2, aumentando così la segnalazione interferonica (107).

3. Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio è stato quello di individuare tra i pazienti afferenti al nostro centro reumatologico pediatrico quelli affetti da una interferonopatia di tipo I e successivamente di delineare e validare un iter diagnostico preciso per questa nuova classe di malattie autoinfiammatorie.

Come già detto in precedenza, le recenti scoperte riguardo i meccanismi patogenetici alla base di questo gruppo di patologie sono risultate fondamentali non solo per la definizione di un possibile approccio terapeutico, ma anche per l'identificazione di un valido work-up diagnostico.

L'intento è quello di valutare il potere diagnostico della combinazione tra la presenza di specifici criteri clinici individuati nei pazienti con interferonopatia e l'analisi dell'attivazione della via dell'interferone su sangue periferico nella popolazione reumatologica pediatrica.

Per facilitare l'applicazione clinica dell'analisi della via dell'interferone proponiamo l'utilizzo di un biomarker, la firma interferonica o Interferon Score, calcolato come la mediana dell'espressione di sei geni indotti dall'interferone relativa a un donatore sano, utilizzando come riferimento 19 donatori sani.

Un percorso diagnostico definito, guidato quindi dai criteri clinici e dalla firma interferonica permetterebbe di indirizzare all'analisi genetica solo quei soggetti fortemente sospetti per le malattie in questione, riducendo così sia la mole di lavoro per il laboratorio di genetica sia i costi.

La combinazione di questi criteri clinici e di laboratorio verrà validata su una popolazione di controllo al fine di verificarne il potere predittivo, con l'obiettivo di fornire allo specialista reumatologo pediatrico uno strumento efficace per una corretta diagnosi differenziale.

L'utilizzo della firma interferonica, infine, potrebbe rivelarsi estremamente utile come biomarker in grado di predire la risposta terapeutica a farmaci inibitori della via

dell'interferone di tipo I in soggetti seppur non affetti da malattie genetiche, resistenti alle terapie convenzionali.

4. Pazienti e Metodi

4.1 Selezione dei pazienti e registro clinico EUROFEVER

La prima fase dello studio è stata dedicata all'individuazione dei criteri clinici di selezione dei pazienti. La soddisfazione di tali criteri rappresenta il presupposto necessario per accedere alle indagini diagnostiche successive. Al fine di selezionare, all'interno della popolazione reumatologica pediatrica, i bambini che avevano una maggiore probabilità di essere affetti da interferonopatia, l'aspetto che abbiamo considerato è stato principalmente quello clinico. I criteri di selezione sono stati stabiliti da un pannello di esperti sulla base della letteratura scientifica e dell'esperienza in ambito reumatologico pediatrico. Il rationale che ha guidato la scelta è stato quello di includere le manifestazioni cliniche più frequentemente descritte in letteratura associate ad interferonopatia e gli aspetti clinici maggiormente condivisi dalle diverse patologie inserite in questa categoria.

I dati dei pazienti analizzati in questo studio sono stati estratti dal registro EUROFEVER (Executive Agency for Health and Consumers project n. 2007332), che arruola pazienti a partire da novembre 2009 (108). L'approvazione del comitato etico e il consenso informato per l'inserimento dei soggetti all'interno del registro sono stati ottenuti in tutti i centri partecipanti, in conformità con le disposizioni locali. I dettagli epidemiologici e i dati clinici, laboratoristici e molecolari sono stati raccolti in forma anonima. EUROFEVER è un progetto internazionale nato per creare un'unica raccolta di dati di pazienti affetti da malattie autoinfiammatorie, con lo scopo di permettere una più approfondita conoscenza di queste. Il registro EUROFEVER è ospitato dal Pediatric Rheumatology INternational Trials Organisation (PRINTO, <https://www.printo.it>); vi partecipano sia centri reumatologici pediatrici legati al network di PRINTO, sia centri per adulti con un interesse specifico nelle malattie autoinfiammatorie. Questo sistema permette quindi l'inserimento di informazioni riguardanti la diagnosi, la presentazione clinica, gli esami di laboratorio e la terapia di ogni soggetto affetto da malattia autoinfiammatoria sistemica, sia monogenica sia multifattoriale, o di pazienti presentanti un quadro clinico suggestivo di infiammazione sistemica. Nel nostro caso sono stati estratti i dati inseriti fino al 3 giugno 2020.

I pazienti arruolati nello studio sono stati raggruppati nelle seguenti categorie diagnostiche:

- 1) *Interferonopatie*, comprendente i soggetti affetti da sindrome di Aicardi-Goutières, sindrome COPA, sindrome SAVI, deficit di DNASE, sindrome RALD;
- 2) *Malattie autoinfiammatorie sistemiche*, comprendente i soggetti affetti da sindrome Blau, sindromi legate alla famiglia NLRP3 (FCAS, Familiar Cold Autoinflammatory Syndrome; MWS, Muckle-Wells Syndrome; CINCA, Chronic Infantile Neurological Cutaneous and Articular syndrome), Deficit di Adenosina Deaminasi 2, Febbre Mediterranea Familiare, Deficit di Mevalonato Chinasi, Artrite Idiopatica Giovanile Sistemica;
- 3) *Malattie autoimmuni*, comprendente i soggetti affetti da lupus eritematoso sistemico, sindrome autoimmune linfoproliferativa, vasculite ANCA-associata, sindrome antifosfolipidi, osteomielite cronica multifocale ricorrente, dermatomiosite giovanile, malattia mista del tessuto connettivo, poliarterite nodosa, sclerodermia, sindrome di Sjogren;
- 4) *Malattie autoinfiammatorie indifferenziate*, ovvero condizioni infiammatorie sistemiche di natura indeterminata. In questa categoria sono stati inseriti soggetti presentanti acrocianosi e fenomeno di Raynaud, cromosomopatia, lupus pernio, vasculopatia o sintomi reumatologici caratteristici; oltre a soggetti che per il quadro fenotipico hanno destato sospetto di lupus eritematoso sistemico o sindrome di Aicardi-Goutières;
- 5) *Immunodeficienze primarie*, comprendente soggetti affetti da mutazioni genetiche a carico dei geni *STAT1* (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) e *ARPC1B* (*Actin Related Protein 2/3 Complex Subunit 1B*), che svolgono un ruolo cruciale nell'attivazione della risposta immunitaria.

4.2 Interferon Score

La fase successiva del percorso diagnostico prevede che i pazienti individuati, sulla base della sintomatologia clinica, siano ulteriormente selezionati per stabilire chi sottoporre alle indagini diagnostiche genetico-molecolari.

Nello studio tutti i pazienti saranno sottoposti all'analisi genetica per valutare l'efficacia diagnostica della combinazione fra la selezione clinica e lo studio dell'espressione dei geni indotti dall'interferone (interferon signature).

Per lo screening dei pazienti precedentemente selezionati è stato validato in ambito reumatologico pediatrico un biomarker che rispondesse ai seguenti criteri:

AFFIDABILITÀ: un biomarker ideale deve avere una buona sensibilità, cioè un'elevata probabilità di risultare positivo nei soggetti affetti dalla patologia, ed un'elevata specificità, ovvero un'elevata probabilità di risultare negativo nei soggetti sani, avendo quindi un numero ridotto di falsi positivi. Di fondamentale importanza infine è che sia facilmente riproducibile tra centri differenti.

UTILITÀ: la capacità nel nostro caso di guidare il clinico nell'approccio terapeutico e aiutare a monitorare l'andamento clinico della malattia nel tempo.

CONVENIENZA: il test ideale dev'essere infine economicamente vantaggioso e di semplice esecuzione.

La prima descrizione di un'associazione fra l'incremento dei livelli dell'interferone di tipo I e le patologie con fenotipo clinico autoimmune è stata riportata nel LES (109,110). Sulla base di tale osservazione e della difficoltà tecnica di dosare i livelli della citochina nel sangue, è stato studiato un nuovo strumento diagnostico e di valutazione dell'efficacia terapeutica: lo studio della "signature dell'interferone" (111–113). Il termine "signature dell'interferone" indica l'espressione dei geni indotti dall'interferone nel sangue periferico. Studi effettuati in pazienti con la sindrome di Aicardi-Goutières (AGS) hanno dimostrato una forte correlazione fra le mutazioni dei geni causativi della sindrome e la signature dell'interferone (69). Nel 2013 Rice e colleghi hanno utilizzato l'espressione dei geni indotti dall'interferone come indicatore di attivazione della via, dimostrando la sua efficacia nel distinguere i pazienti affetti da AGS dai controlli sani (89). Dapprima hanno considerato 15 geni indotti dall'interferone individuati sulla base di precedenti studi sull'interferon signature nel LES (112,114), poi hanno selezionato un sottogruppo di 6 geni con elevata espressione in una coorte di 10 pazienti con AGS (36). Tramite un'analisi semiquantitativa con la RT-PCR, hanno valutato quante volte questi sei geni fossero

maggiormente espressi nei malati rispetto ad un controllo sano, sviluppando un biomarker definito "Interferon Score", con una sensibilità elevata per AGS. In un secondo momento il rilevamento di una up-regolazione dell'espressione dei geni stimolati dall'interferone nel sangue periferico è stato utilizzato anche in pazienti con altre interferonopatie, in particolare le sindromi PRAAS (62), suggerendone il grande potenziale come test di screening e strumento diagnostico.

Sulla base di queste esperienze, abbiamo riconosciuto nell'Interferon Score le caratteristiche di un biomarker idoneo per individuare, nel percorso diagnostico descritto, chi fra i pazienti che soddisfano i criteri clinici stabiliti possa accedere alla fase diagnostica definitiva: l'indagine genetica.

4.2.1 Metodo

L'espressione dei geni indotti dall'interferone è stata determinata utilizzando una tecnica derivata dalla Reazione a Catena della Polimerasi (PCR), la Real-Time PCR (RT-PCR) quantitativa. La PCR è un metodo in vitro di amplificazione degli acidi nucleici. Permette una sintesi esponenziale di un segmento di DNA a partire da un filamento di DNA chiamato stampo. Si utilizza un enzima, la DNA-polimerasi, che lega le sequenze oligonucleotidiche costruite in modo tale da permettere il legame all'estremità della sequenza di interesse.

La miscela di amplificazione deve contenere:

- Sequenza target: il materiale genetico contenente le regioni che si desidera amplificare;
- DNA polimerasi termo-resistente e termo-stabile;
- Due Primer: oligonucleotidi a singolo filamento complementari rispettivamente all'estremità 3' e 5' della sequenza target, chiamati perciò senso e antisenso, che costituiscono gli elementi di innesco per l'attività della DNA polimerasi;
- Soluzione buffer: una soluzione salina acquosa che mantiene stabile il pH;

- Deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs): i singoli nucleotidi che costituiscono i mattoncini necessari per la sintesi di nuove eliche.

La reazione prevede il susseguirsi di cicli di amplificazione realizzati grazie all'alternanza di cicli di specifiche temperature. Per ogni ciclo si possono distinguere tre fasi: la denaturazione, l'appaiamento o annealing e infine l'estensione.

Durante la denaturazione si raggiungono alte temperature di circa 95°C. In questa fase avviene la separazione della doppia elica del DNA stampo in due filamenti singoli (denaturazione termica). Ciò avviene poiché l'alta temperatura rende i legami idrogeno, tra le catene, instabili, permettendone la rottura. La denaturazione viene favorita dalla presenza di concentrazioni saline relativamente alte. L'attività dell'enzima generalmente si mantiene stabile per la realizzazione dei 30-40 cicli necessari ad ottenere milioni di copie della stessa sequenza bersaglio.

Nella seconda fase, l'appaiamento o annealing, la temperatura viene abbassata (raggiungendo temperature comprese tra i 55 e i 65°C): a queste temperature si verifica il legame dei primer alle sequenze di DNA a singola elica ad essi complementari localizzati alle estremità del frammento di interesse. La temperatura di annealing del primer è condizionata dal loro contenuto di basi (G) e (C) e dalla loro lunghezza.

Nell'ultima fase, quella di estensione, la temperatura viene leggermente alzata per massimizzare l'azione dell'enzima (la temperatura di lavoro dell'enzima è solitamente compresa tra i 68 e 72°C). In questa fase i primer oligonucleotidici vengono estesi dalla DNA polimerasi che incorpora i singoli deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs) complementari al DNA stampo. Il ciclo di amplificazione, costituito dalle tre fasi appena descritte, viene ripetuto 30-40 volte per ottenere un'amplificazione esponenziale della sequenza target. Negli ultimi cicli di amplificazione la reazione rallenta, a causa del consumo di reagenti e della riduzione di attività della polimerasi, fino al raggiungimento di un plateau, nel quale non si ha più amplificazione a causa dell'esaurimento dei reagenti e dell'accumulo di prodotto. Il segnale che viene quantificato è rappresentato dalla fluorescenza emessa da fluorofori, cioè coloranti fluorescenti in grado di legarsi alle molecole di DNA prodotte ad ogni ciclo di amplificazione. I fluorofori che abbiamo utilizzato fungono da marcatori di sonde oligonucleotidiche complementari a specifiche sequenze. Nelle analisi basate

sull'utilizzo di sonde specifiche, il segnale fluorescente viene rilevato solo in conseguenza dell'appaiamento della sonda alla sequenza bersaglio. Le sonde tipicamente usate possono essere di due tipi: sonde idrolitiche o di ibridazione. Le sonde idrolitiche presentano rispettivamente alle due estremità un fluoroforo ad alta energia (reporter) e un inibitore del fluoroforo (quencher). Quando la sonda è appaiata alla sequenza bersaglio, l'inibitore è sufficientemente vicino al fluoroforo da bloccarne l'emissione del segnale fluorescente. Durante l'allungamento, in ogni ciclo di amplificazione, la polimerasi idrolizza la sonda. In questo modo il fluoroforo viene liberato nella miscela di reazione e si allontana dall'azione dell'inibitore, con conseguente emissione del segnale fluorescente. Quindi nelle analisi che utilizzano sonde idrolitiche l'emissione del segnale fluorescente dipende dall'attività della DNA polimerasi. La valutazione quantitativa dell'acido nucleico è affidata alla rilevazione e alla conseguente quantificazione di un "reporter" fluorescente il cui segnale cresce in maniera proporzionale alla quantità di prodotto di PCR nella reazione. Viene disegnata la sonda gene-specifica che si appaia nella zona compresa fra i due primer (forward e reverse). Tale sonda, generalmente lunga 20-30 paia di basi, contiene un colorante fluorescente (*Reporter*), solitamente di colore verde, all'estremità 5' ed un colorante spegnitore (*Quencher*), di colore rosso, all'estremità 3'. In condizioni di normale appaiamento sonda-DNA stampo, se il campione viene irradiato, l'energia fluorescente emessa dal colorante ad alta energia in 5' viene assorbita totalmente dal quencher a bassa energia. Fino a quando, in altri termini, la sonda resta intatta la vicinanza tra reporter fluorescente e quencher annulla l'emissione del segnale di fluorescenza perché si verifica un trasferimento di energia dal primo al secondo. Nel momento in cui la DNA-polimerasi, replicando lo stampo, incontra la sonda appaiata al suo interno, grazie alla sua attività esonucleasica 5' → 3', comincia a degradarla. L'allontanamento tra il reporter ed il quencher pone fine all'attività di assorbimento di quest'ultimo e fa in modo che il reporter inizi ad emettere fluorescenza. Quest'ultima incrementerà a ogni ciclo proporzionalmente al tasso di degradazione della sonda. L'accumularsi del prodotto amplificato viene rivelato monitorando quindi l'incremento di fluorescenza del reporter. Registrando la quantità di emissione fluorescente per ogni ciclo è possibile monitorare la reazione di polimerizzazione durante la sua fase esponenziale, nella quale il primo incremento significativo di prodotti neosintetizzati è collegato alla

concentrazione iniziale di stampo nel campione. Infatti, maggiore è il numero di copie iniziali dell'acido nucleico, prima si osserverà un incremento significativo della fluorescenza. La fluorescenza emessa ad ogni ciclo di amplificazione viene rilevata ed analizzata tramite un software. Il software consente la programmazione di diversi protocolli sperimentali. La configurazione del protocollo permette di settare tempi e temperature per le diverse fasi del ciclo di PCR e specificare il momento in cui raccogliere il segnale fluorescente.

Curva di amplificazione

La curva di amplificazione descrive l'aumento di fluorescenza in funzione del numero di cicli di PCR. L'intensità della fluorescenza emessa durante la RT-PCR è correlata con la quantità di prodotto formato. Il segnale fluorescente emesso ad ogni ciclo di amplificazione viene rilevato dal sistema ottico e memorizzato da un computer. Dopo i primi cicli di amplificazione, la fluorescenza supera un livello di soglia arbitrario e inizia ad aumentare in modo esponenziale.

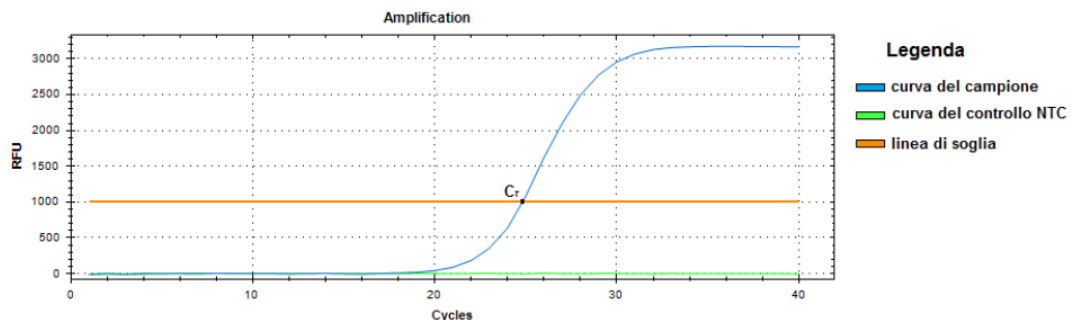


Figura 4. Esempio di curva di amplificazione del segnale di fluorescenza

Come si nota dal grafico (Figura 4), la curva di amplificazione ha un andamento tipicamente sigmoideale con una fase esponenziale, una fase lineare e una fase di plateau in cui termina l'amplificazione, e la fluorescenza si stabilizza a un valore di regime.

Soglia di reazione

La linea di soglia della reazione di PCR (*threshold line*) rappresenta il livello di segnale che raggiunge un aumento statisticamente significativo rispetto al segnale di background. Viene impostata automaticamente dal software, ma può essere poi riposizionata manualmente dall'operatore in modo che essa intersechi tutti i campioni

dell'esperimento nella loro fase esponenziale. Solitamente si posiziona a circa metà della fase di amplificazione lineare, meglio identificabile visualizzando le curve su scala logaritmica.

Ciclo Soglia

Il *ciclo soglia CT*, chiamato anche *ciclo di quantificazione CQ*, rappresenta il numero di cicli necessari in cui il segnale di amplificazione raggiunge la linea di soglia impostata. Graficamente è il punto di intersezione tra la *linea di soglia (threshold line)* e la curva di amplificazione. Su questo parametro si basano i diversi metodi per la quantificazione del segnale. Il *CT* di ogni campione è inversamente proporzionale alla quantità iniziale: infatti minore è la quantità di materiale di partenza, più cicli saranno necessari per raggiungere il livello di soglia. Se si confrontano, per esempio, due campioni contenenti una quantità doppia di sequenza target rispetto all'altro, ipotizzando che l'efficienza per entrambe le reazioni di PCR sia del 100%, la curva di amplificazione del campione più concentrato intersecherà la linea di soglia un ciclo prima rispetto alla curva del campione meno concentrato.

Analisi quantitativa

La quantificazione del segnale di fluorescenza di real-time PCR viene effettuata seguendo due strategie diverse. I livelli di espressione genica possono essere riportati tramite *quantificazione assoluta* o *relativa*. La prima rappresenta una misura del numero di copie di DNA target di partenza e viene valutata utilizzando una *curva di calibrazione*. La quantificazione relativa, invece, rappresenta una misura relativa dei livelli di espressione rispetto a una specifica condizione sperimentale (M. Filion, 2012). Per ottenere dati biologicamente significativi, con entrambe le metodologie i livelli di espressione dei geni target devono essere normalizzati rispetto ai livelli di espressione di geni di riferimento, normalmente costanti nelle varie condizioni sperimentali.

Quantificazione relativa

La quantificazione relativa determina i cambiamenti di livello di espressione di un gene target in più campioni rispetto a un controllo interno, ovvero un gene di riferimento che può essere co-amplificato insieme al target di interesse. Un gene di

riferimento (*reference gene*) è un gene il cui livello di espressione rimane costante in tutti i campioni del test, e la cui espressione non è influenzata dal trattamento sperimentale di cui si vuole studiare gli effetti. L'impiego di un gene di riferimento è vantaggioso nei casi dove non è possibile una precisa quantificazione del materiale di partenza e quando è disponibile solo una piccola quantità di templatato iniziale. Per ogni esperimento di quantificazione relativa sono necessari:

- Target: la sequenza di cDNA da analizzare;
- Calibratore: il campione da usare come riferimento per l'analisi comparativa;
- Controllo endogeno: un gene espresso costitutivamente in tutti i campioni (*gene di riferimento*), necessario per normalizzare i dati rispetto alla quantità di cDNA caricato e a possibili variazioni di efficienza della reazione.

Il calibratore si impiega nel confronto tra campioni multipli; l'espressione del gene target in tutti i campioni è rappresentata da un incremento o decremento relativo rispetto al calibratore. L'inconveniente è che il procedimento necessita di geni di riferimento che abbiano un livello di espressione costante in tutti i campioni, cioè che non cambi a causa del trattamento farmacologico in esame. La scelta dei geni di riferimenti non è banale, e va valutata caso per caso. Sono disponibili diversi software gratuiti come *geNorm*, *BestKeeper* o *NormFinder* per la scelta e validazione dei geni di riferimento (M.Filion, 2012). Tra i *reference gene* utilizzati troviamo spesso il *GAPDH*, la beta 2-microglobulina (*B2M*) e il gene *HPRT1*. Recentemente è stato proposto l'impiego di più geni di riferimento contemporaneamente per realizzare una quantificazione più accurata. Per calcolare l'espressione di un gene target in relazione a un gene di riferimento sono stati proposti vari modelli matematici. I calcoli si basano sul confronto di distinti cicli, ad esempio i valori soglia (*CT*, cycle threshold) corrispondenti ad un livello costante della fluorescenza o l'acquisizione di *CT* rispettando un determinato algoritmo matematico. In questo tipo di analisi il risultato che si ottiene è un rapporto (*ratio*). Ad oggi sono stati sviluppati diversi modelli matematici che determinano l'espressione relativa (S.Bustin 2004).

Metodo del ΔCT

Il metodo del ΔCT si basa sulla differenza di ciclo soglia tra il calibratore e il campione di test.

$$\Delta CT = CT(test) - CT \text{ calibrator} \quad Ratio = E^{-\Delta CT}$$

dove E è l'efficienza della reazione.

Se assumiamo l'ipotesi di un'efficienza d'amplificazione ideale, l'equazione precedente diventa:

$$Ratio = 2^{-\Delta CT}$$

(K.J. Livak et al, 2001)

4.2.2 Procedura

Raccolta del campione

Il campione ematico di 2,5 ml per la valutazione dell'interferon signature è stato raccolto in un PAXGene Tube (QIAGEN).

Estrazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule del sangue intero utilizzando il PAXGene blood kit (QIAGEN, <http://www.qiagen.com/us/products/catalog/sample-technologies/rna-sample-technologies/total-rna/paxgene-blood-rna-kit-ivd/>).

La concentrazione dell'RNA totale è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica.

Retrotrascrizione (RT)

L'RNA totale è stato sottoposto a retrotrascrizione, permettendo di ottenere la sintesi di DNA complementare (cDNA) mediante il kit SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies). Durante la reazione di retrotrascrizione i primer si legano alle specifiche sequenze complementari di RNA per venir poi estesi dall'enzima trascrittasi inversa, formando un composto ibrido dato da un filamento di cDNA e uno di RNA.

Un nanogrammo di cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato utilizzato nella reazione di real-time PCR, per determinare la quantità relativa di di mRNA dei 6 geni indotti dall'interferone. Si è passati alla fase di amplificazione utilizzando primer specifici. I risultati ottenuti sono stati normalizzati utilizzando i valori ottenuti dall'analisi dell'mRNA per il gene codificante la G6PD (glucosio-6-fosfato deidrogenasi) e la HPRT1 (ipoxantina fosforibosil transferasi) dello stesso campione, due geni housekeeping costitutivi, la cui espressione non viene generalmente modificata dai trattamenti, ma varia soltanto in funzione della quantità di RNA totale. La RT-PCR quantitativa è stata eseguita mediante metodi standard utilizzando le sonde *Universal Probe Library* della ditta Roche. I campioni sono stati analizzati in triplice copia e sono stati usati due geni housekeeping (HPRT1 e G6PD).

Sono stati utilizzati i Primer e le Sonde elencate in tabella:

	Roche probe n.	Probe Catalog	Primer	Primer sequence
IFI27	21	4686942001	IFI27 FW	gtggccaaagtggtcagg
			IFI27 REV	ccaatcacaactgtagcaatcc
IFI44L	15	4685148001	IFI44L FW	tgacactatggggctagatgg
			IFI44L REV	ttggtttacgggaattaaactgat
IFIT1	82	4689054001	IFIT1 FW	tccacaagacagaatagccagat
			IFIT1 REV	gctccagactatccttgacctg
ISG15	76	4688996001	ISG15 FW	gaggcagcgaactcatcttt
			ISG15 REV	agcatcttcaccgtcaggtc
RSAD2	76	4688996001	RSAD2 FW	acaaatgcggtctctgtttc
			RSAD2 FW	gaaatggctctccacctgaa
SIGLEC1	76	4688996001	SIGLEC1 FW	ctgcctgcaagtcctcta

			SIGLEC1 REV	cagcaggtggctcactgtc
HPRT1	73	4688961001	HPRT1 FW	tgaccttgattattttgcatacc
			HPRT1 REV	Cgagcaagacgttcagtctt
G6PD	82	4689054001	G6PD FW	Gcaaacagagtgagcccttc
			G6PD REV	Gagttgctgggcaaagaagt

Tabella 3: Primer e Sonde utilizzate

Sono stati effettuati 40 cicli di amplificazione. È stata utilizzata la quantificazione relativa per stimare l'espressione di ogni gene in esame, rispetto all'espressione dello stesso gene nel controllo sano usato come calibratore:

$$RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$$

dove

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ campione } 1 - \Delta CT \text{ calibratore}$$

e

$$\Delta CT = CT \text{ del gene testato} - CT \text{ del controllo endogeno}$$

L'Interferon Score è calcolato come la mediana della quantificazione relativa dei sei geni analizzati rispetto ad un controllo sano, denominato calibratore, utilizzando come riferimento 19 donatori sani. Il valore di cut-off è di 0,8, che rappresenta la mediana più due deviazioni standard (Figura 11).

4.3 Indagine genetica

La terza fase dello studio corrisponde alla fase diagnostica definitiva. È rappresentata dall'indagine genetica di analisi del DNA, volta a riscontrare eventuali mutazioni causative di malattia o delle quali sono state riportate correlazioni con il fenotipo clinico presentato dai pazienti. Sono state utilizzate diverse tecniche di sequenziamento del DNA. In caso di presentazione clinica estremamente suggestiva

di una singola malattia si è proceduto con il sequenziamento di un solo gene con metodica di Sanger. Negli altri casi, invece, sono stati utilizzati i moderni approcci di Sequenziamento di Nuova Generazione (NGS) tramite l'utilizzo di un pannello di geni o il sequenziamento dell'intero esoma.

Il sequenziamento del DNA

Il sequenziamento è il metodo fondamentale per caratterizzare una macromolecola, sia che si tratti di determinare l'ordine degli aminoacidi di una proteina o la sequenza di basi di un acido nucleico. Per capire l'importanza di questa tecnica e la conseguente informazione che fornisce, basti pensare che il sequenziamento di un intero genoma può permettere di predire la sequenza di tutte le proteine che potenzialmente questo può produrre. Nella pratica clinica il sequenziamento di geni specifici è utilizzato per la ricerca di mutazioni responsabili di malattie monogeniche.

Il sequenziamento di Sanger

Il metodo della terminazione enzimatica della catena di DNA in fase di replicazione, scoperto da Sanger e collaboratori nel 1977, ha segnato una pietra miliare nella storia del sequenziamento del DNA e ha fornito la base per lo sviluppo del sequenziamento automatico (Smith et al 1986, Ansorge et al 1987). Per quasi 20 anni il metodo di Sanger ha rappresentato il gold standard del sequenziamento genomico, con una capacità di analisi in parallelo di frammenti fino a 1000 paia di basi in 96 capillari.

Il metodo di sequenziamento del DNA con dideossinucleotermine o *metodo di Sanger* consiste di 3 fasi: la preparazione del campione, la reazione di sequenziamento, l'elettroforesi.

Preparazione del campione

Nella prima fase di preparazione del campione, il filamento di DNA che si vuole sequenziare viene copiato artificialmente, in modo da ottenere diverse copie identiche dello stesso. Sono due le tecniche che permettono questo processo di duplicazione: il *DNA ricombinante* e la *PCR*, dall'inglese *Polymerase Chain Reaction*. Il DNA ricombinante è una sequenza di DNA ottenuta artificialmente dalla combinazione di materiale genetico di origini differenti; per ottenerlo ci si serve di sistemi biologici come i plasmidi. Quest'ultimi sono piccoli filamenti circolari di DNA presenti nel

citoplasma batterico e distinguibili dal cromosoma batterico per le loro dimensioni ridotte. I batteri usano i plasmidi come veicolo per trasportare DNA ad un altro batterio. È possibile sfruttare la capacità dei plasmidi di integrarsi in un batterio ospite (ad esempio *Escherichia Coli*) per integrare un gene o una sequenza di DNA d'interesse. Affinché la sequenza di DNA o il gene d'interesse possa essere correttamente trasportato, occorre anzitutto che sia tagliato e ridotto nei minimi termini possibili. In seguito al taglio, il gene potrà essere integrato (cioè inserito) all'interno del vettore. L'ultima fase consiste nell'inserimento di un plasmide all'interno del batterio, che viene fatto replicare. Dopo la replicazione, si ottengono così molti batteri che contengono lo stesso materiale genetico e i plasmidi con la sequenza di DNA di interesse. Attraverso opportune tecniche di laboratorio, le sequenze di DNA oggetto allo studio vengono estratte dai plasmidi, ricavando più copie del campione biologico d'interesse. Come descritto precedentemente, invece, con il processo di reazione a catena della polimerasi (PCR), è possibile produrre milioni di copie di una quantità molto ristretta di DNA iniziale. È dunque una tecnica più rapida rispetto al DNA ricombinante, sebbene necessiti delle sequenze nucleotidiche (primer) che possano appaiarsi correttamente con le estremità del segmento da amplificare.

Reazione di sequenziamento

Durante la seconda fase, la reazione di sequenziamento, il campione biologico viene sottoposto a quattro processi: denaturazione, primer annealing, copia del filamento, terminazione. Con la denaturazione i singoli filamenti di DNA così separati sono posti in provetta. Il primer annealing è la fase in cui viene aggiunto un primer all'estremità 3' di uno dei due filamenti. Il primer è sintetizzato artificialmente e appositamente per la sequenza di DNA da sequenziare. Vengono allestite quattro miscele in quattro provette, una per ogni base. In ogni provetta viene aggiunta la DNA polimerasi (fase della copia del filamento), i quattro nucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e una piccola quantità di un dideossinucleoside trifosfato (ad esempio ddATP), ovvero un nucleotide che non ha il gruppo -OH in posizione 3' dello zucchero. Questi comunque potranno esser aggiunti dalla DNA polimerasi a un filamento di DNA in corso di sintesi mediante la formazione di un legame fosfodiesterico tra il suo 5'-fosfato e il 3'-OH del residuo precedente. Tuttavia, poiché i ddNTPs mancano del gruppo -OH in posizione 3', il nucleotide successivo non potrà esser legato come avviene nella

replicazione naturale del DNA. Per questo motivo la sintesi si arresta alla posizione in cui un ddNTP è stato incorporato all'estremità in accrescimento di un filamento di DNA (fase di terminazione). A differenza di quanto accade nella PCR questa volta viene copiato solo il filamento specifico per il primer utilizzato, in direzione 5'-3'. La replicazione del DNA procede e nella provetta si viene a trovare una miscela di filamenti stampo del DNA insieme ad una varietà di filamenti neosintetizzati più brevi. I filamenti nuovi, ognuno dei quali termina con un ddATP, per l'esempio riportato, avranno lunghezze differenti. Una volta che la DNA polimerasi incontra una base T sul filamento stampo, essa potrà aggiungere o un dATP o un ddATP. Se viene aggiunto un dATP la crescita del filamento continua, mentre se viene aggiunto un ddATP la crescita del filamento si arresta. Questo processo viene ripetuto in altre provette rispettivamente per il ddGTP, ddTTP, ddCTP. Dopo aver fatto proseguire per un po' la replicazione del DNA, i filamenti neosintetizzati vengono denaturati e tramite opportune tecniche di laboratorio separati dai filamenti stampo. A questo punto il preparato è pronto per la successiva fase e viene sottoposto ad elettroforesi.

Elettroforesi

L'elettroforesi è un processo elettrocinetico nel quale molecole e particelle cariche, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano in direzione del polo che ha carica opposta. Grazie alla presenza dei gruppi fosfato, le molecole di DNA sono cariche negativamente e quindi migreranno verso il polo positivo (anodo) se sottoposte ad un campo elettrico, con velocità che dipende anche dalla loro lunghezza, oltre che dall'intensità della corrente. Nel sequenziamento manuale le quattro miscele di frammenti di terminazione della catena, una per ogni analogo ddNTP marcato radioattivamente, vengono sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilamide o gel di agarosio in differenti corsie. Durante la corsa i frammenti più corti si muoveranno più agevolmente attraverso il gel rispetto ai frammenti più lunghi. Se il campo elettrico viene tolto prima che le molecole abbiano raggiunto l'elettrodo, si ha una separazione dei singoli componenti in base alla loro mobilità elettroforetica. La sequenza delle basi del DNA complementare a quella cercata viene letta dall'autoradiogramma delle quattro linee. Nel sequenziamento automatico, invece, non è necessario separare le quattro reazioni di terminazione in quattro provette differenti, ma si può allestire una singola reazione inserendo i quattro ddNTPs marcati mediante l'incorporazione di un

composto fluorescente, diverso per ogni base, e l'elettroforesi avviene lungo dei capillari, all'interno dei quali è sempre ricostruita la rete di gel o in polimero. Durante la corsa elettroforetica, i frammenti vengono letti in ordine di lunghezza crescente da un fascio laser che eccita i marcatori fluorescenti. Quindi viene misurata l'intensità della luce emessa e tale informazione, cioè quale colore di fluorescenza e dunque il tipo di ddNTP presente all'estremità di ogni filamento di differente lunghezza, viene inviata ad un computer. L'introduzione dell'elettroforesi capillare per la separazione dei frammenti marcati ha consentito un notevole aumento della produttività. Sono stati inoltre sviluppati modelli di sequenziatori automatici che sono in grado di eseguire corse elettroforetiche multiple su apparecchi multicapillari.

Il sequenziamento di nuova generazione: la Next Generation Sequencing

Rispetto al metodo di sequenziamento del DNA con dideossinucleotermine (*metodo di Sanger*), l'introduzione di tecniche High-Throughput (ad alta processività) ha enormemente aumentato la possibilità di analisi delle molecole biologiche. Con il termine di High Throughput (HT) si intende la capacità di effettuare numerosissime misurazioni in contemporanea. Il campo della genomica è stato il primo a beneficiare delle tecnologie HT con lo sviluppo del cosiddetto high-throughput sequencing (HTS), o next generation sequencing (NGS). Sono stati necessari circa 3 miliardi di dollari e 17 anni (dal 1990 al 2007) per il completamento del Progetto Genoma Umano (HGP, Human Genome Project), mentre per rifequenziare il genoma di James Watson con una piattaforma HTS, sono stati necessari solo due mesi e il costo è stato 100 volte inferiore a quello che sarebbe stato necessario con la metodica Sanger e l'impiego dei sequenziatori a capillari. L'avvento delle piattaforme NGS ha aperto eccezionali prospettive per lo sviluppo della ricerca genomica su larga scala in moltissimi ambiti, che includono il rifequenziamento o il sequenziamento de novo di genomi, la caratterizzazione di SNP, siti di metilazione e di editing, l'analisi del profilo di trascrizione a livello qualitativo e quantitativo, la caratterizzazione di siti di legame DNA-proteine e RNA-proteine, l'analisi metagenomica. La possibilità di sequenziare molti genomi individuali sarebbe dunque utile per molti studi di genetica di popolazione, ma anche di genetica medica, per esempio consentendo di valutare il grado di variabilità normale di soggetti in buona salute. L'iniziativa "1000 genomes" (<https://www.internationalgenome.org/>), sponsorizzata dal Wellcome Trust Sanger

Institute, dall'Istituto Shenzhen di Genomica e dal National Human Genome Research Institute, rappresenta quindi un ambizioso sviluppo del Progetto Genoma Umano. La disponibilità di tecnologie sempre più rapide e meno costose potrebbe aprire le porte alla "medicina personalizzata", basata sulla conoscenza del genoma dei singoli individui.

Analisi bioinformatica

Per quanto le varie tecnologie di sequenziamento seguano strade diverse, forniscono come output delle sequenze. Delle sottostringhe di queste sequenze, di lunghezza variabile da alcune decine a diverse centinaia di basi, vengono combinate insieme, di solito in un file FASTQ, un tipo di file utilizzato in biologia per memorizzare sequenze genetiche e i relativi quality scores, ossia il punteggio che l'algoritmo che effettua l'analisi assegna alla stringa, e che viene poi utilizzato per scegliere il match migliore contro il genoma di riferimento. A questo punto, l'analisi bioinformatica si divide in tre passi: allineamento, che ricerca corrispondenze tra le reads e il genoma di riferimento, variant calling, che tenta di separare differenze dovute ad errori genetici dagli errori strumentali compiuti nell'analisi, filtraggio e annotazione, che tentano di allineare le reads al genoma di riferimento. L'allineamento è il processo attraverso cui si mappano reads contro un genoma di riferimento. Si tratta di un compito complesso, in quanto il software deve confrontare ogni reads con ogni posizione del DNA di riferimento. Si tratta di un passaggio computazionalmente impegnativo e dispendioso in termini temporali. I file SAM (Sequence Alignment Map) e BAM (Binary Alignment Map) sono gli standard di riferimento per il salvataggio dei dati ottenuti dall'allineamento per le tecnologie di nuova generazione. Esistono numerosi software in commercio, gratuiti o a pagamento, per svolgere questo compito. Dopo l'allineamento delle reads, il DNA in analisi può essere confrontato al genoma di riferimento, avendo quindi la possibilità di individuare le variazioni. Queste variazioni possono essere causa di malattie, oppure possono essere varianti senza alcun effetto dannoso. La complessità di questo argomento risiede nel dover identificare le variazioni vere, ossia mutazioni del genoma, da variazioni dovute ad errori di sequenziamento. Il continuo sviluppo e perfezionamento delle tecnologie di nuova generazione porterà auspicabilmente vantaggi anche in questo ambito, migliorando l'input che l'analisi delle variazioni riceve. La difficoltà nell'analisi delle variazioni è

dovuta principalmente a fenomeni di inserimenti (insertion) o cancellazioni (deletion): questi infatti sono la causa della maggior parte dei falsi positivi rilevati da questi algoritmi. Altra causa sono gli errori compiuti nella preparazione delle sequenze, dovuti a problemi nell'analisi PCR. La soluzione a questo problema è aumentare la sensibilità degli strumenti nell'analisi iniziale e migliorare i software utilizzati nell'allineamento, nonché avere un database di confronto di notevoli dimensioni, così da avere a disposizione un set per il confronto più ampio. Con i passaggi precedenti viene generata una lista di migliaia di potenziali differenze tra il genoma in corso di studio e quello di riferimento. Il passaggio successivo è quindi quello di determinare quali di queste variazioni, non dovute ad errori di sequenziamento, contribuiscono al problema in corso di studio, quali cioè siano legate in qualche modo al fenomeno, eliminando tutte quelle che, secondo studi pregressi, oppure secondo euristiche, si stima non siano collegate all'oggetto in esame, riducendo quindi la quantità di materiale da analizzare. Oltre al filtraggio, l'annotazione fornisce un altro strumento per selezionare e restringere il campione in esame, effettuando ricerche su studi precedenti, oppure applicando modelli degli effetti funzionali predetti.

L'efficacia e il basso costo di questi strumenti sta portando alla scoperta di un numero di variazioni genetiche sempre più ampio, dando la possibilità di identificare le cause delle varie malattie.

Piattaforme NGS

Tra le piattaforme HT (High Throughput) troviamo 454 Genome Sequencer FLX di Roche, Genome Analyzer di Illumina e SOLiD di Applied Biosystem.

La tecnologia 454 è stata la prima ad essere messa in commercio nel 2005. È basata sul rilevamento dei gruppi pirofosfato rilasciati dall'incorporazione di ogni nuovo nucleotide durante la sintesi del filamento complementare a quello da sequenziare. Il DNA a singolo filamento è legato a microparticelle (beads) ed è amplificato attraverso una PCR in emulsione, consentendo la creazione di moltissime microcelle di PCR in soluzione acquosa separate da olio. Il DNA legato alle beads e preamplificato viene trasferito in pozzetti di una piastra con fibre ottiche e gli enzimi necessari per produrre luce in presenza di ATP. La chemiluminescenza è generata quando i nucleotidi si legano alla base complementare e rilasciano il gruppo pirofosfato. Aggiungendo i

quattro nucleotidi uno alla volta in sequenza (A, C, G, T) è possibile ricostruire la sequenza fino a 250-400 nucleotidi.

La seconda metodica considerata è basata sull'amplificazione del DNA in presenza di nucleotidi fluorescenti modificati al 3' in modo da poter essere aggiunti solo uno alla volta, ma, a differenza dei didesossinucleotidi impiegati nel metodo di Sanger, la modificazione al 3' è reversibile e, pertanto, è possibile ripetere il ciclo di sintesi e incorporare il nucleotide successivo (reverse termination). Anche in questo caso i frammenti di DNA da sequenziare vengono preamplificati, ma non in fase liquida (emulsione) come per il pirosequenziamento, bensì in situ, ancorati a un supporto solido. I nucleotidi sono marcati con diversi fluorocromi, vengono aggiunti tutti insieme e dopo la lettura del chip, vengono rimossi insieme al gruppo di protezione del 3'. La lunghezza delle sequenze è intorno ai 100 nucleotidi.

Il sistema SOLiD differisce dalle altre due piattaforme perché si basa sul sequenziamento per ligazione. Dopo una preamplificazione con PCR in emulsione, non vengono aggiunti sequenzialmente nucleotidi grazie alla DNA polimerasi, ma la sequenza viene ricostituita grazie all'ibridazione specifica di primer con tutte le possibili combinazioni di due nucleotidi.

Tutte e tre le principali tecniche di sequenziamento HT si basano sull'utilizzo della PCR per aumentare i segnali di fluorescenza, ma potenzialmente fonte di errori per una non corretta incorporazione di nucleotidi. La nuova frontiera del sequenziamento degli acidi nucleici è quindi il "single molecule sequencing", basato sullo sviluppo di tecnologie più sensibili in grado di riconoscere un solo fotone e dall'impiego di nanotecnologie capaci di riconoscere fisicamente i singoli nucleotidi. Le principali protagoniste di questa nuova fase, battezzata third-generation sequencing, sono Pacific Biosciences, Life Technologies, Oxford Nanopore e Ion Torrent. Le prime due utilizzano DNA polimerasi e nucleotidi marcati e producono reads molto lunghe (1000-1500 basi) in tempi brevi (15-20 minuti per corsa). Inoltre, entrambe le aziende hanno sviluppato un sistema che consente alla polimerasi di non venire danneggiata dalla continua stimolazione luminosa del laser di eccitazione, come invece accade per le tecnologie di seconda generazione. Oxford Nanopore e Ion Torrent sono più innovative: nessuna delle due tecnologie fa uso di nucleotidi marcati e di costosi

sistemi di rilevazione ottica, il che le rende molto più economiche. Nel primo caso il sequenziamento avviene ad opera di una esonucleasi che stacca dalla molecola di DNA una singola base, la quale, entrando in un nanoporo, va a disturbare la corrente elettrica che lo attraversa, in un modo caratteristico della specifica base azotata. Ion Torrent prevede l'amplificazione clonale del campione attraverso Emulsion PCR, ma il processo di sequenziamento presenta due aspetti essenziali che lo caratterizzano rispetto alle altre tecnologie: l'utilizzo dei semiconduttori come elemento strutturale dei supporti in cui viene dispensato il campione per il sequenziamento (Ion Chips) e l'impiego di un sistema di rilevamento non basato su reazioni luminescenti ma su variazioni di potenziale. Nucleo centrale dell'intero sistema di sequenziamento è l'Ion Chip. Esso è costituito da uno strato superficiale superiore, in cui sono ricavati dei pozzetti appositamente strutturati per poter accogliere le beads e i reagenti per il sequenziamento. Ciascun pozzetto ha diametro di pochi micron, tale che in esso possa trovare spazio una sola biglia. Questo primo strato superficiale poggia su un secondo costituito da semiconduttori, che permette la trasmissione dei segnali allo strato ancora sottostante. Quest'ultimo è strutturato come una piastra di sensori, uno corrispondente a ciascun pozzetto, che hanno la capacità di registrare le piccolissime variazioni di pH che avvengono all'interno del pozzetto durante il sequenziamento, trasformandole in differenze di potenziale, ovvero, in dati digitali.

Il processo di sequenziamento è simile a quelli precedentemente descritti, caratterizzato da un susseguirsi ciclico sulla superficie del chip di lavaggi e flussi (flows) di soluzioni, contenenti ciascuno dei quattro diversi nucleotidi. In questo modo, quando viene dispensato il nucleotide complementare alla prima base libera sul frammento stampo, esso è incorporato alla sequenza nascente. Poiché la bead su cui è avvenuta l'amplificazione clonale presenta sulla propria superficie frammenti tutti uguali, il legame della nuova base si verifica contemporaneamente su migliaia di frammenti. La formazione di ogni nuovo legame fosfodiesterico determina l'idrolisi del gruppo trifosfato del nucleotide entrante con la liberazione netta di un protone (H). Il rilascio dei protoni causa l'abbassamento del pH della soluzione presente all'interno del pozzetto; questa variazione viene trasmessa e registrata dal sensore sottostante e digitalizzata. Durante ciascun flow, la variazione di pH registrata è direttamente proporzionale al numero delle basi incorporate nella sequenza nascente, e, nel

momento in cui la sequenza stampo presenta una zona omopolimerica, l'intensità della variazione di potenziale registrata è tanto superiore quante più sono le basi identiche consecutive. Questo dato viene rappresentato attraverso uno grafico definito Ionogramma in cui è visualizzato il numero delle basi incorporate rispetto ai flows eseguiti dalla macchina. Il vantaggio offerto da questo sistema consiste nella possibilità di introduzione multipla di basi nella sequenza nascente. Tuttavia, all'aumentare del numero delle basi identiche consecutive, il sistema Ion Torrent mostra una diminuzione di accuratezza nella chiamata delle basi stesse.

È stato in precedenza indicato come la variazione del pH, conseguente all'inserimento di nuovi nucleotidi, venga misurata dai sensori posizionati al di sotto dei pozzetti, convertita in differenza di potenziale ed espressa come un dato digitale. Il processo totale di generazione e misura del segnale (da quando viene riversata la soluzione contenente il nucleotide sulla superficie del Chip fino alla avvenuta misura del pH) dura poco più di 4 s. Successivamente, attraverso il fluire di una soluzione di lavaggio, necessaria per eliminare dai pozzetti i reagenti già utilizzati, il Chip viene preparato per un successivo flow che produce l'incorporazione del successivo nucleotide. Questo processo viene ripetuto ciclicamente per 500 volte consentendo la lettura di reads lunghe circa 200bp. A differenza delle tecnologie che sfruttano i segnali di fluorescenza, il sistema Ion Torrent non prevede le reazioni chimiche necessarie per la eliminazione dei gruppi fluorofori legati ai nucleotidi e ciò favorisce la rapidità del processo di sequenziamento che caratterizza questa tecnologia.

Applicazioni della tecnologia NGS nella diagnostica molecolare

L'avvento della tecnologia NGS ha aperto importanti prospettive nella diagnostica molecolare e rappresenta un potente mezzo per l'analisi simultanea di un gran numero di regioni codificanti. L'applicazione di questa tecnica nella analisi molecolare di malattie dovute a grossi geni e di malattie caratterizzate da eterogeneità genetica riduce notevolmente i lunghi tempi di analisi, soprattutto in quei casi in cui non si hanno abbastanza informazioni cliniche.

5. Risultati

5.1 Suddivisione dei pazienti

Da marzo 2015 a marzo 2020 la valutazione della firma interferonica è stata effettuata in 250 pazienti. Sulla base dei criteri di esclusione (mancanza di dati al follow-up, incompletezza di dati clinici e laboratoristici) sono stati eliminati dallo studio 33 pazienti.

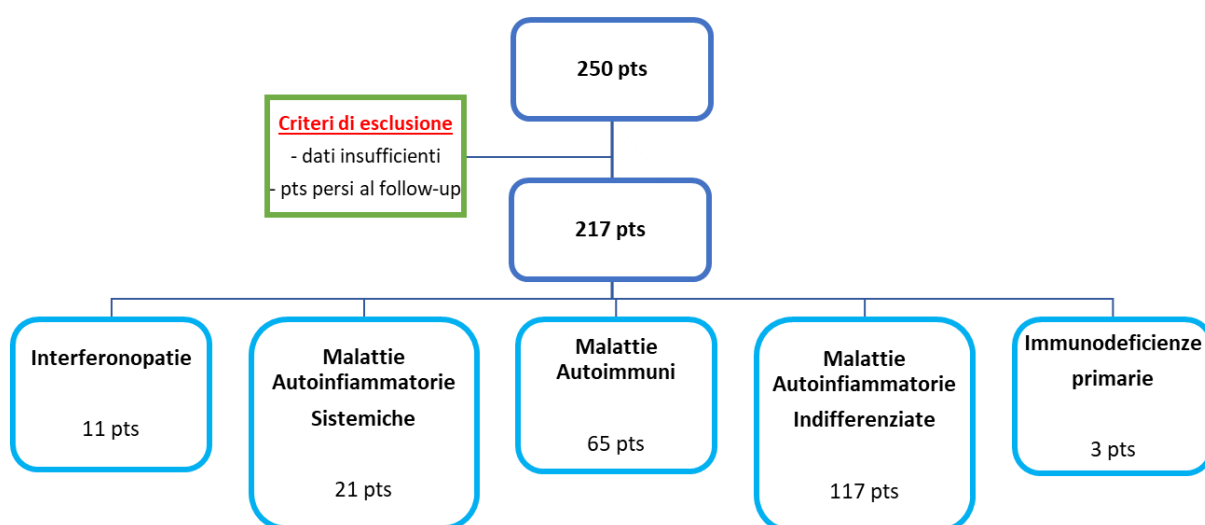
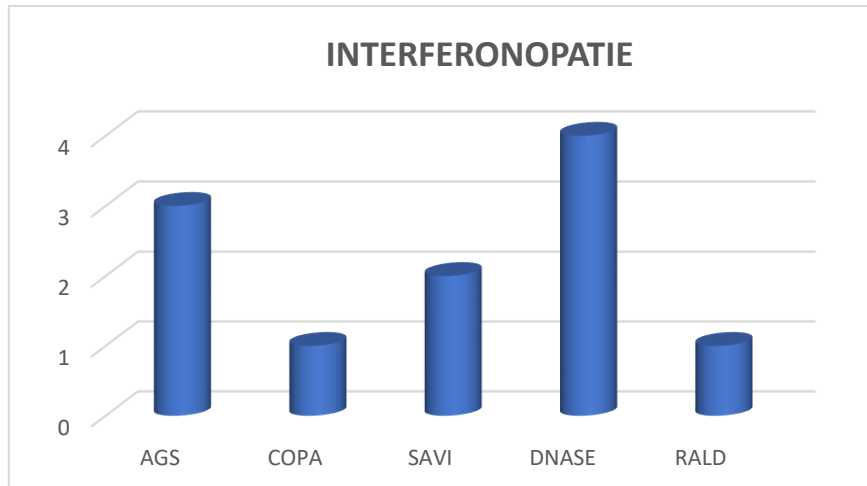


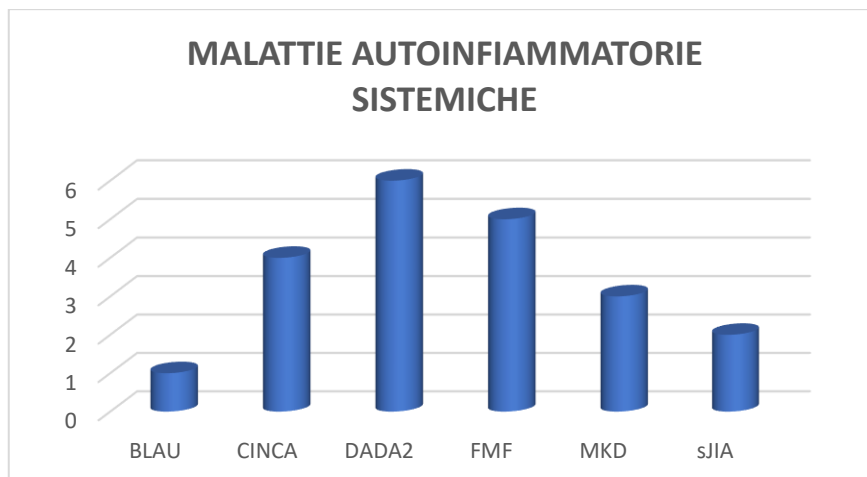
Figura 5. Suddivisione dei pazienti partecipanti allo studio

I soggetti rimasti sono stati così suddivisi nelle categorie diagnostiche precedentemente individuate:

- 11 pazienti hanno ricevuto una diagnosi genetica di interferonopatia (3 sindrome Aicardi-Goutières; 1 sindrome COPA; 2 sindrome SAVI; 4 deficit di DNASE; 1 sindrome RALD);

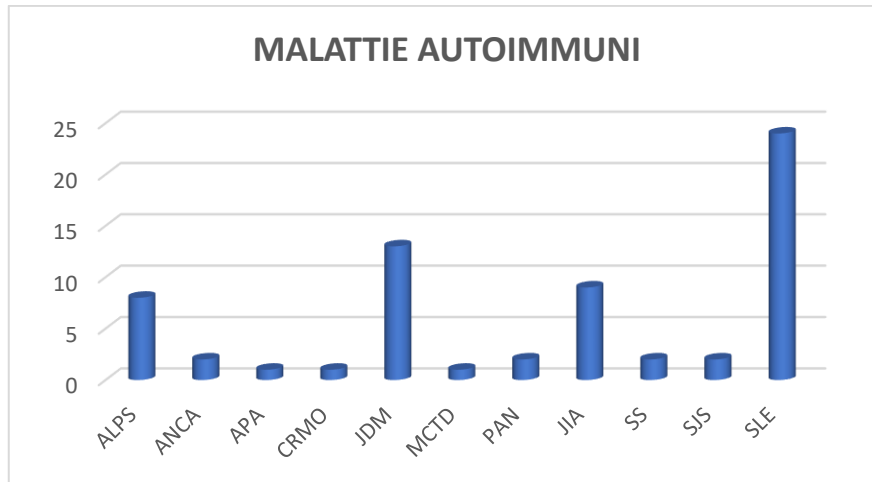


- 21 pazienti avevano già ricevuto una diagnosi molecolare e clinica di malattia autoinfiammatoria monogenica o artrite idiopatica giovanile sistemica (1 sindrome Blau; 4 sindrome legata alla famiglia NLRP3; 6 deficit di adenosina deaminasi 2; 5 febbre mediterranea familiare; 3 deficit di mevalonato chinasi; 2 artrite idiopatica giovanile sistemica). Questa categoria è stata utilizzata come gruppo di controllo, sia per l'analisi delle manifestazioni cliniche sia per l'esame della firma interferonica;

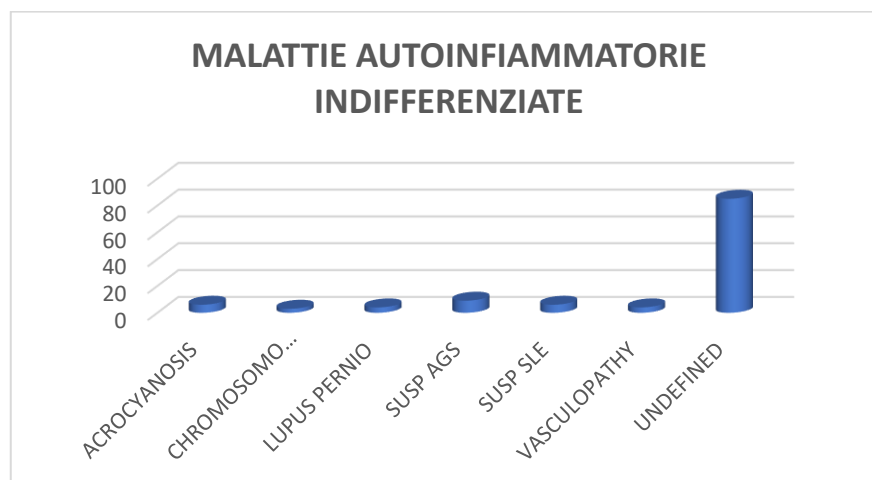


- 65 pazienti sono stati classificati come affetti da malattia autoimmune (24 lupus eritematoso sistemico; 13 dermatomiosite giovanile; 9 artrite idiopatica giovanile oligoarticolare o poliarticolare; 8 sindrome autoimmune linfoproliferativa; 2 vasculite ANCA-associata; 2 poliarterite nodosa; 2

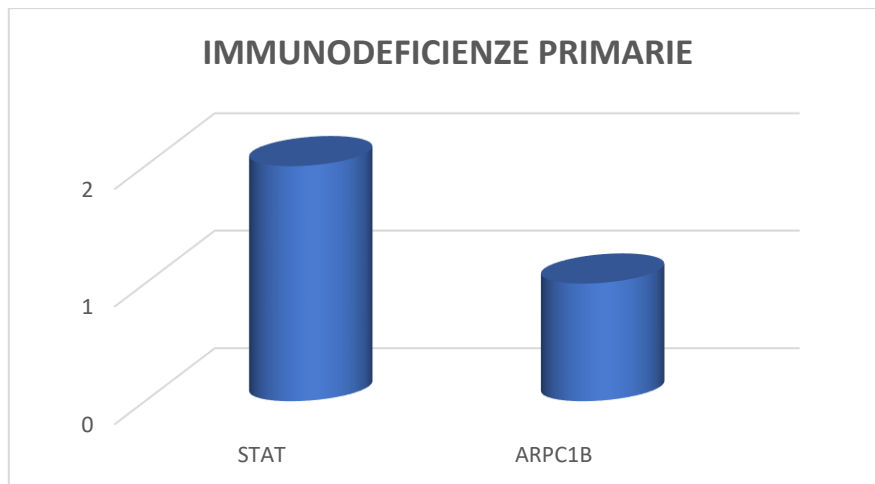
sclerosi sistemica; 2 sindrome di Sjogren; 1 sindrome antifosfolipidi; 1 osteomielite cronica ricorrente multifocale; 1 malattia mista del tessuto connettivo);



- 117 pazienti presentavano un quadro infiammatorio cronico o subcronico compatibile con una forma autoinfiammatoria, ma non hanno ricevuto una diagnosi definitiva (malattia autoinfiammatoria indifferenziata, UND). All'interno di questa categoria 85 sono stati classificati come *undefined*; 6 manifestavano acrocianosi e fenomeno di Raynaud, 4 lupus pernio, 4 vasculopatia; 9 soggetti destavano sospetto di sindrome di Aicardi-Goutières e 6 di lupus eritematoso sistemico. Infine, sono stati inseriti in questo gruppo anche 3 soggetti affetti da cromosomopia presentanti sintomi reumatologici caratteristici;



- 3 pazienti hanno ricevuto una diagnosi genetica di immunodeficienza primaria (2 mutazione del gene STAT1 - *Signal Transducer and Activator of Transcription* del tipo *Gain Of Function*; 1 mutazione del gene ARPC1B – *Actin Related Protein 2/3 Complex Subunit 1B*).



5.2 Analisi demografica

Per l'analisi demografica sono stati presi in considerazione il genere, l'età di esordio e l'etnia.

La distribuzione per genere è illustrata nella Figura 6. Il sesso femminile risulta essere prevalente in modo sovrapponibile in tutte le categorie da noi individuate: interferonopatie 64%, malattie autoinfiammatorie sistemiche 57%, malattie autoimmuni 69%, malattie autoinfiammatorie indifferenziate 65%. L'unica eccezione è rappresentata dal gruppo delle immunodeficienze primarie, in cui si ha una netta prevalenza del sesso maschile (100%), tuttavia, dato il numero ridotto dei pazienti (N=3) e la modalità non legata all'X di trasmissione delle immunodeficienze analizzate, possiamo con sicurezza ritenere questa prevalenza casuale. Andando ad analizzare più nel dettaglio la categoria delle malattie autoimmuni, è possibile evidenziare come queste abbiano una distribuzione del genere più eterogenea: nel caso del lupus eritematoso sistemico, dell'artrite idiopatica giovanile e della sindrome linfoproliferativa autoimmune è netta la prevalenza del sesso femminile,

rispettivamente 79%, 89% e 75%, mentre, al contrario, nel caso della dermatomiosite giovanile sono più frequentemente affetti i soggetti di sesso maschile (62%) (Figura 7).

I dati riguardanti l'età di esordio sono riportati nella Tabella 4. L'età di esordio di malattia si concentra prevalentemente nella prima infanzia (prima dei due anni) nella maggior parte dei pazienti affetti da interferonopatie (1,42), malattie autoinfiammatorie monogeniche e multifattoriali (2,0) e immunodeficienze primarie (0,16), come ci si aspetterebbe, essendo queste malattie geneticamente determinate. È più tardivo, invece, l'esordio di malattia nel caso delle malattie autoimmuni (8,81) e delle forme indifferenziate (4,81).

I soggetti partecipanti allo studio sono prevalentemente di razza caucasica, per la maggior parte europei. Solo una piccola minoranza appartiene alla razza africana, ispanica o asiatica. Non si evidenziano discrepanze tra le cinque categorie (Tabella 5).

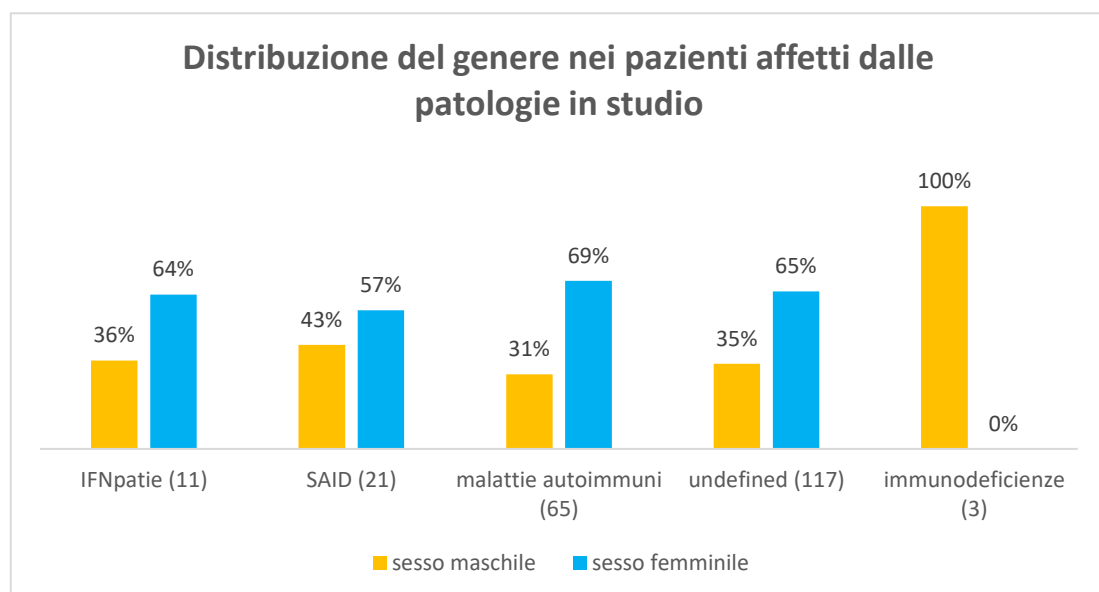


Figura 6. Distribuzione del genere nei pazienti affetti dalle patologie in studio. *IFNpatie* Interferonopatie, *SAID* Malattie Autoinfiammatorie Sistemiche, *undefined* Malattie Autoinfiammatorie Indifferenziate

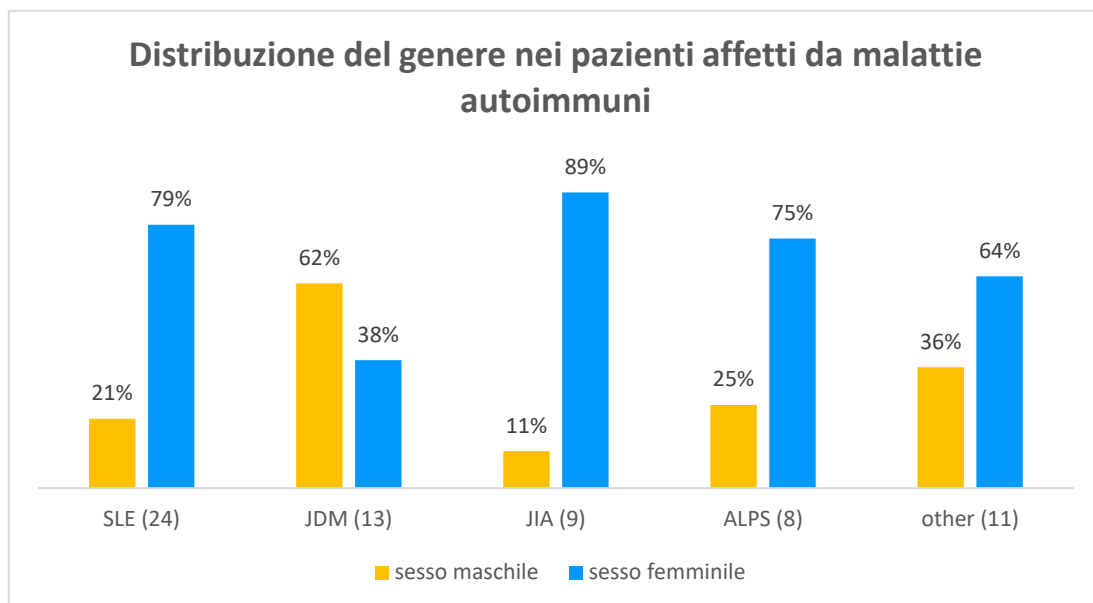


Figura 7. Distribuzione del genere nei pazienti affetti da malattie autoimmuni. *SLE* Lupus Eritematoso Sistemico, *JDM* Dermatomiosite Giovanile, *JIA* Artrite Idiopatica Giovanile, *ALPS* Sindrome Linfoproliferativa Autoimmune, *other* altre malattie autoimmuni

Categoria diagnostica	N° pts	Età di esordio (mediana)	Intervallo età di esordio
IFNpatie	11	1,42	0,3-7,6 a
SAID	21	2,0	0,1-11,3 a
mal. AI	65	8,81	0,7-16,2 a
undefined	117	4,81	0,1-26,0 a
immunodeficienze	3	0,16	0,1-14,0 a

Tabella 4. Distribuzione dell'età di esordio

Categoria diagnostica	African.	Cauc. eur	Cauc. afr	Cauc. middle	Asiat.	Ispan.	Mixed	Not know
IFNpatie	1	10	0	0	0	0	0	0
SAID	1	20	0	0	0	0	0	0
mal. AI	0	60	1	1	1	2	0	0
undefined	3	99	2	3	2	0	1	7
immunodeficienze	0	3	0	0	0	0	0	0

Tabella 5. Distribuzione dell'etnia

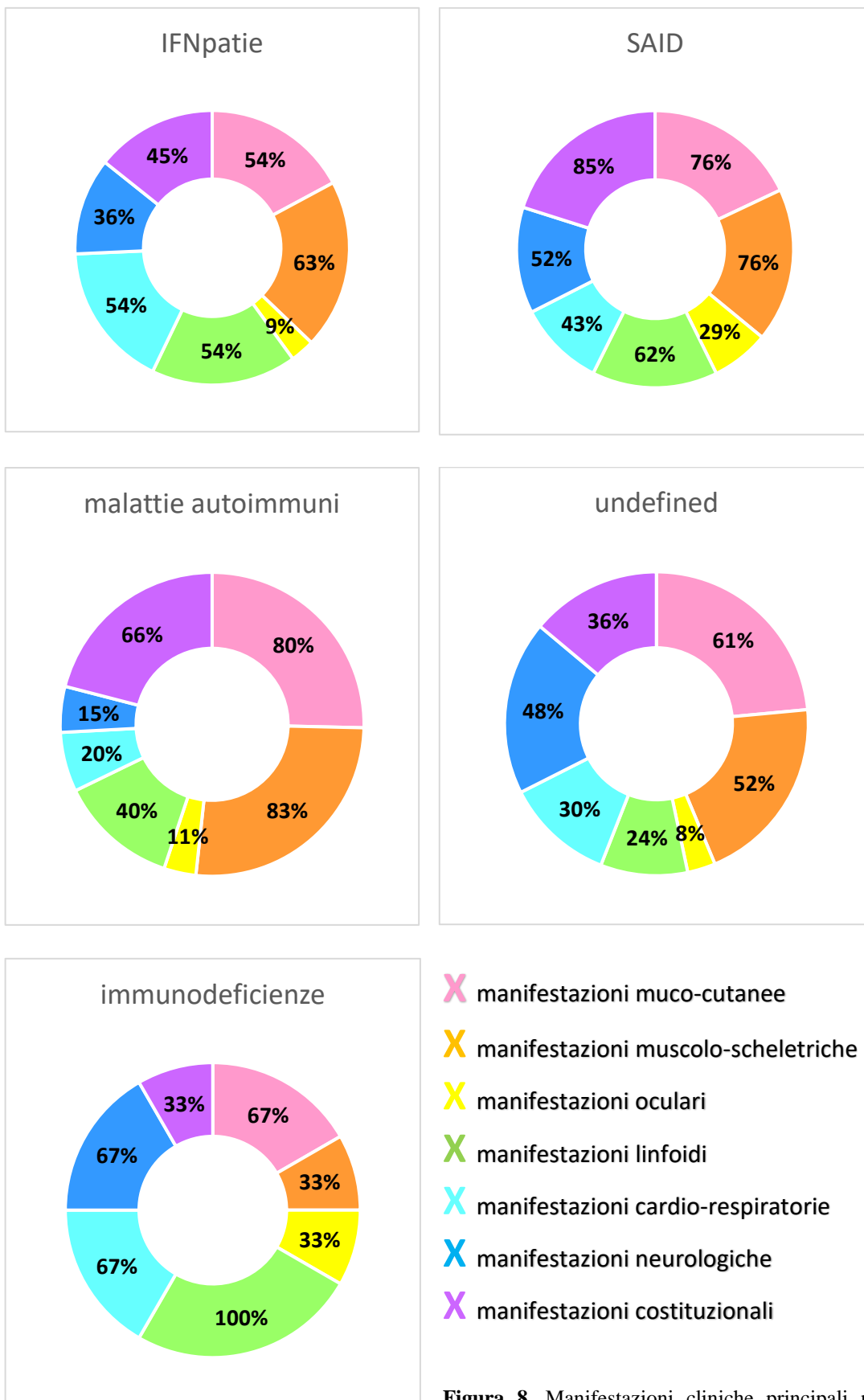
5.3 Manifestazioni cliniche

È stata valutata la diversa espressione fenotipica nelle cinque categorie diagnostiche; in particolare sono state osservate le manifestazioni muco-cutanee, muscolo-scheletriche, oculari, del sistema linfoide, cardio-respiratorie, neurologiche e costituzionali. I dati sono riportati nella Tabella 6 e nella Figura 8; accanto alla prevalenza espressa in numero assoluto, è rappresentata la percentuale dei pazienti coinvolta dalle manifestazioni in questione.

Nel gruppo delle interferonopatie sono state osservate prevalentemente manifestazioni muscolo-scheletriche (63%), muco-cutanee, linfoidi e cardio-polmonari (54%). Nella categoria delle malattie autoinfiammatorie monogeniche, come atteso, gli episodi febbrili sono i più frequenti (85%), accompagnati da manifestazioni muco-cutanee e muscolo-scheletriche (76%). Nel gruppo delle malattie autoimmuni ritroviamo soprattutto manifestazioni muco-cutanee (80%) e muscolo-scheletriche (83%). Nelle forme indifferenziate la presentazione fenotipica è più eterogenea: oltre ai segni e sintomi di interessamento muco-cutaneo (61%) e muscolo-scheletrico (52%), si è manifestata più volte la componente neurologica (48%). Infine, nella categoria delle immunodeficienze primarie tutti i pazienti hanno presentato manifestazioni legate al sistema linfatico (100%), accompagnate da una componente muco-cutanea, cardio-respiratoria e neurologica (67%).

Categoria diagnostica	N° pts	Muco-cutanee	Muscolo-schelet.	Oculari	Linfoidi	Cardio-resp.	Neurol.	Costituz.
IFNpatie	11	6 (54%)	7 (63%)	1 (9%)	6 (54%)	6 (54%)	4 (36%)	5 (45%)
SAID	21	16 (76%)	16 (76%)	6 (29%)	13 (62%)	9 (43%)	11 (52%)	18 (85%)
mal. AI	65	52 (80%)	54 (83%)	7 (11%)	26 (40%)	13 (20%)	10 (15%)	43 (66%)
undefined	117	71 (61%)	61 (52%)	9 (8%)	28 (24%)	35 (30%)	56 (48%)	42 (36%)
immunodeficienze	3	2 (67%)	1 (33%)	1 (33%)	3 (100%)	2 (67%)	2 (67%)	1 (33%)

Tabella 6. Manifestazioni cliniche principali nei pazienti affetti dalle patologie in studio



pazienti affetti dalle patologie in studio

Figura 8. Manifestazioni cliniche principali nei

Andando ad analizzare nel dettaglio segni e sintomi manifestati dai pazienti in studio, è stato possibile individuare alcune discrepanze tra le varie categorie diagnostiche.

In particolare, la classe di interferonopatie, oltre a presentare sintomi comuni anche agli altri gruppi, quali febbre, rash, epatosplenomegalia e artrite poliarticolare, si distingue per la presenza di sintomi atipici rispetto alle altre quattro categorie.

Prendendo in considerazione la sfera muco-cutanea, le lesioni ulcerative (18%), l'onicodistrofia (9%) e la lipodistrofia (9%) sono risultate manifestazioni quasi esclusive di questa classe, in quanto la percentuale di presentazione negli altri soggetti non supera mai il 2-3%, con eccezione per le malattie autoinfiammatorie monogeniche in cui 2 pazienti hanno presentato lesioni ulcerative (10%).

Tra le manifestazioni neurologiche sono risultate caratteristiche la spasticità e la presenza di calcificazioni cerebrali (27%); nelle altre categorie solo una piccola minoranza ha presentato questi sintomi.

Altra manifestazione peculiare è rappresentata dalla fibrosi polmonare (27%); risulta, invece, molto rara nelle altre classi (malattie autoinfiammatorie monogeniche 5%; malattie autoimmuni 6%; forme indifferenziate 4%).

Infine, come già detto, mentre tutte le categorie analizzate hanno manifestato molto frequentemente artrite poliarticolare, solo i pazienti sospetti di interferonopatia hanno sviluppato contratture articolari in flessione (36%) e deformità ossee (27%), con significativa discrepanza rispetto agli altri soggetti.

I dati sono riportati nella Tabella 7; accanto alla prevalenza espressa in numero assoluto, è rappresentata la percentuale dei pazienti che ha sviluppato le manifestazioni in questione.

<i>Segni e Sintomi</i>	<i>IFNpatie</i>	<i>SAID</i>	<i>mal. AI</i>	<i>undefined</i>	<i>immunodef.</i>
Febbre	3 (27%)	13 (62%)	21 (32%)	56 (48%)	3 (100%)
Epatosplenomegalia	6 (55%)	13 (62%)	25 (38%)	28 (24%)	3 (100%)
Rash	6 (55%)	16 (76%)	50 (77%)	70 (60%)	2 (67%)
Lesioni ulcerative	2 (18%)	2 (10%)	1 (2%)	2 (2%)	0 (0%)
Onicodistrofia	1 (9%)	0 (0%)	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)
Acrocianosi/Raynaud/chilblain	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)	15 (13%)	0 (0%)
Livedo reticularis	0 (0%)	5 (24%)	1 (2%)	5 (4%)	0 (0%)
Spasticità e calcificazioni	3 (27%)	1 (5%)	1 (2%)	8 (7%)	0 (0%)
Stroke	0 (0%)	3 (14%)	0 (0%)	4 (3%)	0 (0%)
Ritardo mentale	2 (18%)	1 (5%)	0 (0%)	19 (16%)	0 (0%)
Convulsioni	1 (9%)	1 (5%)	2 (3%)	16 (14%)	0 (0%)
Glaucoma	1 (9%)	6 (29%)	7 (11%)	9 (8%)	1 (33%)
Episclerite	0 (0%)	6 (29%)	6 (9%)	9 (8%)	1 (33%)
Congiuntivite	3 (27%)	10 (48%)	16 (25%)	27 (23%)	2 (67%)
Contratture in flessione	4 (36%)	1 (5%)	3 (5%)	3 (3%)	0 (0%)
Artrite poliarticolare	6 (55%)	16 (76%)	52 (80%)	58 (50%)	1 (33%)
Deformità ossee	3 (27%)	3 (14%)	3 (5%)	7 (6%)	0 (0%)
Fibrosi polmonare	3 (27%)	1 (5%)	4 (6%)	5 (4%)	1 (33%)
Lipodistrofia	1 (9%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (3%)	0 (0%)

Tabella 7. Segni e sintomi peculiari nei pazienti affetti dalle patologie in studio

5.4 Analisi dell'Interferon Score

In tutti i pazienti reclutati nello studio è stata eseguita l'analisi della firma interferonica (Tabella 8 e Figura 9).

Come atteso, l'esame è risultato positivo nella maggior parte dei pazienti con interferonopatia (82%). Al contrario, nelle categorie di pazienti affetti da malattie autoinfiammatorie monogeniche e multifattoriali, malattie reumatologiche pediatriche autoimmuni e forme autoinfiammatorie indifferenziate il test è risultato positivo in una percentuale minore di casi, rispettivamente 48% e 40%. È interessante notare i dati riguardanti i soggetti affetti da malattie autoimmuni: il 62% di questi ha presentato un esito positivo dell'esame. Non sorprende, invece, il fatto che tutti i casi di immunodeficienza primaria da noi analizzati siano risultati positivi (100%), in quanto presentanti mutazioni dei geni STAT1 e ARPC1B, entrambi coinvolti indirettamente nella via di attivazione dell'interferone di tipo I.

<i>Categoria diagnostica</i>	<i>N° pts</i>	<i>Positivi</i>	<i>Negativi</i>	<i>% positivi</i>	<i>% negativi</i>
IFNpatie	11	9	11	82%	18%
SAID	21	10	11	48%	52%
mal. AI	65	40	25	62%	38%
undefined	117	47	70	40%	60%
immunodeficienze	3	3	0	100%	0%

Tabella 8. Distribuzione esiti Interferon Score

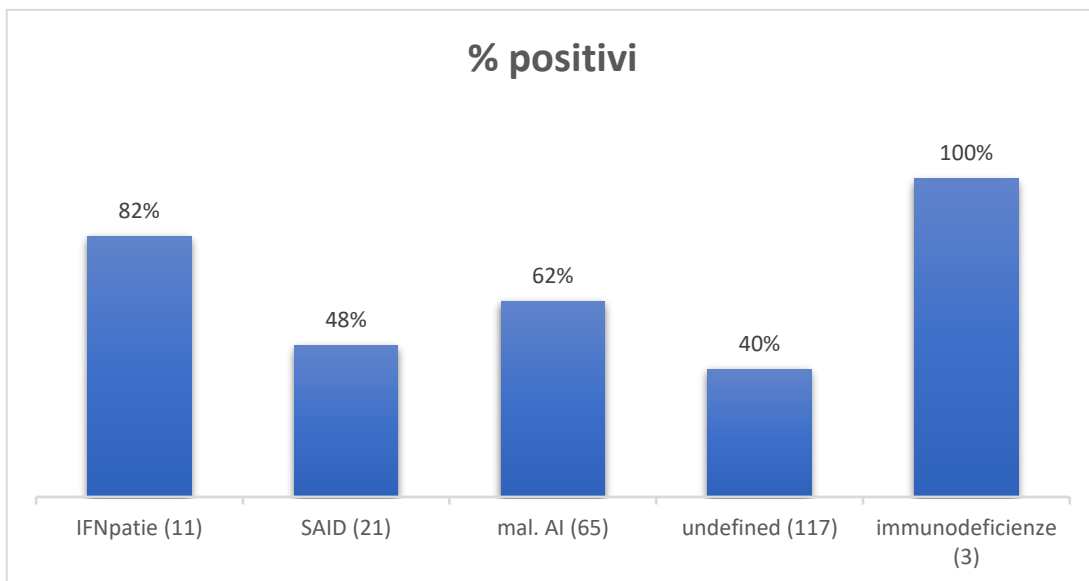


Figura 9. Percentuale dei soggetti risultati positivi all'Interferon Score

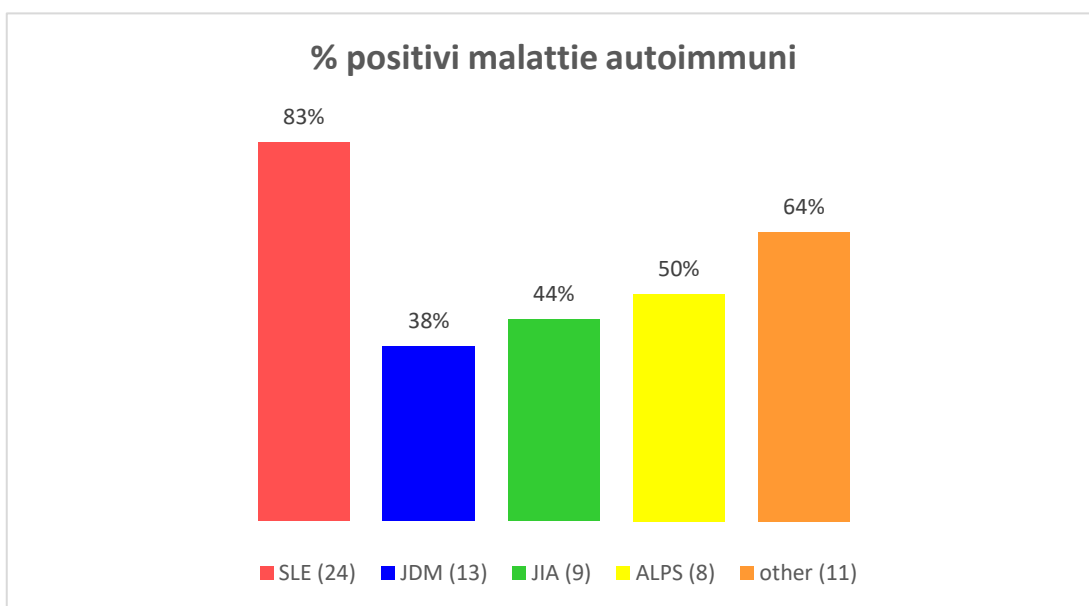


Figura 10. Percentuale dei soggetti affetti da malattie autoimmuni positivi all'Interferon Score

Andando ad approfondire i dati riguardanti la classe delle malattie autoimmuni (Figura 10), essendo una categoria molto eterogenea, i soggetti affetti da LES e da dermatomiosite giovanile, che rappresentano la fetta più cospicua, risultano positivi all'Interferon Score rispettivamente per l'83% e il 38%. Mentre i soggetti affetti da artrite idiopatica giovanile e ALPS hanno dato risultato positivo nel 44% e 50% dei casi; dei pazienti restanti 7 hanno mostrato un Interferon Score positivo (64%).

La firma interferonica, oltre ad essere un esame di tipo qualitativo (positivo/negativo), è anche un esame di tipo quantitativo: il valore di cut-off è 0,8, che rappresenta la mediana più due deviazioni standard. Abbiamo quindi analizzato anche la distribuzione dei valori di Interferon Score dei singoli soggetti. Nella Figura 11 è riportato il grafico che rappresenta i valori di espressione dei sei geni indotti dall'interferone da noi considerati per l'esecuzione dell'esame (*IFI27*, *IFI44L*, *IFIT1*, *SIGLEC*, *ISG15*, *RSAD2*); viene rappresentato anche il confronto con i valori dei 19 donatori sani (*HD – Healthy Donors*).

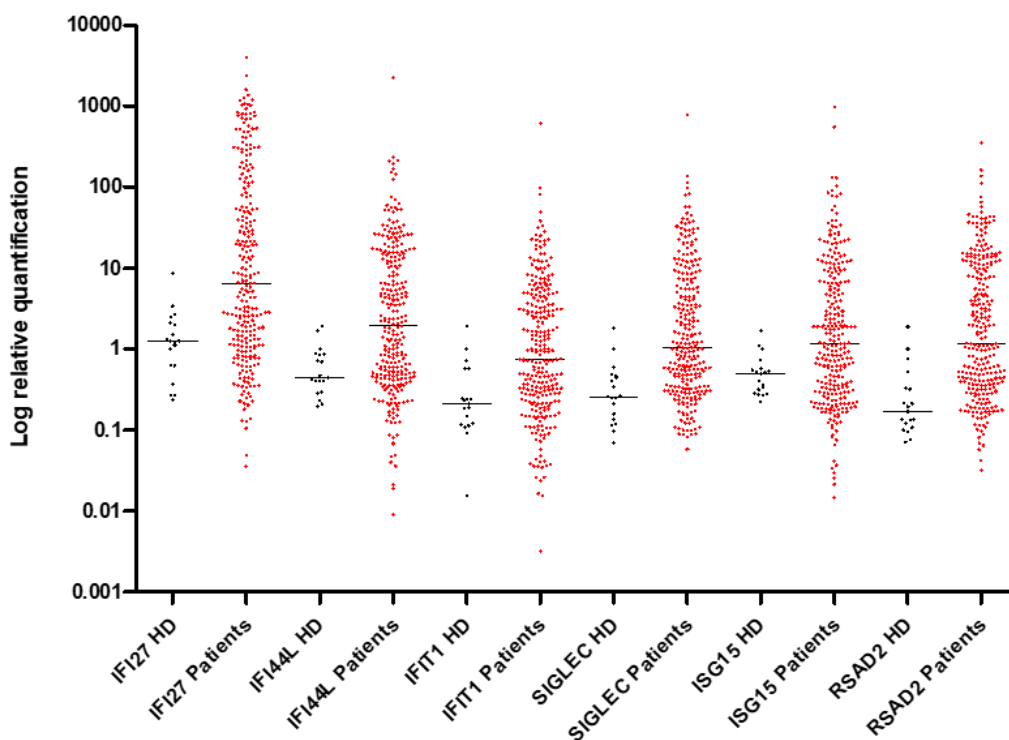


Figura 11. Distribuzione dei valori di espressione dei sei geni indotti dall'interferone nei pazienti reclutati nello studio

Nella Figura 12 è invece riportata la distribuzione dei valori di Interferon Score, calcolato come la mediana della quantificazione relativa dei sei geni analizzati rispetto ad un gruppo di controllo sano.

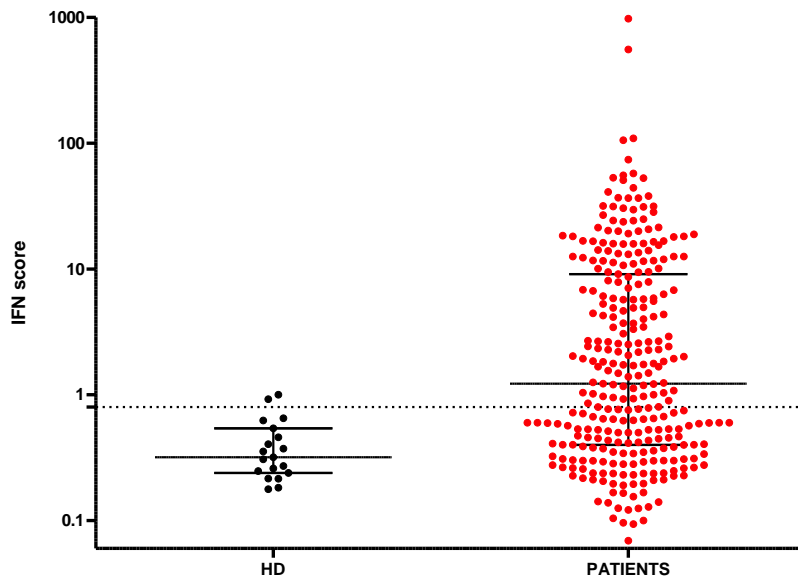


Figura 12. Distribuzione dei valori di Interferon Score nei pazienti reclutati nello studio

Successivamente è stata analizzata la distribuzione dei valori di Interferon Score di tutti i pazienti suddivisi per categoria diagnostica. Come si può notare dalla Figura 13, i soggetti affetti da interferonopatia presentano una distribuzione piuttosto omogenea dei valori di Interferon Score, rispetto alle altre categorie: hanno riportato per la maggior parte un valore positivo e ben al di sopra del valore di cut-off. Unica eccezione è rappresentata dai 3 pazienti con immunodeficit da mutazioni di geni coinvolti nella via dell'interferone.

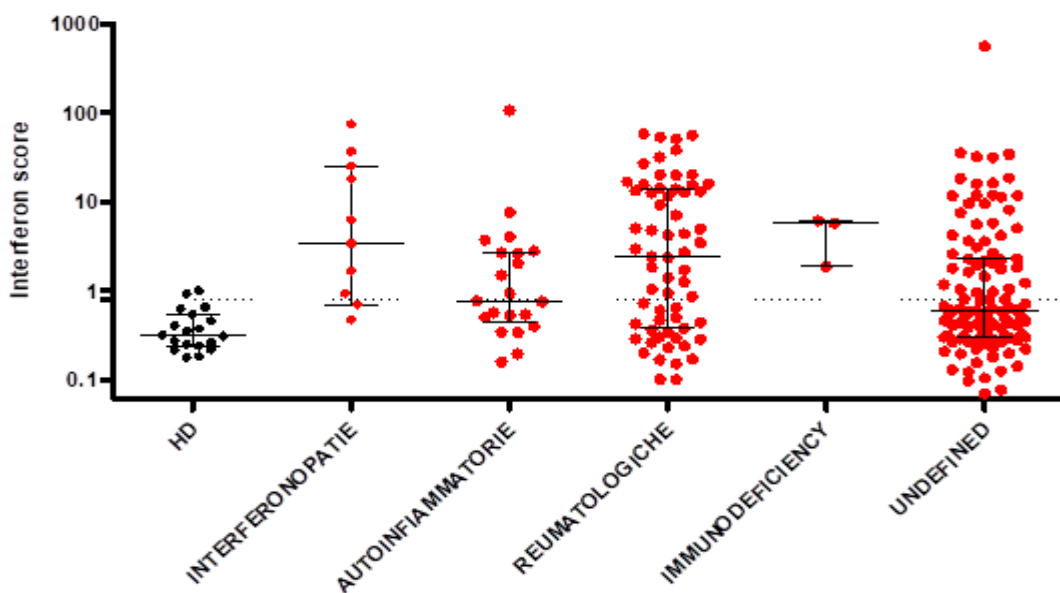


Figura 13. Distribuzione dei valori di Interferon Score per categoria diagnostica

Nelle figure successive vengono riportate nel dettaglio le distribuzioni dei valori della firma interferonica per singola categoria diagnostica, con i relativi sottogruppi di diagnosi.

Interferonopatie

In generale i pazienti affetti da interferonopatia sono risultati per la maggior parte positivi al test. In particolare, i casi di sindrome COPA, SAVI, RALD hanno riportato un valore fortemente positivo (>10). I soggetti affetti da sindrome di Aicardi-Goutières, tutti positivi, hanno riportato invece valori più bassi (<10); i casi di deficit di DNase hanno un andamento più eterogeneo, che probabilmente riflette l'attività di malattia al momento del prelievo: infatti, al contrario delle altre interferonopatie, questi pazienti sembrano risentire maggiormente della terapia di fondo nell'attivazione della via dell'interferone, probabilmente essendo la mutazione coinvolta in una regolazione più a monte della via.

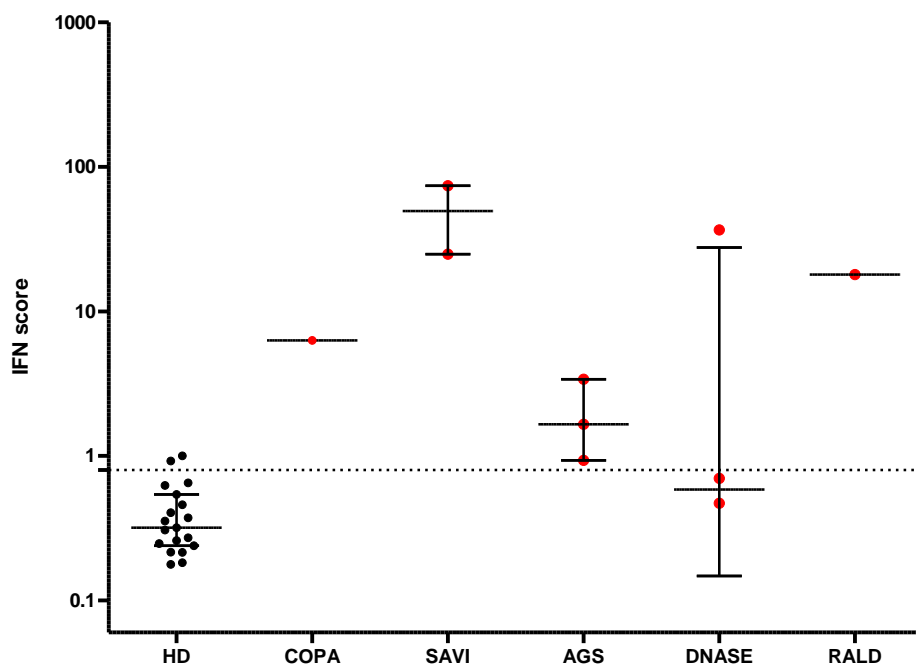


Figura 14. Distribuzione dei valori di Interferon Score nei soggetti affetti da interferonopatia

Malattie autoinfiammatorie sistemiche

I soggetti affetti da malattie autoinfiammatorie sistemiche sono risultati per la maggior parte negativi alla firma interferonica. È possibile però notare che il gruppo dei pazienti

DADA2 (Deficit Adenosina Deaminasi 2) presenta una distribuzione più assimilabile alla classe delle interferonopatie. Quanto in questa patologia ci sia una diretta attivazione e se debbano essere inserite nel gruppo delle interferonopatie è al momento fonte di discussione. Dal punto di vista clinico la presentazione è differente rispetto alle altre interferonopatie, sono infatti assenti i sintomi clinici più caratteristici quali chilblain, interstiziopatia polmonare e sono invece presenti segni specifici non caratteristici quali livedo reticularis, stroke ricorrenti e marcato aumento della PCR.

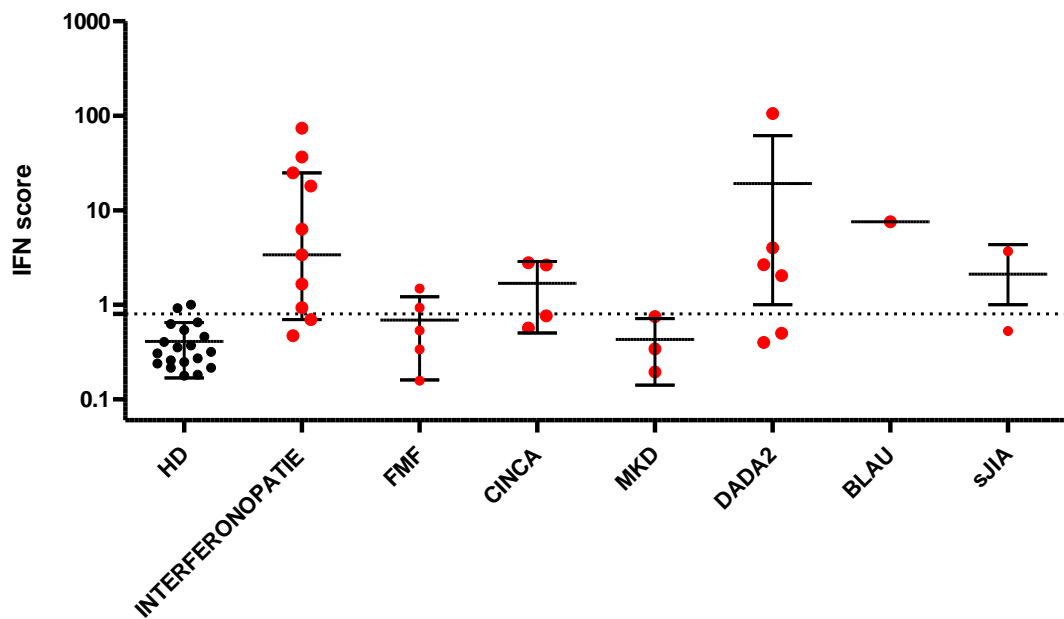


Figura 15. Distribuzione dei valori di Interferon Score nei soggetti affetti da malattie autoinfiammatorie sistemiche

Malattie autoimmuni

La classe delle malattie autoimmuni è risultata positiva in più della metà dei casi. Ogni disturbo presenta però un andamento a sé stante: i soggetti con diagnosi di LES hanno riportato per la maggior parte valori fortemente positivi (>10), con una mediana addirittura superiore a quella delle interferonopatie. Le dermatomiositi giovanili e le artriti idiopatiche giovanili presentano invece una mediana inferiore a 0,8, con però alcuni pazienti francamente positivi. Questo dato suggerisce come, sebbene la presentazione clinica sia compatibile con la diagnosi della rispettiva classe di malattia, questi pazienti potrebbero avere una causa fisiopatologica distinta dal resto del gruppo e potenzialmente potrebbero rispondere a terapie differenti rispetto agli altri pazienti con stessa diagnosi ma senza attivazione della via.

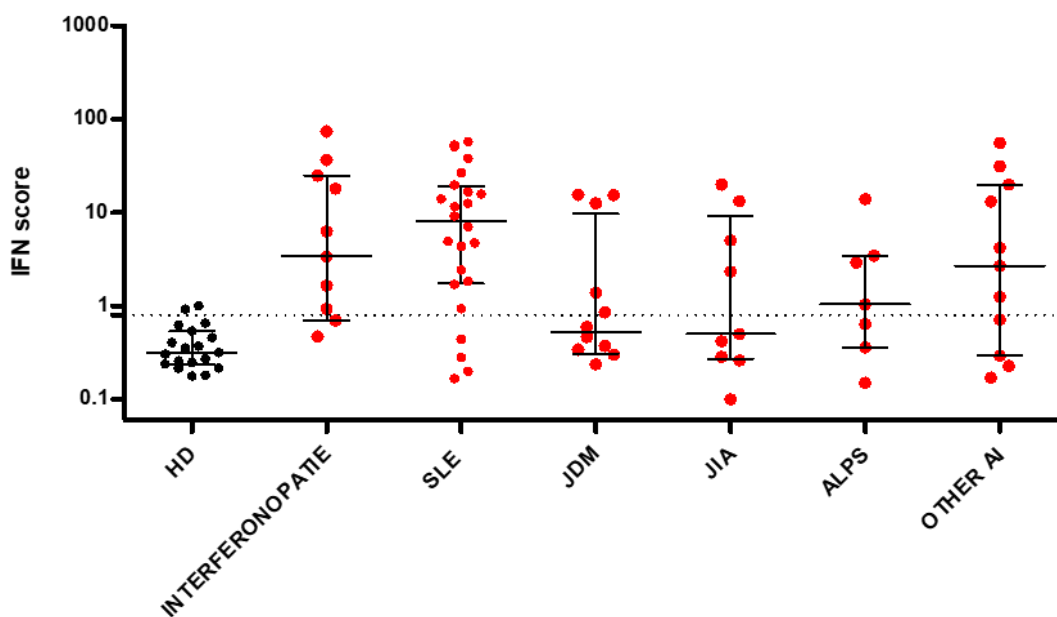


Figura 16. Distribuzione dei valori di Interferon Score nei soggetti affetti da malattie autoimmuni

Malattie autoinfiammatorie indifferenziate

Nel gruppo delle malattie autoinfiammatorie indifferenziate alcuni sottogruppi hanno una tendenza fortemente positiva della firma interferonica, come ad esempio i pazienti affetti da lupus pernicio e da cromosomopatie. In questi pazienti la ricerca di precise alterazioni molecolari coinvolte nella regolazione della via potrebbe spiegarne il comportamento. Al contrario, i soggetti che hanno manifestato acrocianosi o fenomeno di Raynaud presentano un Interferon Score negativo, suggerendo come il meccanismo fisiopatologico coinvolto non interessi questa via.

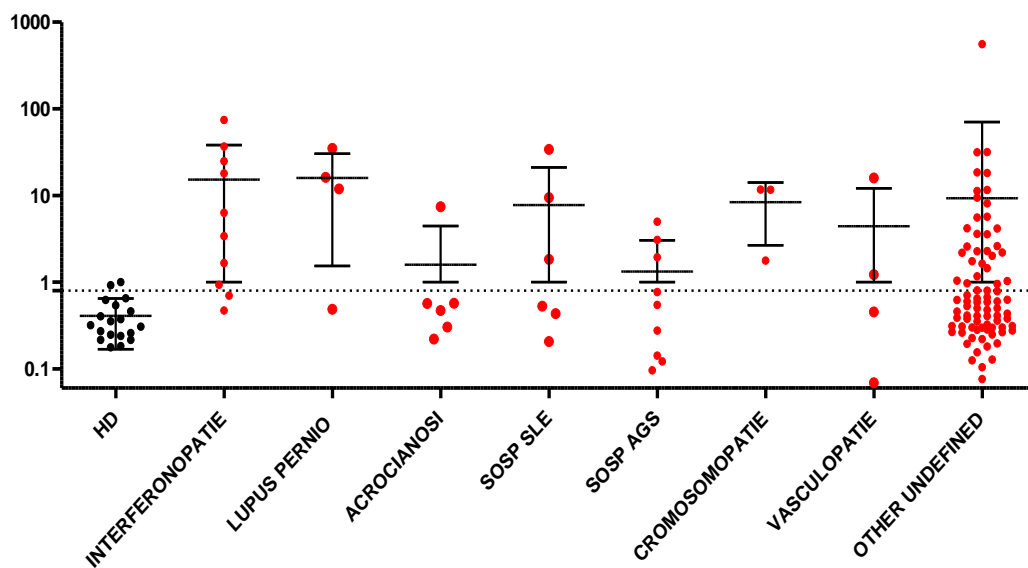


Figura 17. Distribuzione dei valori di Interferon Score nei soggetti affetti da forme indifferenziate

5.5 Diagnosi genetica

La fase finale dello studio prevede che i pazienti selezionati sulla base dei criteri clinici siano sottoposti all'indagine genetica volta all'individuazione di mutazioni riconosciute come causative per interferonopatie o di cui è stata descritta la correlazione con determinati fenotipi clinici. È stato analizzato il materiale genetico di 11 pazienti (Tabella 9).

Poiché il percorso diagnostico e terapeutico di questi soggetti è stato molto articolato e significativo, è importante riportare una breve epicrisi di ciascuno.

<i>Paziente</i>	<i>Gene</i>	<i>Mutazione</i>	<i>Tipologia</i>	<i>Meccanismo</i>	<i>Malattia</i>
Pz 1	<i>COPA</i>	c.698G>A (p.Arg233His)	Eterozigote	Aploinsufficienza	COPA
Pz 2	<i>RNASEH2B</i>	c.529G>A (p.Ala177Thr)	Omozigote	Perdita di funzione	AGS
Pz 3	<i>ADAR1</i>	c.3019G>A (p.Gly1007Arg)	Eterozigote dominante negativa	Perdita di funzione	AGS
Pz 4	<i>RNASEH2B</i>	c.529G>A (p.Ala177Thr)	Omozigote	Perdita di funzione	AGS
Pz 5	<i>DNASE1L3</i>	c.290_291delCA (p.Thr97Ilefs*2); delezione esone 5	Eterozigote composto	Perdita di funzione	DNASE
Pz 6	<i>DNASE2</i>	c.362A>T (p.Asp121Val)	Omozigote	Perdita di funzione	DNASE
Pz 7	<i>DNASE1L3</i>	c.289_290delAC (p.Thr97Ilefs*2)	Omozigote	Perdita di funzione	DNASE
Pz 8	<i>DNASE1L3</i>	c.289_290delAC (p.Thr97Ilefs*2)	Omozigote	Perdita di funzione	DNASE
Pz 9	<i>TMEM173</i>	c.463G>A (p.Val155Met)	Eterozigote	Guadagno di funzione	SAVI
Pz 10	<i>TMEM173</i>	c.842G>A (p.Arg281Gln)	Eterozigote	Guadagno di funzione	SAVI
Pz 11	<i>NRAS</i>	c.38G>A (p.Gly13Asp)	Mutazione somatica eterozigote	Guadagno di funzione	RALD

Tabella 9. Analisi genetica dei soggetti affetti da interferonopatia. *Pz* paziente, *COPA* sindrome COPA, *AGS* sindrome di Aicardi-Goutières, *DNASE* deficit di DNASE, *SAVI* sindrome SAVI, *RALD* – RAS associated Autoimmune Leukoproliferative Disease

Paziente 1

La paziente 1 è una ragazza con normale sviluppo psicomotorio che all'età di 3 anni ha presentato esordio di artrite molto severa, simile all'artrite idiopatica giovanile poliarticolare, seguita da insorgenza di tosse persistente. Non presentava in anamnesi storia familiare di malattie autoimmuni o reumatologiche. Le manifestazioni articolari sono iniziate tre mesi prima e hanno coinvolto i polsi, le articolazioni metacarpo-falangee, l'anca sinistra (con liquido visto agli ultrasuoni) e la colonna cervicale. L'analisi di laboratorio ha mostrato elevazione dei marker infiammatori (VES 54 mm/h), fattore reumatoide ad alto titolo (390 UI/ml) e assenza di ANA. Clinicamente, la paziente presentava gonfiore e dolore ai polsi, all'anca sinistra, al gomito e alle piccole articolazioni di mani e piedi e limitazione funzionale della colonna cervicale. È stata dimessa con terapia a base di FANS con parziale regressione del processo artritico con coinvolgimento persistente solo dei polsi e delle articolazioni interfalangee della mano sinistra e del piede destro. Cinque mesi dopo, la paziente è stata rivalutata: c'è stato un peggioramento dell'artrite con il coinvolgimento di articolazioni multiple. Gli esami del sangue hanno rivelato un fattore reumatoide di 578,5 mg/dl, VES 67 mm/h, PCR 0,46 mg/dl. Inoltre, la paziente ha continuato ad avere tosse persistente nonostante la terapia antibiotica. La radiografia del torace ha mostrato ispessimento interstiziale e la TC di controllo ha rivelato la presenza di ispessimento interstiziale con pattern micronodulare. Il lavaggio broncoalveolare è stato eseguito rivelando l'alveolite linfocitica senza cellule atipiche o istiociti CD1a positivi. I test di Mantoux e Quantiferon erano entrambi negativi. La risonanza magnetica total body in sequenza STIR ha escluso la presenza di lesioni ossee. La paziente è stata trattata con steroidi ad alto dosaggio (3 boli endovena di Metilprednisolone alla dose di 30 mg/kg) e quindi prednisone orale (2 mg/kg) per un mese. Al follow-up, i sintomi respiratori e articolari erano notevolmente migliorati in assenza di articolazioni attive, gli steroidi sono stati ridotti ed è stata introdotta la terapia di mantenimento con Metotrexato. Con la terapia con Metotrexato, tuttavia, il coinvolgimento articolare è peggiorato: al follow-up, la paziente ha presentato artrite attiva di entrambi i polsi, piccole articolazioni delle mani e dei piedi, ginocchio destro e colonna cervicale. Nonostante uno scarso controllo della malattia con la terapia con Metotrexato, non è stato aggiunto un agente biologico anti-TNF a causa degli effetti

negativi riportati in letteratura sulla malattia polmonare interstiziale. È stato, invece, utilizzato Abatacept, senza un completo controllo della malattia. La ripetizione della TC polmonare eseguita un anno dopo mostrava un ispessimento intralobulare con pattern *tree in bud* nei lobi superiore e medio, bande parenchimali alla base sinistra e un'ectasia bronchiale peri-ilare sinistra. La famiglia ha deciso di proseguire le cure con uno specialista in medicina naturale e quindi la terapia convenzionale è stata interrotta ed è stato avviato il trattamento omeopatico. La paziente è stata persa al follow-up per 3 anni. Alla luce della pubblicazione della sindrome COPA, è stato eseguito il sequenziamento di Sanger sul DNA della paziente ed è stata trovata la mutazione già descritta c.698G>A sia nella ragazza che nella madre. Sulla base dei risultati clinici e dei test genetici, anche considerando la penetranza incompleta della malattia, è stata stabilita la diagnosi della sindrome COPA. A seguito della comunicazione della diagnosi, la famiglia ha accettato di essere nuovamente seguita ed è stata valutata la fase della malattia: era presente artrosi molto grave con danni articolari e deformità delle mani e dei piedi, limitazione funzionale del gomito, delle spalle e della colonna cervicale, oltre a fusione delle vertebre cervicali. I test di funzionalità respiratoria hanno rivelato un modello leggermente restrittivo; la funzione renale era normale. Sulla base dell'esperienza clinica con altri pazienti con sindrome COPA, è stato iniziato Micofenolato mofetile insieme a Idrossiclorochina e steroidi. Nei mesi successivi, la progressione della malattia polmonare e l'artrite è stata controllata, tuttavia, a causa dell'attività della malattia di lunga durata, le cicatrici osteoarticolari persistevano. La terapia con Micofenolato mofetile ha permesso solo un controllo parziale di malattia, per cui dopo un anno di somministrazione i genitori hanno deciso di sospendere il farmaco. Nei mesi successivi è stato avviato Rituximab, il quale ha portato ad un iniziale miglioramento clinico e funzionale, fino a gennaio 2019, quando, in seguito alla ripresa di attività della malattia, è stato deciso di sospenderlo. Ad aprile dello stesso anno, sulla base della letteratura, all'età di 12 anni la bambina ha iniziato la somministrazione di Baricitinib, ottenendo un ottimo controllo di malattia.



Paziente 2

La paziente 2 è una bambina nata a termine da parto eutocico, in seguito a una gravidanza fisiologica. All'età di un anno e mezzo, in occasione di un episodio intercorrente, ha sviluppato regressione delle capacità psicomotorie precedentemente acquisite. In seguito alla regressione psicomotoria venivano avviate indagini diagnostiche approfondite; la TC dell'encefalo dimostrava la presenza di deposizioni calcifiche a carico dei nuclei lentiformi e comparsa di focolai calcifici in corrispondenza della sostanza bianca sottocorticale frontale e parietale a destra, in associazione a riduzione del grado di ipodensità della sostanza bianca. L'analisi genetica ha confermato il sospetto di sindrome di Aicardi-Goutières: è stata rilevata la mutazione omozigote c.529G>A a carico del gene RNASEH2B, che causa la perdita di funzione della proteina normalmente codificata. La bambina presenta tetraparesi spastico-distonica, con ipertono ai quattro arti, importante resistenza alla talizzazione dei piedi sia ad arto flessor sia ad arto esteso, difficoltà nell'estensione delle mani, riflessi osteo-tendinei iperevocabili, clono del piede e segno di Babinski bilateralmente. All'età di 10 anni è stata sottoposta a un intervento ortopedico di sezione degli adduttori ed allungamento dei flessori delle ginocchia e successivamente a chemodenervazione a livello degli arti superiori con parziale beneficio. Attualmente il quadro clinico è sostanzialmente stabile; la ragazza, che oggi ha 16 anni, esegue settimanalmente trattamento psicomotorio, fisioterapico e logopedico.

Paziente 3

La paziente 3 è nata a termine da parto eutocico, da gravidanza normodecorsa. La bambina desta le prime preoccupazioni genitoriali a partire dai 6 mesi di vita per ritardo nelle acquisizioni delle tappe dello sviluppo psicomotorio. Effettuavano quindi una prima valutazione pediatrica privatamente con riscontro di ritardo psicomotorio, per cui veniva consigliato avvio di fisioterapia e visita neuropsichiatrica. Fin dalla nascita è segnalato nistagmo bilaterale, successivamente prevalente all'occhio destro. Nei mesi successivi la paziente presenta episodi epilettici parossistici pluriquotidiani (fino a 10) della durata di pochi secondi, caratterizzati da ipertono dell'arto inferiore destro con intrarotazione del piede in apparente postura a schermidore, successivo irrigidimento ai quattro arti e pianto. Viene quindi eseguito un elettroencefalogramma, che rileva anomalie irritative frontali bilaterali con incostante asimmetria di ampiezza, e una RMN encefalica, con riscontro di corpo calloso sottile, ridotta rappresentazione della sostanza bianca sovratentoriale, aree di alterato segnale nei nuclei lenticolari con possibile espressione di calcificazioni, quadro atrofico del tronco cerebrale. Si decide di avviare terapia con Diazepam soluzione orale 2 gtt per 3 volte al giorno, con riferita riduzione in frequenza ed intensità degli episodi parossistici. Alla ripetizione dell'EEG di controllo viene rilevata la persistenza delle crisi, sia a livello elettrico che clinico; si sostituisce il Diazepam con Levetiracetam (250 mg). L'esecuzione di una TC di controllo conferma la presenza di calcificazioni cerebrali con multipli focolai in sede nucleo-basale e a livello della sostanza bianca frontale, sia in sede profonda che sottocorticale, oltre che a livello della sostanza bianca parieto-occipitale bilaterale e temporale posteriore destra. Successivamente viene ripetuta la RMN con evidenza di progressiva atrofia cerebrale e mancata progressione del processo di mielinizzazione della sostanza bianca sovratentoriale. Sospettando la sindrome di Aicardi-Goutières, è stata eseguita la firma interferonica, con esito positivo, e, quindi, l'analisi genetica, volta ad individuare mutazioni causative. È stata riscontrata, infatti, una mutazione eterozigote dominante negativa a carico del gene ADAR1 (p.Gly1007Arg). Sulla base dei dati riportati in letteratura riguardo la terapia delle interferonopatie, è stato avviato il trattamento off-label con Ruxolitinib, al dosaggio di 7,5 mg al giorno, successivamente incrementato a 10 mg. In seguito all'introduzione del farmaco, la

bambina ha presentato un miglioramento delle condizioni cliniche, con scomparsa delle crisi epilettiche.

Paziente 4

La paziente 4 è una bambina nata a termine da parto eutocico. All'età di 1 anno viene ricoverata per verosimile malattia esantematica complicata da interessamento del SNC esitato in paresi degli arti inferiori (in particolare il destro), ipostenia dell'arto superiore destro ed ipoacusia neurosensoriale. Viene presa in cura dal reparto di Reumatologia Pediatrica di Parma, dove viene seguita come sospetto di connettivopatia. L'anno successivo viene posta diagnosi di "vasculite sistemica con interessamento del SNC". Negli anni successivi sviluppa spasticità, soprattutto a carico dell'emisoma destro, e deformità a carico delle articolazioni interfalangee delle mani ("a collo di cigno"), soprattutto a destra, e delle articolazioni metatarso-falangee ("a colpo di vento"). A causa del grave grado di spasticità a livello della muscolatura degli arti inferiori, viene sottoposta a un intervento ortopedico funzionale (tenotomia dosata degli adduttori bilateralmente, dell'ileopsoas, del retto femorale e dei muscoli gracile e semitendinoso a destra) per grave lussazione dell'anca destra. Da allora è sottoposta a terapia immunosoppressiva con multipli agenti farmacologici, tra cui immunoglobuline endovena, corticosteroidi, Azatioprina e Ciclosporina, questi ultimi secondariamente sospesi e sostituiti da Idrossiclorochina e Prednisone. All'età di 9 anni viene riscontrata per la prima volta insufficienza renale cronica, con proteinuria ed ipertensione arteriosa. Sviluppa, inoltre, lesioni eritemato-vescicolari a livello delle dita degli arti inferiori bilateralmente, che venivano interpretate come eritema pernicio. Agli esami ematochimici viene confermato il quadro di insufficienza renale cronica (creatinina 1.6 mg/dL, urea 87 mg/dL) con acidosi metabolica (bicarbonati 15 mmol/L) ed iperfosforemia (5.4 mg/dL). Inoltre, presenta debole positività di pANCA (1:40), ANA non francamente positivi (1:80), iperalfa-2globulinemia ed ipergammaglobulinemia policlonale all'elettroforesi proteica, debole consumo del C3 (84.9 mg/dL), lieve anemia normocitica (Hb 11.8 g/dL, MCV 87.4 fl), ipoferritinemia 9 ng/mL, VES 30 mm/h. Si decide quindi di eseguire una biopsia renale che dimostra un quadro compatibile con una "glomerulonefrite proliferativa diffusa lupica" Classe IV sec

RPS/ISN, per cui viene intrapresa la terapia con Micofenolato mofetile associato a steroide per os. Per il sospetto di una forma di Lupus familiare viene chiesto consulto all'Istituto Gaslini. In seguito alla valutazione di una risonanza magnetica all'encefalo che rivela iperintensità nelle sequenze in T2, viene eseguita dapprima la signature dell'interferone su sangue periferico, che risulta positiva, e successivamente viene analizzato il DNA della bambina. L'indagine genetica ha permesso di formulare la diagnosi di sindrome di Aicardi-Goutières; è stata, infatti, rilevata la mutazione in omozigosi c.529G>A (p.Ala177Thr) a carico del gene RNASEH2B, già descritta in letteratura.

Paziente 5

La paziente 5 all'età di 4 anni sviluppa rash malare, edema al volto, artrite non erosiva e anemia emolitica. Agli esami ematochimici presentava Hb 7,5 g/dl, test di coombs diretto positivo, VES 83 mm/h, PCR 0,79 mg/dl, C3 56 mg/dl, C4 4 mg/dl, ANA positivi (1:640); la funzionalità epato-renale era nella norma, mentre presentava ematuria e proteinuria. Veniva, quindi, posta diagnosi di lupus eritematoso sistemico. A partire dall'anno successivo, visto il peggioramento della funzionalità renale, dell'ematuria e della proteinuria, la bambina veniva sottoposta all'infusione di tre boli endovena di corticosteroide ed iniziata la somministrazione di Ciclofosfamide a dosaggi incrementali. Successivamente veniva, invece, impostata una terapia di fondo con Micofenolato mofetile. Erano intanto eseguiti firma interferonica (negativa) e pannello genetico per il sospetto di una forma familiare di lupus con riscontro di eterozigosi composta per due varianti del gene DNASE1L3: delezione dell'esone 5 e variante missenso c.290_291delCA. Negli anni successivi veniva sostituita la terapia di fondo con Idrossiclorochina e, a causa del progressivo peggioramento della funzionalità renale (creatinina 10,52 mg/dl, urea 310 mg/dl, potassiemia 6,2 mEq/L, bicarbonati 13,2 mmol/L, proteinuria, ematuria, leucocituria), si posizionava catetere venoso centrale per iniziare il trattamento emodialitico tre volte a settimana e la ragazza è stata inserita in lista di attesa per il trapianto renale, effettuato circa un anno fa senza complicanze periprocedurali e con stabilità clinica post trapianto.

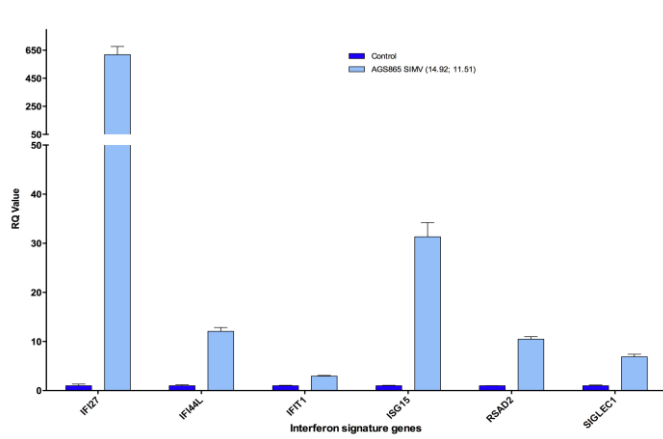
Paziente 6

Il paziente 6, nato alla 37^o settimana di una gravidanza normodecorsa, ha presentato alla nascita una condizione di insufficienza epatica acuta, a eziologia non chiara. La biopsia evidenziava un infiltrato istiocitario a livello degli spazi portali, un'organizzazione panacinare degli epatociti, associata a strutturazione pseudoghiandolare comprendente trombi biliari, con segni di colestasi. È stata esclusa la diagnosi di emosiderosi ed è stato eseguito il puntato midollare, anch'esso risultato negativo. Questo episodio è stato seguito da un periodo di sostanziale benessere. All'età di 3 anni è stata ripetuta la biopsia epatica, con riscontro di un quadro di iniziale cirrosi con segni di attività. All'età di 5 anni sono comparsi artralgie e rigidità articolare, febbre, scarso accrescimento e proteinuria non selettiva dovuta a glomerulonefrite. Inoltre, è stata riscontrata la presenza di citopenia: leucopenia con linfocitopenia e anemia, associata ad elevazione degli indici di flogosi. Il bambino ha sempre risposto bene alla terapia steroidea, senza però mai completa risoluzione della rigidità articolare e mostrando una steroide-dipendenza, nonostante l'avvio di altre terapie immunosoppressive (Metotrexato) e biologiche (Etanercept, Anakinra, Infliximab). A 12 anni è stata eseguita la biopsia renale ed è stato evidenziato un quadro di nefrite da immunocomplessi compatibile con nefrite lupica, supportato dal riscontro di una positività autoanticorpale (ANA e antidsDNA). È stata avviata terapia con Micofenolato mofetile (250 mg x 2 vv/die) ed è stato scalato il dosaggio di cortisone. Tuttavia, alla riduzione del dosaggio del cortisone si è assistito ad una riacutizzazione della sintomatologia (febbre, rigidità articolare) ed a un rialzo degli indici di flogosi, efficacemente trattata con tre boli di Metilprednisolone (500 mg). Successivamente avviata la terapia con Idrossiclorochina (150 mg/die) e proseguita la terapia steroidea con Prednisone inizialmente a 25 mg/die, con incremento del dosaggio a 35 mg/die. Nei mesi seguenti sono stati fatti diversi tentativi di scalo della terapia steroidea, falliti per peggioramento della sintomatologia articolare, della proteinuria e riscontro di cataratta. Sospesa la terapia con Micofenolato mofetile per inefficacia, è stato avviato un ciclo di iniezioni di Canakinumab (anticorpo monoclonale umanizzato contro l'Interleuchina-1 β) 100 mg s.c. con riduzione dello steroide a 12.5 mg/die.

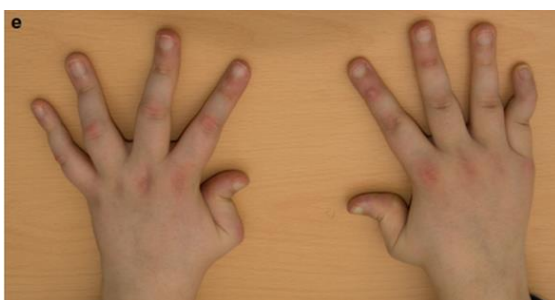
A 13 anni il paziente è stato sottoposto alla RM total body: a livello delle articolazioni coxofemorali non ha mostrato versamento endoarticolare, ma è stata riscontrata la presenza di collo femorale tozzo bilateralmente, marcata disomogeneità del segnale midollare a livello del collo e della diafisi femorale bilateralmente, delle ossa del bacino e in minor misura del rachide in T1, quadro ritenuto compatibile con sostituzione del midollo giallo in possibile malattia da accumulo; inoltre è stata evidenziata una diffusa ipotrofia dei muscoli, e fegato a margini bozzolati. Eseguito anche l'esame radiografico del rachide e delle articolazioni coxofemorali, è stata riscontrata una riduzione della densità ossea, in particolare a livello delle teste femorali. Per inefficacia è stato sospeso anche il Canakinumab, ed incrementato il Prednisone a 25 mg/die, ma la malattia non risultava essere ben controllata né dal punto di vista clinico (persistenza di rigidità articolare lamentata dal paziente e di artrite riscontrata obiettivamente, presenza di lesioni crostose ai gomiti e alle dita), né da un punto di vista laboratoristico (leucopenia, anemia e indici di flogosi, in particolare VES, aumentati). La sintomatologia del bambino, evolvendo in maniera sempre più complessa nel tempo, con comparsa di dolore addominale ricorrente, rinolalia e manifestazioni cutanee eritemato-desquamative ai gomiti e sulla superficie estensoria delle dita delle mani, risultava di difficile gestione. È stato eseguito anche un esame spirometrico, sulla base del quale è stato evidenziato un modesto quadro restrittivo. Per approfondire il quadro, il bimbo viene sottoposto a una TC del torace che evidenzia un principio di interstiziopatia polmonare.

I numerosi elementi clinici hanno reso necessaria un'accurata diagnosi differenziale: sono state escluse le malattie metaboliche con accertamento dei valori di acidi organici ed amminoacidi urinari, acidi grassi a catena lunga, sialotransferrine, GAG (glicosaminoglicani) urinari, mucopolisaccaridi urinari, alfa-iduronidasi, alfa-galattosidasi, acido lattico, ammoniemia, antitripsina plasmatica, chitotriosidasi, risultati nella norma; per la presenza di febbre, interessamento articolare, cutaneo, addominale e della costante elevazione degli indici di flogosi sono state eseguite le indagini genetiche per le principali malattie autoinfiammatorie (CANDLE, MKD, FMF, TRAPS, CIAS1), risultate negative. Successivamente, alla luce dei dati clinici, laboratoristici e strumentali, evocativi di una sindrome simil-lupica, il paziente è stato inserito nello studio, e avviato il percorso diagnostico per le interferonopatie, con il

sospetto di una forma di Lupus monogenico. È stato sottoposto alla valutazione della signature dell'interferone, risultata molto elevata, con un IFN-score di 14,92.



Infine, il DNA del paziente è stato analizzato, attraverso lo studio dell'intero esoma con la tecnica della Next Generation Sequencing, con riscontro della mutazione c.A362T (mutazione da Adenosina a Timina nella posizione 362 del cDNA) a carico del gene che codifica per la DNase2 sull'esone 4, che corrisponde a p.D121V, una mutazione da Aspartato a Valina nella posizione 121 della proteina. Tale mutazione non è mai stata riscontrata nell'uomo, ma è stato studiato nel topo che la compromissione della funzione della DNase2 causa la morte embrionale, per lo sviluppo di un processo patologico analogo ad una grave patologia autoinfiammatoria, dovuta all'iperproduzione di interferone e altre citochine proinfiammatorie, stimolata dalla presenza di frammenti di acidi nucleici non digeriti (115).



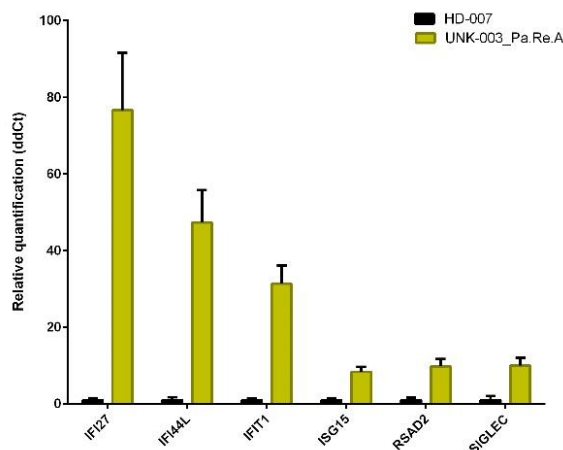
Paziente 7

Il paziente 7 è un bambino nato da genitori sani, non consanguinei, a termine di una gravidanza fisiologica, il cui periodo neonatale si è svolto nella norma. Fatta eccezione

per sporadici episodi di vomito che non presentavano particolare correlazione con cibi o situazioni specifiche, alcuni episodi di orticaria e artralgie agli arti inferiori, il bambino ha goduto di buona salute fino all'età di 7 anni. In quel periodo ha sviluppato una sintomatologia complessa: iperpiressia, vomito, anuria, segni di disidratazione, linfadenopatia laterocervicale sinistra, epatosplenomegalia, lesioni eritemato-maculose a livello degli arti superiori ed inferiori e lesioni necrotiche al III dito, alla pianta e al dorso del piede destro. Eseguita un'accurata diagnosi differenziale con malattie infettive, endocrino-metaboliche e autoimmuni, all'età di 8 anni viene posta la diagnosi di Sindrome Infiammatoria Cronica e "Glomerulonefrite Pauci-immune" (glomerulonefrite necrotizzante con semilune ANCA associata) sulla base della sintomatologia, degli esami ematochimici e dell'analisi del campione bioptico renale, effettuata per il riscontro di insufficienza renale (creatinina 1,2 mg %), ematuria e proteinuria in range nefrosico. Il bimbo è stato trattato nella fase acuta con 6 boli mensili di Ciclofosfamide e steroide, con normalizzazione della funzione renale; successivamente in accordo con i nefrologi si è passati ad una terapia di mantenimento con Micofenolato mofetile (600 mg x 2) per ridurre progressivamente il dosaggio dello steroide. Il paziente presentava anche un'importante anemia in quanto portatore di *trait talassemico*. Lo sviluppo psico-motorio risultava normale per l'età. Associate al quadro renale, erano presenti manifestazioni orticarioidi, figurate, pruriginose, fugaci, localizzate prevalentemente agli arti inferiori, ma anche al tronco, arti superiori e volto, inizialmente trattate con terapia antistaminica. Nel tempo si sono verificate diverse riaccensioni della sintomatologia renale con importante ematuria, proteinuria e significativo incremento del titolo anticorpale (ANCA). Sono state trattate inizialmente con boli di steroide endovena ad alto dosaggio (10 mg/kg), con, a seguire, terapia steroidea per os alla dose di 1 mg/kg a scalare. Sono stati fatti diversi tentativi per trovare una terapia di mantenimento di fondo efficace: dapprima con Micofenolato mofetile 600 mg x 2, scarsamente efficace, con persistenza di proteinuria, ematuria, positività degli anticorpi pANCA (anticorpi contro il citoplasma dei neutrofilo, in particolare contro l'antigene MPO, mieloperossidasi), PCR (proteina C reattiva) elevata, C3 basso, successivamente con Rituximab (anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD20), seguito da una terapia di mantenimento con Azatioprina. Tuttavia, una seconda biopsia renale evidenziava nuovamente una glomerulonefrite

diffusa con aspetti necrotizzanti, proliferazione extracapillare, glomerulosclerosi diffusa, infiltrati e fibrosi tubulo-interstiziale, perciò veniva sospesa l'Azatioprina ed iniziata la terapia con Tacrolimus, dato lo scarso controllo della malattia. Per il sospetto di un'eziologia allergica delle lesioni cutanee, viene effettuato il dosaggio delle IgE sieriche, risultate negative. Viene eseguito anche un controllo spirometrico, durante il quale si evidenzia una riduzione di flussi e volumi con un quadro misto di tipo restrittivo. Ritenuta inefficace anche la terapia con Tacrolimus, è mantenuto solo lo steroide. Su consiglio degli pneumologi, per approfondire il dato spirometrico, viene effettuata una TC del torace che dimostra interessamento del parenchima polmonare, diffuso ad entrambi i lati ed a tutti i livelli, con uno sfumato quadro "ground glass" con tralci fibrotici che giungono fino a contatto con la superficie pleurica. Compatibile, alla spirometria, con un deficit ventilatorio di tipo restrittivo puro, viene fatta diagnosi di interstiziopatia polmonare con lieve riduzione della diffusione dei gas respiratori. Il coinvolgimento renale, polmonare e cutaneo dimostrava come il processo vasculitico interessasse diversi organi.

Sulla base dei reperti clinici, il bimbo è stato inserito nello studio ed è stata studiata la signature dell'IFN. Viene riscontrata un'elevata espressione dei 6 geni indotti dall'interferone presi in esame, con un IFN-score di 20,07.



Il DNA del paziente è stato analizzato utilizzando il pannello di screening genetico per le malattie autoinfiammatorie basato sul sequenziamento di nuova generazione (NGS) poiché la clinica non era suggestiva per una specifica patologia. L'analisi molecolare ha riscontrato una mutazione frame-shift del gene che codifica per l'enzima DNase1L3 (c.289_290delAC), che porta al troncamento della proteina. Tale mutazione è stata

individuata come causativa della Sindrome Orticaria Vasculite con grave ipocomplementemia (HUVS) in una famiglia in cui tre bambini erano affetti (116). Tale sindrome generalmente esordisce nella terza o quarta decade di vita e la diagnosi viene effettuata sulla base della soddisfazione dei criteri clinici (2 maggiori e almeno 2 minori) stabiliti dall'American College of Rheumatology (117). In letteratura è riportato solo un piccolo numero di casi pediatrici e, al momento, non sono ancora state studiate efficaci soluzioni terapeutiche. È ancora molto viva la questione riguardante la sovrapposizione dei fenotipi clinici di questa rara sindrome e del lupus eritematoso sistemico. Poichè, più del 50% dei pazienti affetti da HUVS(118), sviluppano il LES, è in discussione se si tratti di un'unica entità clinica o di patologie separate.

Paziente 8

Il paziente 8 ha goduto di sostanziale benessere fino all'età di 7 anni, quando ha sviluppato sindrome nefrosica, inizialmente trattata con corticosteroidi. La biopsia renale ha evidenziato un quadro di glomerulonefrite membranosa (II stadio), trattata dapprima con Ciclosporina, poi con Micofenolato mofetile e Clorambucile, tutti farmaci risultati inefficaci. Il bambino è andato incontro a insufficienza renale cronica (creatinina 3.2 mg/dl, proteinuria 4.5g/die) e all'età di 15 anni ha iniziato la dialisi peritoneale. Due anni più tardi è stato sottoposto a trapianto renale, in seguito al quale si è riusciti ad ottenere un controllo della proteinuria solo con la somministrazione di Rituximab. Nello stesso anno il ragazzo ha contratto infezione da HCV, trattata con Sofosbuvir e Daclatasvir. Successivamente la funzionalità del rene trapiantato è nuovamente peggiorata ed è stata iniziata l'emodialisi. Nei mesi successivi il paziente ha subito numerosi ricoveri per episodi ricorrenti di febbre, ascite, pericardite, pleurite, con riscontro di ANA positivi (1:160) e ipocomplementemia (C3 86.4 mg/dl). A causa del continuo peggioramento della funzionalità renale è stata eseguita dapprima l'embolizzazione dell'arteria renale e successivamente la nefrectomia, per sospetto di sindrome da intolleranza al rene trapiantato non funzionante (*Graft Intolerance Syndrome*). Per sospetto di interferonopatia è stata eseguita la firma interferonica, che rivelato un Interferon Score negativo, mentre l'indagine genetica ha dimostrato una

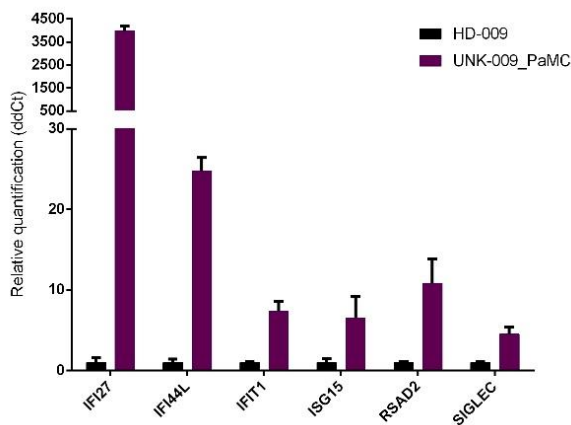
mutazione in omozigosi a carico del gene DNASE1L3 (c.289_290delAC), che porta a troncamento della proteina normalmente codificata.

Paziente 9

La paziente 9, nata pretermine (alla 36° settimana), non ha presentato problemi in età perinatale.

Dall'età di circa 8 mesi viene riferita la comparsa di lesioni cutanee a carattere necrotico-ulcerativo, con evoluzione cicatriziale, solitamente non accompagnate da altra sintomatologia, il cui trattamento topico con creme antibiotico-steroidi è riferito poco efficace. Tali lesioni si presentavano in numero di 2-3 alla volta, localizzandosi prevalentemente agli arti ed esitando in aree di cute eritematosa ed escavata a stampo. Dall'età di circa 3 anni viene inoltre riferita la comparsa di distrofia ungueale, prevalentemente a carico dei piedi, interpretata inizialmente come lesione di natura psoriasica. Successivamente ha presentato episodi ricorrenti di broncospasmo dall'età di circa 4 anni, trattati abitualmente con β 2-inalatori e steroidi sistemici. Dall'età di 8 anni viene riferita la comparsa di ripetuti episodi febbrili, accompagnati da faringite e dispnea, trattati con terapia antibiotica associata a broncodilatatori con scarsa efficacia. Era presente inoltre un'anemia normocromica e normocitica. Alla radiografia del torace inizialmente si era riscontrato un diffuso addensamento dei campi polmonari medio-basali con impegno interstiziale; successivamente la TC del torace aveva evidenziato più precisamente un addensamento parenchimale a livello del seno costo-frenico destro e un diffuso ispessimento dell'interstizio con aspetto a vetro smerigliato. Il profilo spirometrico, contestualmente, indicava un quadro restrittivo con sovrapposti aspetti ostruttivi. Esclusa la discheratosi congenita, risultavano positivi gli indici di flogosi, gli ANA (anticorpi antinucleo), gli pANCA (anticorpi contro il citoplasma dei neutrofilo, in particolare l'antigene MPO, mieloperossidasi), ed era presente un'alterazione delle sottopopolazioni linfocitarie (deficit dei linfociti T e linfociti B iper-rappresentati). Nello stesso periodo è stata indagata la natura delle lesioni cutanee tramite l'effettuazione di due biopsie, una su di una lesione infiammatoria in fase acuta e una su di una lesione in fase cicatriziale, dalle cui analisi istopatologiche è emerso un quadro di dermatite a carattere prevalentemente granulomatoso, con aspetti di

follicolite e perifollicolite profonda, con evidenti fenomeni di vasculite secondaria e di fibrosi. Sulla base del riscontro di infiammazione sia a livello polmonare che cutaneo è stata avviata la terapia steroidea al dosaggio di 1 mg/kg/die a scalare, con miglioramento del quadro respiratorio (evidenziato ai successivi controlli con PFR), cutaneo (non sono più state evidenziate nuove lesioni cutanee) ed ematochimico (negativizzazione degli indici di flogosi). Rivalutato il quadro polmonare, in previsione di eseguire una biopsia polmonare, vengono riscontrate invariate le aree a *ground glass* (vetro smerigliato) e l'ispessimento dei setti interlobulari, ma è stata osservata una riduzione delle dimensioni degli addensamenti pleuro-parenchimali basali nello spazio costo-frenico posteriore di destra. La biopsia polmonare ha evidenziato sezioni di parenchima polmonare con focale infarcimento emorragico, edema ed aggregati infiammatori prevalentemente linfocitari interstiziali, piccoli focolai di granulociti neutrofili, e raramente eosinofili con aspetti di capillarite. Viene proseguita la terapia steroidea con Prednisone (10 mg/die), che purtroppo risulta poco efficace, con la comparsa di diverse riesacerbazioni: episodi febbrili associati a riattivazione delle lesioni cutanee (arrossate e dolenti) a livello del volto e degli arti, prevalentemente quelli inferiori, artralgie a livello dei polsi e delle caviglie, rialzo degli indici di flogosi e positività autoanticorpali (ANA 1:320, pANCA 1:20). Ripetuta la biopsia cutanea viene riscontrato un quadro suggestivo per pioderma gangrenoso. Il follow-up spirometrico mostrava un peggioramento con quadro restrittivo-ostruttivo non completamente reversibile. È stato avviato il trattamento con Azatioprina, inizialmente 25, poi 50 mg/die, sostituito dopo breve tempo, per scarsa efficacia, con Etanercept sc 10 mg x 2/settimana. Riscontrata microematuria con normale morfologia degli eritrociti urinari per diversi mesi, viene proposta dai nefrologi una terapia antiipertensiva con Ramipril 1,25 mg/die. La complessità del quadro clinico e soprattutto la difficoltà ad individuare una strategia terapeutica efficace hanno condotto ad effettuare indagini diagnostiche più approfondite. È stata valutata la signature dell'interferone, con esito positivo, di elevata espressione dei 6 geni indotti dall'interferone, IFN-score di 9,11.



Considerando la sintomatologia autoinfiammatoria, la vasculite polmonare e le lesioni cutanee necrotico-ulcerative, si è ritenuto opportuno eseguire le indagini genetiche volte all'analisi del gene *TMEM173* causativo della sindrome SAVI (STING-associated vasculopathy with onset in infancy). Il sequenziamento del gene *TMEM173* ha individuato la presenza della mutazione V155M allo stato eterozigote, che ha permesso di porre diagnosi di sindrome SAVI. L'analisi genetica dei genitori ha dato esito negativo: si tratta pertanto di una mutazione “de novo”. Alla luce della severità del quadro clinico della bambina, della marcata cortico-dipendenza unitamente all'inefficacia dei più comuni farmaci immunosoppressori e biologici, previo consenso informato dei genitori, è stata proposta alla famiglia la possibilità di avviare una terapia di fondo con un JAK inibitore. Tale proposta terapeutica si basa sulla dimostrazione in studi in vitro su fibroblasti di soggetti affetti da Sindrome SAVI della presenza di una up-regolazione di STAT1, fattore di trascrizione responsabile dell'attivazione della produzione di interferone. L'uso in vitro di JAK inibitori (che interrompono il ciclo vizioso di continua stimolazione del recettore per l'IFN sulla superficie cellulare) ha evidenziato una netta riduzione della up-regolazione di STAT1, con conseguente riduzione della produzione di IFN. Ottenuta l'autorizzazione del “Comitato Buon Uso del Farmaco (CBUF)” dell'Istituto Gaslini è stata avviata la terapia con Ruxolitinib ad un iniziale dosaggio di 2.5 mg due volte al dì, successivamente incrementato a 5 mg due volte al dì. Visto il quadro di severa anemia su base infiammatoria presente, e tenuto conto che la terapia con Ruxolitinib può determinare un'iniziale anemizzazione, è stata eseguita trasfusione di emazie concentrate prima dell'avvio della terapia. Inoltre, è stato associato un ciclo di steroide al dosaggio di 2mg/kg/die, a scalare. L'avvio di tale terapia ha determinato un completo controllo del quadro cutaneo, la

negativizzazione degli indici infiammatori ed un netto miglioramento del quadro polmonare (dimostrato, oltre che dalla maggiore tollerabilità allo sforzo presentata dalla paziente, anche dal miglioramento dei dati spirometrici e della TC torace). È stato pertanto possibile procedere a riduzione della terapia steroidea, attualmente somministrata a basso dosaggio. Ad oggi non si sono registrati effetti collaterali legati all'uso del farmaco, la cui posologia è stata inoltre aumentata.



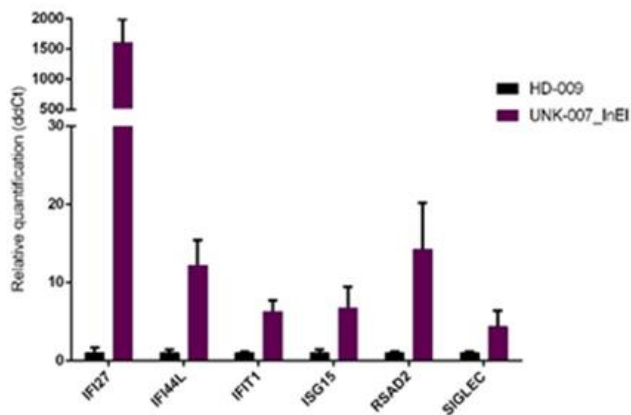
Paziente 10

La paziente 10, primogenita di genitori sani non consanguinei, è nata a termine di una gravidanza fisiologica, con parto eutocico. Ha goduto di buona salute nei primi mesi di vita; dal quarto mese viene riferito scarso incremento ponderale per difficoltà nella deglutizione e tosse attribuita a condizione di reflusso gastroesofageo. Esclusa la presenza di fistola tracheoesofagea, è stato evidenziato un impegno respiratorio, probabilmente aggravato da un episodio di bronchiolite febbrile secondaria a virus respiratorio sinciziale. Poiché nei mesi successivi, proseguiva il calo ponderale associato a tosse e secrezioni respiratorie, è stato effettuato un nuovo controllo radiografico con individuazione di segni di interessamento bronco-interstiziale. Basandosi sull'ipotesi di aspirazione di materiale gastroenterico, è stato intrapreso un trattamento per il reflusso gastro-esofageo con Omeprazolo, ma lo scarso beneficio ha reso necessario l'avvio di alimentazione da sondino naso-gastrico. All'età di 2 anni la bambina ha sviluppato una condizione di insufficienza respiratoria acuta con necessità di ossigenoterapia. Viene rilevata alla TC la presenza di estese aree di consolidazione e di polmonite in fase di organizzazione: il quadro era congruo con bronchiolite obliterante, polmonite produttiva e/o polmonite da aspirazione in fase

attiva. La biopsia polmonare mostrava un quadro di polmonite in fase di organizzazione secondaria probabilmente a fibrosi interstiziale e diffuso danno alveolare, con assenza di segni di vasculite e istiocitosi a cellule di Langerhans. Esclusa una patologia del surfactante (l'analisi molecolare del gene ABCA 3 ha evidenziato una mutazione in eterozigosi, non nota in precedenza e di funzione sconosciuta), è stata eseguita un'approfondita diagnosi differenziale. Tre mesi dopo la bimba è andata incontro ad un nuovo aggravamento del distress respiratorio, perciò è stato avviato un trattamento con 3 boli di steroide (10 mg/kg), proseguito per os al dosaggio di circa 1mg/kg/die. Per le persistenti difficoltà ad alimentarsi, è stata posizionata una gastrostomia ed eseguito l'intervento di funduplicatio secondo Nissen, con avvio dell'alimentazione tramite PEG e miglioramento della funzionalità respiratoria. Il riscontro di epatomegalia e di incremento delle transaminasi ha indotto inoltre l'esecuzione di biopsia epatica, con riscontro di infiammazione di tipo granulomatoso con necrosi e atrofia pericentrale. Valutato il complesso quadro clinico, è stata condotta un'ampia diagnostica differenziale che ha escluso forme infettive (epatiti virali, da micobatteri atipici), metaboliche (malattia di Gaucher e Niemann Pick, intolleranza alle proteine con lisinuria, deficit di mevalonato chinasi) e la fibrosi cistica (test del sudore e analisi genetica); sono state altresì escluse le comuni immunodeficienze primitive (nella norma differenziazione e morfologia leucocitaria, chemiotassi, fagocitosi e attività battericida, valori di Ig e sottoclassi IgG, tipizzazione linfocitaria, attività cellule NK). Si è riscontrata inoltre una positività ad alto titolo degli cANCA, anticorpi anti-citoplasma dei neutrofilo, contro l'antigene Proteinasi 3 (1: 5120), prima dell'avvio del trattamento steroideo. Fin dal primo anno di vita, la bambina presentava, inoltre, incostanti lesioni maculari eritematose, non rilevate né pruriginose su volto e arti, mai sul tronco, responsive allo steroide, che hanno portato ad eseguire una biopsia cutanea, che non era suggestiva per condizione vasculitica. La condizione polmonare ha presentato, nel tempo, una sostanziale instabilità, con fasi di riacutizzazioni febbrili, che hanno richiesto ossigenoterapia, trattamento di supporto con diuretici e boli di steroide ad alto dosaggio (3 boli di steroide al dosaggio di 10 mg/kg). Nell'ipotesi diagnostica di un'affezione granulomatosa infiammatoria è stata proseguita la terapia steroidea, associata a Metotrexato al dosaggio di 0.5 mg/m²/settimana con acido folico. Tuttavia, la scarsa

efficacia ha portato ben presto ad avviare un nuovo tentativo terapeutico con Infliximab al dosaggio di 5 mg/kg ogni 6 settimane. Successivamente le condizioni della bambina sono andate incontro a stabilizzazione, soprattutto la broncopneumopatia, lo steroide è stato gradualmente ridotto fino alla posologia di 2.5mg a giorni alterni, anche per la comparsa di effetti collaterali, quale l'ipertensione arteriosa. Nonostante il quadro polmonare fosse caratterizzato alla TC da una disomogenea densità del parenchima per la presenza di aree di *air trapping* e aree di *ground glass*, ispessimento peribroncovasale bilaterale e alcuni ispessimenti dei setti interlobulari, la clinica risultava migliorativa e permetteva di ridurre ulteriormente la posologia dello steroide passando ad unico basso dosaggio al mattino (Prednisone 2.5 mg/die), di sospendere Metotrexato e Infliximab. Anche l'interessamento epatico sembrava migliorativo con una progressiva normalizzazione dei valori della funzionalità epatica. Tuttavia, negli anni successivi la bimba ha presentato nuove riacutizzazioni del quadro respiratorio, rendendo necessaria l'ossigenoterapia anche in condizioni di base. Successivamente per peggioramento del quadro di ipercapnia, è stata anche avviata la ventilazione non invasiva (NIV) nelle ore notturne, associata alla terapia steroidea a basso dosaggio. Tale combinazione terapeutica ha portato, nel tempo, ad un progressivo e discreto miglioramento della funzionalità respiratoria, con possibilità di mantenere la respirazione in aria ambiente, e regressione dell'ipercapnia. Sulla base del complesso quadro clinico caratterizzato dalla combinazione di un precoce e ingravescente interessamento polmonare con un quadro infiammatorio subcronico steroide-dipendente, lesioni cutanee di tipo vasculitico e positività degli autoanticorpi, è stato posto il sospetto di interferonopatia, in particolare di Sindrome SAVI (STING-associated vasculopathy with onset in infancy). È stata quindi studiata la signature dell'IFN. È stata riscontrata una buona espressione dei 6 geni indotti dall'interferone scelti, con un IFN-score di 9,49. Sulla base del sospetto diagnostico è stata eseguito il sequenziamento del gene TMEM173 (codificante per la proteina STING), che ha evidenziato la presenza della mutazione c.842G>A a livello dell'esone 7. Tale mutazione non era mai stata identificata in precedenza, ma era stata predetta come deleteria dal punto di vista funzionale in vitro ed era stata descritta la mutazione di una porzione attigua del gene recentemente associata con un evidente difetto funzionale della proteina (119). Alla luce della

severità del quadro clinico della bambina, della marcata cortico-dipendenza unitamente all'inefficacia dei più comuni farmaci immunosoppressori e biologici, previo consenso informato dei genitori, è stata proposta alla famiglia la possibilità di avviare una terapia di fondo con un JAK inibitore. Tale proposta terapeutica si basa sulla dimostrazione in studi in vitro su fibroblasti di soggetti affetti da Sindrome SAVI, della presenza di una up-regolazione di STAT1, fattore di trascrizione responsabile dell'attivazione della produzione di interferone. L'uso in vitro di JAK inibitori (che interrompono il ciclo vizioso di continua stimolazione del recettore per l'IFN sulla superficie cellulare) ha evidenziato una netta riduzione della up-regolazione di STAT1, con conseguente riduzione della produzione di IFN. Nel gennaio 2015 la terapia con il farmaco è stata inoltre avviata per la paziente 9 e non sono stati registrati effetti collaterali. Già autorizzato l'utilizzo dal "Comitato Buon Uso del Farmaco (CBUF)" dell'Istituto Gaslini, è stato avviato il trattamento anche per la paziente numero 9, ad un iniziale dosaggio di 2.5 mg due volte al dì, successivamente incrementato a 5 mg due volte al dì, con la speranza di rendere la bimba indipendente dall'assunzione giornaliera di cortisone.



Paziente 11

Il paziente 11, secondogenito nato da genitori non consanguinei, è nato alla quarantesima settimana di gestazione da parto eutocico dopo gravidanza complicata da minacce di aborto trattate con tocolitici. Alla nascita non presentava segni di sofferenza perinatale; ha poi avuto uno sviluppo psicomotorio nella norma. Viene ricoverato per la prima volta all'età di 5 mesi per comparsa di epatosplenomegalia, linfadenomegalia diffusa, anemia, leucocitosi, ipergammaglobulinemia, riduzione di

C3 e C4, lieve aumento delle transaminasi e riscontro di sierologia positiva per EBV. In tale occasione venivano eseguiti ecografia addominale (organomegalia a struttura omogenea), biopsia midollare (riscontro di cellularità discreta, rapporto mielo-eritroide aumentato, presenza delle varie serie midollari nei vari stadi maturativi, 10% di linfociti con rari linfoblasti) e studio del cariotipo (46 XY con presenza di frequenti rotture cromosomiche); veniva dimesso con diagnosi di infezione cronica da EBV. Il mese successivo veniva sottoposto a biopsia di linfonodo ascellare, con riscontro di iperplasia linfoghiandolare di tipo misto; la ricerca dell'EBV con ibridazione in situ su tessuto biotico risultava negativa. Per la persistenza del quadro clinico, veniva effettuata terapia con IFN per 6 settimane e con Aciclovir per 7 giorni. Al controllo successivo si aveva riscontro di IgM anti-VCA negative con IgG anti-VCA, EBNA e EA positive. All'età di 3 anni il bambino viene nuovamente ricoverato per peggioramento delle condizioni generali, con comparsa di febbre, otite recidivante, dispnea, edema palpebrale e a mantellina, incremento dell'epatosplenomegalia e della linfadenomegalia generalizzata. L'RX torace mostrava un'area di addensamento parenchimale in sede basale paracardiaca destra e tenue velatura dei campi polmonari, ombre ilari ingrandite a carattere adenopatico, ipertrofia del timo; la TC torace-addome-pelvi linfonodi diffusamente aumentati di volume. Durante la degenza veniva somministrato Betametasone ev per 6 giorni. Successivamente il paziente ha presentato progressione del quadro clinico con comparsa di versamento pericardico necessitante di puntura evacuativa e successivo posizionamento di tubo di drenaggio (rimasto in sede per 20 giorni), versamento ascitico ed articolare, edemi periferici, proteinuria non selettiva ed ematuria. Durante il ricovero riscontro di ANA, anti-dsDNA ed AMA positivi; inoltre si segnalavano ipocomplementemia, ipergammaglobulinemia, anemia, piastrinopenia e PCR per CMV su urine positiva. In corso di degenza il bambino necessitava di trasfusioni di emazie concentrate, plasma, piastrine e fattori della coagulazione. Veniva dimesso con diagnosi di LES ed infezione cronica da EBV; veniva inoltre iniziata terapia con prednisone, il cui dosaggio veniva successivamente ridotto per comparsa di segni di cortisonizzazione, associandovi prima l'Idrossiclorochina, poi il Micofenolato mofetile. A 12 anni per riscontro di deficit di crescita staturale, intraprendeva terapia sostitutiva con GH e successivamente, per ritardo nello sviluppo puberale, terapia con testosterone. Intanto

persistevano proteinuria marcata, epatosplenomegalia, linfadenomegalia cervicale, ipertrofia delle ghiandole salivari, aumento delle IgM con riduzione delle IgG e IgA, queste ultime trattate con infusioni di immunoglobuline endovena. All'età di 17 anni il ragazzo inizia a sviluppare progressiva anemizzazione con riduzione dei livelli di ferritina: veniva pertanto eseguito screening per celiachia (EMA, TTG) ed EGDS, che permettevano di porre diagnosi di morbo celiaco. Venivano eseguiti in tale occasione anche studio delle sottopopolazioni linfocitarie con doppi negativi e valutazione dell'apoptosi indotta da attivazione dell'antigene Fas. Viene anche posta diagnosi di ipotiroidismo, per cui avviava terapia sostitutiva con Eutirox. All'esecuzione di EGDS di controllo si evidenziava la presenza di modeste ectasie venose al terzo distale dell'esofago, visibili con manovra di Valsalva.; all' ecografia addominale riscontro di epatomegalia, presenza di formazione nodulare ipo-isoecogena di diametro 20 mm, dilatazione della vena porta, splenomegalia, reni di dimensioni regolari con ridotta differenziazione cortico-midollare bilateralmente. La RM addome confermava l'organomegalia e la presenza di circoli epatofughi superficiali e profondi, oltre a riscontro di molteplici aree di alterato segnale in sede epatica da alterazione della vascolarizzazione. Veniva inoltre eseguita la firma interferonica su sangue periferico, con marcata positività dell'Interferon Score. Il quadro clinico risultava dunque molto complesso, con tratti suggestivi sia di lupus sia di sindrome linfoproliferativa autoimmune (sierosite, autoanticorpi, linfoproliferazione, ipogammaglobulinemia, sindrome nefrosica, signature dell'IFN positiva). È stato deciso di avviare l'analisi genetica con lo studio dell'esoma; l'esame ha finalmente dimostrato la presenza di una mutazione patogenetica. Si tratta di una mutazione somatica a carico del gene NRAS (G13D), responsabile della sindrome RALD (*RAS-associated Autoimmune Leukoproliferative Disease*), di cui sono stati descritti solamente sei casi in letteratura (120). La mutazione in questione rientra fra le cosiddette RASopatie. Oggi il paziente ha 27 anni ed è in lista di attesa per il trapianto di fegato per sindrome epato-polmonare.

6. Discussione

Le Interferonopatie sono una nuova classe di malattie recentemente individuate all'interno del gruppo delle malattie autoinfiammatorie sistemiche. Si tratta di malattie genetiche ad eredità mendeliana dovute a mutazioni monogeniche responsabili di una inappropriata attivazione della via dell'interferone di tipo I. Essendo patologie piuttosto rare, di recente descrizione e con una presentazione clinica assai eterogenea, è comune un ritardo nella diagnosi. Pertanto, lo scopo del presente studio è stato quello di individuare un possibile percorso diagnostico che potesse essere di aiuto al clinico specialista; in particolare è stato valutato il ruolo della firma interferonica su sangue periferico nel work-up diagnostico in pazienti afferenti ad un centro terziario di reumatologia pediatrica. Una diagnosi precoce risulta, infatti, fondamentale nella gestione di queste patologie, in quanto, grazie alle recenti scoperte riguardo i meccanismi patogenetici alla base delle interferonopatie, permetterebbe di intraprendere un approccio terapeutico adeguato, ottenendo così un buon controllo di malattia e riducendo il rischio di sviluppare complicanze a lungo termine. L'approccio diagnostico dei pazienti con un quadro infiammatorio sistemico all'esordio è molto complesso e lo spettro di patologie da considerare nella diagnosi differenziale è molto ampio, includendo oltre alle malattie autoimmuni ed autoinfiammatorie, anche quelle emato-oncologiche ed infettive. In questo studio abbiamo analizzato tutti i pazienti afferenti all'Istituto G. Gaslini in cui a manifestazioni infiammatorie sistemiche con coinvolgimento d'organo quale interessamento cutaneo con ulcere o vasculopatia, interstiziopatia polmonare, febbre ricorrente o sintomatologia neurologica non si accompagnava una diagnosi clinica definitiva. Questi pazienti sono stati confrontati con bambini con diagnosi di malattia reumatologica pediatrica, malattia autoinfiammatoria o immunodeficienza. Oltre alle classiche malattie reumatologiche, le forme autoimmuni e alcune forme di immunodeficienza primaria, abbiamo incluso anche pazienti con malattie autoinfiammatorie, sia con diagnosi definitiva (malattie monogeniche) sia con carattere indifferenziato. Questo è stato reso possibile grazie al fatto che il nostro centro rappresenta un punto di riferimento nazionale non solo nell'ambito della reumatologia pediatrica ma anche nell'ambito delle malattie autoinfiammatorie, che rappresentano un gruppo emergente di patologie

immunomediate con prevalente attivazione dell'immunità innata. Questo studio ha permesso di comprendere come le interferonopatie debbano essere prese in considerazione nel novero delle possibili diagnosi in pazienti con quadro infiammatorio sistemico all'esordio. Infatti, 11 pazienti su 217 (circa il 5%) in 5 anni di osservazione hanno ricevuto questa diagnosi finale. Come evidenziato dalla nostra casistica, i soggetti affetti da interferonopatia presentano un esordio precoce caratterizzato da un quadro clinico molto eterogeneo con interessamento dei distretti muco-cutaneo, muscolo-scheletrico, linfoide, neurologico, cardio-respiratorio, il tutto accompagnato da episodi febbrili ricorrenti. Molte manifestazioni risultano comuni sia alle interferonopatie sia alle altre patologie da noi prese in considerazione, quali rash cutanei eritematosi, artrite oligo e poliarticolare, epatosplenomegalia, rialzi della temperatura corporea. È stato possibile però individuare alcuni segni e sintomi che risultano assai frequenti nelle interferonopatie: lipodistrofia e fenomeni di panniculite, lesioni cutanee ulcerative, oncodistrofia, fibrosi polmonare. A livello neurologico sono state riscontrate in alcuni pazienti spasticità e presenza di calcificazioni cerebrali all'imaging. Infine, come già detto, mentre buona parte delle patologie autoimmuni osservate erano accomunate da processi artritici, solo i soggetti affetti da interferonopatia hanno sviluppato frequentemente rigidità articolare, contratture in flessione e displasie ossee, che li hanno spesso costretti a subire interventi ortopedici funzionali. Andando ad osservare nel dettaglio le percentuali di presentazione delle suddette manifestazioni, è possibile evidenziare una netta discrepanza tra le interferonopatie e le altre classi di malattia. La comparsa di questi segni e sintomi in età precoce nel contesto di un quadro infiammatorio dovrebbe, quindi, porre il dubbio di interferonopatia e far sì che il clinico specialista includa questa nuova classe di malattie nel percorso di diagnosi differenziale. Proponiamo inoltre l'utilizzo di un biomarker che possa essere uno strumento di ausilio nel sollevare il sospetto di interferonopatia: la firma interferonica su sangue periferico, o "Interferon Score". Si tratta di un esame poco invasivo, in quanto viene eseguito su un campione di sangue periferico. Consiste nell'analisi dell'espressione di alcuni geni indotti dall'interferone, per cui rappresenta un indice indiretto dell'attivazione della via dell'interferone di tipo I. La firma interferonica è stata eseguita su tutti i 217 pazienti partecipanti allo studio: sono risultati positivi in 109. In particolare, più dell'80% dei pazienti affetti da

interferonopatia (9 pazienti su 11) ha presentato un Interferon Score positivo, mentre meno della metà dei soggetti affetti da malattie autoinfiammatorie sistemiche e indifferenziate è risultato positivo. È curioso notare come altre patologie, soprattutto il lupus eritematoso sistemico, presentino un'elevata espressione dei geni indotti dell'interferone (LES 83% positivi). È stata, inoltre, eseguita l'analisi genetica sugli 11 pazienti in questione, la quale ha permesso di dimostrare la presenza di mutazioni responsabili del quadro clinico. Sulla base dei risultati ottenuti, possiamo confermare che l'aumento dell'attività interferonica è un meccanismo condiviso fra i pazienti con quadri clinici suggestivi di interferonopatia e può rappresentare un biomarker di screening per capire chi sottoporre all'indagine genetica. Le recenti scoperte riguardo ai meccanismi patogenetici alla base di questa classe di malattie hanno aperto le porte, oltre che a percorsi diagnostici più mirati, anche ad approcci terapeutici adeguati. Difatti, i più comuni farmaci immunosoppressori e biologici risultano inefficaci nel trattamento di questi disturbi. Risultati promettenti sembrano arrivare dall'utilizzo dei farmaci JAK inibitori, che sono molecole in grado di bloccare la via di segnalazione del recettore IFNAR attraverso l'inibizione delle Janus Chinasi. Questi dati sono sostenuti dalla letteratura e la nostra esperienza può confermarli. La somministrazione di JAK inibitori in alcuni dei nostri pazienti ha permesso un ottimo controllo di malattia, mai ottenuto con le terapie convenzionali. Ne sono un esempio le due bambine affette da sindrome SAVI che hanno partecipato al nostro studio: l'avvio della somministrazione di Ruxolitinib ha condotto a un ottimo controllo di malattia con netto miglioramento sia del quadro cutaneo sia del quadro polmonare, con negativizzazione degli indici infiammatori (Figura 18). L'utilizzo dei JAK inibitori ha inoltre permesso la riduzione, prima, e l'interruzione, poi, della terapia di fondo con corticosteroidi. Anche la paziente da noi seguita affetta da sindrome COPA in seguito all'avvio di Baricitinib ha riportato un'ottima risposta clinica.

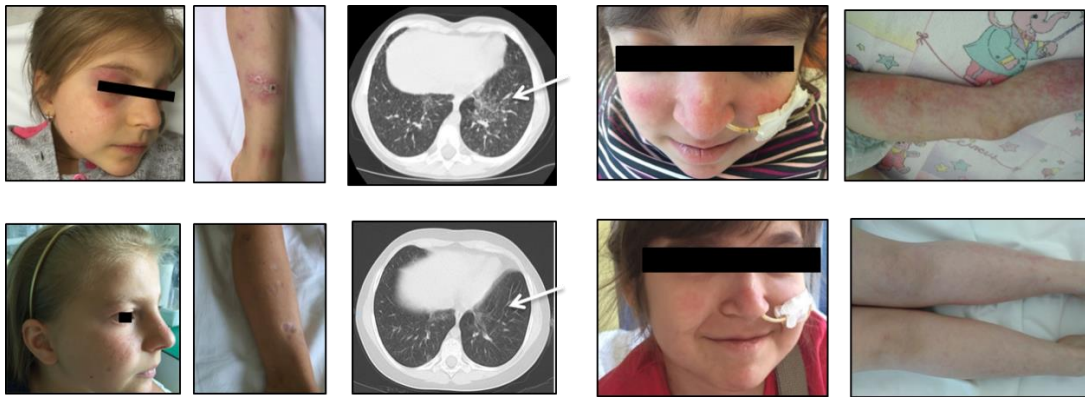


Figura 18. Effetti della terapia con JAK inibitori nelle pazienti affette da sindrome SAVI

Infine, è interessante sottolineare che il biomarker sviluppato potrebbe avere una potenzialità predittiva della risposta terapeutica a questi farmaci, non solo nel trattamento delle interferonopatie, ma in tutti quei disturbi che presentino un'augmentata espressione dei geni indotti dall'interferone, come nel caso del lupus eritematoso sistemico.

7. Conclusioni

In questi ultimi anni lo sviluppo delle nuove tecniche di sequenziamento genetico (Next Generation Sequencing, NGS e Whole Exome Sequencing, WES) hanno notevolmente rivoluzionato il campo delle malattie autoinfiammatorie, tra le quali è stata recentemente definita la classe delle interferonopatie. Queste malattie devono essere prese in considerazione all'interno di coorti di pazienti con patologie reumatologiche pediatriche, qualora vi sia un esordio precoce, una presentazione clinica particolarmente grave e la presenza di sintomi atipici rispetto alle classiche malattie reumatologiche, oltre ad una scarsa risposta alle terapie convenzionali. L'Interferon Score, basato sulla misurazione dell'attivazione dei geni coinvolti nella via dell'interferone di tipo I, rappresenta un utile strumento di screening per la diagnosi delle interferonopatie. Questo può, infatti, guidare all'esecuzione dell'indagine genetica in pazienti con sintomatologia clinica suggestiva, fondamentale per la diagnosi finale di malattia e, quindi, per l'avvio di trattamenti specifici in grado di bloccare le vie di segnale alterate, terapie che in recenti trial hanno permesso di ottenere un buon risultato clinico in pazienti fino ad oggi orfani di terapia e resistenti ai farmaci immunosoppressori o biologici convenzionali.

8. Bibliografia

1. Borghini S, Tassi S, Chiesa S, Caroli F, Carta S, Caorsi R, et al. Clinical Presentation and Pathogenesis of Cold-Induced Autoinflammatory Disease in a Family With Recurrence of an NLRP12 Mutation. *Arthritis Rheum.* marzo 2011;63(3):830–9.
2. Shen M, Tang L, Shi X, Zeng X, Yao Q. NLRP12 autoinflammatory disease: a Chinese case series and literature review. *Clin Rheumatol.* luglio 2017;36(7):1661–7.
3. Romberg N, Al Moussawi K, Nelson-Williams C, Stiegler AL, Loring E, Choi M, et al. Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation. *Nat Genet.* ottobre 2014;46(10):1135–9.
4. Canna SW, de Jesus AA, Gouni S, Brooks SR, Marrero B, Liu Y, et al. An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. *Nat Genet.* ottobre 2014;46(10):1140–6.
5. Jordan CT, Cao L, Roberson EDO, Pierson KC, Yang C-F, Joyce CE, et al. PSORS2 Is Due to Mutations in CARD14. *Am J Hum Genet.* 4 maggio 2012;90(5):784–95.
6. Fuchs-Telem D, Sarig O, van Steensel MAM, Isakov O, Israeli S, Noursbeck J, et al. Familial Pityriasis Rubra Pilaris Is Caused by Mutations in CARD14. *Am J Hum Genet.* 13 luglio 2012;91(1):163–70.
7. Vece TJ, Watkin LB, Nicholas S, Canter D, Braun MC, Guillerman RP, et al. Copa Syndrome: A Novel Autosomal Dominant Immune Dysregulatory Disease. *J Clin Immunol.* maggio 2016;36(4):377–87.
8. Zhou Q, Yang D, Ombrello AK, Zavialov AV, Toro C, Zavialov AV, et al. Early-onset stroke and vasculopathy associated with mutations in ADA2. *N Engl J Med.* 6 marzo 2014;370(10):911–20.
9. Liu Y, Jesus AA, Marrero B, Yang D, Ramsey SE, Montealegre Sanchez GA, et al. Activated STING in a Vascular and Pulmonary Syndrome. *N Engl J Med.* 7 agosto 2014;371(6):507–18.
10. Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early onset autoinflammatory syndrome. *Nat Genet.* gennaio 2016;48(1):67–73.
11. Krainer J, Siebenhandl S, Weinhäusel A. Systemic autoinflammatory diseases. *J Autoimmun.* 1 febbraio 2020;102421.
12. Touitou I, Aksentijevich I. Genetic Approach to the Diagnosis of Autoinflammatory Diseases. In: Hashkes PJ, Laxer RM, Simon A, curatori. *Textbook of Autoinflammation* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citato 20 marzo 2020]. pag. 225–37. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-98605-0_12
13. Crow YJ. Type I interferonopathies: a novel set of inborn errors of immunity. *Ann N Y Acad Sci.* novembre 2011;1238:91–8.
14. Isaacs A, Lindenmann J, Andrewes CH. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond Ser B - Biol Sci.* 12 settembre 1957;147(927):258–67.

15. Rönnblom L. The importance of the type I interferon system in autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol.* agosto 2016;34(4 Suppl 98):21–4.
16. Hardy MP, Owczarek CM, Jermin LS, Ejdebäck M, Hertzog PJ. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics.* 1 agosto 2004;84(2):331–45.
17. Marks ZRC, Campbell N, deWeerd NA, Lim SS, Gearing LJ, Bourke NM, et al. PROPERTIES AND FUNCTIONS OF THE NOVEL TYPE I INTERFERON EPSILON. *Semin Immunol.* 1 giugno 2019;43:101328.
18. Cavlar T, Ablasser A, Hornung V. Induction of type I IFNs by intracellular DNA-sensing pathways. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(5):474–82.
19. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic-GMP-AMP Is An Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science* [Internet]. 15 febbraio 2013 [citato 26 marzo 2020];339(6121). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3855410/>
20. Dobbs N, Burnaevskiy N, Chen D, Gonugunta VK, Alto NM, Yan N. STING activation by translocation from the ER is associated with infection and autoinflammatory disease. *Cell Host Microbe.* 12 agosto 2015;18(2):157–68.
21. 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.* 30 gennaio 1998;273(5):2714–20.
22. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature.* aprile 2005;434(7034):772–7.
23. Andersen LL, Mørk N, Reinert LS, Kofod-Olsen E, Narita R, Jørgensen SE, et al. Functional IRF3 deficiency in a patient with herpes simplex encephalitis. *J Exp Med.* 24 agosto 2015;212(9):1371–9.
24. Ciancanelli MJ, Huang SXL, Luthra P, Garner H, Itan Y, Volpi S, et al. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science.* 24 aprile 2015;348(6233):448–53.
25. Sancho-Shimizu V, de Diego RP, Jouanguy E, Zhang S-Y, Casanova J-L. Inborn errors of anti-viral interferon immunity in humans. *Curr Opin Virol.* dicembre 2011;1(6):487–96.
26. Schreiber G. The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J Biol Chem.* 5 maggio 2017;292(18):7285–94.
27. Wang W-B, Levy DE, Lee C-K. STAT3 Negatively Regulates Type I IFN-Mediated Antiviral Response. *J Immunol.* 1 settembre 2011;187(5):2578–85.
28. Jaks E, Gavutis M, Uzé G, Martal J, Piehler J. Differential Receptor Subunit Affinities of Type I Interferons Govern Differential Signal Activation. *J Mol Biol.* 16 febbraio 2007;366(2):525–39.
29. Lavoie TB, Kalie E, Crisafulli-Cabatu S, Abramovich R, DiGioia G, Moolchan K, et al. Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine.* 1 novembre 2011;56(2):282–9.

30. Easlick J, Szubin R, Lantz S, Baumgarth N, Abel K. The early interferon alpha subtype response in infant macaques infected orally with SIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 1 settembre 2010;55(1):14–28.
31. Gresser I, Morel-Maroger L, Rivière Y, Guillon J-C, Tovey MG, Woodrow D, et al. Interferon-Induced Disease in Mice and Rats*. *Ann N Y Acad Sci.* 1980;350(1):12–20.
32. Gresser J, Morel-Maroger L, Verroust P, Rivière Y, Guillon JC. Anti-interferon globulin inhibits the development of glomerulonephritis in mice infected at birth with lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* luglio 1978;75(7):3413–6.
33. Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, Robins P, Leitch A, Ali M, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat Genet.* agosto 2006;38(8):917–20.
34. Crow YJ, Leitch A, Hayward BE, Garner A, Parmar R, Griffith E, et al. Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat Genet.* agosto 2006;38(8):910–6.
35. Rice GI, Bond J, Asipu A, Brunette RL, Manfield IW, Carr IM, et al. Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat Genet.* luglio 2009;41(7):829–32.
36. Rice GI, Kasher PR, Forte GMA, Mannion NM, Greenwood SM, Szykiewicz M, et al. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat Genet.* novembre 2012;44(11):1243–8.
37. Rice GI, Del Toro Duany Y, Jenkinson EM, Forte GM, Anderson BH, Ariaudo G, et al. Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat Genet.* maggio 2014;46(5):503–9.
38. Jang M-A, Kim EK, Now H, Nguyen NTH, Kim W-J, Yoo J-Y, et al. Mutations in DDX58, which encodes RIG-I, cause atypical Singleton-Merten syndrome. *Am J Hum Genet.* 5 febbraio 2015;96(2):266–74.
39. Liu Y, Jesus AA, Marrero B, Yang D, Ramsey SE, Sanchez GAM, et al. Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome. *N Engl J Med.* 7 agosto 2014;371(6):507–18.
40. Gruber C, Martin-Fernandez M, Ailal F, Qiu X, Taft J, Altman J, et al. Homozygous STAT2 gain-of-function mutation by loss of USP18 activity in a patient with type I interferonopathy. *J Exp Med.* 4 maggio 2020;217(5).
41. Zhang X, Bogunovic D, Payelle-Brogard B, Francois-Newton V, Speer SD, Yuan C, et al. Human intracellular ISG15 prevents interferon- α/β over-amplification and auto-inflammation. *Nature.* 1 gennaio 2015;517(7532):89–93.
42. Alsohime F, Martin-Fernandez M, Temsah M-H, Alabdulhafid M, Le Voyer T, Alghamdi M, et al. JAK Inhibitor Therapy in a Child with Inherited USP18 Deficiency. *N Engl J Med.* 16 2020;382(3):256–65.
43. Aicardi J, Goutières F. A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann Neurol.* gennaio 1984;15(1):49–54.
44. 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.* 1 aprile 1988;84(2):201–8.

45. Crow YJ, Chase DS, Lowenstein Schmidt J, Szykiewicz M, Forte GMA, Gornall HL, et al. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am J Med Genet A*. febbraio 2015;167A(2):296–312.
46. Rice GI, Forte GMA, Szykiewicz M, Chase DS, Aeby A, Abdel-Hamid MS, 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*. dicembre 2013;12(12):1159–69.
47. Meuwissen MEC, Schot R, Buta S, Oudesluijs G, Tinschert S, Speer SD, et al. Human USP18 deficiency underlies type 1 interferonopathy leading to severe pseudo-TORCH syndrome. *J Exp Med*. 27 giugno 2016;213(7):1163–74.
48. Rice GI, Meyzer C, Bouazza N, Hully M, Boddaert N, Semeraro M, et al. Reverse-Transcriptase Inhibitors in the Aicardi–Goutières Syndrome. *N Engl J Med*. 06 2018;379(23):2275–7.
49. Kothur K, Bandodkar S, Chu S, Wienholt L, Johnson A, Barclay P, et al. An open-label trial of JAK 1/2 blockade in progressive IFIH1-associated neuroinflammation. *Neurology*. 06 2018;90(6):289–91.
50. Dai J, Huang Y-J, He X, Zhao M, Wang X, Liu Z-S, et al. Acetylation Blocks cGAS Activity and Inhibits Self-DNA-Induced Autoimmunity. *Cell*. 07 2019;176(6):1447-1460.e14.
51. Singleton EB, Merten DF. An unusual syndrome of widened medullary cavities of the metacarpals and phalanges, aortic calcification and abnormal dentition. *Pediatr Radiol*. marzo 1973;1(1):2–7.
52. Rutsch F, MacDougall M, Lu C, Buers I, Mamaeva O, Nitschke Y, et al. A specific IFIH1 gain-of-function mutation causes Singleton-Merten syndrome. *Am J Hum Genet*. 5 febbraio 2015;96(2):275–82.
53. Jang M-A, Kim EK, Now H, Nguyen NTH, Kim W-J, Yoo J-Y, et al. Mutations in DDX58, which encodes RIG-I, cause atypical Singleton-Merten syndrome. *Am J Hum Genet*. 5 febbraio 2015;96(2):266–74.
54. Liddicoat BJ, Piskol R, Chalk AM, Ramaswami G, Higuchi M, Hartner JC, et al. RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself. *Science*. 4 settembre 2015;349(6252):1115–20.
55. Arima K, Kinoshita A, Mishima H, Kanazawa N, Kaneko T, Mizushima T, et al. Proteasome assembly defect due to a proteasome subunit beta type 8 (PSMB8) mutation causes the autoinflammatory disorder, Nakajo-Nishimura syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 settembre 2011;108(36):14914–9.
56. Liu Y, Ramot Y, Torrelo A, Paller AS, Si N, Babay S, et al. Mutations in proteasome subunit β type 8 cause chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature with evidence of genetic and phenotypic heterogeneity. *Arthritis Rheum*. marzo 2012;64(3):895–907.
57. Kitamura A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kawachi I, Nishizawa M, et al. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J Clin Invest*. ottobre 2011;121(10):4150–60.
58. Agarwal AK, Xing C, DeMartino GN, Mizrachi D, Hernandez MD, Sousa AB, et al. PSMB8 encoding the β 5i proteasome subunit is mutated in joint contractures, muscle atrophy,

microcytic anemia, and panniculitis-induced lipodystrophy syndrome. *Am J Hum Genet.* 10 dicembre 2010;87(6):866–72.

59. Kitano Y, Matsunaga E, Morimoto T, Okada N, Sano S. A syndrome with nodular erythema, elongated and thickened fingers, and emaciation. *Arch Dermatol.* agosto 1985;121(8):1053–6.

60. Oyanagi K, Sasaki K, Ohama E, Ikuta F, Kawakami A, Miyatani N, et al. An autopsy case of a syndrome with muscular atrophy, decreased subcutaneous fat, skin eruption and hyper γ -globulinemia: peculiar vascular changes and muscle fiber degeneration. *Acta Neuropathol (Berl).* 1 dicembre 1987;73(4):313–9.

61. Tanaka M, Miyatani N, Yamada S, Miyashita K, Toyoshima I, Sakuma K, et al. Hereditary lipo-muscular atrophy with joint contracture, skin eruptions and hyper-gamma-globulinemia: a new syndrome. *Intern Med Tokyo Jpn.* gennaio 1993;32(1):42–5.

62. Torrelo A, Patel S, Colmenero I, Gurbindo D, Lendínez F, Hernández A, et al. Chronic atypical neutrophilic dermatosis with lipodystrophy and elevated temperature (CANDLE) syndrome. *J Am Acad Dermatol.* marzo 2010;62(3):489–95.

63. Sarabay G, Méchin D, Salhi A, Boursier G, Rittore C, Crow Y, et al. PSMB10, the last immunoproteasome gene missing for PRAAS. *J Allergy Clin Immunol.* 1 marzo 2020;145(3):1015-1017.e6.

64. de Jesus AA, Brehm A, VanTries R, Pillet P, Parentelli A-S, Montealegre Sanchez GA, et al. Novel proteasome assembly chaperone mutations in PSMG2/PAC2 cause the autoinflammatory interferonopathy CANDLE/PRAAS4. *J Allergy Clin Immunol.* maggio 2019;143(5):1939-1943.e8.

65. Sanchez GAM, Reinhardt A, Ramsey S, Wittkowski H, Hashkes PJ, Berkun Y, et al. JAK1/2 inhibition with baricitinib in the treatment of autoinflammatory interferonopathies. *J Clin Invest.* 02 2018;128(7):3041–52.

66. Dobbs N, Burnaevskiy N, Chen D, Gonugunta VK, Alto NM, Yan N. STING Activation by Translocation from the ER Is Associated with Infection and Autoinflammatory Disease. *Cell Host Microbe.* 12 agosto 2015;18(2):157–68.

67. Jeremiah N, Neven B, Gentili M, Callebaut I, Maschalidi S, Stolzenberg M-C, et al. Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations. *J Clin Invest.* dicembre 2014;124(12):5516–20.

68. Chia J, Eroglu FK, Özen S, Orhan D, Montealegre-Sanchez G, de Jesus AA, et al. Failure to thrive, interstitial lung disease, and progressive digital necrosis with onset in infancy. *J Am Acad Dermatol.* gennaio 2016;74(1):186–9.

69. Omoyinmi E, Melo Gomes S, Nanthapaisal S, Woo P, Standing A, Eleftheriou D, et al. Stimulator of interferon genes-associated vasculitis of infancy. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* marzo 2015;67(3):808.

70. Munoz J, Rodière M, Jeremiah N, Rieux-Laucat F, Oojageer A, Rice GI, et al. Stimulator of Interferon Genes-Associated Vasculopathy With Onset in Infancy: A Mimic of Childhood Granulomatosis With Polyangiitis. *JAMA Dermatol.* agosto 2015;151(8):872–7.

71. Guillerman RP. Imaging of Childhood Interstitial Lung Disease. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol.* marzo 2010;23(1):43–68.

72. Volpi S, Insalaco A, Caorsi R, Santori E, Messia V, Sacco O, et al. Efficacy and Adverse Events During Janus Kinase Inhibitor Treatment of SAVI Syndrome. *J Clin Immunol.* luglio 2019;39(5):476–85.
73. Frémond M-L, Rodero MP, Jeremiah N, Belot A, Jeziorski E, Duffy D, 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(6):1752–5.
74. Watkin LB, Jessen B, Wiszniewski W, Vece TJ, Jan M, Sha Y, et al. COPA mutations impair ER-Golgi transport and cause hereditary autoimmune-mediated lung disease and arthritis. *Nat Genet.* giugno 2015;47(6):654–60.
75. Vece TJ, Watkin LB, Nicholas SK, Canter D, Braun MC, Guillerman RP, et al. CopA Syndrome: a Novel Autosomal Dominant Immune Dysregulatory Disease. *J Clin Immunol.* 1 maggio 2016;36(4):377–87.
76. Volpi S, Tsui J, Mariani M, Pastorino C, Caorsi R, Sacco O, et al. Type I interferon pathway activation in COPA syndrome. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2018;187:33–6.
77. Krutzke S, Rietschel C, Horneff G. Baricitinib in therapy of COPA syndrome in a 15-year-old girl. *Eur J Rheumatol.* 20 agosto 2019;1–4.
78. Briggs TA, Rice GI, Daly S, Urquhart J, Gornall H, Bader-Meunier B, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase deficiency causes a bone dysplasia with autoimmunity and a type I interferon expression signature. *Nat Genet.* febbraio 2011;43(2):127–31.
79. Lausch E, Janecke A, Bros M, Trojandt S, Alanay Y, De Laet C, et al. Genetic deficiency of tartrate-resistant acid phosphatase associated with skeletal dysplasia, cerebral calcifications and autoimmunity. *Nat Genet.* febbraio 2011;43(2):132–7.
80. Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MBF, Kobayashi KS, Glimcher LH, et al. Osteopontin expression is essential for interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol.* maggio 2006;7(5):498–506.
81. Cantor H, Shinohara ML. Regulation of T-helper-cell lineage development by osteopontin: the inside story. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(2):137–41.
82. Sisirak V, Sally B, D’Agati V, Martinez-Ortiz W, Özçakar ZB, David J, et al. Digestion of Chromatin in Apoptotic Cell Microparticles Prevents Autoimmunity. *Cell.* 30 giugno 2016;166(1):88–101.
83. Al-Mayouf SM, Sunker A, Abdwani R, Arawi SA, Almurshedi F, Alhashmi N, et al. Loss-of-function variant in DNASE1L3 causes a familial form of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 23 ottobre 2011;43(12):1186–8.
84. Özçakar ZB, Foster J, Diaz-Horta O, Kasapcopur O, Fan Y-S, Yalçınkaya F, et al. DNASE1L3 mutations in hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Arthritis Rheum.* agosto 2013;65(8):2183–9.
85. Rice GI, Melki I, Frémond M-L, Briggs TA, Rodero MP, Kitabayashi N, et al. Assessment of Type I Interferon Signaling in Pediatric Inflammatory Disease. *J Clin Immunol.* 2017;37(2):123–32.
86. 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.* gennaio 2005;6(1):49–56.

87. Rodero MP, Tesser A, Bartok E, Rice GI, Della Mina E, Depp M, et al. Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency. *Nat Commun.* 19 dicembre 2017;8(1):1–15.
88. Rodero MP, Decalf J, Bondet V, Hunt D, Rice GI, Werneke S, et al. Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease. *J Exp Med.* 01 2017;214(5):1547–55.
89. Rice GI, Forte GMA, Szykiewicz M, Chase DS, Aeby A, Abdel-Hamid MS, 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.* dicembre 2013;12(12):1159–69.
90. Pescarmona R, Belot A, Villard M, Besson L, Lopez J, Mosnier I, et al. Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. *Cytokine.* 2019;113:446–52.
91. Pin A, Monasta L, Taddio A, Piscianz E, Tommasini A, Tesser A. An Easy and Reliable Strategy for Making Type I Interferon Signature Analysis Comparable among Research Centers. *Diagnostics* [Internet]. 4 settembre 2019 [citato 16 aprile 2020];9(3). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6787630/>
92. Kim H, de Jesus AA, Brooks SR, Liu Y, Huang Y, VanTries R, et al. Development of a Validated Interferon Score Using NanoString Technology. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* 2018;38(4):171–85.
93. Henrickson M, Wang H. Tocilizumab reverses cerebral vasculopathy in a patient with homozygous SAMHD1 mutation. *Clin Rheumatol.* 2017;36(6):1445–51.
94. Tsui JL, Estrada OA, Deng Z, Wang KM, Law CS, Elicker BM, et al. Analysis of pulmonary features and treatment approaches in the COPA syndrome. *ERJ Open Res.* aprile 2018;4(2).
95. Hayashi M, Kikuchi T, Takada T. Mycophenolate mofetil for the patients with interstitial lung diseases in amyopathic dermatomyositis with anti-MDA-5 antibodies. *Clin Rheumatol.* gennaio 2017;36(1):239–40.
96. Hoa S, Troyanov Y, Fritzler MJ, Targoff IN, Chartrand S, Mansour AM, et al. Describing and expanding the clinical phenotype of anti-MDA5-associated rapidly progressive interstitial lung disease: case series of nine Canadian patients and literature review. *Scand J Rheumatol.* 2018;47(3):210–24.
97. Parperis K, Kiyani A. Clinically amyopathic dermatomyositis associated with anti-MDA5 antibody. *BMJ Case Rep.* 4 gennaio 2018;2018.
98. Zhang SH, Zhao Y, Xie QB, Jiang Y, Wu YK, Yan B. Aberrant activation of the type I interferon system may contribute to the pathogenesis of anti-melanoma differentiation-associated gene 5 dermatomyositis. *Br J Dermatol.* 2019;180(5):1090–8.
99. Spetie DN, Tang Y, Rovin BH, Nadasdy T, Nadasdy G, Pesavento TE, et al. Mycophenolate therapy of SLE membranous nephropathy. *Kidney Int.* dicembre 2004;66(6):2411–5.
100. 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.* 2018;25(24):2797–810.

101. An J, Woodward JJ, Sasaki T, Minie M, Elkon KB. Cutting edge: Antimalarial drugs inhibit IFN- β production through blockade of cyclic GMP-AMP synthase-DNA interaction. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 maggio 2015;194(9):4089–93.
102. Ghoreschi K, Gadina M. Jakpot! New small molecules in autoimmune and inflammatory diseases. *Exp Dermatol*. gennaio 2014;23(1):7–11.
103. Meesilpavikkai K, Dik WA, Schrijver B, van Helden-Meeuwssen CG, Versnel MA, van Hagen PM, et al. Efficacy of Baricitinib in the Treatment of Chilblains Associated With Aicardi-Goutières Syndrome, a Type I Interferonopathy. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2019;71(5):829–31.
104. Yu Z-X, Song H-M. Toward a better understanding of type I interferonopathies: a brief summary, update and beyond. *World J Pediatr*. 1 febbraio 2020;16(1):44–51.
105. Baker KF, Isaacs JD. Novel therapies for immune-mediated inflammatory diseases: What can we learn from their use in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis? *Ann Rheum Dis*. 2018;77(2):175–87.
106. Furie R, Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, Kalunian K, Brohawn P, et al. Anifrolumab, an Anti-Interferon- α Receptor Monoclonal Antibody, in Moderate-to-Severe Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2017;69(2):376–86.
107. Cao J, Sun L, Aramsangtienchai P, Spiegelman NA, Zhang X, Huang W, et al. HDAC11 regulates type I interferon signaling through defatty-acylation of SHMT2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 2019;116(12):5487–92.
108. Toplak N, Frenkel J, Ozen S, Lachmann HJ, Woo P, Koné-Paut I, et al. An international registry on autoinflammatory diseases: the Eurofever experience. *Ann Rheum Dis*. luglio 2012;71(7):1177–82.
109. Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, Notkins AL. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med*. 5 luglio 1979;301(1):5–8.
110. Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Notkins AL. The role of interferon in immediate hypersensitivity and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;350:21–32.
111. Petri M, Wallace DJ, Spindler A, Chindalore V, Kalunian K, Mysler E, et al. Sifalimumab, a human anti-interferon- α monoclonal antibody, in systemic lupus erythematosus: a phase I randomized, controlled, dose-escalation study. *Arthritis Rheum*. aprile 2013;65(4):1011–21.
112. Yao Y, Higgs BW, Morehouse C, de los Reyes M, Trigona W, Brohawn P, et al. Development of Potential Pharmacodynamic and Diagnostic Markers for Anti-IFN- α Monoclonal Antibody Trials in Systemic Lupus Erythematosus. *Hum Genomics Proteomics HGP* [Internet]. 17 novembre 2009 [citato 14 maggio 2020];2009. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950308/>
113. Higgs BW, Liu Z, White B, Zhu W, White WI, Morehouse C, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis*. novembre 2011;70(11):2029–36.
114. Yao Y, Richman L, Higgs BW, Morehouse CA, de los Reyes M, Brohawn P, et al. Neutralization of interferon-alpha/beta-inducible genes and downstream effect in a phase I

trial of an anti-interferon-alpha monoclonal antibody in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* giugno 2009;60(6):1785–96.

115. Ahn J, Gutman D, Saijo S, Barber GN. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 novembre 2012;109(47):19386–91.

116. Özçakar ZB, Foster J, Diaz-Horta O, Kasapcopur O, Fan Y-S, Yalçınkaya F, et al. DNASE1L3 mutations in hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Arthritis Rheum.* agosto 2013;65(8):2183–9.

117. Davis MDP, Brewer JD. Urticarial vasculitis and hypocomplementemic urticarial vasculitis syndrome. *Immunol Allergy Clin North Am.* maggio 2004;24(2):183–213, vi.

118. Davis MD, Daoud MS, Kirby B, Gibson LE, Rogers RS. Clinicopathologic correlation of hypocomplementemic and normocomplementemic urticarial vasculitis. *J Am Acad Dermatol.* giugno 1998;38(6 Pt 1):899–905.

119. Tang ED, Wang C-Y. Single Amino Acid Change in STING Leads to Constitutive Active Signaling. *PLoS ONE* [Internet]. 19 marzo 2015 [citato 30 giugno 2020];10(3). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4366210/>

120. Shiota M, Yang X, Kubokawa M, Morishima T, Tanaka K, Mikami M, et al. Somatic mosaicism for a NRAS mutation associates with disparate clinical features in RAS-associated leukoproliferative disease: a report of two cases. *J Clin Immunol.* luglio 2015;35(5):454–8.