



## **TESI DOCTORAL**

**Nous aspectes fisiopatogènics en la dermatomiositis**

Doctorand

Xavier Suárez-Calvet

Directora

Isabel Illa Sendra

DEPARTAMENT DE MEDICINA

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

2015

*Als meus pares  
Als meus germans  
A la Marta*

## Agraïments

En primer lloc vull fer un petit homenatge molt sincer a tots els que han fet possible aquesta tesi directe o indirectament, i ensenyar-me a ser cada dia millor persona i científic. Aquesta tesi també és vostra.

Agraïr a la meva directora de tesi, a la Isabel Illa, per haver-me donat la oportunitat de formar part del teu grup, per contagiarme les ganes d'aprendre i superar-se cada dia. Per ensenyar-me a disfrutar de la recerca sense perdre mai de vista als pacients.

A l'Eduard, per les incontables hores d'ajut i paciència al lab, pels teus savis consells en moments difícils i per transmetre'm dia a dia la passió per aquesta feina.

Al laboratori cada detall és important, i tots vosaltres m'heu ensenyat a veure'ls, a cuidar-los i a aprendre'n. A la Gisela, Noemí i Luis, per aguantar-me abans i després de cada experiment. Al Jordi i al Ricard, per estar sempre disposats a col·laborar i a riure. A la Bàrbara i al Miquel, per compartir tants bons moments dins i fora del lab. A la Fina, perquè tot i tenir els buffers més llunyants sempre has estat molt aprop. A la Sònia, Alba, Roser, Cinta, Patricia, Esther, Ana i Elena per compartir tantes hores de bon rollo. Gràcies a tots!

A tots els companys que han estat al lab i que han aportat també el seu gra de sorra per aquesta tesi, Eugenia, Aída, Matteo, Mireia, Carles, Raul, René i Carolina. Gràcies a tots!

Vull agrair a tots els pacients que, tot i la seva malaltia, estan disposats a col·laborar amb la recerca. Agraïr també a les entitats públiques i privades que han finançat aquest projecte.

Als veïns d'immunologia, pels inicis i per la seva disposició, al Cándido, la Bet, al Juan, a la M<sup>a</sup> Angels, al Germà i especialment a la Sílvia per la seva ajuda, força i per despertar-me la curiositat per la innata. Al Carlitos, perquè un germà no es troba a la universitat.

Vull agrair també als col·laboradors de fora de l'hospital que han estat essencials en aquesta tesi. Al companys del Vall d'Hebrón, del Clínic i del IMIM.

Al Carlos i a la Laura, per la seva amistat i ajuda incondicional i per la seva participació en el disseny d'aquesta tesi.

A tota la meva família. Als avis, perquè heu estat un exemple i queda reflectit també en aquesta tesi. Al Juan i al Marc, aquesta tesi queda molt petita amb uns referents com vosaltres. I molt especialment a la Mare: sense el teu suport i amor aquest tesi mai hagués estat una realitat. I als nostres nens, a la Júlia i al Joan, per fer-nos viure i somiar.

A la Marta, per cada dia.

## Resum

Les miopaties inflamatòries són un grup de malalties neuromusculars molt heterogeni que es caracteritzen clínicament per la presència de debilitat muscular que pot arribar a ser invalidant. Aquest grup de malalties inclou la dermatomiositis (DM), la polimiositis, la miopatia per cossos d'inclusió i recentment s'hi ha inclòs la miopatia necrotitzant autoimmune. Per arribar a un diagnòstic precís és necessari l'estudi de la biòpsia muscular entre d'altres paràmetres clínics. La biòpsia muscular d'aquest grup de pacients es caracteritza per la presència d'infiltrats inflamatoris que fenotípicament i quantitativament varia a cada entitat. A més, s'observa la sobreexpressió del complex major d'histocompatibilitat de classe I (MHC-I) a les fibres musculars havent-li atribuït un paper patogènic. Fins ara no hi ha evidències de l'etiologia de la DM, havent-hi dues hipòtesis principals: la primera considera que la malaltia comença amb un atac autoimmune contra un antigen desconegut de l'endoteli muscular provocant la destrucció dels capil·lars i una hipòxia tissular. De fet a les biòpsies de pacients amb DM és característica una disminució dels capil·lars que, com a conseqüència, es pensa que provoca la típica atròfia perifascicular. La segona atribueix un paper principal a l'interferó (IFN) ja que múltiples gens induïts per IFN s'han trobat sobreregulats a la DM. L'origen de l'IFN s'ha atribuït als infiltrats inflamatoris. Per estudiar específicament la contribució del múscul a la patogènia d'aquestes malalties, evitant l'efecte confusor dels infiltrats inflamatoris, vam aïllar fibres musculars patològiques mitjançant microdissecció làser a partir de biòpsies musculars d'aquests pacients. L'anàlisi transcriptòmic de les fibres aïllades va demostrar una contribució específicament a la DM de la immunitat innata, de l'IFN de tipus I (IFN-I) i de la hipòxia. En particular, es va observar una sobreregulació de RIG-I a la DM, un receptor de la immunitat innata induïble per IFN i que fisiològicament reconeix àcids nucleics vírics per iniciar una resposta antivírica a través de IFN-I. Els estudis de immunofluorescència van demostrar que la sobreexpressió de RIG-I colocalitzava amb fibres MHC-I positives a la DM. Els estudis in vitro utilitzant miotubs humans va demostrar la capacitat de RIG-I d'induir una resposta de IFN $\beta$  –un subtipus de IFN-I- i com a conseqüència es sobreexpressava MHC-I i altre vegada RIG-I suggerint un mecanisme inflamatori auto-sustentat a la DM. A partir d'aquest primer resultat l'estudi va evolucionar al paper de la hipòxia en relació a la immunitat innata. La hipòxia està modulada principalment per un factor de transcripció clau anomenat HIF1 $\alpha$  que indueix l'expressió de gens que continguin al seu promotor unes seqüències específiques. Els estudis in silico i in vitro van demostrar que RIG-I és un gen induït per HIF1 $\alpha$ . Els resultats experimentals conclouen que la hipòxia és un fenomen primerenc en la seqüència d'esdeveniment fisiopatogènics en la DM ja que la sobreexpressió de RIG-I era capaç d'induir la seva activació i per tant, de promoure l'expressió d'IFN-I i en canvi, l'expressió de HIF1 $\alpha$  no es modificava per l'estimulació amb interferons. Finalment es va avaluar la utilitat de RIG-I com a biomarcador histològic per la DM. A partir de 115 biòpsies musculars incloent malalties neuromusculars que podien confondre's clínicament o histològicament amb la DM, vam demostrar que RIG-I és un biomarcador més sensible que la atrofia perifascicular per la DM (50% a la DM vs 11% a la resta). De fet, en els pacients amb DM on a la biòpsia l'atròfia perifascicular no era evident, un 32% dels pacients eren RIG-I positius. Analitzant la reproductibilitat de la interpretació de l'atròfia perifascicular i RIG-I, vam trobar que RIG-I era un biomarcador

més fàcilment interpretable que la atrofia perifascicular. Com a conclusió, aquesta tesi unifica les dues hipòtesis patogèniques actuals sobre la DM on la hipòxia es el primer esdeveniment que a través de RIG-I explica la signatura de IFN-I.

## **Abstract**

Inflammatory myopathies are an heterogeneous group of neuromuscular diseases that are clinically characterized by the presence of muscle weakness that leads to disability. This group of diseases includes dermatomyositis (DM), polymyositis, inclusion body myositis and recently, necrotizing autoimmune myopathies have also been included. The study of the muscle biopsy, among other parameters, is necessary to obtain an accurate diagnosis. The muscle biopsy of these patients is characterized by the presence of inflammatory infiltrates that vary phenotypically and quantitatively in each entity. However, overexpression of the major histocompatibility complex class I (MHC-I) is shared by all these entities and it is believed that it has a pathogenic role. Until now, the etiology of DM is a matter of debate but there are two main hypotheses: The first hypothesis considers that the disease starts with an autoimmune attack against unknown antigens in the endothelium leading to the destruction of capillaries promoting, eventually, tissular hypoxia and muscle fiber atrophy. In fact, in the muscle biopsies of DM patients there is a characteristic reduction in the number of capillaries and perifascicular atrophy. The second hypothesis is based on the role of type I interferons (IFN-I). Experiments of gene expression analysis have demonstrated upregulation of multiple IFN-I-induced genes in DM. The origin of this IFN-I has been attributed to perimysial inflammatory infiltrates. To study the pathological mechanisms that occur specifically in the muscle fibers we isolated MHC-I positive muscle fibers using laser-microdissection from the muscle biopsies of these patients. This technology allowed us to exclude inflammatory infiltrates that could interfere with the results. The transcriptomic profile of the isolated fibers demonstrated a significant contribution of innate immunity, IFN-I and hypoxia specifically in DM. In particular, we observed the upregulation of RIG-I in DM, a receptor of the innate immunity that recognizes nucleic acids derived from virus to initiate an antiviral response and promoting IFN-I. Immunofluorescence studies demonstrated that RIG-I is overexpressed in MHC-I-expressing fibers in DM. In vitro studies using human myotubes showed the ability of RIG-I to induce the secretion of IFN $\beta$  – an IFN-I subtype – and as a consequence, induced the expression of MHC-I and RIG-I itself, suggesting a self sustained autoimmune mechanism in DM. These results prompted us to evaluate the relation between hypoxia and innate immunity. Hypoxia is mainly modulated by a key transcription factor named HIF1 $\alpha$  that induces the expression of genes that contain specific sequences in its promoter. Our studies in silico and in vitro demonstrated that RIG-I is an HIF-inducible gene. From these studies, we concluded that hypoxia is a primary event in the pathogenic sequence of events in DM because the overexpression of RIG-I was able to induce its own activation promoting the expression of IFN-I-stimulated genes. In contrast, the expression of HIF1 $\alpha$  was not modified by the stimulation of IFNs. Finally we evaluated the utility of RIG-I as a histological biomarker for DM. We studied 115 muscle biopsies using immunohistochemistry including diseases that may be confused clinically or histologically with DM. We demonstrated that RIG-I has a higher sensitivity than perifascicular atrophy for DM diagnosis (50% in

DM vs 11 % in non-DM). Interestingly, 32% of patients with DM in whom perifascicular atrophy was not evident, showed expression of RIG-I at the perifascicular areas. We analyzed the reproducibility of perifascicular atrophy and RIG-I staining and we found that RIG-I has a higher reproducibility and therefore constitutes a more easily interpretable biomarker than perifascicular atrophy. We conclude that this thesis unifies both current hypotheses on DM pathogenesis and shows that hypoxia contributes to the pathology of DM by activating the RIG-I signaling pathway and consequently inducing IFN-I expression.

## Abreviatures

**ALR:** *AIM2-like receptors*  
**AR:** Artritis reumatoide  
**ASS:** Síndrome anti-sintetasa  
**ATP:** *Adenosine triphosphate*  
**BAFF:** *B-cell activating factor*  
**BDCA2:** *Blood dendritic cell antigen 2*  
**CARD:** *Caspase activation and recruitment domains*  
**CD:** *Cluster of differentiation*  
**cDNA:** DNA complementari  
**CK:** Creatina quinasa  
**CLR:** *C-type lectin receptors*  
**CMV:** Citomegalovirus  
**CTD:** *C-terminal domain*  
**CYLD:** Cylindromatosis  
**DAB:** 3,3'-Diaminobenzidina  
**DAMP:** *Danger-associated molecular pattern*  
**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol  
**DDX58:** *DEAD box helicase 58*  
**DM:** Dermatomiositis  
**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's medium*  
**dsRNA:** RNA de doble cadena  
**Dysf:** Disferlinopatia  
**FC:** *Fold change*  
**FSHD:** *Facioscapulohumeral muscular dystrophy*  
**HIF1 $\alpha$ :** *Hypoxia-inducible factor 1 alpha*  
**HLA:** *Human leukocyte antigen*  
**HMGCR:** 3-hidroxi-3-metilglutari-CoA reductasa  
**HRE:** *Hypoxia response elements*  
**I/R:** Isquèmia-reperfusió  
**IBM:** *Inclusion body myositis*  
**IFIH1:** *Interferon induced with helicase C domain 1*  
**IFN:** Interferó  
**IL:** Interleucina  
**IMNM:** *Immune-mediated necrotizing myopathy*  
**IRF:** *Interferon-related factors*  
**ISG15:** *Interferon-stimulated gene 15*  
**LGP2:** *Laboratory of Genetics and Physiology 2*  
**MAC:** *Membrane attack complex*  
**MAP:** *Mitogen-activated protein kinase*  
**MAVS:** *Mitochondrial antiviral-signaling protein*  
**MCTD:** *Mixed connective tissue disease*  
**MDA5:** *Melanoma Differentiation Associated-protein 5*  
**MHC-I:** *Major histocompatibility complex class I*  
**mRNA:** *RNA missatger*  
**MxA:** *Mixovirus resistance A*

**MyD88:** *Myeloid differentiation primary response 88*  
**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
**NLR:** *Nod-like receptors*  
**OAS-1:** *2'-5'-oligoadenylate synthetase 1*  
**PAMP:** *Pathogen-associated molecular pattern*  
**PAS:** *Periodic acid–Schiff*  
**pb:** *Pairell de bases*  
**PBS:** *Phosphate buffered saline*  
**PHD:** *Prolyl hidroxilase*  
**PM:** *Polimiositis*  
**PRR:** *Pattern-recognition receptor*  
**qPCR:** *Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa*  
**RIG-I:** *Retinoic acid-inducible gene 1*  
**RIN:** *RNA integrity number*  
**RLR:** *Rig-like receptors*  
**RQ:** *Relative quantification*  
**RSAD2:** *Radical S-adenosyl methionine domain containing 2*  
**SLE:** *Lupus eritematós sistèmic*  
**SRP:** *Signal recognition particle*  
**SSc:** *Escleroderma i escleromiositis*  
**ssDNA:** *DNA de simple cadena*  
**STAT:** *Signal Transducers and Activators of Transcription*  
**TIF1 $\gamma$ :** *Transcription intermediary factor 1 gamma*  
**TIR:** *Toll/interleukin-1 receptor*  
**TLR:** *Toll-like receptors*  
**TRIF:** *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*   
**TRIM25:** *Tripartite motif 25*  
**UTR:** *Untranslated region*  
**VCAM-1:** *Vascular cell adhesion molecule 1*  
**WB:** *Western-blot*



# ÍNDEX

AGRAÏMENTS  
RESUM  
ABSTRACT  
ABREVIATURES

<b>I. INTRODUCCIÓ</b>	<b>11</b>
1. EL SISTEMA IMMUNOLÒGIC: Generalitats	12
1.1 La immunitat innata	13
1.1.1 Els receptors de reconeixement de patrons	14
Els “Toll-Like receptors”	14
Els “Rig-Like receptors”	16
RIG-I	16
1.1.2 El model de dany	19
1.2 Immunitat innata, IFN i autoimmunitat	21
2. LA HIPÒXIA	23
2.1 La resposta cel·lular a la hipòxia: el HIF	23
2.2 Hipòxia i inflamació	24
3. MALALTIES NEUROMUSCULARS	25
3.1 Les Miopaties inflamatòries	25
3.1.1 Polimiositis	26
3.1.2 Miopatia per cossos d’inclusió	27
3.1.3 Dermatomiositis	29
Clínica	30
Principals característiques histopatològiques	31
Patogènesis	32
Mecanismes no immunològics	33
La microangiopatia	33
Mecanismes immunològics	35
El paper de l’interferó	35
Altres citocines	36
La immunitat innata a la DM	36
3.1.4 Miopaties necrotitzants autoimmunes	37
3.2 Les Síndromes de superposició	38
<b>II. HIPÒTESI I OBJECTIUS</b>	<b>40</b>
<b>III. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>42</b>
1. Pacients	43
2. Microdissecció làser guiada per immunofluorescència	43
3. Biologia molecular	45
3.1 Microarrays	45
3.2 Extracció de RNA, retrotranscripció i qPCR	46
3.3 Clonatge, plàsmids i assaig de la luciferasa	46
4. Assajos <i>in vitro</i>	48
4.1 Cultius primaris humans de múscul esquelètic	48
4.2 Cultiu amb lligands de RIG-I i amb IFNs	49
4.3 Inhibició de d’IFN $\beta$ i TLR3	49
4.4 Inducció de la resposta a hipòxia	49
4.5 Cultiu i transfecció transitòria de la línia HEK293	50

5. Western blot	50
6. ELISA	50
7. Histoquímica, immunofluorescència, immunohistoquímica	51
8. Anàlisi de l'atrofia perifascicular a les biòpsies musculars	52
9. Estadística	

#### **IV. RESULTATS** **53**

##### **A. Microarrays, validació i els efectes de RIG-I en miotubs** **54**

- 1) Perfil transcriptòmic de fibres musculars MHC-I+ microdisseccionades.
- 2) Validació dels resultats *in vivo*.
- 3) Efecte de l'activació de RIG-I en miotubs humans
- 4) L'efecte de l'activació de RIG-I és dependent de IFN $\beta$  i independent de TLR3.

##### **B. L'efecte de la hipòxia als mecanismes immunes a la DM** **63**

- 5) Presència de gens induïts per hipòxia a la DM
- 6) Identificació d'elements de resposta a hipòxia (HRE) putatius al promotor humà del gen DDX58/RIG-I.
- 7) La sobreexpressió de RIG-I és dependent de HIF.
- 8) La hipòxia induïx l'expressió de RIG-I a miotubs humans
- 9) La hipòxia induïx RIG-I d'una manera independent d'IFN
- 10) La sobreexpressió de RIG-I induïx l'activació de la cascada de senyalització.
- 11) Efecte de la hipòxia en la diferenciació, atrofia muscular i metabolisme.

##### **C. Valor de l'expressió de RIG-I com a biomarcador a les biòpsies musculars de DM** **71**

- 12) L'atrofia perifascicular que afecta a dues files de fibres musculars s'associa a la DM.
- 13) L'expressió perifascicular de RIG-I s'associa a la DM.
- 14) Valor de l'atrofia perifascicular i l'expressió de RIG-I pel diagnòstic de DM.

#### **V. DISCUSSIÓ** **77**

#### **VI. CONCLUSIONS** **85**

#### **VII. BIBLIOGRAFIA** **88**

#### **VIII. ANNEXES** **98**

Suárez-Calvet X, Gallardo E, Nogales-Gadea G, Querol L, Navas M, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Illa I. Altered RIG-I/DDX58-mediated innate immunity in dermatomyositis. *J Pathol.* 2014 Jul;233(3):258-68. IF: 7.33

Greenberg SA. Sustained autoimmune mechanisms in dermatomyositis. *J Pathol.* 2014; Jul;233 (3):215-16.

# **I. Introducció**

# 1. EL SISTEMA IMMUNOLÒGIC: Generalitats

Els éssers vius estan constantment exposats a agents infecciosos i en la majoria de casos són capaços de combatre'ls i el sistema immunològic n'és el responsable. El sistema immunològic està compost de dues principals branques efectores: la immunitat innata o no específica i la immunitat adaptativa o específica. Encara que cada branca té la seva funció, hi ha una interacció entre les dues que permet una resposta eficient. De fet una activació inicial de la immunitat innata determinarà quina és la resposta adaptativa específica per controlar la infecció i preparar l'organisme per una possible segona exposició a través de la memòria immunològica<sup>1</sup>.

El sistema immune la majoria de vegades té efectes beneficiosos tot i que també pot produir efectes perjudicials. Com a conseqüència del procés inflamatori hi poden haver danys col·laterals al teixit sa<sup>2</sup>. A més, pot haver-hi un **atac immune contra els propis teixits resultant en una malaltia autoimmune** que pot tenir una base genètica o bé adquirida<sup>3</sup>.

## 1.1 La immunitat innata

La immunitat innata és la primera línia de defensa de l'organisme davant els patògens i està mediada principalment per cèl·lules fagocítiques, com els macròfags o cèl·lules dendrítiques. Tot i que inicialment va ser considerada com un sistema inespecífic, **la immunitat innata és capaç de discriminar entre lo propi i lo no propi** gràcies a diferents famílies de receptors de reconeixement de patrons (PRR, de l'anglès *pattern-recognition receptors*)<sup>4</sup>. Malgrat aquesta distinció de lo propi o no propi, teories més actuals proposades per la Dra. Matzinger, suggereixen un altre model, "el model de dany", que es discutirà més endavant.

### 1.1.1 Els receptors de reconeixement de patrons (PRR)

Es coneixen diferents famílies de receptors i les principals són els *Toll-Like Receptors* (TLRs), els *Rig-Like Receptors* (RLR), els *Nod-Like Receptors* (NLRs), *AIM2-Like Receptors* (ALRs) i els *C-type Lectin Receptors* (CLRs)<sup>5, 6</sup>. Tots ells tenen diferents característiques en comú: **reconeixen diferents components microbians, coneguts com patrons moleculars associats a patògens (PAMPs)** i que són essencials per la supervivència del microorganisme i que per tan, són poc variables durant l'evolució. A més, els PRR estan codificats per la línia germinal i no depenen de la memòria immunològica. En canvi, alguns són receptors de membrana, altres associats al sistema endosòmic i altres citoplasmàtics. Així, la seva localització està lligada a la seva especialització, al tipus de PAMP que reconeixen i a la via de senyalització que induiran<sup>7</sup>.

#### Els Toll-Like receptors

Els receptors tipus "toll", de l'anglès *toll-like receptors* (TLR), són receptors altament conservats desde *C. elegans* fins als mamífers i que van ser inicialment identificats com el producte del gen "Toll" essencial per al desenvolupament a *Drosophila*. Més tard es va identificar el seu paper a la resposta antifúngica de les mosques<sup>8</sup>. Aquestes troballes, juntament amb la identificació de la primera parella receptor:ligand (TLR4:Lipopolisacàrid)<sup>9</sup> van merèixer el premi Nobel de Fisiologia i Medicina al 2011.

Els TLRs són glicoproteïnes transmembrana de tipus I i fins ara s'en han identificat més de 13 tipus. Es classifiquen en dos grans grups segons la seva localització cel·lular, a la membrana cel·lular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10) o bé associats a endosomes (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 i TLR13)<sup>10</sup>. Per tan, els TLRs tenen com a funció monitoritzar l'espai extracel·lular per la presència de PAMPs. Les molècules que reconeix cada tipus de TLR i la seva localització es resumeixen a la figura 1. Els TLRs no sols s'expressen a cèl·lules de la immunitat

innata, també a cèl·lules del sistema adaptatiu, com els limfòcits B i algunes subpoblacions de limfòcits T. Fins i tot hi ha TLRs en cèl·lules no immunològiques, com els fibroblasts i les cèl·lules epitelials.

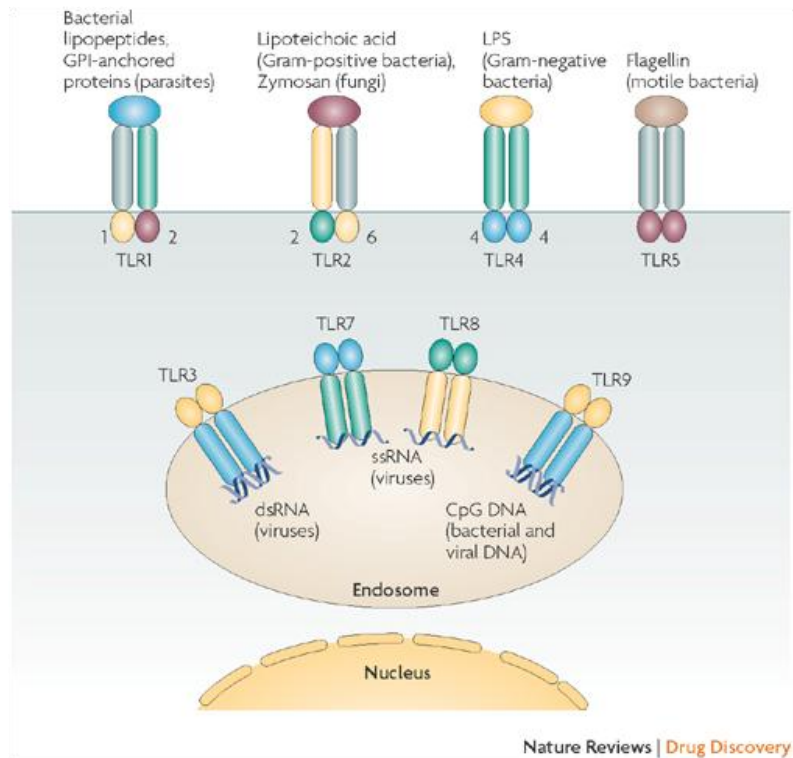


Figura 1. Lligands i localització dels TLRs <sup>7</sup>.

El reconeixement de PAMPs pels TLRs provoca el reclutament de les molècules adaptadores MyD88 i TRIF, que contenen dominis TIR homòlogues amb seqüències TIR del TLR. Aquesta interacció **inicia unes vies de senyalització cel·lular que culminen en l'activació de NF- $\kappa$ B, IRFs o MAP quinases que regularan l'expressió de citocines, quimiocines i interferons (IFN)<sup>11</sup>**. El TLR3 és el receptor capaç de detectar els dsRNA (RNA de doble cadena). Malgrat això, els dsRNA presents al citoplasma cel·lular o presents com a conseqüència d'una infecció viral, no són accessibles pel TLR3, ja que és un receptor associat a endosoma i que per tan monitoritza l'espai extracel·lular. Fins i tot, la majoria de cèl·lules infectades per virus són capaces de produir IFN de tipus I (IFN-I) d'una manera TLR3-independent. A més

a més, estudis previs en fibroblasts sense MyD88 i TRIF, demostren que encara són capaces de produir IFN-I, indicant que el sistema TLR no és un requeriment únic per la detecció viral, almenys en alguns tipus cel·lulars<sup>12</sup>.

### Retinoic acid-inducible gene 1-like receptors (RLRs)

La família dels RLRs (de l'anglès *retinoic acid-inducible gene 1-like receptors*) són receptors de la immunitat innata citoplasmàtics que inclou RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (*Melanoma Differentiation Associated-protein 5*) i LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*)<sup>13</sup>. Aquests receptors estan **especialitzats en el reconeixement d'àcids nucleics, el tipus de lligand més abundant i que per tant es podrien considerar els activadors de la immunitat innata més importants.**

### RIG-I (*Retinoic-acid inducible gene-1*)

**El receptor RIG-I està codificat pel gen *DDX58* que és un gen induïble per IFN-I. Té com a funció reconèixer al citoplasma material d'origen víric: fragments curts de dsRNA<sup>14</sup>.** La presència a l'extrem 5' de tres molècules de fosfat (5'ppp) permet discernir el lligand d'origen víric del mRNA propi<sup>15</sup> que l'extrem 5'ppp no el té accessible per la presència de 7-metilguanosina, necessari per promoure la traducció i la estabilitat del mRNA eucariota<sup>16</sup>.

La proteïna RIG-I està constituïda per dos dominis CARD (de l'anglès, *caspase activation and recruitment domains*), un domini central de tipus helicasa/ATPasa i a la part C-terminal un domini regulador (CTD) (Figura 2).

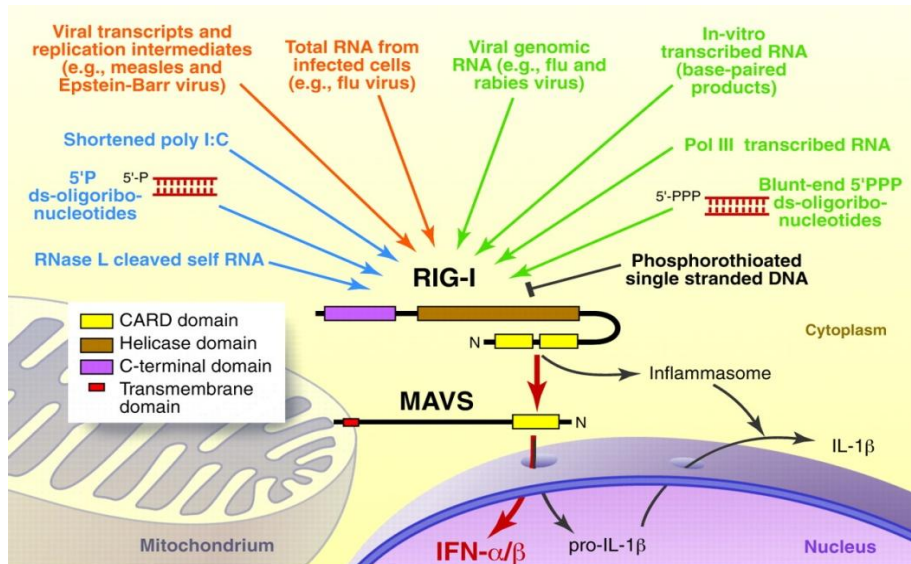


Figura 2. Estructura i lligands de RIG-I <sup>17</sup>.

Els dominis CARD són els responsables de la unió a la molècula adaptadora MAVS, necessària per la senyalització i que està localitzada a la mitocòndria<sup>18</sup>. En absència de lligands, el domini CTD reprimeix la interacció entre els dominis CARD i per tant evita la seva activació<sup>15</sup>. En presència de lligands, aquests s'uneixen al domini CTD provocant la dimerització de RIG-I i induint un canvi conformacional que exposa els dominis CARD. Aquest canvi permet la unió de lligases de ubiquitina, com TRIM25, que provoquen la unió de poliubiquitines en posició K63. Aquestes modificacions faciliten la unió a MAVS per iniciar la cascada de senyalització cel·lular (figura 3).



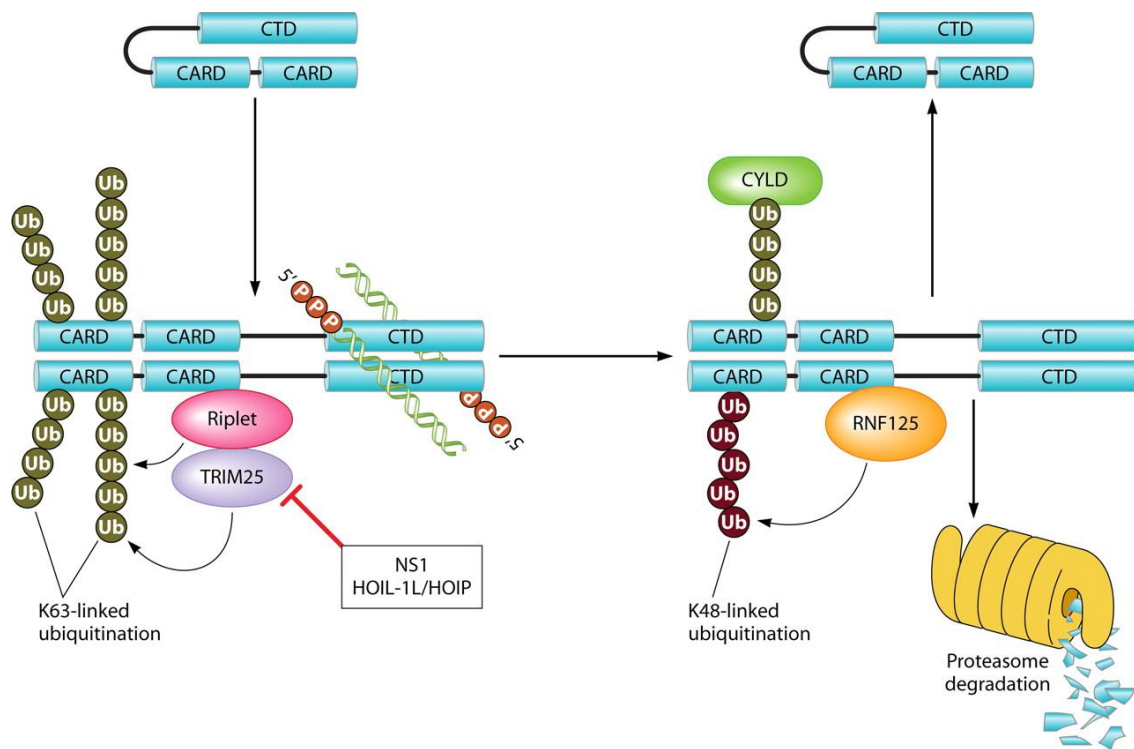


Figura 3. Activació de RIG-I <sup>19</sup>

**La senyalització induïx una potent resposta immune anti viral caracteritzada per una producció robusta de citocines proinflamatòries i d'interferons de tipus I (IFN-I).** L'expressió de IFN-I està dirigida principalment pels factors de transcripció nuclears NF- $\kappa$ B i *interferon regulatory factor* (IRF)<sup>20</sup>. La secreció de IFN-I i el seu posterior reconeixement pels seus receptors promou la senyalització per la via Jak-STAT i la posterior transcripció d'una gran varietat de gens per limitar la replicació viral. Entre aquests múltiples gens, s'indueixen gens necessaris per mantenir la resposta creant un loop retroalimentat (figura 4). A més, els IFN-I contribueixen a l'activació de varis tipus cel·lulars incloent les cèl·lules dendrítiques i monòcits i modula les respostes immunes adaptatives actuant directament sobre cèl·lules T i B.

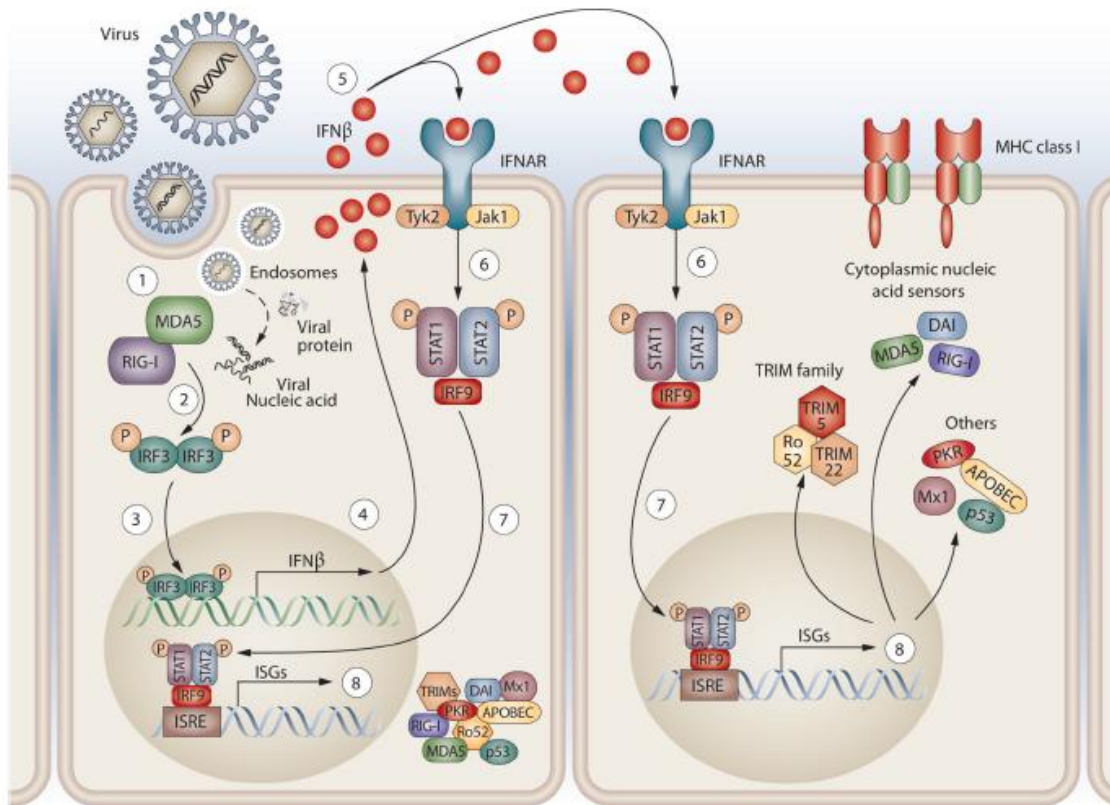


Figura 4. Senyalització de RIG-I, de IFN-I i els seus efectes<sup>21</sup>.

Després de l'activació i senyalització, la unió de poliubiquitines en posició K48 indueix la degradació del receptor per la via del proteosoma, mentre que CYLD constitutivament elimina les ubiquitines activadores K63 (Figura 3).

### 1.1.2 Model de dany

Les teories clàssiques del funcionament del sistema immunològic estableixen que la discriminació de lo propi, definit a l'inici de la vida, i lo no propi, a allò que ens exposem durant la vida, era la manera de tolerar lo propi i atacar lo estrany. Aquestes teories van anar evolucionant (figura 5) i amb noves dades experimentals, la Dra. Matzinger va proposar al 1994 el "model de dany"<sup>22</sup> que suggereix que el sistema immune està més preocupat per la detecció de la presència de dany que per la detecció de lo forani o lo no propi. Quan les cèl·lules d'un teixit estan en situació d'estrès com a conseqüència d'un dany o d'una infecció, es secreten i/o s'expressen molècules

anomenades DAMPs (*Danger-associated molecular patterns*). Els DAMPs són patrons moleculars associats a dany o perill, que en condicions fisiològiques es troben a l'espai intracel·lular però que són alliberats a l'espai extracel·lular com a conseqüència de dany. Els DAMPs inclou DNA, RNA i proteïnes de xoc tèrmic (*Heat-shock proteins* o HSP) entre altres. Aquestes molècules són conegudes també com alarmines, i són reconegudes pels PRRs. Així, en aquest context es parla del terme inflamació estèril<sup>23, 24</sup> que s'ha relacionat amb diversos processos patològics. El procés patològic pot agreujar-se quan una resposta inflamatòria és exagerada i incontrolada degut a una sobreproducció de DAMPs que resulta en un procés inflamatori crònic i autosustentat.

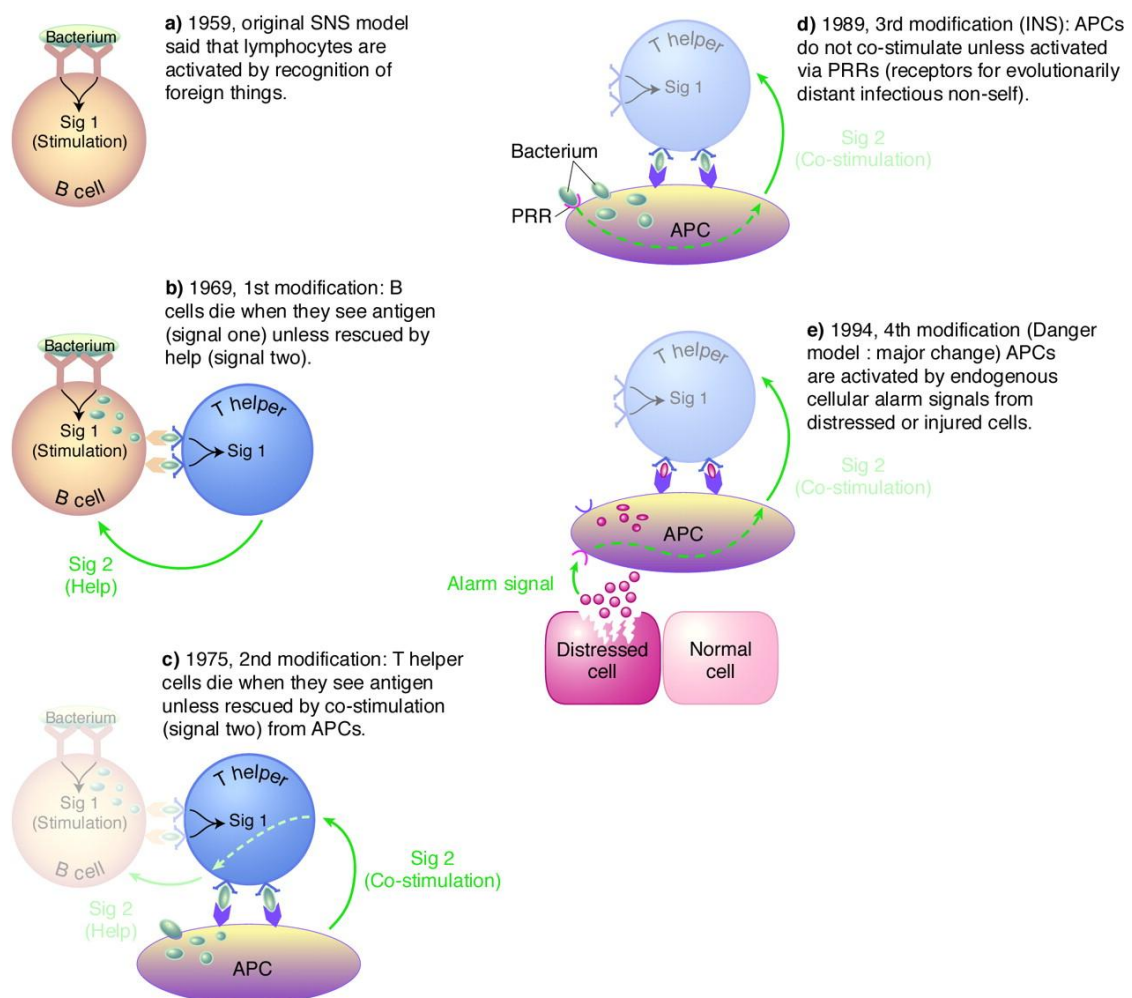


Figura 5. Evolució del model de la immunitat innata<sup>25</sup>.

## 1.2 Immunitat innata, IFN i autoimmunitat

El paper dels IFN-I durant les infeccions víriques està ben establert. El control estricte de l'IFN-I és necessari ja que la seva desregulació pot esdevenir en processos autoimmunes. Els receptors de la immunitat innata involucrats en la inducció d'IFN-I es resumeixen a la taula 1.

Receptor	Expressió	Localització	Lligand primari
<i>Rig-Like Receptors</i>			
RIG-I	Ubiquïa	Citoplasma	dsRNA curts/ssRNA 5'ppp dsRNA
MDA5	Ubiquïa	Citoplasma	dsRNA llargs
<i>Toll-Like Receptors</i>			
TLR3	mDCs	Endosoma	dsRNA
TLR4	Monòcits/Macròfags	Membrana	LPS
TLR7	B, pDCs	Endosoma	GU-ssRNA
TLR8	Monòcits/mDCs	Endosoma	GU-ssRNA
TLR9	B, pDCs	Endosoma	CpG DNA

Taula 1. Receptors de la immunitat innata inductors de IFN-I

**S'ha relacionat la resposta crònica d'IFN-I amb processos autoimmunes que alguns autors han anomenat interferonopaties ja que comparteixen l'anomenada "signatura de l'IFN",** és a dir, la presència de gens induïts per IFN-I<sup>26</sup>. Per exemple el lupus eritematós sistèmic, el síndrome de Sjögren, la artritis i les miositis s'han relacionat amb la resposta crònica dels IFN-I<sup>21</sup>. Es creu que els IFN-I tenen un paper patogènic en malalties autoimmunes promovent la presentació d'antigen i la resposta dels limfòcits induïnt l'expressió de quimiocines encara que en algunes situacions se li ha otorgat un paper protector<sup>27</sup>. S'ha descrit que l'activació constitutiva de la immunitat innata pot induir processos d'autoimmunitat en absència d'infecció viral o inflamació estèril<sup>28</sup>. Per una banda, s'ha demostrat com mutacions en MDA5, PRR citoplasmàtic de RNA, que provoquen guany de funció indueixen fenotips associats a malalties caracteritzades per una sobrerregulació de IFN-I<sup>29-31</sup>. Aquestes malalties s'estant identificant a la bibliografia com interferonopaties (taula 2).

Per altra banda, **en processos de dany mediats per isquèmia/reperfusió, el restabliment de la circulació sanguínia provoca més destrucció del teixit induïnt una major presència d'inflamació i una major resposta inflamatoria a cèl·lules necròtiques<sup>32</sup>.**

Gen (Proteïna)	Malaltia	Efecte de la mutació	Conseqüències cel·lulars
<i>TREX1</i>	AGS, SLE	Pèrdua de funció	Acumulació de DNA al citoplasma
<i>RNASEH2</i>	AGS	Pèrdua de funció	Acumulació de ribonucleòtids i de híbrids RNA:DNA
<i>SAMHD1</i>	AGS	Pèrdua de funció	Augment cel·lular de dNTPs
<i>ADAR1</i>	AGS, vasculopatia cerebral	Pèrdua o alteració de funció	Acumulació de RNA sense editar
<i>IFIH1</i> (MDA5)	AGS	Guany de funció	Activació constitutiva de la senyalització de MDA5
<i>ISG15</i>	IBGC	Pèrdua de funció	Pèrdua de la regulació negativa de IFN-I

Taula 2. Causes moleculars d'interferonopaties. AGS: *Aicardi-Goutières syndrome*; SLE: *Systemic lupus erythematosus*; IBGC: *Idiopathic basal ganglia calcification*.

## 2. LA HIPÒXIA

### 2.1 La resposta cel·lular a la hipòxia: el HIF

L'adaptació cel·lular a la hipòxia està regulada per uns factors de transcripció clau anomenats HIF (de l'anglès, *hypoxia-inducible factor*)<sup>33</sup>. La seva activitat està basada en modificacions post-traduccionals i estabilització de les subunitats  $\alpha$ <sup>34</sup>. En condicions de normòxia, les prolyl hidroxilases (PHD) modifiquen la subunitat  $\alpha$  provocant la poliubiquitinització i per tant HIF1 $\alpha$  és degradat per la via del proteosoma<sup>35</sup>. En canvi, en condicions d'hipòxia l'activitat de les hidroxilases està reduïda, estabilitzant HIF1 $\alpha$  que pot translocar al nucli. Dins al nucli, HIF1 $\alpha$  dimeritza amb HIF1 $\beta$  permetent la unió als promotors dels gens que contenen elements de resposta a hipòxia o HRE (de l'anglès, *Hypoxia-response element*) (figura 6). La majoria dels gens que contenen HRE als seus promotors, són gens implicats en metabolisme i angiogènesi per tal de mediar l'adaptació fisiològica a la falta d'oxigen<sup>36</sup>.

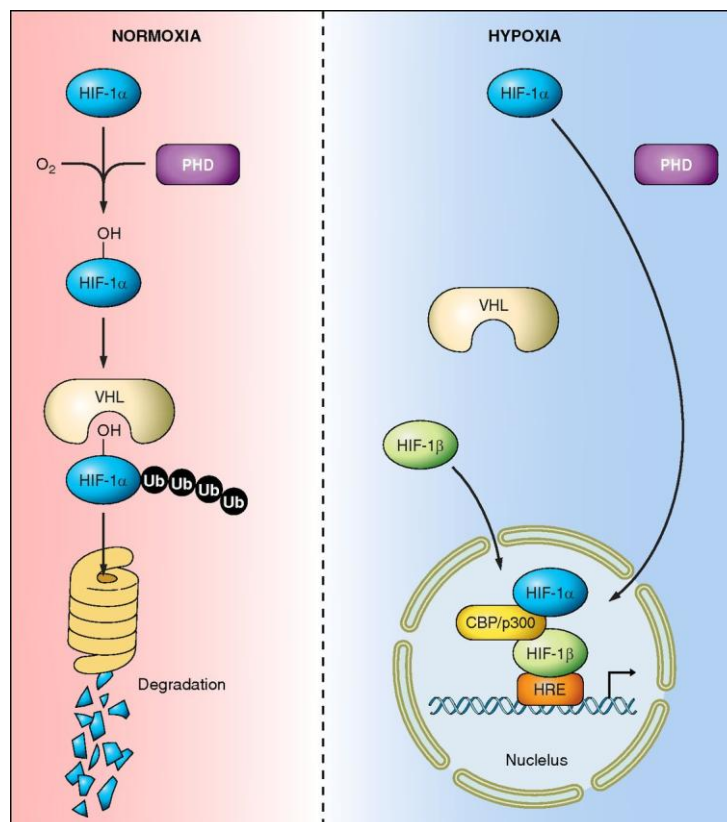


Figura 6. Regulació de HIF1 $\alpha$ <sup>37</sup>.

## 2.2 La hipòxia i la inflamació

S'ha relacionat la resposta a l'hipòxia amb la inflamació i especialment amb la immunitat innata<sup>38, 39</sup>. La presència d'hipòxia tissular és característica durant processos d'infecció per tal de restablir la homeòstasi tissular. Aquest ambient provocant la infiltració de cèl·lules inflamatòries, a través de la inducció de molècules d'adhesió<sup>40</sup>, que fagociten restes cel·lulars com a conseqüència de la infecció i/o del dany del teixit. És per aquesta finalitat, que la hipòxia mediada per HIF1 $\alpha$  potencia per una banda l'activitat fagocítica i per tan bactericida i potencia també l'expressió de molècules relacionades amb la immunitat innata com els TLRs<sup>41</sup>. Per exemple, s'ha descrit que el TLR4 conté HRE al seu promotor i que la seva activació està augmentada en condicions d'hipòxia<sup>41, 42</sup>. A més, l'activació de TLRs tant en normòxia com en hipòxia induïx l'activació transcripcional de HIF1 $\alpha$ , amplificant la resposta a hipòxia<sup>43, 44</sup>. En experiments *in vitro* utilitzant la línia cel·lular de múscul de ratolí C2C12, ha demostrat que l'exposició a restes cel·lulars induïx la sobreexpressió de múltiples dianes de HIF1 $\alpha$ <sup>45</sup>. En un model de ratolí d'I/R hepàtica es va demostrar com les cèl·lules de parènquima hepàtic, és a dir, cèl·lules que no pertanyen al sistema immunològic, participaven activament en la resposta d'inflamació estèril mitjançant la immunitat innata<sup>46</sup>.

### 3. MALALTIES NEUROMUSCULARS

Les malalties neuromusculars són un **grup heterogeni de malalties**. Segons l'òrgan afectat, es classifiquen en neuropaties o miopaties afectant al nervi o el múscul respectivament. La unió neuromuscular pot també estar afectada, parlant aleshores de síndromes miastènics. L'etiologia potser tan d'origen genètic, immunològic o tòxic<sup>47</sup>.

**En conjunt, les malalties neuromusculars son les més nombroses entre les malalties rares.** En aquesta tesi el treball es centra en miopaties de tipus inflamatori.

#### 3.1 Les Miopaties inflamatòries

Les miopaties inflamatòries són, també, un grup heterogeni de malalties caracteritzades per **debilitat muscular i la presència de inflamació a la biòpsia muscular**<sup>48</sup>. Les quatre entitats clíniques principals que componen aquest grup de malalties són la **polimiositis** (PM), la **miopatia per cossos d'inclusió** (IBM, de l'anglès *inclusion body myositis*), la **dermatomiositis** (DM) i la **miopatia necrotitzant immuno-mediada** (IMNM, de l'anglès *immune-mediated necrotizing myopathy*). L'afectació cutània és la característica més destacada que diferencia clínicament la DM de la resta, però hi ha diferències fisiopatològiques destacades entre elles que es desenvoluparan més endavant.

**L'estudi de la biòpsia muscular és indispensable per establir el diagnòstic de totes elles.** Certes característiques histopatològiques són comunes als diferents grups de miopaties inflamatòries i que solen ser més evidents en músculs proximals. Aquestes alteracions inclouen necrosis, regeneració, increment del teixit connectiu i presència d'inflamació. **En condicions normals, les fibres musculars no expressen MHC-I i sols és detectable als capil·lars de la biòpsia muscular** (figura 7A). **En canvi, a les miopaties inflamatòries està sobre-expressat a les fibres musculars amb diferents patrons.** A la polimiositis la presència de MHC-I sol ser extensa a la



majoria de fibres musculars (figura 6B), mentre que a la miopatia per cossos d'inclusió sol també ser extensa però més prominent a fibres atrofiques (figura 7C). **A la dermatomiositis el patró d'expressió de MHC-I és molt característic, amb una expressió molt augmentada a la perifèria dels fascicles musculars, que a la DM estan atrofics i que s'anomena atròfia perifascicular** (figura 7D).

Per tant, la detecció de l'expressió de MHC-I a les fibres musculars en aquest grup de malalties és útil des de un punt de vista diagnòstic.

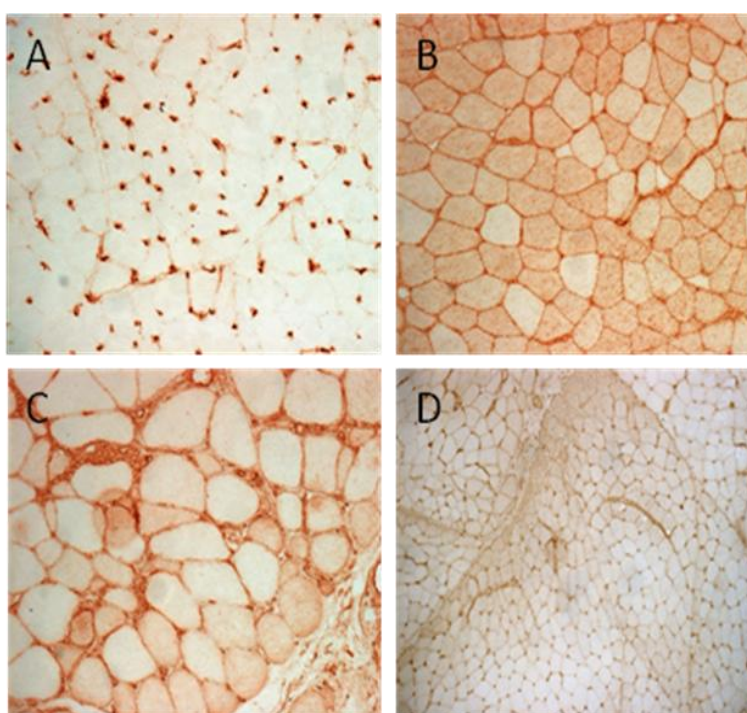


Figura 7. Tinció de MHC-I en biòpsies musculars representatives d'individus sans (A), polimiositis (B), miopatia per cossos d'inclusió (C) i dermatomiositis (D).

### 3.1.1 Polimiositis

La PM no té un fenotip clínic únic i com a conseqüència sovint està sobre-diagnosticada<sup>49</sup> i/o diagnosticada d'altres malalties ja que no existeix fins ara cap biomarcador específic. **L'heterogeneïtat clínic i les troballes a la biòpsia muscular suggereixen que probablement la PM forma un conjunt d'entitats encara per diferenciar<sup>50</sup>.** Clínicament es caracteritza per la presència de **debilitat muscular**

**proximal simètrica**<sup>51</sup> que pot acompanyar-se de manifestacions extramusculars com problemes cardiovasculars i articulars<sup>52</sup>. Els nivells de CK (creatina quinasa) en sèrum solen estar augmentats fins a 50 vegades durant el procés actiu de la malaltia. Per un diagnòstic acurat, cal tenir en compte en el diagnòstic diferencial altres entitats que cal descartar, com miopaties tòxiques i fins i tot distròfies musculars. Des de un punt de vista fisiopatogènic, el procés immunològic implicat principalment és mitjançant **cèl·lules T CD8+ citotòxiques que envaeixen fibres musculars aparentment sanes però que expressen MHC-I** (figura 8A). L'expressió de MHC-I és ubiqua al múscul de pacients amb PM, característica que pot ser útil per el diagnòstic diferencial de miopaties no immuno-mediades, on el MHC-I pot expressar-se però en aquest cas està restringida a fibres necròtiques. Els infiltrats induïrien la necrosis de la fibra muscular mitjançant l'alliberació de grànuls que contenen perforina i granzima<sup>48</sup>.

### 3.1.2 Miopatia per cossos d'inclusió (IBM)

La IBM és la miopatia adquirida més freqüent a partir dels 60 anys d'edat, tot i que és poc freqüent a la població. Clínicament és molt característica, amb la presència de **debilitat muscular distal amb afectació selectiva dels flexors dels dits i extensors dels genolls**. Una afectació comú és la presència de disfàgia, provocant episodis de pneumònia que poden ser letals. La fisiopatogènia de la IBM està encara sota intensa discussió. Per una banda, hi ha un component inflamatori, caracteritzat per la **presència d'infiltrats inflamatoris majoritàriament de CD8+ i macròfags que envolten fibres musculars aparentment sanes**<sup>48</sup>. Les CD8+ infiltrants expressen molècules co-estimuladores induint l'activació de la via citotòxica de la perforina i necrosis de les fibres<sup>48</sup>. Estudis in vitro han demostrat que tant CD8+ aïllades de pacients amb PM i amb IBM presentaven reactivitat contra miotubs autòlegs. A part de l'activació de la via citotòxica, s'ha descrit també una alta prevalença d'autoanticossos, encara que sense un valor clínic clar<sup>53</sup>. Al 2013, es van descriure per primera vegada

uns anticossos dirigits contra la 5'-nucleotidasa 1A citosòlica, presents en un **30% dels pacients amb IBM** <sup>54</sup>, mentre que menys del 5% de pacients amb PM o DM en tenien<sup>55</sup>. Malgrat això, cal encara demostrar-ne la seva utilitat. Per altra banda, hi ha un component degeneratiu, amb una acumulació de proteïnes ubiquitinades i congofíliques a algunes fibres musculars. S'ha descrit positivitat per la proteïna  $\beta$ -amiloides i TDP-43, relacionades amb degeneració<sup>56, 57</sup>, així com p62 com a conseqüència de la renovació proteica alterada i que està relacionada amb processos d'autofàgia<sup>58</sup>. A més de la presència de MHC-I a les fibres musculars, **és característica la presència de vacuoles ribetejades així com la fibres musculars angulades més característiques de processos neurògens** (figura 8B).

**Si el procés fisiopatològic comença amb la inflamació o bé si és la degeneració està en discussió** ja que hi ha arguments per totes dues possibilitats <sup>59</sup>. Malgrat això, el tractament amb immunosupressors no és efectiu en aquests pacients suggerint que els futurs tractaments hauran de dirigir-se contra els dos processos per ser efectius.

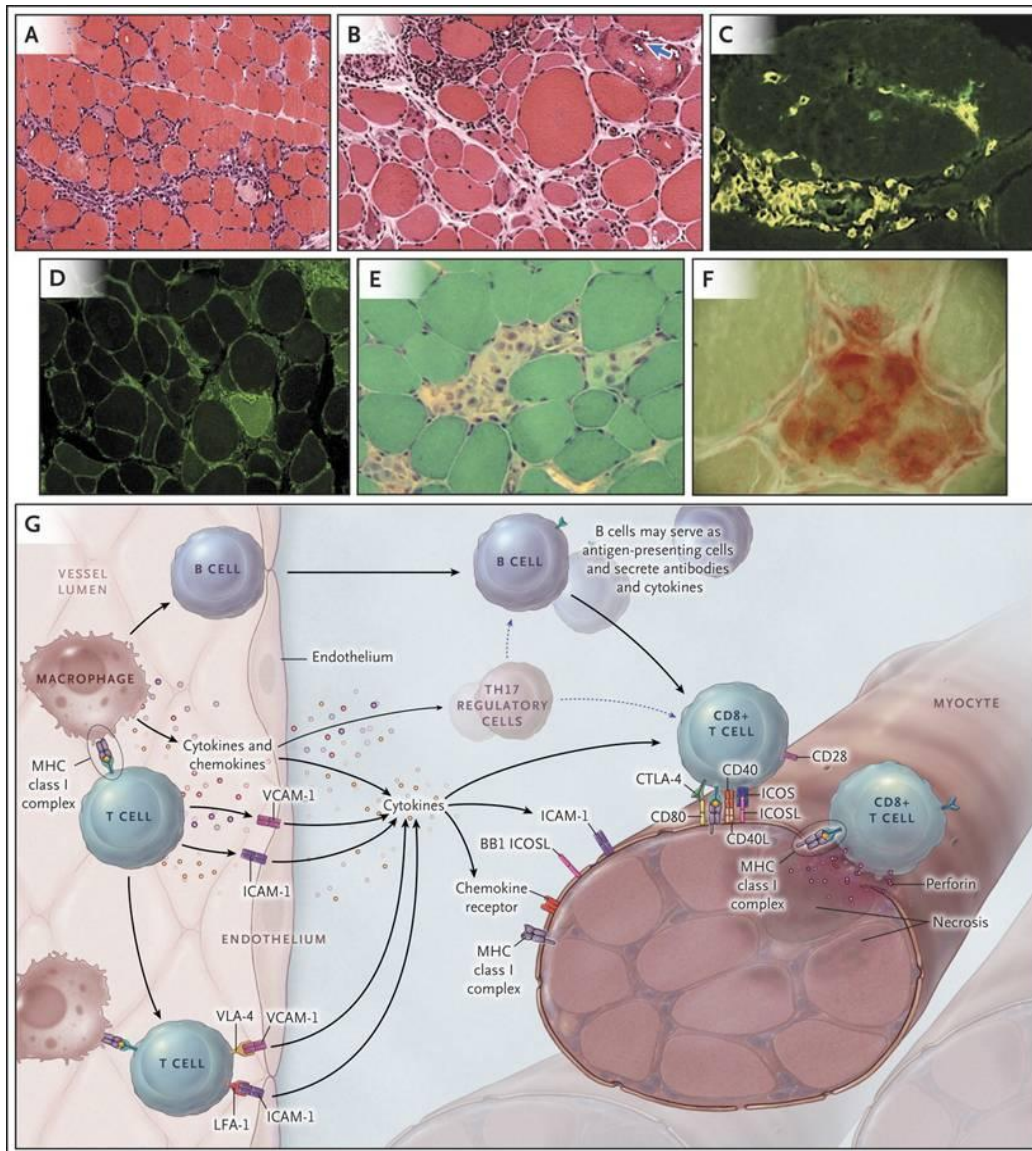


Fig 8. Principals característiques histopatològiques a la PM, IBM i IMNM A les biòpsies musculars de pacients amb PM s'observa infiltrats inflamatoris focals rodejant fibres d'aparença sana (A). A la IBM s'observen canvis miopàtics crònics (augment teixit connectiu i atròfia/hipertròfia) i vacuoles (B). En els dos casos els infiltrats són majoritàriament del tipus T CD8 (C) i l'expressió de MHC-I és difusa (D). Tinció de tricròmic de Gomori en una biòpsia de IMNM on s'observen fibres necròtiques (E) amb infiltrat macrofàgic (F) <sup>48</sup>.

### 3.1.3 Dermatomiositis

La DM va ser inicialment descrita per Wagner a mitjans del segle XIX<sup>60, 61</sup>. Va ser a finals del segle XIX quan Unverricht va establir la DM com a entitat clínica amb la presència de **eritema a la pell i debilitat muscular**<sup>62, 63</sup>.

Des de un punt de vista epidemiològic, la DM pot debutar a qualsevol edat. Tot i així, la forma juvenil de DM es presenta majoritàriament entre els 5 i 14 anys d'edat i la forma adulta entre la cinquena i sisena dècada d'edat. És més comú entre el sexe femení i la incidència varia entre 0,1 a 0,93 casos per 100.000 habitants.

### 3.1.3.1 Clínica

El debut de la DM sol ser insidiós sense una clara manifestació. A l'exploració física s'observa **debilitat muscular simètrica proximal, afectant la musculatura escapular i pelviana**. Pot acompanyar-se de dolor muscular principalment als braços i amb la progressió de la malaltia pot afectar a la musculatura del coll i als músculs respiratoris<sup>47</sup>. **Les lesions cutànies són molt característiques** amb la presència d'erupcions afectant principalment al voltant dels ulls, al coll i a les extremitats<sup>64</sup> (figura 9).



Figura 9. Lesions cutànies típiques als pacients amb DM. Eritema al tòrax (A), eritema palpebral (B), eritema malar (C), lesions unguinals (D), signe de Gottron (E) i eritema al coll (F).

Les complicacions més importants que solen aparèixer son l'afectació cardíaca i/o pulmonar constituint les síndromes de superposició que es desenvoluparan més endavant. **Cal destacar que la DM es pot associar a una neoplàsia i per tant cal descartar-la en el moment del diagnòstic**, ja que en absència de neoplàsies la prognosi millora significativament. S'han descrit múltiples reactivitats d'autoanticossos en els pacients amb DM que s'associen amb major o menor grau a diferents fenotips clínics <sup>65</sup> i que es resumeixen a la taula 3.

Myositis specific antibodies						
Name of the antibody	Target of the antibody	Frequency among auto-immune myopathies	Acute and severe proximal weakness	Muscle pathology	Skin lesions	Life-threatening complication
Anti-Jo-1	Histidyl-t-RNA-synthetase	15-20%	+++ / ++	IMPP/NM	MH	ILD+ / cardiac+
Anti-PL-7	Threonyl-t-RNA-synthetase	5%	+++ / +	IMPP/NM	MH	ILD++
Anti-PL-12	Alanine-t-RNA-synthetase	<5%	+ / ±	IMPP/NM	MH	ILD++
Anti-OJ	Isoleucyl-t-RNA-synthetase	<5%	+ / ±	not characterised	MH	ILD++
Anti-EJ	Glycyl-t-RNA-synthetase	<5%	+ / ±	not characterised	MH	ILD++
Anti-Zo	Phenylalanyl-RNA-synthetase	<5%	+ / ±	not characterised	MH	ILD++
Anti-Ha	anti-tyrosyl-RNA-synthetase	<5%	+ / ±	not characterised	MH	ILD++
Anti-KS	Asparaginyl-t-RNA-synthetase	<5%	+ / ±	not characterised	MH	ILD+
Anti-MI-2	Nucleosome remodeling-deacetylase	6%	++	IMPP	DM rash	none
Anti-TIF1γ	Transcriptional intermediary factor 1 γ	6%	++	IMPP	DM rash	cancer
Anti-MDA5	Melanoma differentiation associated gene 5	6%	±	not characterised	DM rash, ulcers, MH, palmar papules	ILD+++
Anti-SAE	Small ubiquitin-like modifier activating enzyme	<5%	+	not characterised	DM rash	none
Anti-NXP2	Nuclear matrix protein 2	<5%	++	not characterised	DM rash, calcinosis	cancer
Anti-SRP	Signal recognition particle	5%	+++ / ±	NM	none	cardiac++
Anti-HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase	6%	+++ / ±	NM	none	none
Anti-cN1A	Cytosolic 5'-nucleotidase 1A	10%	-	sIBM	none	none

IMPP: immune myopathies with perimysial pathology was described by Pestronk and Mozaffar in patients with anti-synthetase syndrome and dermatomyositis [90]. NM: Necrotizing myopathy. DM rash: dermatomyositis rash. MH: mechanic's hand. ILD: interstitial lung disease.

Taula 3. Associació d'autoanticossos amb determinats fenotips clínics <sup>66</sup>.

Cal destacar dos dels anticossos que han demostrat una utilitat clínica. Per una banda el al anti-TIF1γ que s'associa a la DM amb neoplàsia en el 95 % dels pacients <sup>67</sup>. Per l'altra, el anti-MDA5 que s'associa a un subgrup de pacients descrits com a DM amiofàtica amb una important afectació pulmonar que pot ser letal <sup>68, 69</sup>.

### 3.1.3.2 Principals característiques histopatològiques

Les troballes més importants a la biòpsia muscular d'un pacient amb DM són la **presència d'infiltrats inflamatoris perivasculars** que predominen en el perimisi i en el endomisi perifascicular. Són infiltrats principalment de macròfags CD68+ i limfòcits B CD20+. Poden trobar-se també limfòcits T majoritàriament CD4+ i cèl·lules dendrítiques plasmacitoides CD4+BDCA2+. Hi ha una disminució marcada del número de vasos que irriguen al múscul i els que es troben solen ser hipertròfics i poden contenir complexos d'atac a membrana mitjançant el dipòsit de complement. Com a conseqüència es poden observar petits infarts al múscul. A les fibres musculars es poden observar també de forma aïllada dipòsits de complement, però **el tret més característic a la biòpsia és la presència d'atrofia perifascicular** (figura 10A) i **sobreexpressió de MHC-I** (figura 7D) <sup>48, 70</sup>.

### 3.1.3.3 Patogènesi

Basant-se en evidències indirectes, com l'associació de la DM amb altres malalties autoimmunes, la DM és considerada de naturalesa autoimmune. A nivell genètic s'han relacionat determinats haplotips autoimmunes a la DM i a més, el tractament amb immunosupressors és efectiu en aquests pacients. Malgrat la naturalesa autoimmune, altres factors no immunes s'han descrit que poden participar en la patogènesi i que probablement tots dos estan inter-connectats.

**La malaltia probablement comença amb l'activació de la via del complement i la formació de complexos d'atac a membrana (MAC, de l'anglès *membrane attack complex*) als capil·lars. Aquest atac pot ser degut a la presència d'autoanticossos contra antígens desconeguts a l'endoteli<sup>48</sup>.** El dipòsit de MAC provoquen la destrucció de l'endoteli reduint el nombre de capil·lars al múscul i com a conseqüència l'aport d'oxigen i nutrients es veu alterat al múscul (figura 10B-D). Com a conseqüència, les fibres perifasciculars s'atrofien. A més, hi ha una infiltració cel·lular

facilitada per l'expressió de molècules d'adhesió com VCAM-1. Les citocines secretades pels infiltrats potenciarien el procés inflamatori.

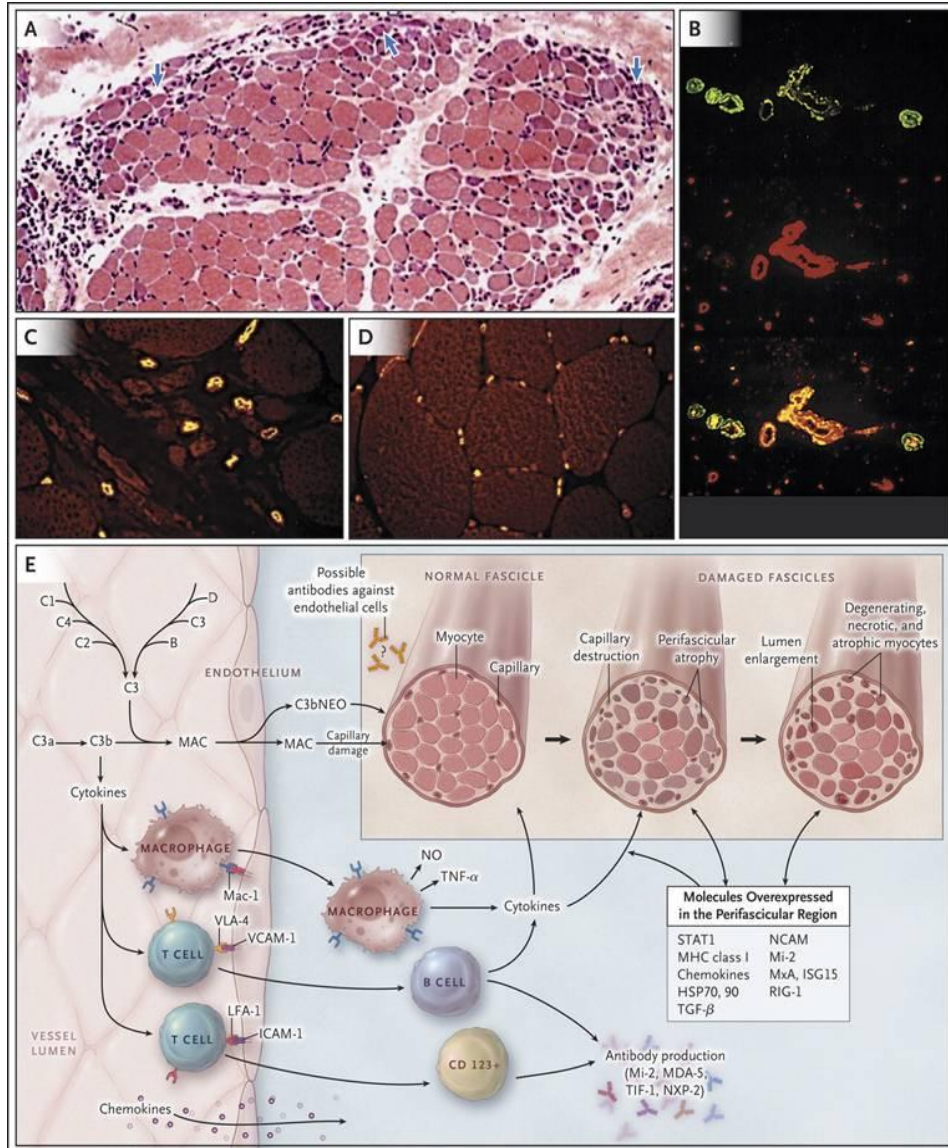


Fig 10. Patogènia de la dermatomiositis: una microangiopatia mediada per complement. L'atròfia perifascicular a les biòpsies musculars dels pacients amb DM és un tret molt característic (A). Els dipòsits de complement a la paret de les cèl·lules endotelials provoca la seva destrucció (B). Com a conseqüència, la densitat de capil·lars endomisials es redueix i hi ha un engruïment dels capil·lars restants per compensar la isquèmia local (C vs D). Esdeveniments seqüencials proposats a la patogènia de la DM (E)

### 3.1.3.3.1 Mecanismes patogènics no immunològics

Malgrat considerar-se malalties immuno-mediades, algunes observacions suggereixen un paper de mecanismes fisiopatològics no immunològics. A més del fenomen de la



microangiopatia, s'han descrit alteracions mitocondrials que eren més prominents a les zones perifasciculars<sup>71</sup>. La sobreexpressió de MHC-I a la fibres musculars s'ha demostrat que indueix un estrès del reticle endoplasmàtic<sup>72</sup>. Estudis posteriors han demostrat la presència de marcadors d'estrès del reticle a les biòpsies musculars<sup>73</sup>.

#### 3.1.3.3.1.1 La microangiopatia a la DM

Com s'ha indicat anteriorment, a la biòpsia muscular de pacients amb DM s'observen canvis a la microvasculatura. Hi ha dipòsit de complement C5b9 a l'endoteli, hiperplasia endotelial amb inclusions tubuloreticulars típiques al microscopi electrònic i destrucció dels vasos focal, predominantment a la zona perifascicular.

No es coneix l'origen de la destrucció dels vasos ni de com la isquèmia participa en la patogènesi. La presència de complement als vasos suggereix que anticossos dirigits contra antígens endotelials podrien participar i per tant ser un esdeveniment desencadenant en la patogènesi de la DM. **Amb la destrucció capil·lar, la perfusió al múscul es veuria alterada provocant episodis d'isquèmia i reperfusió local (I/R)**<sup>48</sup>. És conegut que aquests episodis d' I/R provoquen un dany addicional com a conseqüència de l'estrès oxidatiu causant alteracions microvasculars<sup>74</sup>. És conegut també que el fenomen de I/R provoca inflamació estèril en un context de dany o mort cel·lular<sup>75</sup>. Els models experiments induïts d'I/R desenvolupen lesions microvasculars similars a la DM<sup>76</sup>. A més, models animals autoimmunes han demostrat patir afectacions més severes sota lesions per I/R<sup>77</sup>. L'I/R pot activar el complement, tan per la via alternativa com per la via clàssica, fixant IgM naturals de baixa avidesa contra nous autoantígens<sup>78</sup>, com es va publicar en el cas de miosina no muscular present en diferents tipus cel·lulars<sup>79</sup> suggerint una interconnexió de mecanismes immunològics i no immunològics.

**Malgrat la hipòtesi del paper de la hipòxia està establerta a la patogènia de la DM, pocs estudis fins ara han pogut aclarir quins són els mecanismes implicats i les seves conseqüències a la inflamació del múscul.** S'ha demostrat la presència de HIF1 $\beta$  i de factors angiogènics a les biòpsies de pacients amb DM, mentre que a la PM o al lupus, on les xarxes vasculars al múscul eren normals, aquests marcadors eren absents<sup>80</sup>. En un altre estudi posterior, es va observar HIF1 $\alpha$  a l'endoteli de les biòpsies musculars de pacients amb DM, mentre que la isoforma HIF2 $\alpha$  i factors d'angiogènesi es van trobar a les fibres musculars<sup>81</sup>.

### 3.1.3.3.2 Mecanismes patogenics immunològics

#### 3.1.3.3.2.1 El paper de l'interferó

És àmpliament conegut que les citocines juguen un paper important en regular les respostes immunes fisiològiques i que juguen també un paper important en condicions patològiques. En aquesta xarxa complexa de citocines amb efectes pleiotròpics, s'ha prestat especial atenció al paper d'unes citocines en particular a la DM: els interferons. Existeixen tres tipus d'interferons diferents, de tipus I (IFN-I; principalment IFN $\alpha$  i IFN $\beta$ ), de tipus II (IFN $\gamma$ ) i de tipus III.

Als últims anys, la recerca s'ha centrat en els IFN-I. S'han descrit nivells circulants de IFN $\beta$  als pacients amb DM, però no d'altres tipus de IFN<sup>82</sup>, que correlacionaven amb l'activitat clínica<sup>83</sup>. **Estudis del perfil transcriptòmic a partir de tot el múscul de pacients, ha demostrat una sobreregulació significativa de gens induïts per IFN-I**<sup>84</sup>. A més, s'ha confirmat la presència a nivell de proteïna de diferents proteïnes induïdes per IFN-I com ISG15, MxA i IRF7 en zones perifasciculars<sup>85</sup>. Estudis *in vitro* han demostrat que l'exposició de cultius primaris de múscul a IFN $\beta$  responien mitjançant un perfil transcriptòmic de gens induïts per IFN-I similar a l'observat en els pacients<sup>85</sup>. Malgrat els nivells circulants de IFN $\beta$  als pacients, del que l'origen n'és

desconegut, s'ha atribuït la font d'IFN- $\alpha$  a les cèl·lules plasmacitoides infiltrants al múscul, potents productores de IFNs<sup>84, 86</sup>. El paper del IFN $\beta$  a la patogènia de la DM esta recolzada també, pel fet d'haver-hi casos reportats del debut de la malaltia com a conseqüència del tractament amb IFN $\beta$ <sup>87</sup>.

#### 3.1.3.3.2 Altres citocines

Múltiples citocines s'han trobat desregulades a les miopaties inflamatòries encara que cap ha demostrat tenir utilitat com a biomarcador. A la DM, s'ha trobat un augment de les concentracions circulants de la IL-6, IL-15, IL-17 i a la IL-18<sup>88-91</sup>. Encara que s'han trobat correlacions entre els nivells circulants amb l'activitat clínica, el valor d'aquestes està encara per determinar. Cal destacar la presència de BAFF (de l'anglès, *B-cell activating factor*) a les fibres perifasciculars a la DM<sup>92</sup>, un factor clau per a maduració de limfòcits B i per tant per la producció d'anticossos.

#### 3.1.3.3.3 La immunitat innata a la DM

La fisiopatogènia de les miopaties inflamatòries i en particular de la DM, comprén múltiples mecanismes. Factors ambientals com les infeccions s'han relacionat com un desencadenant de diverses malalties autoimmunes. Fins i tot, s'ha relacionat la seva aparició després de vacunacions<sup>93, 94</sup>. Com s'ha comentat en apartats anterior, els IFN juguen un paper clau en la resposta a virus. La inducció d'IFN està mediada principalment per els receptors de la immunitat innata, incloent els TLRs i els RLRs. Estudis previs han demostrat la presència de TLRs (TLR2, TLR4 i TLR9) a les biòpsies de pacients amb PM i DM suggerint el seu paper en el dany tissular<sup>95</sup>. Estudis posteriors analitzant **el perfil transcriptòmic utilitzant biòpsies de pacients amb PM i DM han demostrat la sobrerregulació de TLRs**. En concret, el TLR3 es va trobar sobrerregulat particularment a la DM i era localitzat en cèl·lules endotelials, en cèl·lules inflamatòries infiltrants i a fibres musculars regenerants<sup>96</sup>. Malgrat aquestes troballes,

no s'ha identificat cap mecanisme específic per cap entitat. A més, els autors suggereixen que una limitació de l'estudi pot ser la utilització de la biòpsia muscular sencera on els infiltrats inflamatoris estan presents<sup>96</sup>.

### 3.1.4 Miopaties necrotitzants immuno mediades

Les miopaties necrotitzants immuno mediades (IMNM, de l'anglès *immune-mediated necrotizing myopathy*) son un **grup heterogeni de malalties que es caracteritzen per CK molt elevades, per una debilitat muscular subaguda associada a la presència d'abundants fibres musculars necròtiques i infiltrats macrofàgics a la biòpsia muscular**<sup>70</sup> (figura 11).

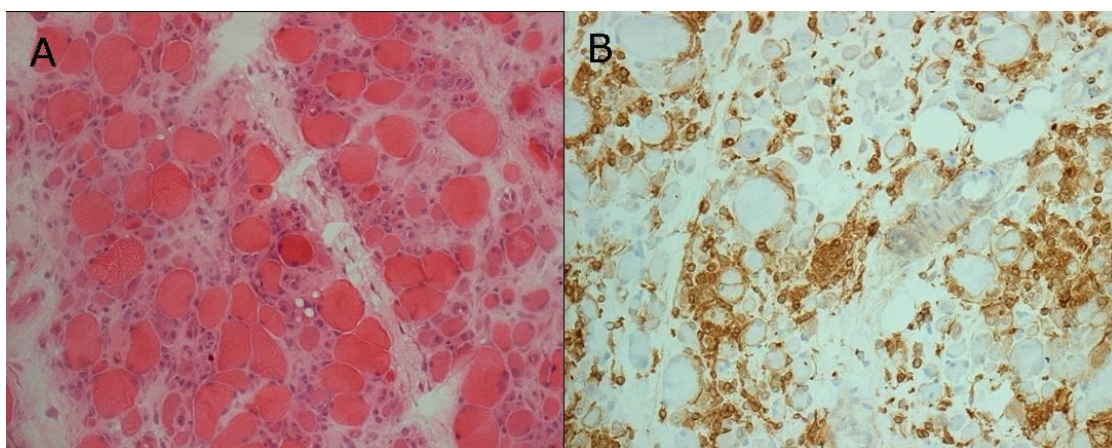


Fig 11. Tinció de hematoxilina i eosina en una biòpsia muscular d'un pacient amb IMNM on s'observa necrosi i abundants infiltrats inflamatoris (A). Immunohistoquímica de CD68 demostrant l'abundant infiltrat macrofàgic (B). Magnificació 100X.

La classificació d'aquest grup heterogeni és motiu d'intens debat i d'intensa recerca<sup>97</sup>. Per exemple, la IMNM pot associar-se a la presència d'anticossos anti-SRP (de l'anglès *signal recognition particle*) que es caracteritza per una debilitat proximal i simètrica amb abundants macròfags peri i endomisials a la biòpsia. S'ha descrit una correlació entre els títols d'anti-SRP i els nivells elevats de CK en sèrum suggerint un possible paper patogènic dels anticossos<sup>98</sup>. Un altre grup s'associa a anti-HMGCR on la majoria dels pacients descrita prenien estatines<sup>99</sup>. El síndrome antisintetasa té una

heterogeneïtat clínica destacada<sup>100</sup> i també pot associar-se a IMNM amb una debilitat especialment escapular, s'associa freqüentment a síndromes reumatològics i a la presència d'anticossos anti-sintetasa (Jo-1, PL-7, PL-12, OJ, KS, Zo, YRS)<sup>101</sup>.

### 3.2 Les síndromes de superposició (*overlap myositis*)

La simptomatologia de **la DM pot solapar-se amb altres malalties** com la esclerosi sistèmica, la malaltia mixta del teixit connectiu, síndrome anti-sintetasa, artritis reumatoide o lupus eritematós sistèmic on les lesions cutànies poden ser transitòries o lleus. Aquestes entitats clíniques s'estan començant a reconèixer i s'anomenen síndromes de superposició (*overlap myositis* en anglès)<sup>48</sup>. Malgrat no hi ha biomarcadors específics per cada entitat de superposició, la determinació d'autoanticossos pot proporcionar evidències diagnòstiques. La distinció dels pacients amb miopaties inflamatòries amb síndrome de superposició és important desde el punt de vista pronòstic ja que sovint aquests pacients presenten complicacions que poden arribar a ser fatals i que per tant necessiten d'un seguiment més exhaustiu<sup>102, 103</sup>. A més, **histològicament hi ha solapaments que en dificulten el diagnòstic**. Per exemple, s'ha descrit que **l'atrofia perifascicular, considerada clàssicament una troballa única a la DM, pot observar-se en síndromes de superposició com a l'anti-sintetasa**<sup>104</sup>. Per tant, la recerca de biomarcadors d'aquestes entitats és necessària. Recentment s'ha proposat un biomarcador histològic per al síndrome anti-sintetasa. Es va observar que el 82% de les biòpsies musculars d'aquests pacients presentaven l'expressió de HLA-DR a les fibres musculars amb un patró perifascicular, mentre que a la DM el percentatge es reduïa fins al 23%<sup>104</sup> (figura 12). S'ha observat que la miositis associada al síndrome anti-sintetasa es caracteritza per inclusions nuclears de filaments d'actina úniques, reforçant la hipòtesi de que aquesta entitat no hauria d'agrupar-se amb la resta de miopaties inflamatòries<sup>105</sup> (figura 13).

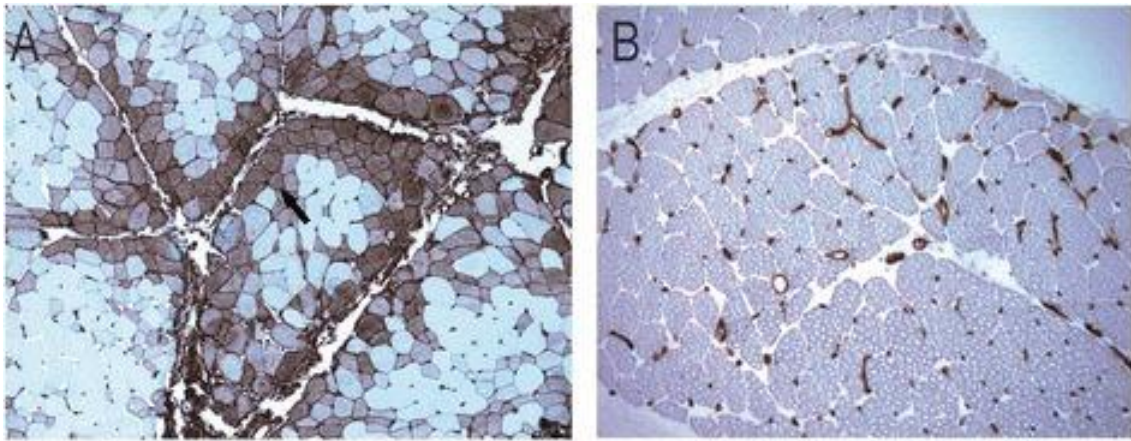


Fig 12. Immunohistoquímica de HLA-DR en biòpsies musculars. L'expressió de HLA-DR s'observa a les fibres perifasciculars en un pacient amb miopatia associada a antisintetasa (A) mentre que a una biòpsia d'un pacient amb DM no s'observa expressió de HLA-DR a les fibres musculars (B)<sup>104</sup>.

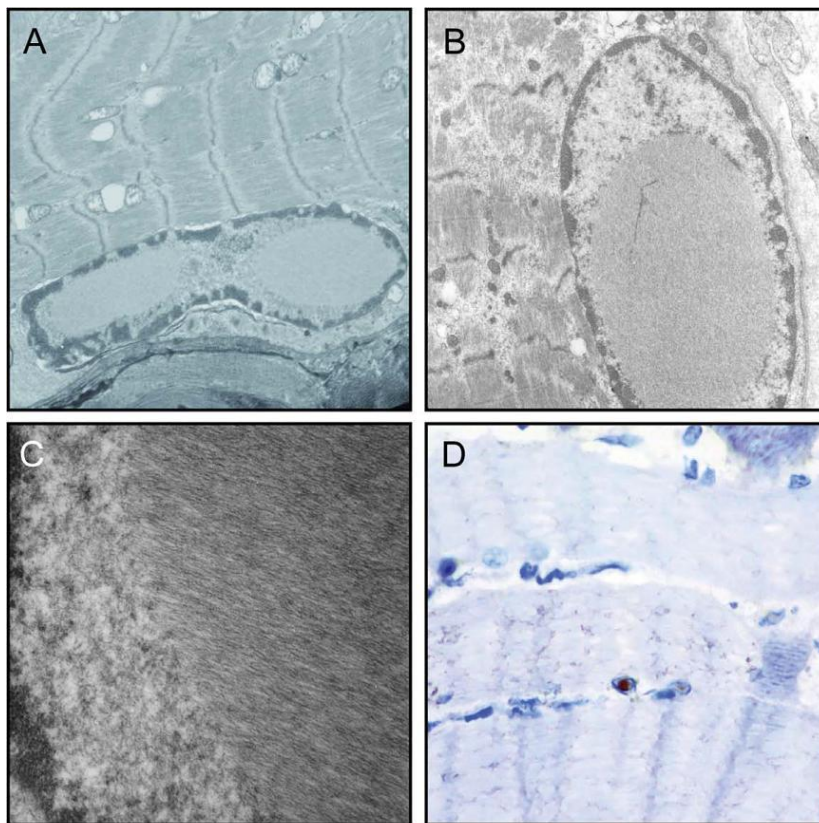


Fig 13. Microscopia electrònica de biòpsies musculars de pacients amb miopatia associada a síndrome anti-sintetasa. Agregats filamentosos mionuclears (A-C) que són positius per actina (D)<sup>105</sup>.

## **II.HIPÒTESI I OBJECTIUS**

## II. HIPÒTESI I OBJECTIUS

### HIPÒTESI

Les miopaties inflamatòries Dermatomiositis, Polimiositis i Miopatia per Cossos d'Inclusió comparteixen mecanismes immunopatogènics, però n'hi ha d'haver de diferencials. La hipòtesi és que a la Dermatomiositis la isquèmia ha de jugar un paper específic, no compartit per les altres miopaties inflamatòries.

Trobar aquests mecanismes tindrà implicacions diagnòstiques i terapèutiques.

### OBJECTIU GENERAL

Descriure nous mecanismes patogènics específics a les miopaties inflamatòries i avaluar-ne la seva utilitat clínica.

### Objectius concrets:

- 1) Estudiar el perfil transcriptòmic (*microarrays*) de fibres musculars MHC-I de pacients amb miopaties inflamatòries i controls. A partir de biòpsies musculars, aïllar les fibres per microdissecció làser per tal d'evitar la interferència dels infiltrats inflamatoris.
- 2) A partir dels resultats del *microarrays*, descriure noves vies específiques que puguin tenir un paper en la fisiopatogènia de les miopaties inflamatòries.
- 3) Estudiar l'efecte de la hipòxia sobre els mecanismes immunològics a la DM.
- 4) Avaluar la utilitat clínica de les troballes com a biomarcadors clínics.



### **III. MATERIAL I MÈTODES**

### III. MATERIAL I MÈTODES

#### 1. Pacients

Els pacients que s'han estudiat en aquesta tesi s'han diagnosticat a la Unitat de Malalties Neuromusculars de l'Hospital de Sant Pau seguint les guies actualment existents. Addicionalment s'han obtingut biòpsies musculars de l'Hospital de la Vall d'Hebrón i de l'Hospital Clínic de Barcelona.

#### 2. Microdissecció làser guiada per immunofluorescència

La microdissecció làser és una tècnica innovadora que permet l'aïllament específic d'estructures o tipus cel·lulars d'interès que formen part de teixits complexos (figura 14). En aquesta tesi la microdissecció làser es va aplicar per aïllar les fibres musculars patològiques de biòpsies musculars de pacients amb miopaties inflamatòries per posteriorment fer un anàlisi transcriptòmic (*microarrays*) Aquestes biòpsies es caracteritzen per una presència d'infiltrats inflamatoris fenotípicament i quantitativament variable que poden dificultar-ne l'estudi de la biòpsia sencera. El criteri que vam seguir va ser l'aïllament de fibres musculars que expressaven MHC-I.

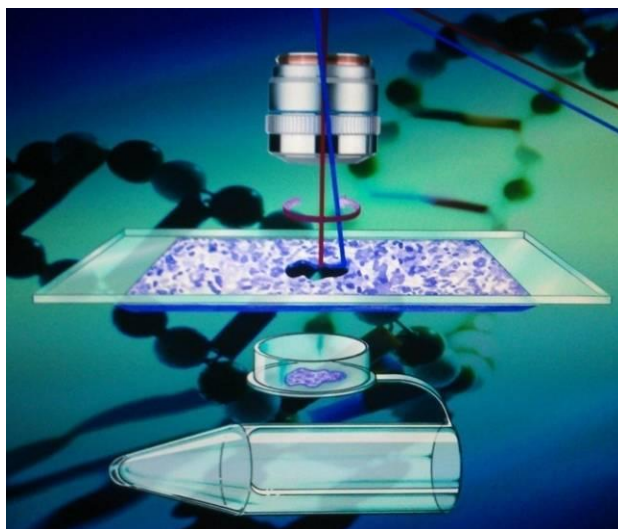


Figura 14. Esquema de la microdissecció làser

Les biòpsies musculars es van tallar en seccions de 20 µm en un criostat i montades en portaobjectes per microdissecció (Expression Pathology, Rockville, MD) prèviament exposats a llum ultravioleta durant 30 min i recoberts amb poli-L-lisina durant 5 min (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO).

Per identificar les fibres musculars patològiques que expressen MHC-I i poder aïllar-les posteriorment, es va desenvolupar un protocol d'immunofluorescència ràpid que minimitza la degradació de RNA per als posteriors anàlisis transcriptòmics. Els talls criostàtics es van fixar durant 5 min amb acetona. Després de rentats amb PBS, els talls es van incubar amb anti-MHC-I (DAKO, Carpenteria, CA, USA) durant 15 min a dilució 1/5. Després de rentar amb PBS, es va incubar l'anticòs secundari de cabra anti-ratolí Alexa594 a 1/100 (Molecular Probes, Eugene, OR). Després de rentar amb PBS, les mostres es van posar en una cambra de dessecació fins començar la microdissecció.

Les fibres MHC-I positives de 5 pacients amb DM, 5 amb PM i 5 amb IBM i les MHC-I negatives de controls sans es van aïllar utilitzant un microdissector Leica LMD 6000 (Leica Microsystems). En el cas de la DM aquestes fibres estaven principalment a l'àrea perifascicular (figura 15), mentre que a la resta, el patró d'expressió de MHC-I era difús. Els infiltrats inflamatoris es van evitar durant la microdissecció. Es van obtenir 7 mm<sup>2</sup> de múscul de cada mostra i van ser immediatament congelades a -80°C abans de procedir a l'extracció de RNA.

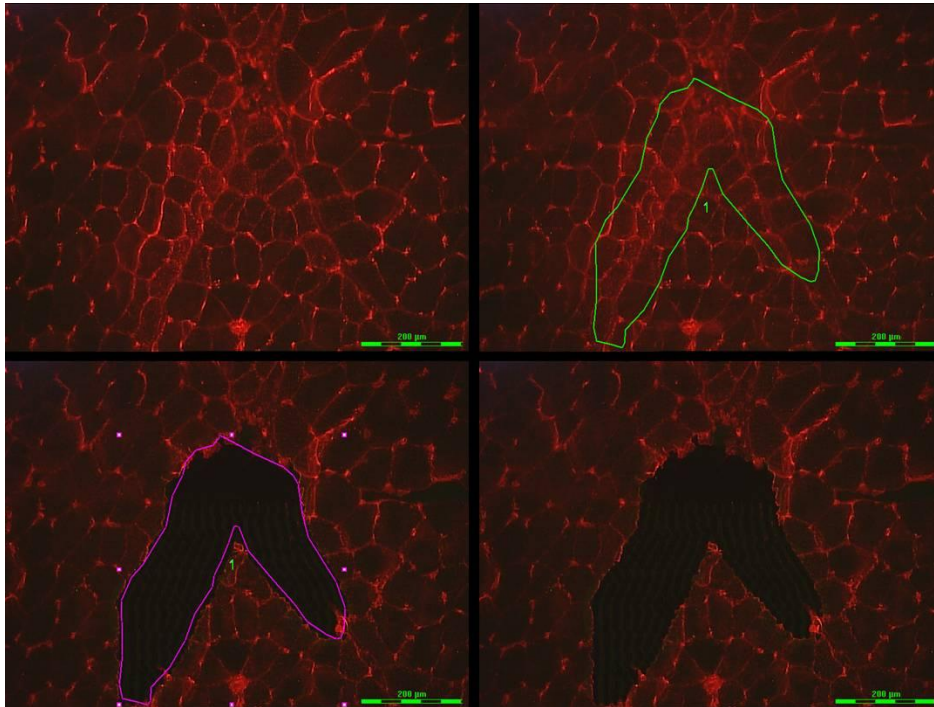


Fig 15. Microdissecció làser guiada per immunofluorescència de MHC-I en una biòpsia muscular d'un pacient amb DM.

### 3. Biologia molecular

#### 3.1 Microarrays

El RNA total de les mostres procedent de la microdissecció làser es va aïllar utilitzant el Rneasy Micro Kit (Qiagen NV, Hilden, Germany). La qualitat i integritat del RNA extret es va analitzar a través d'un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Només les mostres amb RIN (nombre d'integritat de RNA) similar es van incloure a l'estudi. Una mostra procedent d'un pacient amb IBM es va descartar per no arribar a un RIN equivalent a la resta de mostres. Cinc nanograms de RNA total de cada mostra microdisseccionada es va utilitzar per un microarray individual utilitzant Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array. Donat que la quantitat de RNA extret a través de la microdissecció és molt baix, es va fer un pas previ de superamplificació obtenint ssDNA utilitzant Ovation™ Pico WTA System (NuGEN Technologies, San Carlos, CA). Després de fragmentar i marcar amb Encore® Biotin Module (NuGEN Technologies) el cDNA biotinitat es va hibridar en els arrays d'acord amb les instruccions del fabricant.

### 3.2 Extracció de RNA, retrotranscripció i qPCR

El RNA total dels experiments in vitro es va aïllar mitjançant Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) i es van retrotranscriure utilitzant High Capacity cDNA Retrotranscription Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) seguint les instruccions del fabricant. Els nivells d'expressió de mRNA es van quantificar mitjançant la PCR quantitativa (qPCR) utilitzant sondes fluorogèniques TaqMan (Applied Biosystems). Les sondes utilitzades s'indiquen a la taula 4. Els nivells d'expressió relativa es van determinar pel mètode Ct ( $\Delta\Delta CT$ ). El calibrador utilitzat en cada cas s'especifica al peu de figura corresponent.

Nom del gen	Sonda <i>Taqman</i>
<i>DDX58</i> (RIG-I)	Hs00204833_m1
<i>B2M</i> ( $\beta$ 2-microglobulin)	Hs00984230_m1
<i>RSAD2</i> (viperin)	Hs00369813_m1
<i>OAS1</i>	Hs00973637_m1
<i>TLR3</i>	Hs01551078_m1
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1
<i>CTSB</i>	Hs00947433_m1
<i>CTSD</i>	Hs00157205_m1
<i>CTSK</i>	Hs00166156_m1
<i>FBX032</i> (Atrogin-1)	Hs01041408_m1
<i>Desmin</i>	Hs00157258_m1

Taula 4. Sondes *Taqman* utilitzades per els estudis de expressió gènica.

### 3.3 Clonatge, plàsmids i assaig de la luciferasa

Vam utilitzar DNA genòmic d'un donant sa com a motlle per amplificar un fragment de 580 pb desde la regió +3495 a la regió +4075 del promotor 3'UTR de RIG-I, codificat pel gen *DDX58* (NM\_014314.3). Aquesta regió que es va clonar conté 4 elements de resposta a hipòxia (HRE) que es defineixen per la seqüència A/GCGTG que es troben a les regions +3628, +3824, +3982 i +4040 del promotor de RIG-I. La reacció de PCR es va fer utilitzant els següents encebadors sentit 5' CCTCTTTGCTGATCCCTTCCA 3' que conté una única diana de restricció per KpnI a l'extrem 5' i encebador anti sentit 5'

CCTCATCCCCGTTGATCTCCAG 3' que conté una única diana de restricció per SmaI a l'extrem 3'.

Per clonar la seqüència del promotor de IFN $\beta$  que conté la regió potenciadora (*enhanceosoma*)<sup>106</sup> es va amplificar la regió desde -102 a -46 utilitzant els següents encebadors: sentit 5' TGCTTTCCTTTGCTTTCTCCC 3' i anti sentit 5' CAACCTTTCGAAGCCTTTGC 3' que contenen úniques dianes de restricció per HindIII i NheI a l'extrem 5' i 3' respectivament. Els productes de PCR es van purificar utilitzant el Qiaquick extraction kit (Qiagen, Iberica, Madrid, Spain) i clonats en un plàsmid p-Spark TA (Canvax Biotech, Cordoba, Spain). El vector p-Spark que conté l'insert d'interès i el plàsmid pGL3b luciferasa (Promega, Madison, WI, USA) es van digerir amb els mateixos enzims de restricció específics (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). La lligació de l'insert amb el plàsmid pGL3b es va realitzar utilitzant la lligasa de DNA T4 (New England Biolabs). L'orientació correcte del fragment clonat es va comprovar per seqüenciació de DNA. Els plàsmids pGL3b que contenia el fragment de promotor de RIG-I (pGL3-RIG-I 3'UTR) i que contenia la regió potenciadora de IFN $\beta$  (pGL3b+IFN *enhanceosome*) es van purificar utilitzant Maxi prep kit (Qiagen).

Per analitzar la capacitat de l'hipòxia en induir la transcripció dels fragments clonats vam utilitzar un assaig dual indicador de luciferasa (Promega) seguint les instruccions del fabricant. L'assaig de la luciferasa és una tècnica comunament utilitzada com a indicadora de l'activitat transcripcional a cèl·lules que s'han transfectat amb un constructe que conté el gen de la luciferasa sota el control d'un promotor d'interès clonat. A més a més del plàsmid reporter, cal co-transfectar un plàsmid com a control intern (figura 16). En aquest cas es va utilitzar el plàsmid pRLTK que codifica per la proteïna renilla. Els transfectants transitoris es van recol·lectar amb tampó de lisi i es

va calcular la relació luciferasa /renilla mesurant amb un luminòmetre (Victor3, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

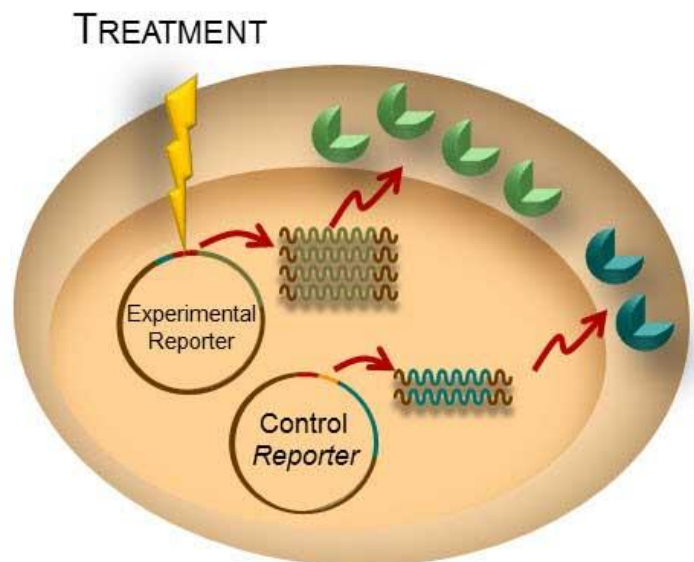


Fig 16. Esquema de l'assaig de la luciferasa (extret de [www.promegaconnections.com](http://www.promegaconnections.com))

#### 4. Assajos in vitro

##### 4.1 Cultius primaris humans de múscul esquelètic

Les biòpsies musculars de pacients i controls sans es va trossejar i els explants es van cultivar com es va descriure prèviament <sup>107</sup>. Per obtenir un cultiu de mioblastes pur, els cultius primaris es van seleccionar mitjançant separació immunomagnètica per CD56 seguint les instruccions del fabricant (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Sols es van utilitzar els cultius amb més d'un 95% de puresa. Els mioblastes purificats es van cultivar en medi DMEM:M-199 (3:1) (Lonza, Basel, Switzerland) amb 10% de sèrum fetal boví, 10mM de glutamina i antibiòtics. Quan el cultiu de mioblastes estava confluent, es va induir la diferenciació reduint el sèrum fetal al medi de cultiu fins a un 2% per obtenir miotubs multinucleats.

##### 4.2 Cultiu amb lligands de RIG-I i amb IFNs.

Els miotubs humans es van cultivar amb lligands específics de RIG-I (5'ppp dsRNA/Lyovect) a 2 µg/ml<sup>108</sup>. Com a control negatiu es va utilitzar la mateixa molècula sense la fracció 5'ppp (Invivogen, San Diego, CA). Es va afegir a diferents temps 10-100 U/ml d' IFNα o IFNβ (Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA) i 500 U/ml de IFNγ (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

#### 4.3 Assajos d'inhibició d'IFNβ i TLR3

Per investigar l'efecte de la neutralització d'IFNβ en miotubs activats amb lligands de RIG-I es van afegir concentracions creixents d'anti-IFNβ neutralitzant (10, 50 o 100 µg/ml) eBioscience, San Diego, CA) o 50 µg/ml de control d'isotip (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Per excloure possibles efectes degut a la senyalització de TLR3 en miotubs on es va activar RIG-I, es van tractar els cultius amb cloroquina (Invivogen), un inhibidor de l'acidificació endosòmica necessària per la senyalització de TLR3<sup>109</sup>.

#### 4.4 Cultiu i transfecció transitòria de la línia HEK293

La línia cel·lular HEK-293 cell (ATCC, CRL-1573) es va cultivar amb DMEM complementat amb 5% de sèrum fetal boví (Lonza), 5% de suero de cavall (Lonza), 1mM de glutamina (Lonza), 1mM piruvat sòdic (Lonza) i 1% de penicil·lina-streptomycina- amfotericina-A (Lonza). La transfecció de HEK293 es va realitzar amb el sistema Fugene HD (Promega) seguint les instruccions del fabricant. Es van transfectar 400.000 cèl·lules amb 2.8 µg de DNA de pGL3b+RIG-I 3'UTR o de pGL3b+IFN *enhanceosome*. Com a control intern es va transfectar amb 120 ng de DNA de pRLTK (Promega) que expressa renilla sota el promotor HSV TK. Per experiments de sobreexpressió de RIG-I es va transfectar la línia HEK-293 amb el plàsmid de transfecció constitutiva pCMV-RIG-I (Origene).

#### 4.5 Inducció de la resposta a hipòxia



La resposta cel·lular d'hipòxia està modulada principalment per l'estabilització del factor de transcripció HIF1 $\alpha$ . A més de la falta d'oxigen, s'ha descrit que l'estabilització de HIF1 $\alpha$  es pot induir *in vitro* amb CoCl<sub>2</sub>. Es va induir la hipòxia afegint 250  $\mu$ M de CoCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) al medi de cultiu corresponent a miotubs humans i a cèl·lules HEK293.

## 5. Western-blot

Per obtenir les mostres proteiques de cada condició experimental, les cèl·lules es van recollir i es van homogeneïtzar dos cops durant 15s en 19 volums d'un tampó que contenia 0.125 mol/l Tris/HCl pH 6.4, 10% glicerol, 4% SDS, 4 mol/l urea, 10% mercaptoetanol i 0.001% de bromofenol blau (pH final 6.8). Els extractes proteics es van tractar amb inhibidors de proteases i fosfatases (Roche Diagnostics). Els extractes es van tractar durant 3 min a 95°C, es van centrifugar durant 3 min a 9500 i 30  $\mu$ l dels sobrenedants es van carregar en un gel de poliacrilamida. Després de la transferència a una membrana de nitrocel·lulosa, els llocs d'unió d'aquesta es van bloquejar incubant la solució de bloqueig Odyssey (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) / PBS (1:1). Es va incubar durant una hora a temperatura ambient l'anticòs primari que corresponia a cada condició experimental. Els anticòsos secundaris corresponents Dye680 o Dye800 (Li-Cor) es van incubar durant una hora a la dilució 1:7500. Les bandes immunoreactives es van visualitzar i quantificar utilitzant el sistema de detecció infraroja Odyssey (Li-Cor) i el seu corresponent *software*.

## 6. ELISA

Les concentracions d'IFN $\alpha$  i IFN $\beta$  dels sobrenedants dels cultius es van determinar utilitzant ELISAs específics seguint les instruccions del fabricant (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ). Cada mostra es va analitzar per triplicat.

## 7. Histoquímica, immunofluorescència, immunohistoquímica i immunocitofluorescència.

La tinció de PAS (periodic acid-Schiff) és un mètode rutinàriament utilitzat per la detecció de polisacàrids com el glicogen. Vam aplicar aquesta tinció en cultius primaris de múscul crescuts sobre cobreobjectes. Es va incubar durant 30 min amb 1% d'àcid periòdic en àcid acètic (Sigma-Aldrich). A continuació es van rentar amb 0.1% de metabisulfit sòdic en 1mM d'àcid hidroclicòric (Sigma-Aldrich). Finalment les cèl·lules es van incubar durant 15 min amb la solució de Schiff (Merck, Darmstadt, Germany).

Les immunofluorescències dobles en biòpsies musculars de RIG-I i MHC-I es van realitzar com prèviament s'han descrit<sup>110</sup>. Les seccions es van incubar amb un monoclonal de ratolí anti-RIG-I a 1/50 (Thermo Scientific, Rockford, USA) i un monoclonal de ratolí anti-MHC-I a 1/100 (Dako). Seccions seriades es van utilitzar per la detecció de RSAD2 (viperin) a 50 µg/ml (Abcam, Cambridge, MA), de MHC-I (Dako) a 1/100 i de IFIH1 (MDA5) a 1/1000 (Abcam). Les preparacions es van muntar amb el medi de muntatge Fluoprep (Biomerieux, France). Per l'anàlisi de RIG-I i HLA-DR (1/20; Dako) a un llarg nombre de biòpsies es va utilitzar el sistema de detecció Novolink Polymer seguint les instruccions del fabricant. (Novocastra, Leica Microsystems). El producte de la reacció es va visualitzar com a precipitat marró amb la incubació del substrat 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Les preparacions es van muntar amb el medi de muntatge Aquatex. Les mostres es van avaluar per 6 investigadors independents.

La immunolocalització de RIG-I i IFIH1 (MDA5) es va estudiar en miotubs humans cultivats sobre cobreobjectes. Després de passos de rentats, els miotubs es van fixar en metanol fred o en paraformaldehid al 4% durant 10 min. Es van incubar amb solució de bloqueig i posteriorment amb un conill anti-RIG-I o un conill anti-MDA5 (Abcam)

durant una hora. Després dels rentats es van incubar amb els anticossos secundaris fets en cabra anti-conill Alexa594 a 1/200. Els cobreobjectes es van muntar amb medi de muntatge que contenia DAPI (Vector Labs, USA). Les imatges es van obtenir amb un microscopi Olympus BX51 acoblat a una càmera DP72 Olympus.

## 8. Anàlisi de l'atrofia perifascicular a biòpsies musculars

No hi ha cap mètode establert per avaluar l'atrofia perifascicular a les biòpsies musculars. Vam establir la presència d'atrofia perifascicular quan hi havia una reducció del diàmetre de les fibres musculars que afectava una o dues fileres de fibres. Vam analitzar també la presència d'atrofia utilitzant un mètode més restrictiu que incloïa només aquelles biòpsies que presentaven dos o més fileres de fibres musculars atrofiques. Per tant, el segon grup és inclòs en el primer grup. Ambdós grups es van analitzar per separat. Les mostres es van avaluar de manera cega per 4 investigadors independents.

## 9. Estadística

L'anàlisi dels *microarrays* per determinar els gens diferencialment expressats es va basar ajustant un model lineal de la moderació Bayesiana de la variància empírica<sup>111</sup>. L'anàlisi de les comparacions múltiples es van corregir pel percentatge de falsos positius. Les significacions estadístiques es van obtenir utilitzant els test t, Fisher o  $\chi^2$  segons correspongui. La reproductibilitat es va analitzar amb el coeficient Kappa de Cohen, considerant que major de 0.75 és excel·lent, entre 0.4 i 0.75 és bo, i per sota de 0.4 és pobre. La sensibilitat i especificitat es van analitzar amb el test de Mc Nemar. Un p valor menor a 0.05 es va considerar significant. L'elaboració i anàlisi de les dades es va fer utilitzant GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## **V. RESULTATS**

## A. Microarrays, validació i els efectes de RIG-I en miotubs

### 1) Perfil transcriptòmic de fibres musculars MHC-I+

#### microdisseccionades.

L'anàlisi bioinformàtic dels perfils transcriptòmics va demostrar 1.144 gens diferencialment expressats a la DM vs controls (906 sobreexpressats; 238 infraexpressats), 250 a la PM vs controls (167 sobreexpressats; 83 infraexpressats) i 485 a la IBM vs controls (308 sobreexpressats; 177 infraexpressats) ( $p < 0.01$ ). Quan vam comparar les diferents miopaties entre si, vam trobar 688 gens diferencialment expressats a la DM vs PM i 549 a la DM vs IBM ( $p < 0.01$ ).

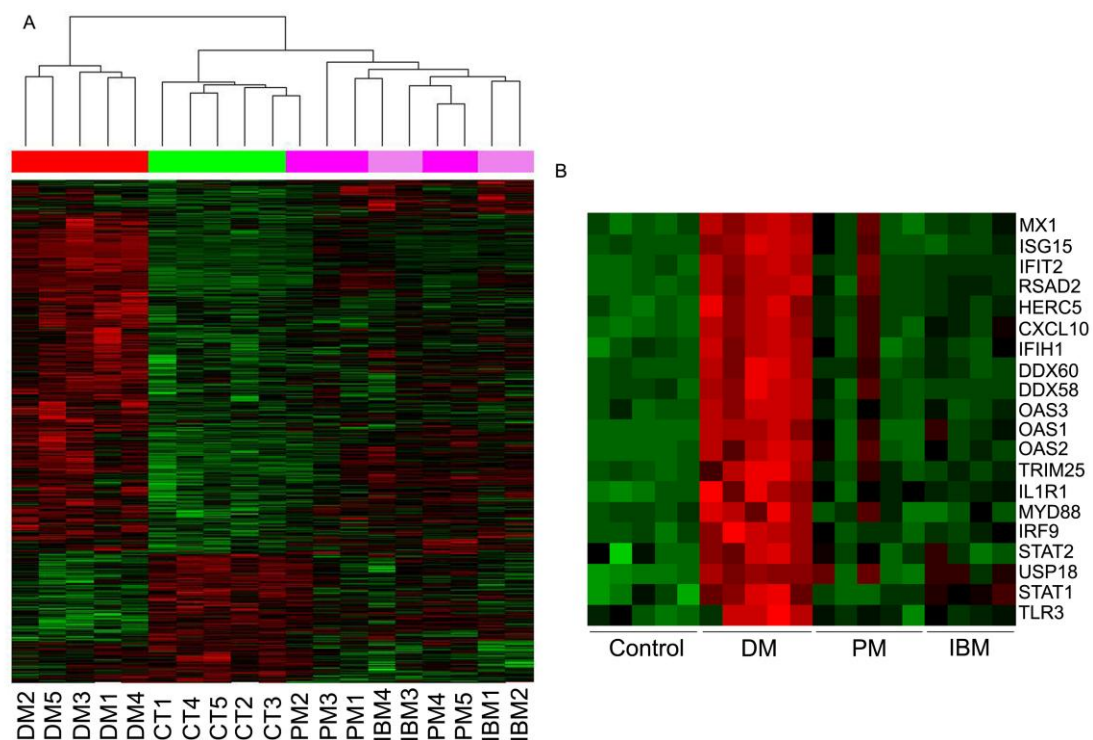


Figura 17. Perfil transcriptòmic a partir de microdissecció làser de fibres musculars. *Heatmap* de l'agrupació jeràrquica dels gens diferencialment expressats a fibres MHC-I positives de pacients amb DM, PM i IBM i fibres MHC-I negatives de controls sans ( $p$  valor ajustat  $< 0.05$ ;  $\log$  del doble canvi  $> 0$ ) (A). Gens diferencialment expressats involucrats en la resposta immune innata, resposta a virus i producció d'IFN. ( $p$  valor ajustat  $< 0.01$ , del doble canvi  $> 0$ ) (B). Valors d'expressió alts es representen en vermell i nivells baixos en verd. DM: dermatomiositis; CT: control; PM: polimiositis; IBM: Miopatia per cossos d'inclusió.

Vam analitzar els resultats per ontogènia dels gens, per determinar quines categories de gens implicats en diferents processos podien tenir una significància a la patogènia. Aquest anàlisi va demostrar una sobrerregulació de la “resposta de la immunitat innata” (GO0045087) tant a la DM, a la PM com a la IBM vs controls. Malgrat aquestes diferències, quan vam comparar les miopaties entre si, vam observar que la immunitat innata era també significativament sobrerregulada a la DM vs PM i a la DM vs IBM. El mateix vam observar per la categoria “resposta a virus” (GO0009615) i per la categoria “producció de IFN-I” (GO0032606).

	GO: Immunitat innata			GO: Resposta a virus			GO: Producció de IFN-I		
	Gens sobrerregulats	OR	p	Gens sobrerregulats	OR	p	Gens sobrerregulats	OR	p
DM vs control	115	3,67	8,3E-26	61	4,11	1,5E-16	15	4,32	2,0E-05
PM vs control	66	6,52	5,7E-28	27	4,97	2,0E-10	10	8,34	1,6E-06
IBM vs control	70	5,08	6,0E-24	27	3,7	6,7E-08	8	4,77	6,0E-04
DM vs PM	89	3,85	3,7E-22	50	4,58	6,9E-16	14	5,67	1,9E-06
DM vs IBM	90	4,14	3,1E-24	50	4,84	9,6E-17	12	4,87	3,4E-05

Taula 5 . Resultats dels *microarrays* analitzant-los per ontologia dels gens.  
GO: Gene ontology; OR: Odds ratio

**El receptor de la immunitat innata RIG-I, codificat pel gen DDX58, estava significativament sobrerregulat a la DM vs controls amb un valor de l'augment d'expressió de log 4,1.** A més el factor DDX60, que promou la senyalització de RIG-I, estava específicament sobrerregulat a la DM (figura 18A). L'augment de RIG-I era també significatiu quan comparàvem DM vs PM (logFC 3,7) i DM vs IBM (log 3,7) (figura 18B). Un altre membre de la família dels receptors RLR, el MDA5, estava significativament sobrerregulat a la DM vs controls (logFC 5.17), vs PM (logFC 4.14) i vs IBM (logFC 4) (figura 18C). El mRNA de TLR3 estava sobrerregulat en DM vs

controls (logFC 3.15), vs PM (logFC 2.8) i vs IBM (logFC 2.6) (figura 18D). OAS-1 and RSAD2 (Viperin) mRNAs, molècules involucrades en la resposta anti vírica, estaven sobre regulades en DM però no a la resta de malalties analitzades (figura 18 E i F). **Aquests resultats reforcen la hipòtesis del paper de la immunitat innata i de les vies anti víriques a les miopaties inflamatòries i suggereixen un paper més prominent dels RLRs específicament a la DM.**

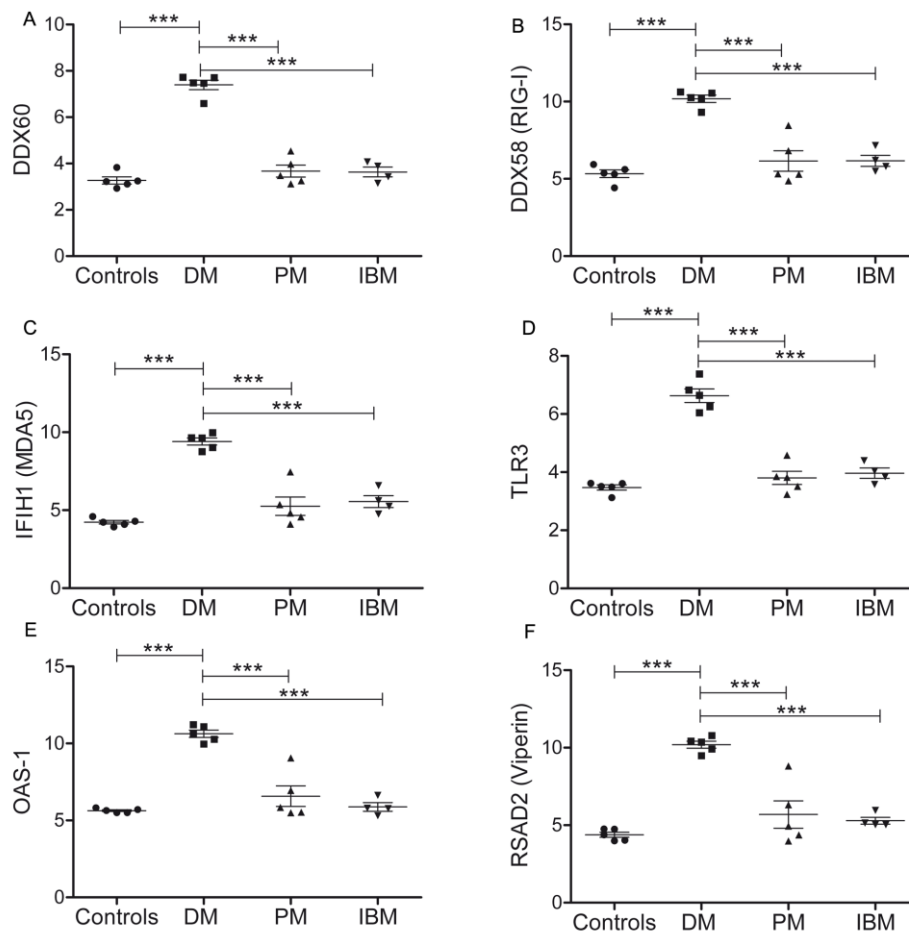


Fig 18. Valors d'expressió normalitzats demostrant la sobreregulació específicament a la DM dels mRNAs de DDX60 (A), DDX58 (RIG-I) (B), IFIH1 (MDA5) (C), TLR3 (D), OAS1 (E) i RSAD2 (viperin) (F) comparat amb PM, IBM i controls sans. \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001.

## 2) Validació dels resultats *in vivo*

Per corroborar les troballes de l'anàlisi transcriptòmic, varem analitzar l'expressió de RIG-I i Viperin/RSAD2 a nivell de proteïna a les biòpsies musculars dels mateixos pacients. L'anàlisi immunohistoquímic va demostrar l'expressió de viperin a les fibres musculars dels pacients amb DM (5/5) (figura 19A) que a més eren MHC-I positives (figura 19B). En canvi, no es va trobar reactivitat per viperin a les biòpsies dels pacients amb PM ni amb IBM (figura 19D i F). Els controls eren també negatius (figura 19H).

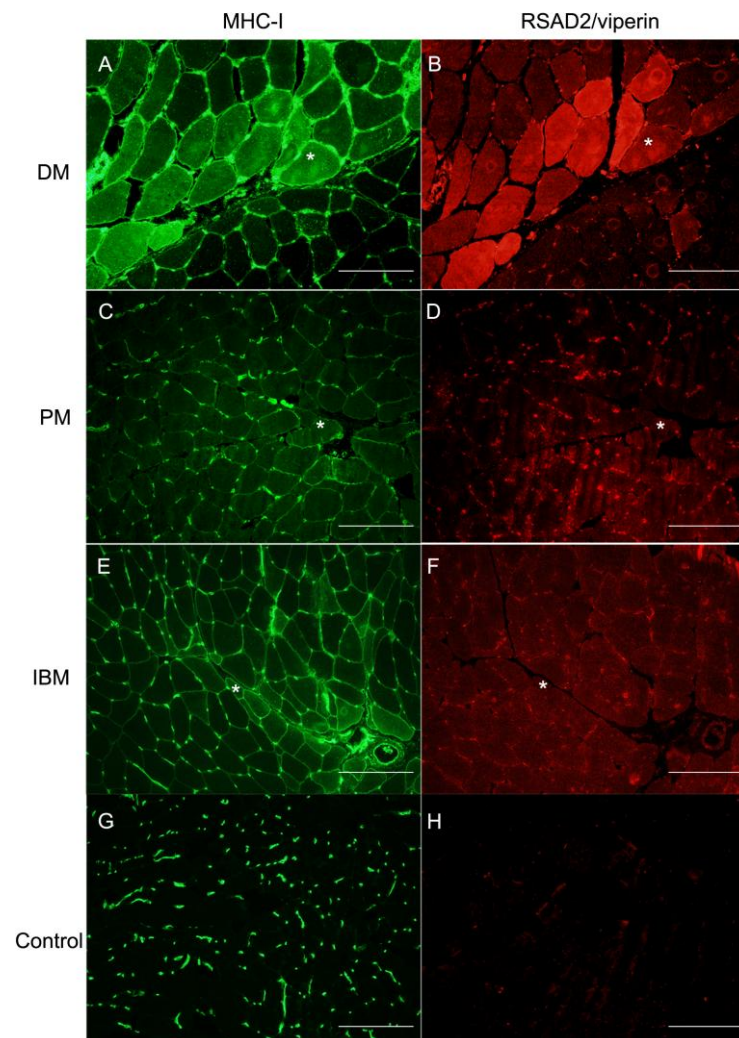


Fig 19. Immunohistoquímica de MHC-I i RSAD2/viperin en seccions seriades de biòpsies musculars. Les fibres musculars que expressen MHC-I a la DM (A) mostren també l'expressió de RSAD2/viperin (B). Les mostres de pacients amb PM i IBM expressen MHC-I (C i E respectivament) mentre que no expressen



RSAD2/viperin (D, F). Els controls sans ni expressaven MHC-I a les fibres musculars (G) ni RSAD2/viperin (H). Magnificació 100X.

L'anàlisi immunohistoquímic va demostrar l'expressió de **RIG-I majoritàriament a les fibres perifasciculars i colocalitzava amb les fibres MHC-I positives als pacients amb DM (5/5)** (figura 20A-C). En canvi, no es va trobar reactivitat per RIG-I a les biòpsies dels pacients amb PM i amb IBM (figura 2E i H) excepte per fibres necròtiques aïllades en un pacient amb PM i un pacient amb IBM.

Aquests resultats confirmen les troballes del perfil transcriptòmic i suggereixen que RIG-I podria estar involucrat en la sobreexpressió de MHC-I específicament a la DM.

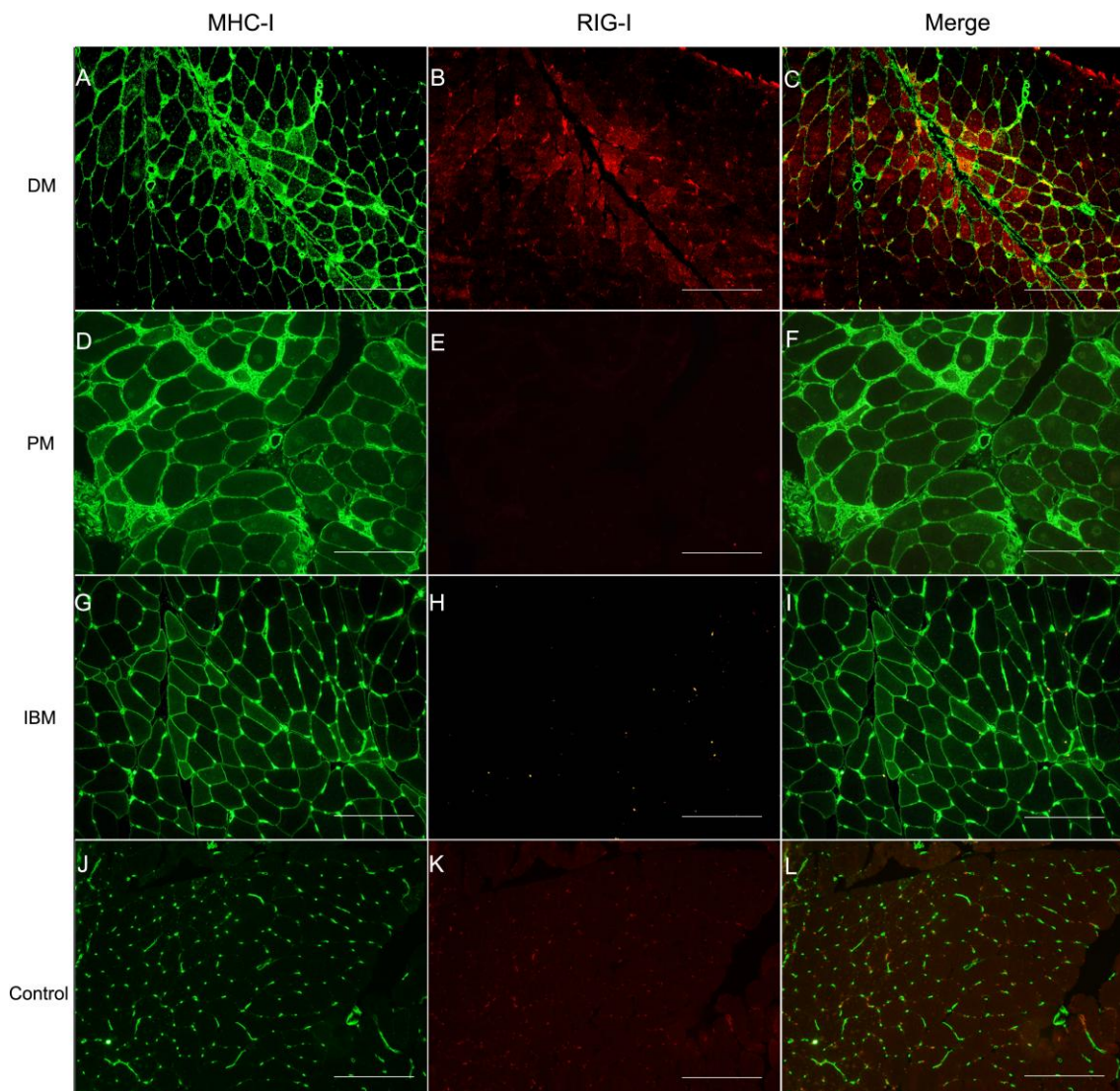


Fig 20. Immunohistoquímica doble de MHC-I i RIG-I en seccions congelades de biòpsies musculars de pacients amb miopaties inflamatòries. Fibres positives per MHC-I a la DM (A) mostren la sobreexpressió de RIG-I (B) que colocalitzen a les àrees perifasciculars (C). Fibres musculars positives per MHC-I estan presents a les biòpsies de pacients amb PM (D) i IBM (G) mentre que el RIG-I no es detecta (E, H respectivament). Les fibres musculars de les biòpsies dels controls sans no expressen ni MHC-I (J) ni RIG-I (K). Magnificació: 100X

### 3) Efecte de l'activació de RIG-I en miotubs humans

Per tal d'estudiar l'efecte de la via de RIG-I a cultius primaris de múscul humà, vam analitzar l'expressió de RIG-I en miotubs humans. Estudis de immunocitofluorescència en miotubs permeabilitzats van demostrar l'expressió citoplasmàtica de RIG-I (figura 21). Aquests resultats demostraven que els miotubs humans són un bon model per estudiar les conseqüències de la via de RIG-I a la fisiopatogènia de la DM.

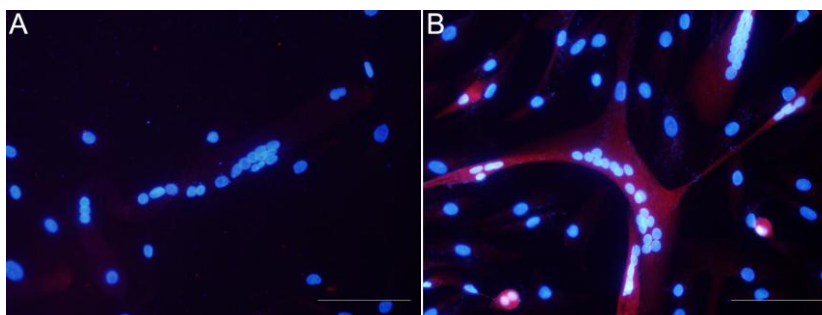


Fig 21. Immunocitoquímica de RIG-I en miotubs humans. En condicions no permeabilitzants no es detecta RIG-I als miotubs (A) mentre que en condicions permeabilitzants s'observa l'expressió citoplasmàtica de RIG-I (B). Magnificació 200X.

Es va induir l'activació de RIG-I en miotubs control i en miotubs provinents de pacients amb DM utilitzant lligands específics (5'ppp dsRNA/LyoVec) i lligands control. Els miotubs humans no produïen nivells basals detectables de IFN $\alpha$  ni de IFN $\beta$  mitjançant la tècnica de ELISA. Després de 24h d'activació de RIG-I no vam detectar nivells detectables de IFNs. En canvi, després de 48h vam detectar **nivells significatius de IFN $\beta$  en els sobredants dels miotubs control i de pacients amb DM activats**

**amb lligand de RIG-I** comparat amb el lligand control (figura 22A) mentre que el IFN $\alpha$  no es va detectar.

Estudis de PCR quantitativa (qPCR) van demostrar que després de 48h d'activació, el mRNA de la  $\beta$ -2 microglobulin (component del MHC-I) tenia un augment significatiu en miotubs control ( $p < 0.05$ ) i en miotubs de pacients amb DM ( $p < 0.01$ ) (figura 23A). Aquests resultats es van confirmar per *western-blot*. Malgrat la comparació de la quantificació de MHC-I no tenien significància estadística, es va observar una clara tendència a la **sobreexpressió de MHC-I en els cultius activats amb lligands de RIG-I** (figura 22B).

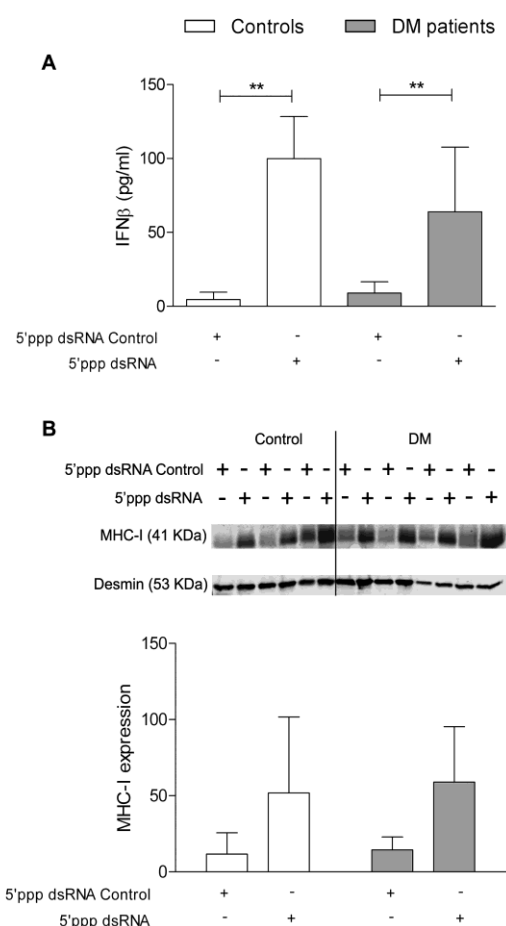


Fig 22. L'activació de RIG-I a miotubs humans indueix la secreció de IFN $\beta$  i la sobreexpressió de MHC-I. Miotubs procedents de controls sans i pacients amb DM cultivats durant 48h amb lligands específics de RIG-I (5'ppp dsRNA) indueixen un augment significatiu de IFN $\beta$  als sobrenadants dels cultius comparat amb el cultiu amb lligands control (A). El *western-blot* demostra un augment de l'expressió de MHC-I dels miotubs de controls ( $n=3$ ;  $p=0.26$ ) i pacients amb DM ( $n=4$ ;  $p=0.054$ ) activats amb lligands de RIG-I. Per la

quantificació de MHC-I es va utilitzar desmina com a control de càrrega. Les mostres es van analitzar per triplicat. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

L'anàlisi de qPCR va demostrar també que el mRNA de DDX58 (RIG-I) era significativament major en els cultius control activats amb RIG-I comparat amb el lligand control (p<0.05) (figura 23B). En el cas dels miotubs de pacients amb DM es va obtenir una significació de p=0.08 indicant una clara tendència. L'activació de RIG-I va tenir el mateix efecte sobre el mRNA de TLR3 mRNA en controls (p<0.01) tot i que en miotubs de DM era significatiu (p<0.001) (figura 23C). Vam observar el mateix efecte en OAS-1 (p<0.05) (figura 23D). El mRNA de RSAD2 (viperin) estava sobreexpressat en controls (p<0.05) però no en els pacients (p=0.06) (figura 23E). **En conjunt, aquests resultats demostraven que l'activació de la via de senyalització de RIG-I indueix una sobreexpressió de MHC-I, la secreció de IFN $\beta$  i una retroalimentació positiva de RIG-I. La presència de RIG-I a les biòpsies musculars dels pacients amb DM podrien ser conseqüència de la seva pròpia activació.**

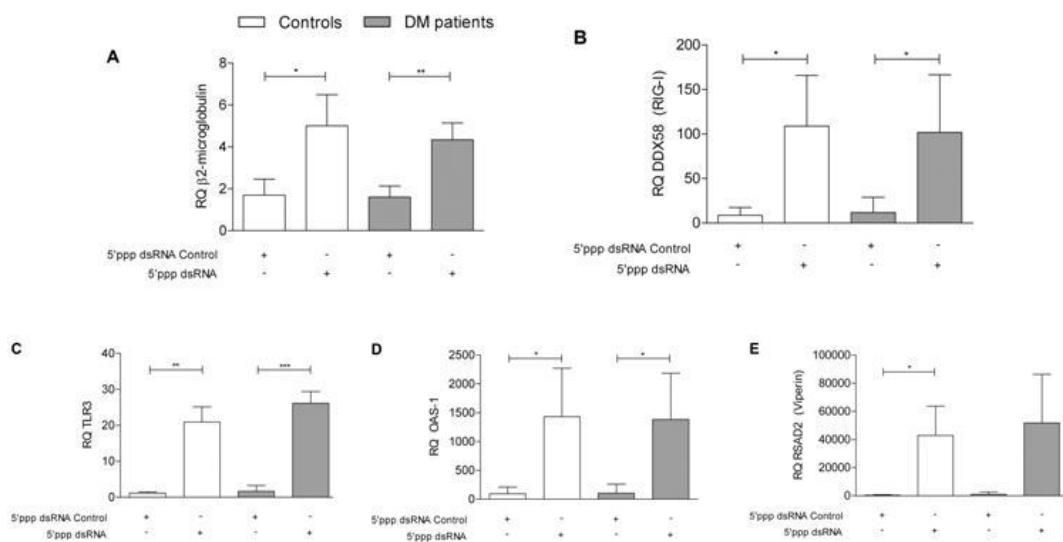


Fig 23. Efecte de l'activació de RIG-I a miotubs humans sobre l'expressió gènica. El cultiu durant 48h de miotubs de controls sans i de pacients amb DM amb lligands específics de RIG-I (5'ppp dsRNA)

demostren un augment significatiu de  $\beta$ 2-microglobulina (A), de DDX58/RIG-I (B), de TLR3 (C), d'OAS1 (D) i de RSAD2 (viperin) (E) comparat amb el lligand control. RQ: quantificació relativa utilitzant GAPDH com a control endògen i miotubs sense tractar com a mostra calibradora. Les mostres es van analitzar per triplicat. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

#### 4) L'efecte de l'activació de RIG-I és dependent de IFN $\beta$ i independent de TLR3.

Per avaluar si els efectes de l'activació de RIG-I en miotubs són deguts a un efecte autocrí de la secreció de IFN $\beta$  provocats per l'activació de RIG-I, vàrem bloquejar aquesta citocina amb un anticòs específic en cultius activats.

Després de 48h d'activació, la inducció del mRNA de la  $\beta$ -2 microglobulina va disminuir en un 69% ( $p$ <0.05) (figura 24A). Vàrem observar també una disminució en l'expressió de DDX58 (RIG-I) (50%) i de TLR3 (75%) (figura 24B i C). **Aquests resultats indicaven que els efectes de l'activació de RIG-I en miotubs són majoritàriament mediat per IFN $\beta$ .**

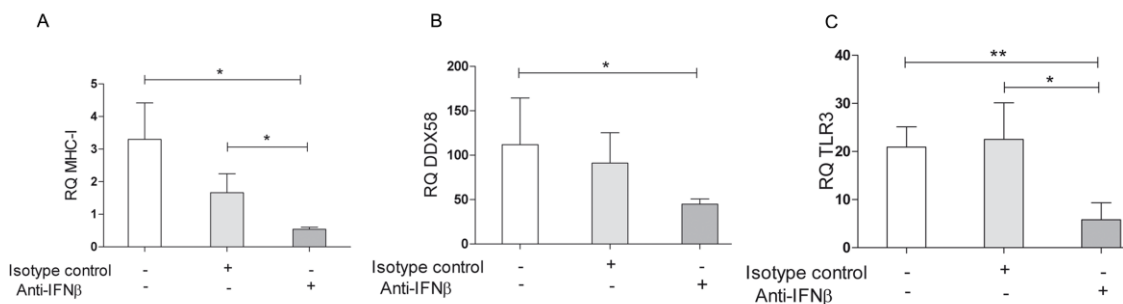


Fig 24. Experiments de bloqueig d'IFN $\beta$  en miotubs cultivats amb lligands de RIG-I. La presència d'anti-IFN $\beta$  disminueix significativament l'expressió de  $\beta$ 2-microglobulina (MHC-I) (A), de DDX58/RIG-I (B) i de TLR3 (C) en miotubs cultivats amb 5'ppp dsRNA durant 48h. RQ: quantificació relativa utilitzant GAPDH com a control endògen i miotubs amb lligands de RIG-I control com a calibrador. Les mostres es van analitzar per triplicat. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001.

Per tal d'establir que els resultats obtinguts eren específics del reconeixement per RIG-I, vam bloquejar l'efecte del TLR3 amb cloroquina en cultius activats, ja que el TLR3 reconeix també dsRNA. Aquests experiments van demostrar que malgrat l'addició de cloroquina, es mantenia l'augment significatiu de  $\beta$ -2 microglobulina, DDX58 (RIG-I) i de TLR3 ( $p < 0.05$ ) (figura 25) indicant que **els efectes dels lligands de RIG-I a miotubs humans són independents de la via de senyalització del TLR3.**

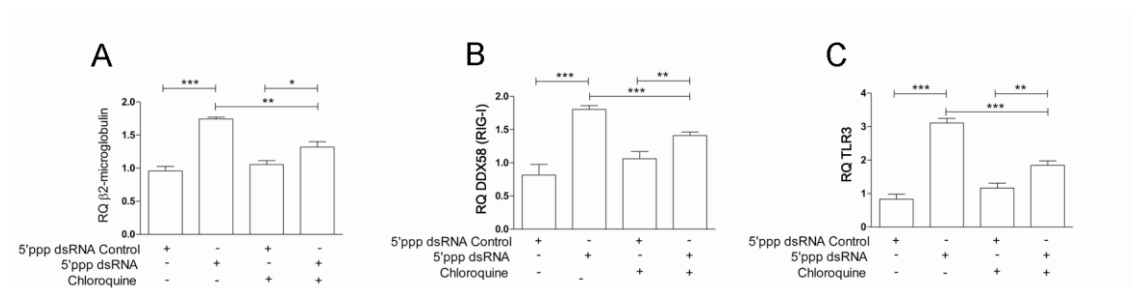


Fig 25. Experiments de bloqueig de TLR3 en miotubs control activats amb lligands de RIG-I. La sobrerregulació del mRNA de  $\beta$ 2-microglobulina (A), de DDX58/RIG-I (B) i de TLR3 (C) es manté en cultius amb lligands de RIG-I i cloroquina (bloqueig de TLR3). RQ: quantificació relativa utilitzant GAPDH com a control endògen i cultius amb lligand control de RIG-I com a calibrador. Les mostres es van analitzar per triplicat. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## **B. L'efecte de la hipòxia als mecanismes immunes a la DM.**

Després de la identificació de RIG-I com a possible actor en la fisiopatogènia muscular a la DM, vam estudiar-ne el seu possible origen i les conseqüències de la sobreexpressió de RIG-I.

### **5) Presència de gens induïts per hipòxia a la DM.**

L'anàlisi per ontologia dels gens (GO) va demostrar a la DM comparat amb els controls un augment significatiu de gens inclosos a les categories "resposta a la hipòxia" (GO: 0001666 ;  $p = 1.7e-6$ ; Odds ratio (OR)= 2.58), "resposta cel·lular a la hipòxia" (GO: 0071456;  $p = 0.00634$ ; OR=3.46), "resposta cel·lular als nivells d'oxigen" (GO: 0071453;

$p=0.00125$ ;  $OR=3.42$ ) i en “resposta a nivells d’oxigen” (GO: 0070482;  $p=2.14e-7$ ;  $OR=2.69$ ). Quan vam comparar DM vs PM vam trobar a la DM un augment significatiu de gens inclosos a la categoria “resposta a la hipòxia” ( $p=0.00018$ ;  $OR=2.36$ ) i en “resposta al nivells d’oxigen” ( $p=9.7e-5$ ;  $OR=2.38$ ). En canvi no vam trobar diferències significatives en aquestes categories quan vam comparar DM amb IBM i comparant PM vs IBM (figura 26).

Cal destacar que el factor de transcripció clau que modula la resposta a hipòxia, HIF1 $\alpha$ , i que està inclòs en les categories anteriorment esmentades, està augmentat significativament en DM vs controls ( $p=0.0015$ ) però no en PM i IBM vs controls ( $p=0.45$  and  $p=0.76$  respectivament). Quan vam comparar els valors d’expressió de HIF1 $\alpha$  entre les diferents patologies, vam observar un augment significativa a la DM vs PM ( $p=0.016$ ) però no vam trobar significació estadística en DM vs IBM ( $p=0.09$ ), malgrat observar una clara tendència. Aquestes dades indiquen un paper prominent de la hipòxia a la DM comparat amb PM i IBM.

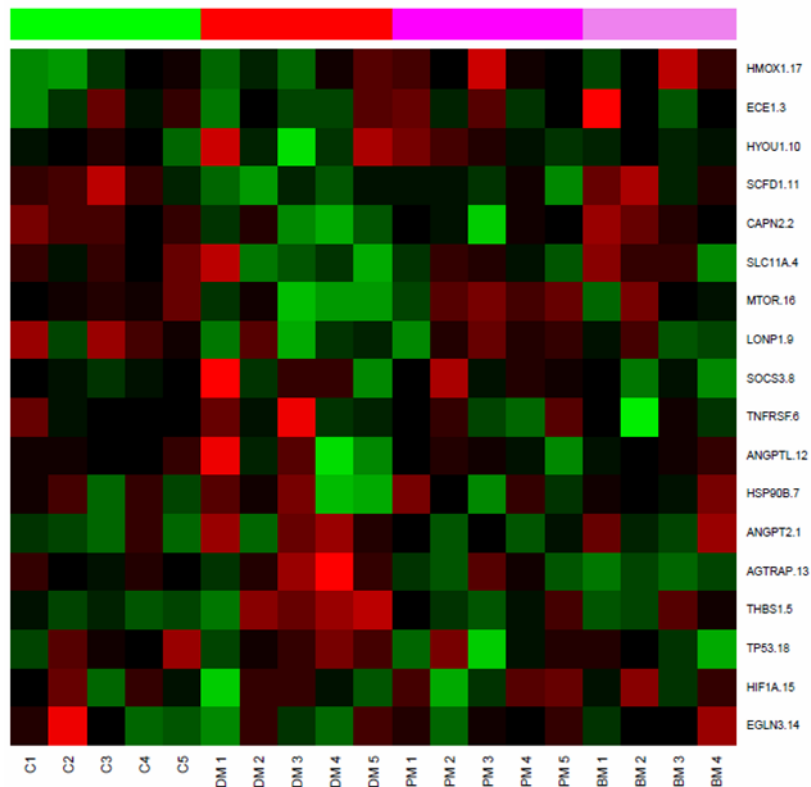


Figura 26. *Heatmap* dels valors d'expressió de gens involucrats en la resposta cel·lular a la hipòxia. C: control; DM: dermatomiositis; PM: polimiositis; IBM: miopatia per cossos d'inclusió. Els valors d'expressió alts es representen en vermell els nivells baixos en verd

## 6) Identificació d'elements de resposta a hipòxia (HRE) putatius al promotor humà del gen DDX58/RIG-I.

Vam analitzar mitjançant eines bioinformàtiques la presència de HRE ((A)/(G)CGTG) a seqüències reguladores de gens que podrien participar a la immunopatogènia de la DM. Els resultats van demostrar que **DDX58/RIG-I** (NM\_014314.3) **contenia a la regió 3'UTR del seu promotor 4 HRE** (+3469, +3676 +3835, +3893) (figura 26A). ISG15 contenia un HRE a la regió 5'UTR (-125) mentre que OAS2 en tenia un a 3'UTR (+2755). En canvi, no vam trobar cap HRE en cap regió reguladora dels promotors de TLR3, MyD88, Rnase L, OAS1, OAS3,  $\beta$ -2-microglobulina, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  i IFN $\gamma$ .



## 7) La sobreexpressió de RIG-I és depenent de HIF.

Vam analitzar la capacitat de resposta dels HRE presents al promotor de RIG-I en condicions d'hipòxia. Vam realitzar un assaig funcional utilitzant la transfecció de HEK293 amb un plàsmid reporter de luciferasa (pGL3) que incloïa el fragment de 580pb del promotor de RIG-I que contenia els 4 HRE (figura 27A). **Els assajos de luciferasa van demostrar un augment significatiu de luminescència dels nivells de luciferasa/renilla en condicions d'hipòxia comparada amb normòxia ( $p < 0.001$ )** (figura 27B).

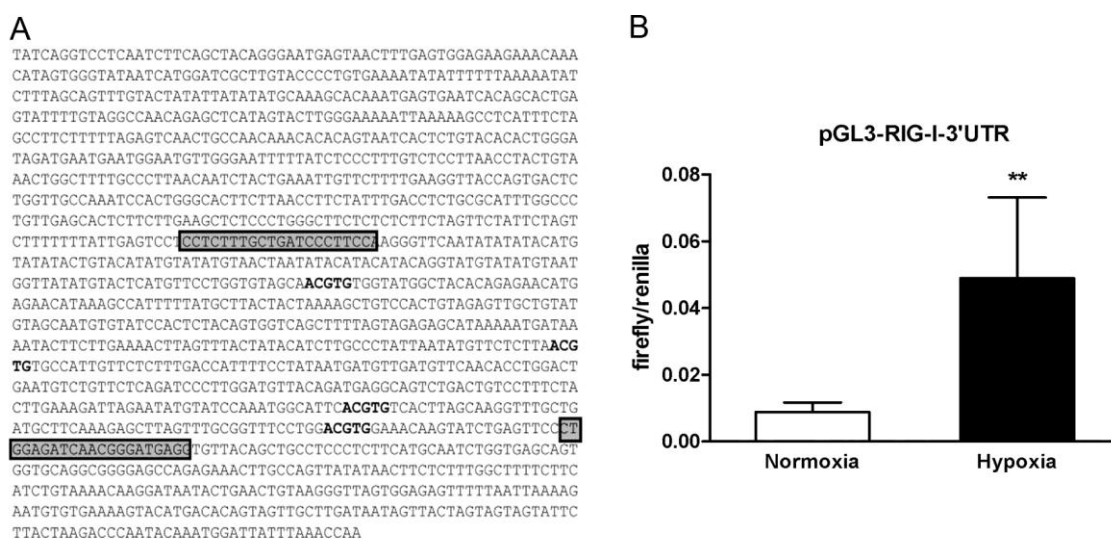


Fig 27. L'anàlisi bioinformàtic demostra que el promotor de RIG-I conté 4 elements de resposta a hipòxia (en negreta). Els rectangles grisos són les seqüències a partir de les que es van dissenyar els encebadors per amplificar la regió de 580 pb per clonar-les a un plàsmid pGL3 reporter (A). La transfecció de cèl·lules HEK-293 amb pGL3b-RIG-I 3'UTR cultivades en condicions d'hipòxia (CoCl<sub>2</sub>) induïx un augment significatiu en la relació luciferasa/renilla comparat amb les mateixes cèl·lules transfectades cultivades en normòxia (B). \*\*  $p < 0.01$ .

## 8) La hipòxia induïx l'expressió de RIG-I a miotubs humans

Vam estudiar l'expressió de RIG-I de miotubs humans cultivats en condicions d'hipòxia. L'anàlisi de mRNA va demostrar un augment significatiu del mRNA de RIG-I a 24h i 72h d'hipòxia ( $p < 0.05$ ) (figura 28A). Aquests resultats es van confirmar per

western blot demostrant que **la hipòxia indueix la sobreexpressió de RIG-I a miotubs humans quan HIF1 $\alpha$  estava present**. L'expressió de RIG-I era encara major amb la presència de lligands de RIG-I tant en normòxia com en hipòxia induïda per CoCl<sub>2</sub>, confirmant els nostres resultats previs (figura 28B).

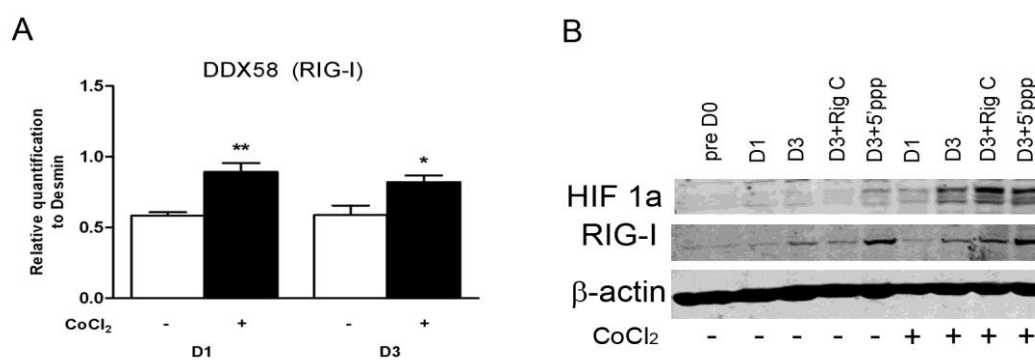


Fig 28. RIG-I es sobreexpressa d'una manera dependent de HIF en miotubs humans. El mRNA de RIG-I (DDX58) incrementa significativament després de cultivar miotubs humans durant un i tres dies en condicions d'hipòxia (CoCl<sub>2</sub>) (A). La sobreregulació del mRNA de RIG-I correlaciona amb un increment de la proteïna de RIG-I. El màxim d'expressió de RIG-I s'observa quan es cultiva amb lligands de RIG-I (5'ppp).

## 9) La hipòxia indueix RIG-I d'una manera independent d'IFN

Per clarificar si la presència de RIG-I a la DM podria ser degut secundàriament a l'efecte de IFN, és a dir si els IFN estabilitzessin HIF1 $\alpha$  i com a conseqüència s'expressés RIG-I, vam tractar miotubs humans amb IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  o IFN $\gamma$  i vam avaluar l'estabilització de HIF1 $\alpha$ . Vam confirmar l'efecte dels IFNs analitzant per immunofluorescència la translocació al nucli de STAT-1 o STAT-2 i per WB l'expressió de RIG-I i HIF1 $\alpha$ . No es va observar HIF amb el tractament amb IFNs, independentment del temps i concentracions. Sols quan la hipòxia va ser induïda es va observar HIF1 $\alpha$ . Vam observar un augment de l'expressió de RIG-I quan es va afegir al cultiu els IFN, malgrat IFN $\beta$  va ser-ne el major inductor (figura 29). **Aquests resultats indiquen que la hipòxia indueix l'expressió de RIG-I d'una manera dependent de HIF i independent de IFNs.**

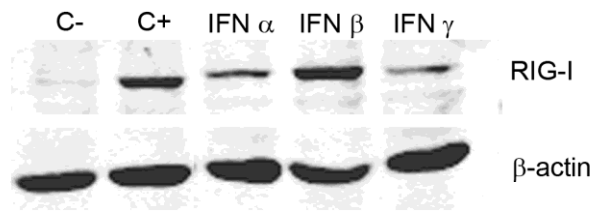


Fig 29. Efecte del cultiu de miotubs humans amb IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , o IFN $\gamma$  sobre l'expressió de HIF i RIG-I. Els tres IFNs indueixen una sobreexpressió de RIG-I, sent IFN $\beta$  el que indueix una major expressió de RIG-I. No es va detectar HIF en cap de les condicions de cultiu amb IFNs. C-: Miotubs sense tractar, C+: Miotubs cultivats amb 5'ppp dsRNA.

## 10) La sobreexpressió de RIG-I indueix l'activació de la cascada de senyalització.

Vam reproduir *in vitro* la sobreexpressió de RIG-I que s'observa a les fibres musculars a la DM mitjançant la transfecció de cèl·lules HEK293 amb un plàsmid d'expressió constitutiva de RIG-I (pCMV-RIG-I). La transfecció de pCMV-RIG-I va demostrar la presència de IRF3-P per *western-blot* tant en normòxia com en hipòxia i en absència de lligands de RIG-I mentre que el control negatiu no tenia IRF3 fosforilat (IRF3-P) (figura 30A). **Aquests resultats indiquen que la sobreexpressió de RIG-I indueix la seva pròpia activació *per se*** i ens van fer hipotetitzar que altes quantitats de RIG-I provocarien una major inducció de IFN $\beta$ . Per això, vam comparar mitjançant assajos de luciferasa en normòxia i en hipòxia, la capacitat transcripcional de l'activació de RIG-I per induir pGL3b-IFN $\beta$  amb la presència o no de pCMV-RIG-I. Els assajos de luciferasa van demostrar un augment significatiu de luminescència quan es va cotransfectar el pCMV-RIG-I a les 24h ( $p < 0.001$ ) i a les 48h ( $p < 0.05$ ) (figura 30B). **Aquests resultats conjuntament suggereixen que altes quantitats de RIG-I provocarien la seva activació i per tant una major capacitat de secretar IFN $\beta$ .**

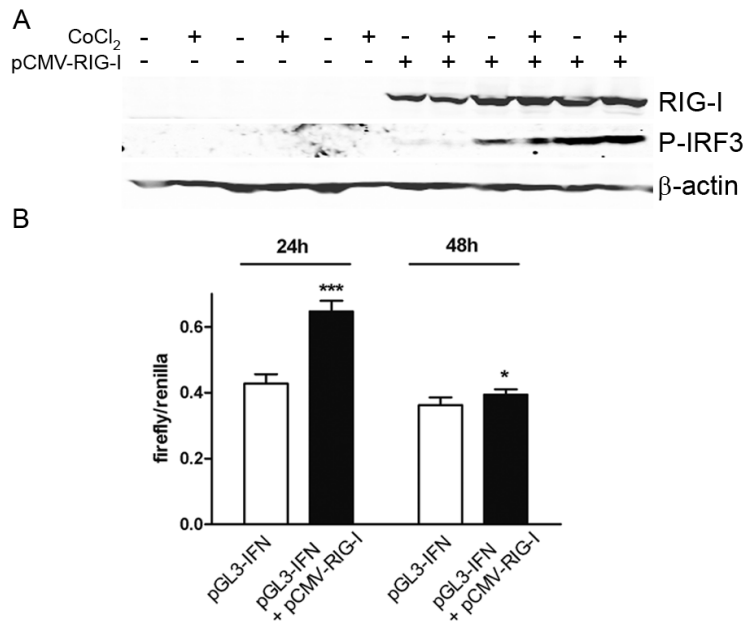


Fig 30. La sobreexpressió de RIG-I indueix la transcripció de IFN $\beta$ . Cèl·lules HEK-293 transfectades amb el plàsmid d'expressió constitutiva pCMV-RIG-I indueix l'expressió de IRF3 fosforilat (P-IRF3) (A). La co-transfecció de HEK-293 amb pGL3b-IFN $\beta$  *enhanceosome* i pCMV-RIG-I demostra un augment significatiu de la senyal de luciferasa indicant una transcripció de IFN $\beta$  quan RIG-I està sobreexpressat. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

## 11) Efecte de la hipòxia en la diferenciació, atròfia muscular i metabolisme.

A partir de cultius primaris humans vam avaluar l'efecte de la hipòxia en la diferenciació muscular analitzant la miogenina. La miogenina és un factor de transcripció que durant la diferenciació muscular augmenta la seva expressió. Els miotubs cultivats en condicions d'hipòxia van demostrar nivells reduïts de miogenina (figura 31A). D'acord amb aquests resultats, vam observar una disminució de miotubs multinucleats, suggerint que la hipòxia té un efecte inhibitori a la diferenciació muscular. Vam estudiar l'efecte de la hipòxia mitjançant l'estudi de l'expressió gènica de proteases (catepsines (CTS) B, D i K) i d'atrofina-1 (FBX032), un factor clau a l'atròfia muscular. Els miotubs en

condicions d'hipòxia van demostrar un augment significatiu en l'expressió de *CTSB* (figura 31B), *CTSD* (figura 31C), *CTSK* (figura 31D) i *FBX032* (figura 31E). Vam observar també que la hipòxia induïa l'acumulació de material PAS+ als miotubs, i per tant, un augment de l'acumulació de polisacàrids com el glicogen (figura 31F i G). Aquests resultats conjuntament indiquen que la hipòxia indueix la desdiferenciació muscular, que intervé en l'atròfia muscular i que produeix un acumulació de polisacàrids.

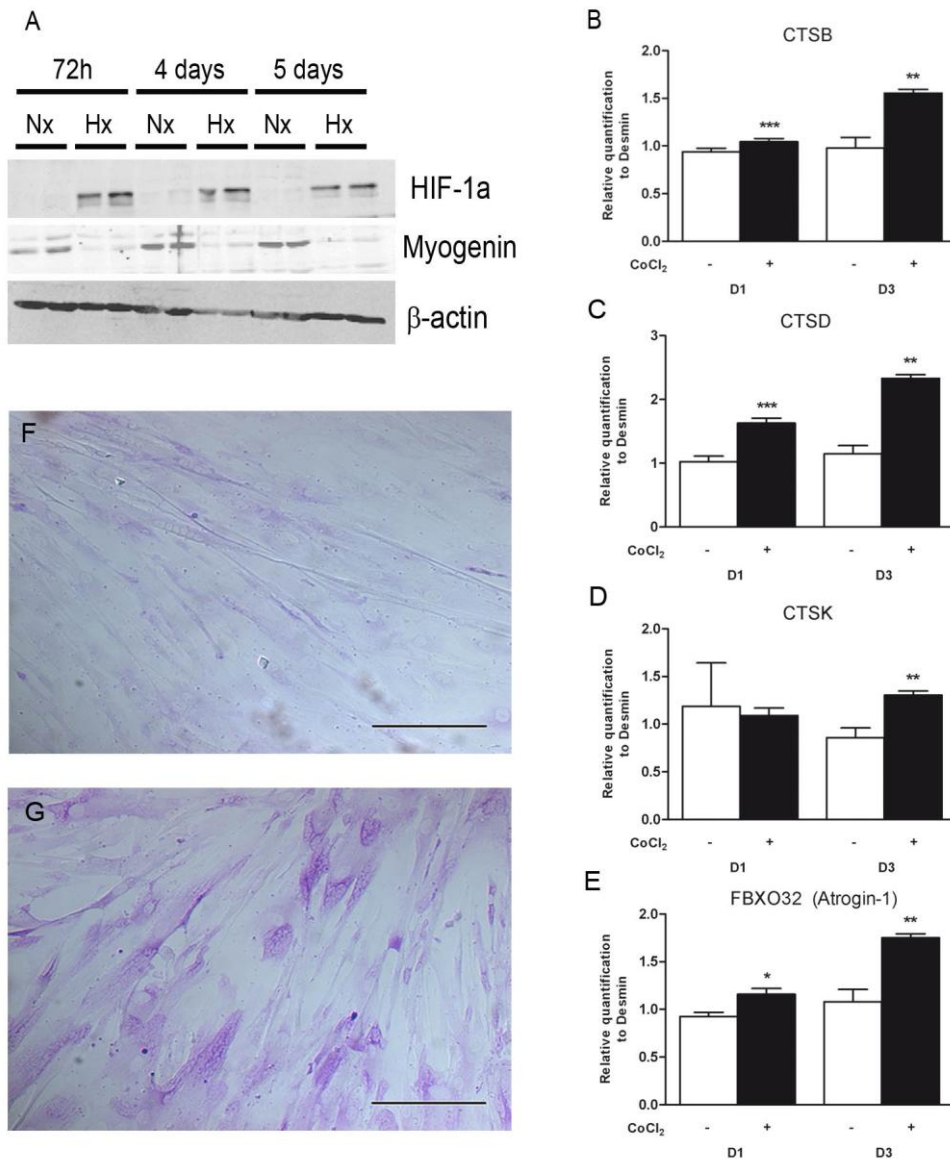


Figura 31. Efecte de la hipòxia en el metabolisme, la diferenciació muscular i en la atrofia muscular. *Western blot* de miotubs humans cultivats en hipòxia tenen una reducció de la expressió de miogenina. La reducció de la miogenina coincideix amb l'estabilització de HIF1 $\alpha$  (A). La hipòxia indueix un increment de la expressió dels gens relacionats amb proteolisi i atrofia: CTSB (B), CTSD (C) CTSK (D) i FBXO32 (Atrogin-1) (G). La tinció de PAS en miotubs en normoxia (F) i en hipòxia on s'observa un increment de material PAS positiu (G). Barra d'escala: 20  $\mu$ m. Nx= Normoxia, Hx= Hipòxia.

## **C. Valor de l'expressió de RIG-I com a biomarcador a les**

### **biòpsies musculars de DM**

La presència d'atrofia perifascicular a la biòpsia muscular de pacients amb DM és considerada patognòmica. Malgrat aquesta associació clàssica, ni totes les biòpsies de DM tenen atrofia perifascicular ni aquesta està restringida a la DM. Algunes malalties autoimmunes sistèmiques que presenten afectació muscular poden presentar atrofia perifascicular (per ex. malaltia mixta del teixit connectiu, escleroderma o artritis reumatoide). A més, no existeix un consens per la valoració de l'atrofia perifascicular que en dificulta la interpretació.

### **12) L'atrofia perifascicular que afecta a dues files de fibres musculars s'associa a la DM.**

En aquest estudi, vam avaluar la presència d'atrofia perifascicular en 105 biòpsies musculars patològiques. Vam incloure biòpsies de pacients amb entitats que podrien presentar confusió al diagnòstic amb DM (taula 6) i 10 controls sans que no es van incloure a l'anàlisi estadístic ja que no són biòpsies confusores.

	Diagnòstic	Total
<b>Miopaties inflammatòries (n=71)</b>	<b>DM</b>	44
	<b>PM</b>	16
	<b>IBM</b>	6
	<b>IMNM</b>	5
<b>Miopaties amb superposició (n=26)</b>	<b>ASS</b>	8
	<b>AR</b>	2
	<b>SLE</b>	2
	<b>SSc</b>	5
	<b>Sjögren</b>	5
	<b>MCTD</b>	4
<b>Distròfies musculars (n=8)</b>	<b>Dysf</b>	4
	<b>FSHD</b>	4
<b>Total</b>		<b>105</b>

Taula 6 DM: Dermatomiositis; PM: Polimiositis; IBM: Miopatia per cossos d'inclusió; IMNM: Miopatia necrotitzant immuno mediada; ASS: Síndrome antisintetasa; AR: Artritis reumatoide; SLE: Lupus eritematós sistèmic; SSc: Scleroderma i scleromiositis; MCTD: Malaltia mixta del teixit connectiu; Dysf: Disferlinopatia; FSHD: Distrofia muscular fascioscapulohumeral

Vam valorar l'atròfia perifascicular tenint en compte si la reducció del diàmetre de les fibres musculars afectava una o dues files de fibres perifasciculars. **Vam observar que el 15% de les biòpsies musculars patològiques presentaven dues files d'atròfia perifascicular.** En canvi, avaluant sols una fila de fibres vam observar que el 28% de les biòpsies presentaven atròfia. Analitzant les biòpsies de pacients amb DM vam observar que el 25% (11/44) presentaven dues files mentre que el 36% (16/44) presentaven una fila de fibres perifascicular atròfiques. Per tant, en conjunt vam observar que el 61% (27/44) de les biòpsies de pacients amb DM presentaven atròfia perifascicular. Analitzant les biòpsies de pacients sense DM vam observar que el 8% (5/61) presentaven dues files (1 ASS, 2 SSc, 1 MCTD, 1 AR) mentre que el 21% (13/61) presentava una fila de fibres perifasciculars atròfiques. Per tant, vam observar

que el 29% (29/61) de les biòpsies musculars de pacients sense DM tenien atròfia perifascicular. L'anàlisi estadístic va demostrar que **l'atròfia perifascicular que afecta a dues files de fibres musculars està significativament associada a la DM** ( $p=0.018$ ). En canvi, la presència d'una fila no s'associava estadísticament a la DM ( $p=0.089$ ).

### 13) L'expressió perifascicular de RIG-I s'associa a la DM.

L'expressió perifascicular de RIG-I es va observar amb una major freqüència a les biòpsies de pacients amb DM comparat amb la resta de biòpsies patològiques (figura 32). Es va observar RIG-I en el 50% (22/44) de les DM mentre que es va observar sols en un 11% (7/61) a les biòpsies de pacients sense DM. L'anàlisi estadístic va demostrar que **l'expressió perifascicular de RIG-I s'associa significativament a la DM** ( $p<0.001$ ). Cinc de les set biòpsies de pacients sense DM que presentaven expressió de RIG-I, aquesta no era perifascicular ni tenien atròfia perifascicular (1 ASS, 2 IBM, 1 AR i 1 SSc). En canvi les dues biòpsies restants (1 SLE i 1 MCTD) l'expressió de RIG-I era perifascicular i presentaven atròfia perifascicular. La resta de pacients amb ASS eren negatives per RIG-I i a més totes excepte una presentaven expressió de HLA-DR perifascicular (figura 33A i B), corroborant estudis previs<sup>104</sup>, on el HLA-DR no està associat a la DM (figura 33D). RIG-I va ser negatiu a la resta de miopaties inflamatòries (PM i IMNM) i a les distròfies musculars (Dysf i FSHD) (taula 7).



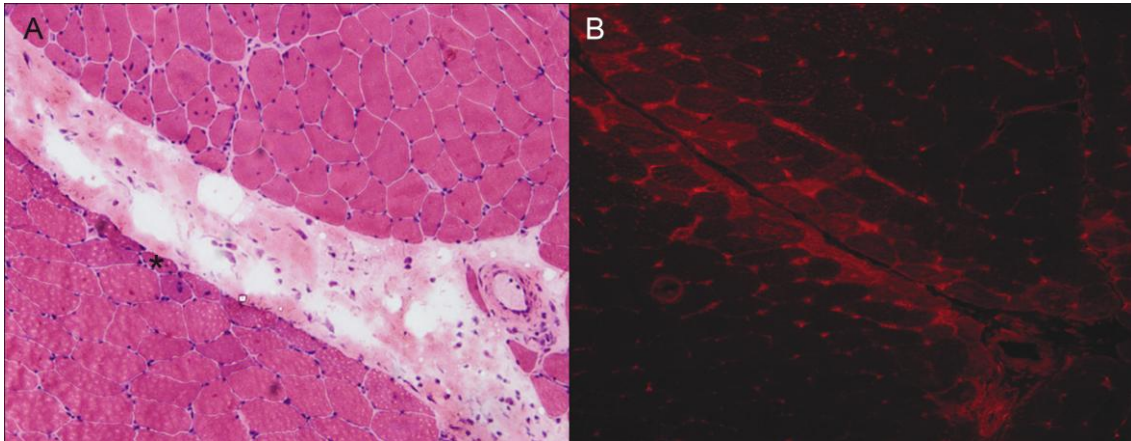


Fig 32. Hematoxilina-eosina i immunofluorescència de RIG-I en seccions seriades d'una biòpsia muscular d'un pacient amb DM. Presència d'atròfia perifascicular (\*) (A) i d'expressió perifascicular de RIG-I.

Magnificació 100X.

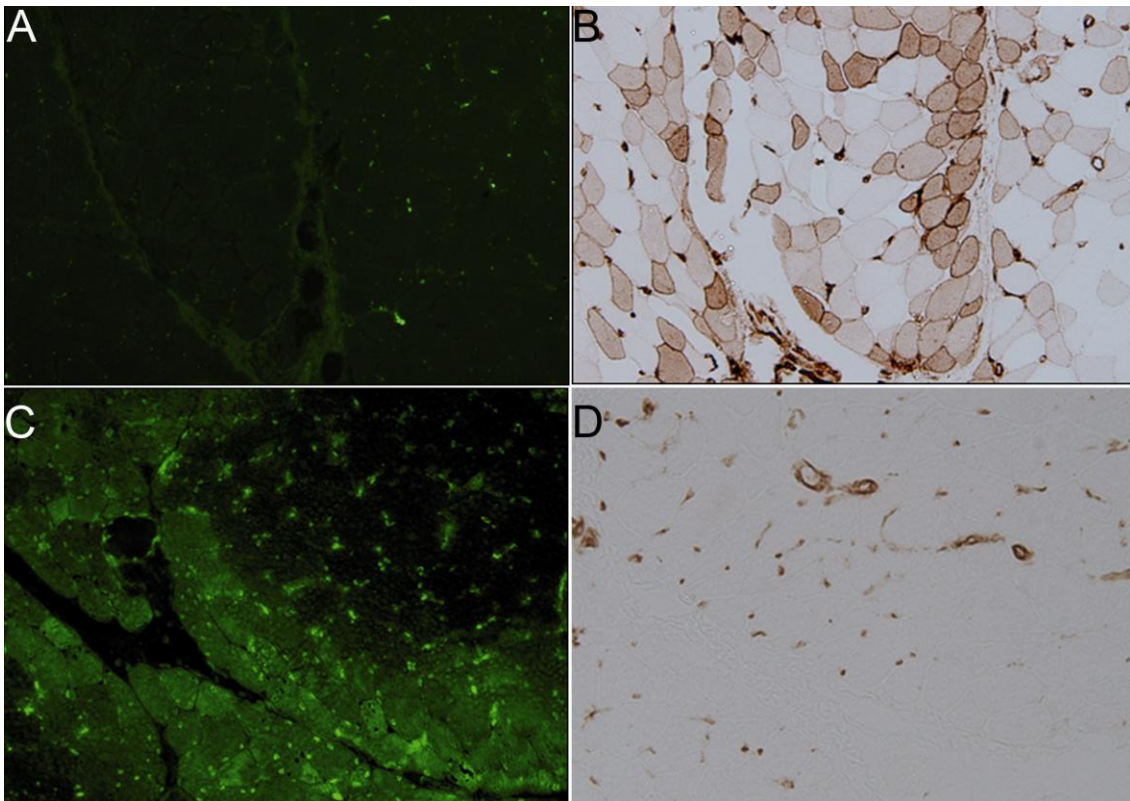


Fig 33. Tinció de RIG-I i HLA-DR en seccions seriades de biòpsies musculars. L'expressió de RIG-I és absent en un pacient amb miopatia del síndrome anti-sintetasa (A) mentre HLA-DR s'expressa a les fibres musculars (B). En un pacient amb DM, la biòpsia demostra una expressió perifascicular de RIG-I (C) mentre que el HLA-DR és absent a les fibres musculars (D). Magnificació 100X.

	Diagnòstic	Atròfia perifascicular <sup>1</sup>	Atròfia perifascicular (2 files)	RIG-I +	Total
<b>Miopaties inflamatòries (n=71)</b>	<b>DM</b>	16 (36%)	11 (25%)	22 (50%)	44
	<b>PM</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	16
	<b>IBM</b>	0 (0%)	0 (0%)	2 (33%)	6
	<b>IMNM</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5
<b>Miopaties amb superposició (n=26)</b>	<b>ASS</b>	7 (88%)	1 (13%)	1 (13%)	8
	<b>AR</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	2
	<b>SLE</b>	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	2
	<b>SSc</b>	3 (60%)	2 (40%)	1 (20%)	5
	<b>Sjögren</b>	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	5
	<b>MCTD</b>	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	4
<b>Distròfies musculars (n=8)</b>	<b>Disf</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4
	<b>FSHD</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4
<b>Total</b>		<b>29 (28%)</b>	<b>16 (15%)</b>	<b>29 (28%)</b>	<b>105</b>

Taula 7. Resum dels resultats obtinguts

<sup>1</sup>Atròfia perifascicular inclou una o més fileres de fibres musculars atròfiques.

DM: Dermatomiositis; PM: Polimiositis; IBM: Miopatia per cossos d'inclusió; IMNM: Miopatia necrotitzant immuno-mediada; ASS: Síndrome anti-sintetasa; AR: Artritis reumatoide; SLE: Lupus eritematós sistèmic; SSc: Escleroderma i escleromiositis; MCTD: Malaltia mixta del teixit connectiu; Disf: Disferlinopatia; FSHD: Distròfia muscular escapulohumeral. Els controls sans estan exclosos en aquest anàlisi.

#### 14) Valor de l'atròfia perifascicular i l'expressió de RIG-I pel diagnòstic de DM.

Vam comparar la utilitat de l'atròfia perifascicular (una, dues o més fileres de fibres musculars) amb la tinció de RIG-I per la seva aplicabilitat al diagnòstic diferencial. L'especificitat de l'atròfia perifascicular per al diagnòstic de DM considerant dues fileres és significativament major que considerant una filera (92% vs 79%;  $p < 0.01$ ). En canvi, no vam trobar diferències a la sensibilitat comparant atròfia en general amb atròfia restringida a dues o més fileres, tot i que es va observar una clara tendència (36% vs 25%;  $p = 0.06$ ). L'expressió perifascicular de **RIG-I demostrava una sensibilitat significativament major comparat amb la presència de dues fileres de fibres atròfiques** (50% vs 25%;  $p < 0.01$ ), ja que 3 mostres no DM (2 SSc and 1 ASS)

presentaven dues o més fileres d'atròfia però eren negatives per RIG-I. En canvi, no vam trobar diferències significatives en la sensibilitat comparant RIG-I amb atròfia en general (50% vs 36%) ( $p=0.08$ ). Tampoc vam trobar diferències en la especificitat entre RIG-I i atròfia en general ( $p=0.08$ ) ni comparat amb dues o més fileres ( $p=0.72$ ). Curiosament, **amb absència d'atròfia perifascicular, un 32% (9/28) de les mostres de DM presentaven expressió perifascicular de RIG-I**, mentre que a les mostres de no DM es va observar només en un 6% (3/48) ( $p=0.007$ ). Vam trobar també diferències significatives a RIG-I entre les DM i el grup de pacients amb miopaties inflamatòries amb síndromes de superposició (50% vs 19%;  $p=0.01$ ). Quan vam comparar la reproductibilitat entre la interpretació de RIG-I i de l'atròfia perifascicular, vam observar que **la interpretació de RIG-I era més reproduïble que l'atròfia** (coeficient  $\kappa$  0.51 vs 0.37). En resum, per al diagnòstic de DM la major sensibilitat es va obtenir amb RIG-I (50%) i la major especificitat es va obtenir amb la valoració de dues o més fibres d'atròfia perifascicular (taula 8).

	Atròfia perifascicular <sup>1,a</sup>	Atròfia perifascicular <sup>1</sup> (2 files) <sup>b</sup>	RIG-1 <sup>c</sup>		
DM (N; %)	16 (36%)	11 (25%)	22 (50%)		
No DM (N; %)	13 (21%)	5 (8%)	7 (11%)		
$p^*$	0.09	0.02	<0.001		
				$p$ (a vs c) **	$p$ (b vs c) **
Sensibilitat	36%	25%	50%	0.08	0.005
Especificitat	79%	92%	88%	0.08	0.7
Reproductibilitat ( $\kappa$ ) <sup>***</sup>		0.37	0.51		

Taula 8. Comparativa atròfia perifascicular i RIG-I per al diagnòstic de DM

<sup>1</sup>Atròfia perifascicular inclou una o més fileres de fibres musculars atrofiques. \*Associació entre dues variables es va fer utilitzant el test exacte de Fisher. \*\*La sensibilitat i l'especificitat es van comprar amb el test de McNemar. \*\*\*La reproductibilitat es va obtenir utilitzant el coeficient  $\kappa$  de Cohen. Els controls sans es van excloure de l'anàlisi.

## **VI. DISCUSSIÓ**

## VI. DISCUSSIÓ

Les miopaties inflamatòries són un grup minoritari i molt heterogeni de malalties que actualment no tenen ni biomarcadors ni tractaments específics. Actualment el tractament es basa en l'ús empíric d'immunosupressors amb una resposta clínica que és molt variable<sup>48</sup>. Els resultats d'aquesta tesi doctoral han obert un nou camp en la patogènia de la DM. A més, les noves vies cel·lulars descrites aquí seran útils per al futur disseny de noves estratègies terapèutiques. Per últim, els resultats tenen una aplicabilitat a la pràctica clínica com a eina diagnòstica en la biòpsia muscular.

**La primera part d'aquesta tesi** es va centrar a posar a punt *la tècnica de microdissecció làser*. Aquesta tècnica novedosa va **permetre estudiar el múscul d'aquest grup de pacients evitant la interferència dels infiltrats inflamatoris**, de naturalesa heterogènia entre les diferents entitats clíniques, ja que uns grups tenen més cèl·lules T, altres B i altres macròfags. Aquesta característica ha sigut reconeguda a la bibliografia com una limitació per l'estudi de les biòpsies d'aquests pacients<sup>96</sup>. L'aplicació d'aquesta tècnica ha demostrat ser útil ja que s'han corroborat resultats prèviament publicats<sup>84, 96</sup> i ha afegit noves vies a explorar fins ara desconegudes. Partint de biòpsies musculars de 5 pacients amb DM, 5 amb PM, 5 amb IBM i de 5 controls vam estudiar l'expressió de més de 16.000 gens mitjançant la tecnologia de *microarrays*. A més a més, vam establir un criteri per la selecció de les fibres musculars i era que només aïllàvem aquelles fibres musculars patològiques que presentaven una sobreexpressió de MHC-I. Aquest és un tret comú a la biòpsia d'aquest grup de pacients malgrat els mecanismes que l'indueixen en cada cas poden ser diferents<sup>48</sup>. S'ha demostrat en models experimentals murins que la sobreexpressió de MHC-I a les fibres és suficient per provocar inflamació al múscul<sup>112</sup>. Aquests resultats indiquen un paper patogènic del MHC-I independentment dels infiltrats inflamatoris. Per altra banda s'ha atribuït un possible paper en la patogènia als IFNs.

Els estudis transcriptòmics previs utilitzant biòpsies musculars (incloent fibres musculars i infiltrats inflamatoris entre altres) de pacients amb miopaties inflamatòries han demostrat la sobrerregulació de gens induïts per IFN-I, fenomen anomenat “la signatura del IFN-I”<sup>84</sup>. Malgrat aquests resultats, no s’ha pogut trobar un possible candidat que pogués explicar la sobreproducció de IFNs i per tan la sobrerregulació dels seus gens diana. En canvi, s’ha pogut relacionar específicament a la DM la presència d’algunes proteïnes induïdes per IFN (p.ex. ISG15 i MxA) que podrien participar en l’atròfia muscular però no explicarien un mecanisme desencadenant de la resposta inflamatòria al múscul<sup>85</sup>. Malgrat els IFNs s’han relacionat amb les diferents entitats, correlacions clinico-immunològiques han demostrat que els nivells circulants de IFN $\beta$  correlacionen amb l’activitat específicament de la DM<sup>82</sup>.

Els resultats dels experiments de microarrays no només van confirmar resultats previs, on la contribució del IFN és significativa en les condicions patològiques respecte els controls sino que **els nostres estudis demostraven una major contribució de la producció de IFN-I i de la immunitat innata a la DM respecte a la PM i a la IBM**. De manera específica vam trobar a la DM una alta presència de sobrerregulació de gens involucrats en el reconeixement de RNAs, entre ells i **de manera molt significativa DDX58 (RIG-I)**. RIG-I és un receptor citoplasmàtic de la immunitat innata capaç de reconèixer dsRNA i que com a conseqüència activar els factors de transcripció involucrats per induir la síntesi i secreció de IFN<sup>14</sup>. Donats aquests resultats vam decidir centrar els nostres estudis en RIG-I ja que podia explicar l’inici de la inflamació local a diferència de les molècules induïdes per IFN fins ara descrites a la DM. Vam validar els resultats dels microarrays a nivell de proteïna a les biòpsies musculars. Els experiments d’immunofluorescència a les biòpsies musculars de partida van demostrar la sobreexpressió de RIG-I i Viperin (RSAD2) a les fibres musculars perifasciculars dels pacients amb DM, mentre que no es va detectar ni en PM, ni en IBM ni en els controls. La viperin és una proteïna amb un paper antiviral i un paper emergent a la

senyalització de la immunitat innata <sup>113</sup>. La interacció de viperin amb MAVS indueix la senyalització de receptors de la família del RIG-I <sup>114</sup>. Aquesta interacció redueix la generació d'ATP cel·lular i modula la dinàmica mitocondrial. Actua també sobre la replicació viral associant-se amb el reticle endoplasmàtic per modificar la seva activitat <sup>115</sup>. Per tant, l'estrés de reticle endoplasmàtic previament demostrat a la patogènia podria explicar-se per la viperin <sup>72, 116</sup>.

Les immunofluorescències dobles a les biòpsies de DM van demostrar que RIG-I colocalitzava amb les fibres sobreexpressants de MHC-I. Aquests resultats ens van fer hipotetitzar que RIG-I podria actuar com a inductor de MHC-I a la DM. Els resultats in vitro utilitzant cultius primaris humans de múscul van demostrar que **RIG-I indueix la secreció de IFN $\beta$  i com a conseqüència una sobreexpressió de MHC-I i altre vegada de RIG-I**. A més, provocava la sobreexpressió de múltiples gens induïts per IFN de l'anomenada "signatura del IFN-I" a la DM (per ex. OAS, RSAD2 (viperin)). **Per tant, l'activació de RIG-I indueix un cercle que s'autosustenta, incloent la sobreexpressió de IFN-I i MHC-I, i que situa a la fibra muscular independentment dels infiltrats inflamatoris, com a cèl·lula immunològica no professional capaç de mantenir la resposta immunològica local.**

Malgrat aquests resultats no expliquen els mecanismes responsables de l'activació de RIG-I, els nostres resultats i la bibliografia suggereixen que a la DM, RIG-I està activat i que els lligands serien DAMPs. La sobrerregulació de DDX60, un factor que promou l'activació de RIG-I <sup>117</sup> reforça aquesta hipòtesi. S'ha descrit que la cèl·lula en un ambient d'IFN i per tant adquirint un estat cel·lular antivíric, indueix una sèrie de processos per evitar la replicació citoplasmàtica del virus <sup>118</sup>. Un dels més importants consisteix en activar la via OAS-RNaseL per induir la degradació de RNAs citoplasmàtics <sup>119, 120</sup>. A més d'actuar sobre els RNAs vírics, la RNaseL pot actuar sobre RNAs propis generant lligands endògens per RIG-I <sup>121</sup>. Per altra banda, la

generació de lligands endògens podria explicar-se a la DM per l'estrés cel·lular degut a la hipòxia/isquèmia. Aquest ambient potenciaria la presència de restes cel·lulars que podrien induir inflamació estèril <sup>122</sup>. Aquests resultats ens van fer hipotetitzar que la hipòxia podria jugar un paper important en activar la immunitat innata al múscul.

**La segona part d'aquesta tesi va demostrar una nova connexió entre la hipòxia i**

**la immunitat innata.** La presència d'atròfia perifascicular i l'observació clàssica de la pèrdua de capil·lars a la biopsia dels pacients amb DM, indiquen una important contribució de la hipòxia a la fisiopatogènia. L'anàlisi del *microarrays* va demostrar que gens involucrats en la resposta a hipòxia estan significativament sobrerregulats a la DM. Vam establir un model d'hipòxia *in vitro* utilitzant CoCl<sub>2</sub> als cultius de HEK293 i primaris humans. El cultiu amb CoCl<sub>2</sub> com a mimètic d'hipòxia és àmpliament utilitzat i ofereix una avantatge destacada en comptes de una reducció d'oxigen. Permet l'estudi únicament dels mecanismes mediat per HIF i en canvi, la reducció d'oxigen influencia altres vies cel·lulars a més de HIF.

L'anàlisi *in silico* del promotor humà de RIG-I va demostrar que conté regions de resposta a hipòxia (HRE), i d'acord amb aquesta troballa vam demostrar que la hipoxia (mitjançant HIF1 $\alpha$ ) indueix la sobreexpressió de RIG-I a la DM. La sobreexpressió de RIG-I per HIF1 $\alpha$  es va demostrar amb diferents tècniques: assajos de luciferasa, qPCR i *western-blot*. A més els nostres resultats permeten discernir que l'origen de RIG-I és degut a HIF1 $\alpha$  i no secundàriament a la estabilització de HIF1 $\alpha$  a causa dels IFNs. Quan vam estudiar els efectes de la sobreexpressió de RIG-I vam observar altes quantitats de RIG-I indueix la fosforilació de IRF3 i la transcripció d'IFN.

Desde un punt de vista del sentit biològic, la sobreexpressió de RIG-I a conseqüència de la hipòxia es pot explicar per un ambient cel·lular ric en DAMPs, on l'expressió de receptors de la immunitat innata és necessària per controlar i compensar la inflamació estèril. De fet, s'ha descrit que la presència de



RNAs degut a dany per isquèmia/reperfusió contribueix a la inflamació miocàrdica<sup>123</sup>. En la mateixa línia, s'ha suggerit que la immunitat innata podria modular la inflamació a la AR<sup>41</sup> que es considera patir una hipòxia tissular<sup>124</sup>. **Per tant, el mecanisme inflamatori autosustingut que proposem a la DM es podria explicar per l'eix HIF-RIG-IFN.** S'ha demostrat que models animals d'isquèmia-reperfusió hepàtica, el dany disminuïa significativament quan els experiments es van realitzar en animals deficients per IFN i IRF3<sup>125, 126</sup>. Aquests resultats reforcen que la resposta d'IFN té un paper important en mantenir la inflamació després d'un dany per hipòxia. Aquest resultats poden contribuir a trobar noves dianes terapèutiques que millorin el maneig d'aquests pacients.

La hipòxia va demostrar tenir un efecte a la diferenciació muscular. Els nivells proteics de la miogenina estaven reduïts en hipòxia i com a conseqüència la hipòxia promou la desdiferenciació muscular. Estudis previs han demostrat que el IFN-I inhibeix la formació de miotubs<sup>127</sup>. Per tant, és temptador especular que la sobreexpressió de RIG-I com a resultat de la hipòxia podria participar en la desdiferenciació muscular mediada per l'IFN. L'anàlisi dels marcadors d'atròfia va demostrar una sobrerregulació de catepsines i d'atrogina-1. Les catepsines són enzims proteolítics presents a la majoria de tipus cel·lulars. Estudis previs han demostrat la sobreexpressió de CTSB i L en fibres perifasciculars a la DM<sup>128</sup>.

D'acord amb aquests resultats, altres estudis han demostrat la sobreexpressió de CTSB en condicions d'hipòxia<sup>129</sup>. En el sistema cel·lular que hem estudiat aquí, l'atrogina-1 també estava sobreexpressada. L'atrogina-1 és una lligasa d'ubiquitines que la seva expressió incrementa en condicions d'atròfia<sup>130</sup>. **Aquests resultats en conjunt, indiquen que l'atròfia perifascicular a la DM pot estar mediada en part per l'efecte de proteases, d'atrogina-1 i per IFN-I mitjançant RIG-I.** Finalment, vam observar un augment dels dipòsits PAS+ als miotubs en hipòxia. Estudis previs han

observat acumulació de material PAS+ en zones perifasciculars en biòpsies de pacients amb DM<sup>131, 132</sup>. De fet, la glucogen sintasa és un gen induïble per hipòxia i la línia cel·lular C2C12, de múscul de ratolí, acumula glucògen amb baixos nivells d'oxigen<sup>133</sup>. Aquestes observacions podrien ser el resultat de l'activació transcripcional de la glucogen sintasa per part de HIF1 $\alpha$ , reforçant el paper de la hipòxia a la fisiopatogènia de la DM.

**A la tercera part d'aquesta tesi vam comparar la utilitat de RIG-I amb l'atròfia perifascicular com a biomarcadors per la DM.** Per això vam incloure pacients amb DM i de pacients que es podrien confondre tant clínicament com histològicament. La DM és una malaltia que pot aparèixer associada a altres malalties (síndromes de superposició o *overlap myositis*) que en dificulta el diagnòstic i les troballes a la biòpsia poden ser sovint coincidents. L'atròfia perifascicular és considerada patognomònica de la biòpsia de DM, però ni tots els pacients en tenen ni és única de la DM<sup>103, 104</sup>. Es van recol·lectar 115 biòpsies musculars de 3 hospitals de Barcelona per analitzar l'expressió de RIG-I per immunohistoquímica i la presència de d'atròfia perifascicular.

Els resultats van demostrar que **RIG-I té major sensibilitat per identificar la DM.** Cal destacar que en absència d'atròfia perifascicular, RIG-I és útil per al diagnòstic de DM. Vam observar que avaluar si l'atròfia afecta a dues o més fileres de fibres perifasciculars augmenta l'especificitat per al diagnòstic de DM (92% vs 79%). Aquests resultats són deguts a que la majoria de mostres que tenen sols atròfia d'una filera pertanyen al grup de ASS. De fet, s'ha demostrat que les biòpsies de ASS tenen atròfia perifascicular caracteritzada per l'expressió de HLA-DR<sup>104</sup>. Aquests resultats suggereixen que els mecanismes que indueixen l'atròfia són diferents a cada entitat, sent associada a HLA-DR a ASS mentre que a la DM s'associaria a RIG-I. Estudis recents han demostrat que l'atròfia perifascicular pot observar-se tant als *overlaps* (30%) com a les DM (17%)<sup>103</sup>. En canvi, en un altre estudi l'atròfia es pot observar fins

a un 51% de les DM<sup>134</sup>. Donada la variabilitat de les troballes de l'atrofia són necessaris altres biomarcadors.

L'expressió perifascicular de RIG-I es va observar en el 50% de les DM, mentre que el percentatge es reduïa fins al 11% a pacients sense DM. A més, RIG-I va demostrar tenir una major sensibilitat que considerar dues o més fileres d'atrofia perifascicular. Vam observar que el 32% de les mostres amb DM que no tenien atrofia eren positives per RIG-I. **Aquests resultats reforçen la utilitat de RIG-I per al diagnòstic de DM. A més s'obté una major reproductibilitat a la interpretació de RIG-I que de l'atrofia perifascicular.** Aquestes diferències són degudes en part a que és més fàcil interpretar la tinció de RIG-I que la presència o no d'atrofia. RIG-I també demostra la seva utilitat per distingir entre DM pures i miopaties inflamatòries amb superposició (*overlaps*). En aquesta mateixa línia, en una revisió recent del Dr. Dalakas, s'ha subratllat la importància de distingir aquestes entitats ja que impliquen diferents prognòstic i respostes a teràpies<sup>48</sup>. **El descobriment de nous biomarcadors no només són útils per al diagnòstic, també permeten obtenir poblacions de pacients més homogènies per estudis clínics.**

## **VII. CONCLUSIONS**

## VII. CONCLUSIONS

1. La microdissecció per làser és una bona eina per analitzar teixits amb presència d'inflamació, on la interferència dels infiltrats inflamatoris poden emascarar vies cel·lulars d'interès.
2. La immunitat innata via RIG-I té un paper rellevant a la patogènia de la DM, però no a la PM ni IBM. RIG-I manté una resposta immunològica local a través de la seva auto regulació.
3. La "signatura del IFN-I", característica de la DM, pot explicar-se per l'activació de RIG-I sense la participació d'infiltrats inflamatoris. Per tant, la fibra muscular actuaria com a cèl·lula inflamatòria no professional.
4. El fenomen d'hipòxia mitjançant HIF1 $\alpha$  té un paper rellevant en la inducció de la immunitat innata.
5. A la DM, es demostra que la patologia comença amb l'hipòxia, la qual a través de HIF1 $\alpha$  activa l'expressió de RIG-I. És aquest RIG-I el que secundàriament produeix la signatura de IFN-I amb la conseqüent perpetuació.
6. L'atròfia perifascicular pot tenir diferents orígens i a la DM és probablement mediat per la hipòxia i RIG-I.
7. La inclusió de RIG-I a l'anàlisi histopatològic de malalties musculars immuno-mediades és d'utilitat per al diagnòstic de DM amb atrofia perifascicular. És

especialment útil en mostres amb absència d'atròfia perifascicular i en el diagnòstic diferencial de miopaties amb atròfia perifascicular que no són DM.

8. Les vies descrites en aquesta tesi, permeten identificar noves dianes terapèutiques a la DM.

## **VIII.BIBLIOGRAFIA**

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Eighth edition. ed; 2014.
2. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454:428-35.
3. van Kempen TS, Wenink MH, Leijten EF, Radstake TR, Boes M. Perception of self: distinguishing autoimmunity from autoinflammation. *Nat Rev Rheumatol* 2015.
4. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16-34.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
6. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009;21:317-37.
7. Borden EC, Sen GC, Uze G, et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:975-90.
8. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
9. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998;282:2085-8.
10. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
11. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-45.
12. Kato H, Sato S, Yoneyama M, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005;23:19-28.
13. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
14. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.
15. Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, et al. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* 2011;147:423-35.
16. Shatkin AJ. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 1976;9:645-53.
17. Rehwinkel J, Reis e Sousa C. RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science* 2010;327:284-6.



18. Wu B, Hur S. How RIG-I like receptors activate MAVS. *Curr Opin Virol* 2015;12:91-8.
19. Maelfait J, Beyaert R. Emerging role of ubiquitination in antiviral RIG-I signaling. *Microbiol Mol Biol Rev* 2012;76:33-45.
20. Honda K, Yanai H, Negishi H, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005;434:772-7.
21. Hall JC, Rosen A. Type I interferons: crucial participants in disease amplification in autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:40-9.
22. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991-1045.
23. Ablasser A, Hertrich C, Wassermann R, Hornung V. Nucleic acid driven sterile inflammation. *Clin Immunol* 2013;147:207-15.
24. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010;10:826-37.
25. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-5.
26. Crow YJ. Type I interferonopathies: mendelian type I interferon up-regulation. *Curr Opin Immunol* 2015;32:7-12.
27. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 2010;207:2053-63.
28. Kato H, Fujita T. Autoimmunity caused by constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014;25:739-43.
29. Crompton SP, Deane JA, Feigenbaum L, Bolland S. Ifih1 gene dose effect reveals MDA5-mediated chronic type I IFN gene signature, viral resistance, and accelerated autoimmunity. *J Immunol* 2012;188:1451-9.
30. Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, et al. Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5. *Immunity* 2014;40:199-212.
31. Rice GI, del Toro Duany Y, Jenkinson EM, et al. Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat Genet* 2014;46:503-9.
32. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2009.
33. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992;12:5447-54.
34. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5510-4.

35. Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* 2001;292:464-8.
36. Covello KL, Simon MC. HIFs, hypoxia, and vascular development. *Curr Top Dev Biol* 2004;62:37-54.
37. Shimoda LA. 55th Bowditch Lecture: Effects of chronic hypoxia on the pulmonary circulation: role of HIF-1. *J Appl Physiol* (1985) 1985;113:1343-52.
38. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9:609-17.
39. Zarembek KA, Malech HL. HIF-1 $\alpha$ : a master regulator of innate host defenses? *J Clin Invest* 2005;115:1702-4.
40. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004;104:2224-34.
41. Hu F, Mu R, Zhu J, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  provoke toll-like receptor signalling-induced inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2014;73:928-36.
42. Fan P, Zhang JJ, Wang B, et al. Hypoxia-inducible factor-1 up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in pancreatic cancer cells under hypoxic conditions. *Pancreatology* 2012;12:170-8.
43. Jantsch J, Wiese M, Schodel J, et al. Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression. *J Leukoc Biol* 2011;90:551-62.
44. Spirig R, Djafarzadeh S, Regueira T, et al. Effects of TLR agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1 $\alpha$  and dendritic cell maturation under normoxic conditions. *PLoS One* 2010;5:e0010983.
45. Dehne N, Kerkweg U, Flohe SB, Brune B, Fandrey J. Activation of hypoxia-inducible factor 1 in skeletal muscle cells after exposure to damaged muscle cell debris. *Shock* 2011;35:632-8.
46. Nace GW, Huang H, Klune JR, et al. Cellular-specific role of toll-like receptor 4 in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatology* 2013;58:374-87.
47. Engel A, Franzini-Armstrong C. *Myology : basic and clinical*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2004.
48. Dalakas MC. Inflammatory muscle diseases. *N Engl J Med* 2015;372:1734-47.
49. van der Meulen MF, Bronner IM, Hoogendijk JE, et al. Polymyositis: an overdiagnosed entity. *Neurology* 2003;61:316-21.

50. Amato AA, Griggs RC. Unicorns, dragons, polymyositis, and other mythological beasts. *Neurology* 2003;61:288-9.
51. Harris-Love MO, Shrader JA, Koziol D, et al. Distribution and severity of weakness among patients with polymyositis, dermatomyositis and juvenile dermatomyositis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48:134-9.
52. Spiera R, Kagen L. Extramuscular manifestations in idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:556-61.
53. Rojana-Udomsart A, Bundell C, James I, et al. Frequency of autoantibodies and correlation with HLA-DRB1 genotype in sporadic inclusion body myositis (s-IBM): a population control study. *J Neuroimmunol* 2012;249:66-70.
54. Larman HB, Salajegheh M, Nazareno R, et al. Cytosolic 5'-nucleotidase 1A autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol* 2013;73:408-18.
55. Pluk H, van Hoeve BJ, van Dooren SH, et al. Autoantibodies to cytosolic 5'-nucleotidase 1A in inclusion body myositis. *Ann Neurol* 2013;73:397-407.
56. Askanas V, Engel WK, Alvarez RB. Light and electron microscopic localization of beta-amyloid protein in muscle biopsies of patients with inclusion-body myositis. *Am J Pathol* 1992;141:31-6.
57. Salajegheh M, Pinkus JL, Taylor JP, et al. Sarcoplasmic redistribution of nuclear TDP-43 in inclusion body myositis. *Muscle Nerve* 2009;40:19-31.
58. Sandri M, Robbins J. Proteotoxicity: an underappreciated pathology in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol* 2014;71:3-10.
59. Benveniste O, Stenzel W, Hilton-Jones D, Sandri M, Boyer O, van Engelen BG. Amyloid deposits and inflammatory infiltrates in sporadic inclusion body myositis: the inflammatory egg comes before the degenerative chicken. *Acta Neuropathol* 2015;129:611-24.
60. Wagner E. Fall einer seltenen Muskelkrankheit. *Arch Heilkd* 1863;4.
61. Wagner E. Ein Fall von acuter Polymyositis. *Dtsch Arch Klin Med* 1887;40.
62. Unverricht H. Polymyositis acuta progressiva. *Z Klin Med* 1887;12.
63. Unverricht H. Dermatomyositis acuta. *Dtsch Med Wochenschr* 1891;17.
64. Auriemma M, Capo A, Meogrossi G, Amerio P. Cutaneous signs of classical dermatomyositis. *G Ital Dermatol Venereol* 2014;149:505-17.
65. Casciola-Rosen L, Mammen AL. Myositis autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:602-8.
66. Allenbach Y, Benveniste O. Diagnostic utility of auto-antibodies in inflammatory muscle diseases. *J Neuromusc Dis* 2015;2.

67. Fiorentino D, Casciola-Rosen L. Autoantibodies to transcription intermediary factor 1 in dermatomyositis shed insight into the cancer-myositis connection. *Arthritis Rheum* 2012;64:346-9.
68. Ceribelli A, Fredi M, Taraborelli M, et al. Prevalence and clinical significance of anti-MDA5 antibodies in European patients with polymyositis/dermatomyositis. *Clin Exp Rheumatol* 2014;32:891-7.
69. Yamaoka T, Doi C, Yokomi A, et al. Anti-MDA5 antibody-positive dermatomyositis with lethal progressive interstitial lung disease and advanced gastric cancer. *Eur J Dermatol* 2014;24:490-1.
70. Dalakas MC. Review: An update on inflammatory and autoimmune myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37:226-42.
71. Alhatou MI, Sladky JT, Bagasra O, Glass JD. Mitochondrial abnormalities in dermatomyositis: characteristic pattern of neuropathology. *J Mol Histol* 2004;35:615-9.
72. Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Lundberg I, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum* 2005;52:1824-35.
73. Vitadello M, Doria A, Tarricone E, Ghirardello A, Gorza L. Myofiber stress-response in myositis: parallel investigations on patients and experimental animal models of muscle regeneration and systemic inflammation. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R52.
74. Nanobashvili J, Neumayer C, Fuegl A, et al. Development of 'no-reflow' phenomenon in ischemia/reperfusion injury: failure of active vasomotility and not simply passive vasoconstriction. *Eur Surg Res* 2003;35:417-24.
75. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 2011;17:1391-401.
76. Reffelmann T, Kloner RA. The "no-reflow" phenomenon: basic science and clinical correlates. *Heart* 2002;87:162-8.
77. Fleming SD, Monestier M, Tsokos GC. Accelerated ischemia/reperfusion-induced injury in autoimmunity-prone mice. *J Immunol* 2004;173:4230-5.
78. Zhang M, Alicot EM, Chiu I, et al. Identification of the target self-antigens in reperfusion injury. *J Exp Med* 2006;203:141-52.
79. Weiser MR, Williams JP, Moore FD, Jr., et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J Exp Med* 1996;183:2343-8.
80. Konttinen YT, Mackiewicz Z, Povilenaite D, Sukura A, Hukkanen M, Virtanen I. Disease-associated increased HIF-1, alphavbeta3 integrin, and Flt-1 do not suffice to

compensate the damage-inducing loss of blood vessels in inflammatory myopathies. *Rheumatol Int* 2004;24:333-9.

81. Probst-Cousin S, Neundorfer B, Heuss D. Microvasculopathic neuromuscular diseases: lessons from hypoxia-inducible factors. *Neuromuscul Disord* 2010;20:192-7.

82. Liao AP, Salajegheh M, Nazareno R, Kagan JC, Jubin RG, Greenberg SA. Interferon beta is associated with type 1 interferon-inducible gene expression in dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:831-6.

83. Walsh RJ, Kong SW, Yao Y, et al. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56:3784-92.

84. Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS, et al. Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol* 2005;57:664-78.

85. Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy. *Ann Neurol* 2010;67:53-63.

86. Lopez de Padilla CM, Vallejo AN, McNallan KT, et al. Plasmacytoid dendritic cells in inflamed muscle of patients with juvenile dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2007;56:1658-68.

87. Somani AK, Swick AR, Cooper KD, McCormick TS. Severe dermatomyositis triggered by interferon beta-1a therapy and associated with enhanced type I interferon signaling. *Arch Dermatol* 2008;144:1341-9.

88. Bilgic H, Ytterberg SR, Amin S, et al. Interleukin-6 and type I interferon-regulated genes and chemokines mark disease activity in dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2009;60:3436-46.

89. Suzuki J, Morimoto S, Amano H, Tokano Y, Takasaki Y, Hashimoto H. Serum levels of interleukin 15 in patients with rheumatic diseases. *J Rheumatol* 2001;28:2389-91.

90. Szodoray P, Alex P, Knowlton N, et al. Idiopathic inflammatory myopathies, signified by distinctive peripheral cytokines, chemokines and the TNF family members B-cell activating factor and a proliferation inducing ligand. *Rheumatology (Oxford)* 2010;49:1867-77.

91. Tucci M, Quatraro C, Dammacco F, Silvestris F. Increased IL-18 production by dendritic cells in active inflammatory myopathies. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1107:184-92.

92. Baek A, Park HJ, Na SJ, et al. The expression of BAFF in the muscles of patients with dermatomyositis. *J Neuroimmunol* 2012;249:96-100.

93. de Souza A, Rebello O. Dermatomyositis presenting with quadriparesis in association with H1N1 influenza. *J Clin Neurosci* 2011;18:733.

94. Stubgen JP. A review on the association between inflammatory myopathies and vaccination. *Autoimmun Rev* 2014;13:31-9.
95. Kim GT, Cho ML, Park YE, et al. Expression of TLR2, TLR4, and TLR9 in dermatomyositis and polymyositis. *Clin Rheumatol* 2010;29:273-9.
96. Cappelletti C, Baggi F, Zolezzi F, et al. Type I interferon and Toll-like receptor expression characterizes inflammatory myopathies. *Neurology* 2011;76:2079-88.
97. Stenzel W, Goebel HH, Aronica E. Review: immune-mediated necrotizing myopathies--a heterogeneous group of diseases with specific myopathological features. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2012;38:632-46.
98. Benveniste O, Drouot L, Jouen F, et al. Correlation of anti-signal recognition particle autoantibody levels with creatine kinase activity in patients with necrotizing myopathy. *Arthritis Rheum* 2011;63:1961-71.
99. Mammen AL, Chung T, Christopher-Stine L, et al. Autoantibodies against 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in patients with statin-associated autoimmune myopathy. *Arthritis Rheum* 2011;63:713-21.
100. Hervier B, Benveniste O. Clinical heterogeneity and outcomes of antisynthetase syndrome. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15:349.
101. Mahler M, Miller FW, Fritzler MJ. Idiopathic inflammatory myopathies and the anti-synthetase syndrome: a comprehensive review. *Autoimmun Rev* 2014;13:367-71.
102. Rider LG, Miller FW. Deciphering the clinical presentations, pathogenesis, and treatment of the idiopathic inflammatory myopathies. *JAMA* 2011;305:183-90.
103. Troyanov Y, Targoff IN, Payette MP, et al. Redefining dermatomyositis: a description of new diagnostic criteria that differentiate pure dermatomyositis from overlap myositis with dermatomyositis features. *Medicine (Baltimore)* 2014;93:318-32.
104. Aouizerate J, De Antonio M, Bassez G, et al. Myofiber HLA-DR expression is a distinctive biomarker for antisynthetase-associated myopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2:154.
105. Stenzel W, Preusse C, Allenbach Y, et al. Nuclear actin aggregation is a hallmark of anti-synthetase syndrome-induced dysimmune myopathy. *Neurology* 2015;84:1346-54.
106. Panne D, Maniatis T, Harrison SC. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell* 2007;129:1111-23.
107. De Luna N, Gallardo E, Sonnet C, et al. Role of thrombospondin 1 in macrophage inflammation in dysferlin myopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010;69:643-53.
108. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994-7.

109. Kuznik A, Bencina M, Svajger U, Jeras M, Rozman B, Jerala R. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines. *J Immunol* 2011;186:4794-804.
110. Illa I, Gallardo E, Gimeno R, Serrano C, Ferrer I, Juarez C. Signal transducer and activator of transcription 1 in human muscle: implications in inflammatory myopathies. *Am J Pathol* 1997;151:81-8.
111. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3:Article3.
112. Nagaraju K, Raben N, Loeffler L, et al. Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9209-14.
113. Helbig KJ, Beard MR. The role of viperin in the innate antiviral response. *J Mol Biol* 2014;426:1210-9.
114. Seo JY, Yaneva R, Cresswell P. Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication. *Cell Host Microbe* 2011;10:534-9.
115. Hinson ER, Cresswell P. The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic alpha-helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20452-7.
116. Rayavarapu S, Coley W, Nagaraju K. Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle homeostasis and disease. *Curr Rheumatol Rep* 2012;14:238-43.
117. Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 2011;31:3802-19.
118. Rigby RE, Rehwinkel J. RNA degradation in antiviral immunity and autoimmunity. *Trends Immunol* 2015;36:179-88.
119. Chakrabarti A, Jha BK, Silverman RH. New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J Interferon Cytokine Res* 2011;31:49-57.
120. Ibsen MS, Gad HH, Thavachelvam K, Boesen T, Despres P, Hartmann R. The 2'-5'-oligoadenylate synthetase 3 enzyme potentially synthesizes the 2'-5'-oligoadenylates required for RNase L activation. *J Virol* 2014;88:14222-31.
121. Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 2007;448:816-9.
122. van Golen RF, Reiniers MJ, Olthof PB, van Gulik TM, Heger M. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and potential therapeutics. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:394-400.

123. Chen C, Feng Y, Zou L, et al. Role of extracellular RNA and TLR3-Trif signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Am Heart Assoc* 2014;3:e000683.
124. Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog EM. Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:153-62.
125. Zhai Y, Qiao B, Gao F, et al. Type I, but not type II, interferon is critical in liver injury induced after ischemia and reperfusion. *Hepatology* 2008;47:199-206.
126. Zhai Y, Shen XD, O'Connell R, et al. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol* 2004;173:7115-9.
127. Franzi S, Salajegheh M, Nazareno R, Greenberg SA. Type 1 interferons inhibit myotube formation independently of upregulation of interferon-stimulated gene 15. *PLoS One* 2013;8:e65362.
128. Gallardo E, de Andres I, Illa I. Cathepsins are upregulated by IFN-gamma/STAT1 in human muscle culture: a possible active factor in dermatomyositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:847-55.
129. Wickramasinghe NS, Banerjee K, Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W. Hypoxia alters cathepsin B / inhibitor profiles in oral carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 2005;25:2841-9.
130. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:14440-5.
131. Lagueny A, Martin-Negrier ML, Bredin A, Berge-Lefranc JL, Piraud M, Vital A. Paraneoplastic dermatomyositis with glycogen accumulation in muscle. *Rev Neurol (Paris)* 2014;170:229-30.
132. Sampson JB, Chin SS, Clayton FC, Pestronk A, Swoboda KJ, Flanigan KM. An unusual pathologic feature associated with dermatomyositis. *Neuromuscul Disord* 2006;16:391-3.
133. Pescador N, Villar D, Cifuentes D, et al. Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One* 2010;5:e9644.
134. Pinal-Fernández I, Casciola-Rosen L, Christopher-Stine L, Corse A, Mammen AL. The prevalence of individual histopathologic features varies according to autoantibody status in muscle biopsies from dermatomyositis patients. *J Rheumatol* 2015.



## **IX. ANNEXES**

## Altered RIG-I/DDX58-mediated innate immunity in dermatomyositis

Xavier Suárez-Calvet,<sup>1,2</sup> Eduard Gallardo,<sup>1,2</sup> Gisela Nogales-Gadea,<sup>1,2</sup> Luis Querol,<sup>1,2</sup> Miquel Navas,<sup>1,2</sup> Jordi Díaz-Manera,<sup>1,2</sup> Ricard Rojas-García<sup>1,2</sup> and Isabel Illa<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Neuromuscular Diseases Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona and Institut de Recerca Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Centro Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

\*Correspondence to: I Illa, Neuromuscular Diseases Unit, Neurology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail: illa@santpau.cat

†The following link provides access to microarray data deposited in GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=ddcdzkusqaeu&acc=GSE48280>

### Abstract

We investigated the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of three inflammatory myopathies, dermatomyositis (DM), polymyositis (PM) and inclusion body myositis (IBM). We performed microarray experiments† using microdissected pathological muscle fibres from 15 patients with these disorders and five controls. Differentially expressed candidate genes were validated by immunohistochemistry on muscle biopsies, and the altered pathways were analysed in human myotube cultures. Up-regulation of genes involved in viral and nucleic acid recognition were found in the three myopathies but not in controls. In DM, retinoic acid-inducible gene 1 (*RIG-I*, *DDX58*) and the novel antiviral factor *DDX60*, which promotes RIG-I-mediated signalling, were significantly up-regulated, followed by *IFH1* (*MDA5*) and *TLR3*. Immunohistochemistry confirmed over-expression of RIG-I in pathological muscle fibres in 5/5 DM, 0/5 PM and 0/5 IBM patients, and in 0/5 controls. Stimulation of human myotubes with a ligand of RIG-I produced a significant secretion of interferon- $\beta$  (IFN $\beta$ ;  $p < 0.05$ ) and up-regulation of class I MHC, RIG-I and TLR3 ( $p < 0.05$ ) by IFN $\beta$ -dependent and TLR3-independent mechanisms. RIG-I-mediated innate immunity, triggered by a viral or damage signal, plays a significant role in the pathogenesis of DM, but not in that of PM or IBM.

Copyright © 2014 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** inflammatory myopathy; innate immunity; dermatomyositis; RIG-I; DDX58

Received 14 November 2013; Revised 6 February 2014; Accepted 25 February 2014

No conflicts of interest were declared.

### Introduction

Inflammatory myopathies (IMs) are a heterogeneous group of myopathies that include dermatomyositis (DM), polymyositis (PM) and inclusion body myositis (IBM), characterized by the presence of inflammatory infiltrates in skeletal muscle [1]. The aetiology of IM is unknown, but several studies indicate that their pathogenesis is mediated by adaptive immunity [2–4]. Although IMs share the presence of inflammation, the clinical features and molecular mechanisms resulting in muscle injury probably differ in each one [2,5,6].

Normal muscle fibres do not express major histocompatibility complex class I (MHC-I), whereas MHC-I over-expression is a hallmark of all IMs [1]. In conditioned transgenic mice, MHC-I over-expression is sufficient to induce myositis [7]. The induction of MHC-I in IM probably involves type I interferon (IFN-I); the 'IFN-I signature' (meaning the group of genes

up-regulated by IFN-I) is also induced in IMs [8–11]. An IFN-I signature in whole blood is also a feature of rheumatic diseases such as systemic lupus erythematosus, arthritis, myositis and scleroderma [12]. Since the target tissue is different in each of these diseases, the trigger mechanisms that induce the IFN-I signature must be specific for each entity. Microarray expression analysis of DM using RNA extracted from whole muscle has previously revealed a large list of IFN-up-regulated genes, some of which have been validated at the protein level [8–11]. Among them, *ISG15*, *MX1* and *IRF7* were found over-expressed in perifascicular areas [10]. *ISG15* is a ubiquitin-like modifier [13] and has been proposed as a possible factor mediating muscle atrophy by conjugating proteins necessary for the maintenance of mature skeletal muscle myofibres [10].

Recognition of pathogen- or damage-associated molecular patterns by Toll-like receptors (TLRs), C-type lectin receptors (CLRs) and RIG-I-like receptors

(RLRs) initiate the innate immune response [14,15]. The role of innate immunity has recently been explored in IMs. In the muscle biopsies of patients with PM and DM, several TLRs showed increased expression, suggesting viral involvement in the triggering of PM and DM [9,16]. Furthermore, *in vitro* studies have suggested that activation of the TLR3 pathway may be responsible for MHC-I up-regulation in both PM and DM, through an IFN $\beta$ -dependent mechanism [17]. CLRs have also been related to IM, as they were found in the muscle inflammatory infiltrates [17].

RLRs include RIG-I (the product of retinoic-acid inducible gene-1, *DDX58*), interferon-induced helicase C domain-containing protein 1 (IFIH1, also known as melanoma differentiation-associated protein 5, *MDA5*) and DEXH box polypeptide 58 (*DHX58*, also known as *LGP2*) [15]. RIG-I recognizes dsRNA and 5'-triphosphate ssRNA to promote the synthesis of IFN-I [14] and the activation of interleukin-1 $\beta$  via the inflammasome [18], and is activated either by viruses or by endogenous damage [19,20].

### Materials and methods

#### Subjects with IM and controls

Muscle biopsies were performed for diagnostic purposes and stored in liquid nitrogen. We selected consecutive well-preserved biopsies from five patients with DM, five with PM and five with IBM, who fulfilled the established diagnostic criteria [21] and did not receive any treatment prior to biopsy. All DM and PM subjects were female, aged 25–71 years, while the IBM subjects were male ( $n = 3$ ) and female ( $n = 2$ ), aged 67–77. Samples from patients with a neoplasm or poor RNA yield were excluded. Control muscle biopsies were obtained from subjects undergoing hip replacement surgery. Routine histological stains were normal. All patients and controls signed an informed consent and the project was approved by the Ethics Committee at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Code No. 12/2009), in accordance with the Declaration of Helsinki for human research.

#### Immunoguided laser microdissection

Muscle biopsies were cut into 20  $\mu\text{m}$  sections and placed on laser microdissection slides (Expression Pathology, Rockville, MD, USA) previously exposed to ultraviolet light for 30 min and coated with poly-L-lysine for 5 min (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

To identify MHC-I-expressing fibres, we developed a fast protocol of immunofluorescence to minimize RNA degradation. Slides were fixed in cold acetone for 5 min and washed in phosphate-buffered saline (PBS). Sections were then incubated for 15 min with anti-MHC-I (DAKO, Carpinteria, CA, USA) at 1/5 dilution. Slides were washed in PBS and then incubated

at 1/100 with goat anti-mouse IgG Alexa 594 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Slides were washed in PBS and air-dried in a desiccation chamber until laser microdissection. MHC-I-positive fibres from IM subjects and MHC-I-negative fibres from controls were isolated using a Leica LMD 6000 (see supplementary material, Figure S1). Inflammatory infiltrates were avoided. We collected 7mm<sup>2</sup> of each sample. Samples were immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction.

#### Microarray experiments

Total RNA was isolated using the Rneasy Micro Kit (Qiagen NV, Hilden, Germany) and its quantity and integrity were assessed using a Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Only samples with a similar RNA integrity number (RIN) were used. One sample from an IBM patient was discarded because it did not reach an RIN equivalent to the other samples. Total RNA (5 ng) from each microdissected sample was used for a single expression microarray analysis, using the Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Human Gene 1.0 ST Array. Briefly, RNA was amplified for ssDNA generation, using the Ovation<sup>™</sup> Pico WTA System (NuGEN Technologies, San Carlos, CA, USA), fragmented and labelled with the Encore<sup>®</sup> Biotin Module (NuGEN Technologies). The biotinylated cDNA was hybridized to the arrays according to the manufacturer's instructions. Microarray data have been deposited in GEO (Accession No. GSE48280: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE48280>).

#### Immunofluorescence

To validate the microarray results at the protein level, we performed immunohistochemistry for RIG-I, RSAD2 (viperin) and MHC-I in sections from the same muscle biopsies used in the microarray experiments (five each of DM, PM, IBM and healthy controls). Double-label immunostaining of RIG-I and MHC-I was performed as previously described [22]. Sections were incubated with 1/50 anti-RIG-I monoclonal antibody (Thermo Scientific, Rockford, USA) and anti-MHC-I (Dako) at 1/100. Serial sections were used for the detection of RSAD2 (viperin) (Abcam, Cambridge, MA) at 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , of MHC-I (Dako) at 1/100 and of IFIH1 (*MDA5*) at 1/1000 (Abcam).

Localizations of RIG-I and IFIH1 (*MDA5*) were studied in control myotubes grown on coverslips (see below). After washing steps, the myotubes were fixed in cold methanol or in 4% paraformaldehyde for 10 min. After incubation with 0.1% Tween 20 blocking solution, the coverslips were incubated with rabbit anti-RIG-I or with rabbit anti-IFIH1 (*MDA5*; both from Abcam) for 1 h. Goat anti-rabbit AlexaFluor 594 was used as secondary antibody at 1/200. The coverslips were mounted with Vectashield with DAPI (Vector Labs, USA). Images were obtained using a Olympus BX51 microscope coupled to a DP72 camera.

### Muscle culture

To validate the *in vivo* observations, we performed functional studies using human muscle primary cultures. Cultured myoblasts from three healthy controls and four DM subjects were grown in six-well plates or on coverslips for immunocytochemical studies, as previously described [23].

At the myotube stage, cells were stimulated with 2 µg/ml of the RIG-I agonist 5' ppp dsRNA/Lyovec [24] or with the negative control agonist, a 19mer blunt-end dsRNA without a 5' triphosphate (both from Invivogen, San Diego, CA, USA). To investigate the effect of IFNβ neutralization on RIG-I-activated myotubes, during stimulation we added increasing concentrations (10, 50 or 100 µg/ml) of the neutralizing anti-IFNβ (eBioscience, San Diego, CA, USA) or 50 µg/ml isotype control (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). To exclude possible effects due to TLR3 signalling in RIG-I-activated myotubes, we

treated cultures with RIG-I ligand plus chloroquine (Invivogen), an inhibitor of the endosomal acidification necessary for TLR3 signalling [25]. Cells were collected for RNA and protein extraction and supernatants for ELISA experiments after 6, 8, 24 and 48 h of culture.

### IFN-I measurements

IFNα and IFNβ concentrations in culture supernatants were determined using specific ELISAs (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ, USA, cat. nos 41100-1 and 41410-1, respectively).

### Real-time PCR

RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA), following the manufacturer's instructions. RNA samples were reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Retrotranscription Kit (Applied Biosystems,

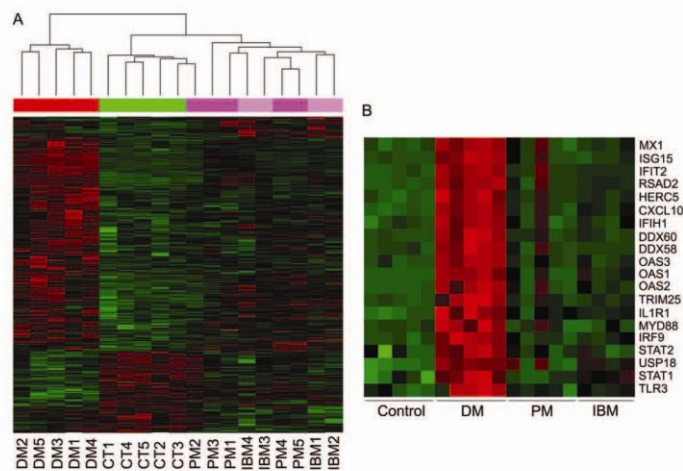


Figure 1. Microarray analysis. (A) Heat map of the hierarchical clustering of genes differentially expressed in MHC-I-positive myofibres of DM, PM, IBM patients and MHC-I-negative myofibres from controls (adjusted  $p < 0.05$ ; log fold change  $> 0$ ). (B) Differentially expressed genes participating in innate immune response, response to virus and IFN-I production of the microarray analysis (adjusted  $p < 0.01$ , log fold change  $> 0$ ). High expression levels are represented in red and low levels in green. DM, dermatomyositis; CT, control; PM, polymyositis; IBM, inclusion body myositis.

Table 1. Gene Ontology (GO) enriched categories in multiple comparisons

	GO: Innate immune response			GO: Response to virus			GO: IFN-I production		
	Up-regulated genes	Odds ratio	<i>p</i>	Up-regulated genes	Odds ratio	<i>p</i>	Up-regulated genes	Odds ratio	<i>p</i>
DM versus control	115	3.67	8.3e-26	61	4.11	1.5e-16	15	4.32	2e-5
PM versus control	66	6.52	5.7e-28	27	4.97	2e-10	10	8.34	1.6e-6
IBM versus control	70	5.08	6e-24	27	3.7	6.7e-8	8	4.77	0.0006
DM versus PM	89	3.85	3.7e-22	50	4.58	6.9e-16	14	5.67	1.9e-6
DM versus IBM	90	4.14	3.1e-24	50	4.84	9.6e-17	12	4.87	3.4e-5

GO, gene ontology; DM, dermatomyositis; PM, polymyositis; IBM, inclusion body myositis.

'Innate immune response' (G00045087), 'response to virus' (G00009615) and 'IFN-I production' (G00032606) were significantly up-regulated in all pathological conditions (DM, PM and IBM) compared to controls. DM samples show these GO categories up-regulated versus PM and IBM. Data from five patients with DM, five with PM, four with IBM and five control samples.

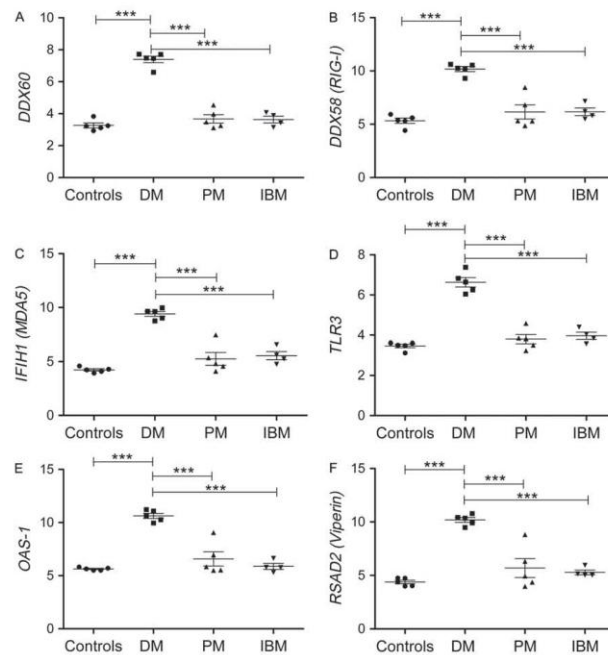


Figure 2. Normalized expression values showing up-regulation of mRNAs for *DDX60* (A), *DDX58 (RIG-I)* (B), *IFIH1 (MDA5)* (C), *TLR3* (D), *OAS1* (E) and *RSAD2* (viperin) (F) in DM samples versus PM, IBM and controls. Error bars represent SD: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Warrington, UK). mRNA was quantified using TaqMan fluorogenic probes for  $\beta 2$ -microglobulin (*MHC-I*), *DDX58 (RIG-I)*, *RSAD2* (viperin), *OAS1*, *TLR3* and *GAPDH* as endogenous control (Applied Biosystems). The relative expression levels were determined by the comparative CT method ( $\Delta\Delta CT$ ), using non-treated myotubes or myotubes treated with the RIG-I-negative control agonist as a calibrators.

#### Immunoblotting

Western blot analysis of cell cultures was performed as previously described [26]. Gel proteins were transferred to a nitrocellulose membrane, and immunoblot was performed with rabbit monoclonal anti-MHC class I (1/1000; Abcam) and mouse anti-desmin (1/1000; Novocastra, Newcastle, UK) as a loading control. Appropriate anti-rabbit and anti-mouse DyLight secondary antibodies (Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA) were used at 1/7500, and band pattern was analysed and quantified using an Odyssey Imager (LI-QOR, Lincoln, NE, USA).

#### Statistics

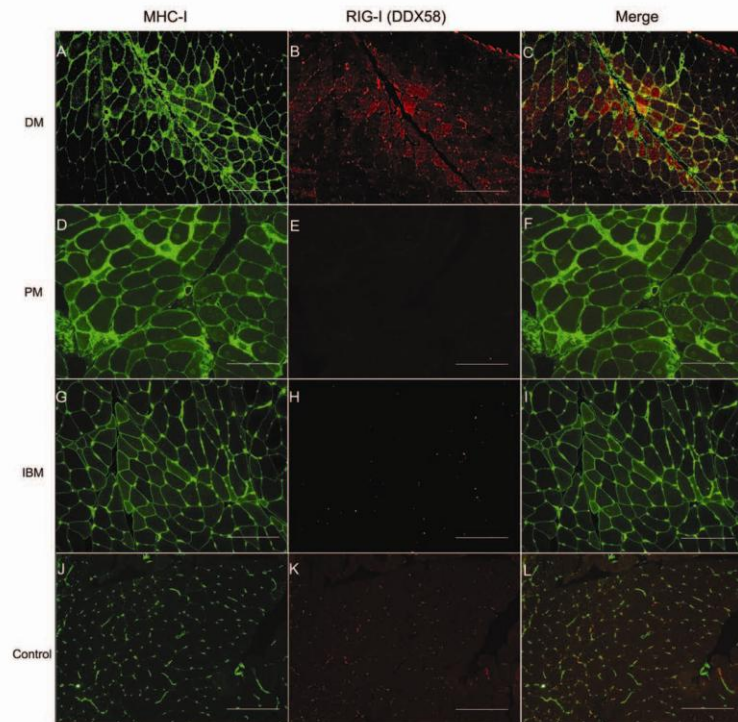
Microarray analysis of selected, differentially expressed genes was based on adjusting a linear model with

empirical Bayesian moderation of variance [27]. Multiple comparison analysis was corrected by false discovery rate. GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for data elaboration and statistical analysis. Student's *t*-test was used for analysis of cell culture data;  $p < 0.05$  was considered significant.

#### Results

##### Transcriptomic profile of MHC-I-positive microdissected myofibres

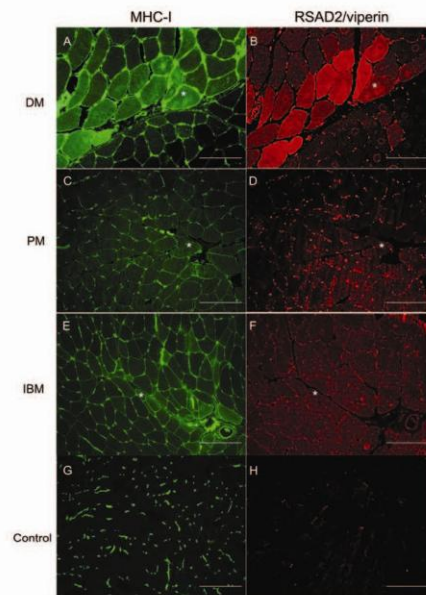
To investigate the differential immune mechanisms involved in IM, we performed high-throughput microarray gene expression analysis of muscle fibres from DM, PM and IBM patients and controls. We used laser microdissection of pathological MHC-I-positive muscle fibres, avoiding inflammatory infiltrates. 1144 probe sets were differentially expressed in DM versus controls (906 up-regulated, 238 down-regulated), 250 in PM versus controls (167 up-regulated, 83 down-regulated) and 485 in IBM versus controls (308 up-regulated, 177 down-regulated) ( $p < 0.01$ ). Comparisons between IMs showed 688 differentially expressed genes in DM versus PM and 549 in DM versus IBM ( $p < 0.01$ ) (Figure 1).



**Figure 3.** Double immunohistochemistry of MHC-I and RIG-I in frozen sections from muscle biopsies. MHC-I-positive myofibres in DM (A) show over-expression of RIG-I (B) colocalizing in perifascicular area (C). MHC-I-positive myofibres were present in PM (D) and in IBM (G), while RIG-I was not expressed (E, H, respectively). Controls do not express MHC-I (J) and RIG-I (K) in myofibres. All pictures were taken at  $\times 100$  magnification; scale bar = 100  $\mu$ m.

Gene ontology (GO) clustering was used to detect enriched GO categories ( $p < 0.00001$ ) in the differentially expressed genes. They indicate a role of IFN-I in IM, in accordance with previous reports, and point to an important role for innate immunity in DM. GO clustering detected up-regulation of 'innate immune response' (GO0045087) in DM versus control [115 genes; odds ratio (OR) 3.67] in PM versus control (66 genes, OR 6.52) and in IBM versus control (70 genes, OR 5.08). This category was significantly up-regulated in DM versus PM (89 genes, OR 3.85) and DM versus IBM (90 genes, OR 4.14). Analysis also showed up-regulation of 'response to virus' (GO0009615) in DM versus control (61 genes, OR 4.11), in PM versus control (27 genes OR 4.97) and in IBM versus control (27 genes, OR 3.7). This category was also up-regulated in DM versus PM (50 genes, OR 4.22) and DM versus IBM (50 genes, OR 4.87). We found up-regulation of 'IFN-I production' (GO0032606) in DM versus controls (15 genes, OR 4.32), in PM versus controls (10 genes, OR 8.34) and in IBM versus controls (eight genes, OR 4.77). This category was significantly up-regulated in DM versus

PM (14 genes, OR 5.67) and DM versus IBM (12 genes, OR 4.87) (Figure 1B, Table 1). *DDX60* mRNA, a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signalling, was highly up-regulated in DM versus controls [log(fold change), logFC 4.12], in DM versus PM (logFC 3.71) and in DM versus IBM (logFC 3.76) (Figure 2A). We also found that *DDX58* mRNA (*RIG-I*) was up-regulated in DM versus controls (logFC 4.85), in DM versus PM (logFC 4.03) and in DM versus IBM (logFC 4.02) (Figure 2B). *IFIH1* (*MDA5*) mRNA was up-regulated in DM versus controls (logFC 5.17), in DM versus PM (logFC 4.14) and in DM versus IBM (logFC 4) (Figure 2C). *TLR3* mRNA was up-regulated in DM versus controls (logFC 3.15), DM versus PM (logFC 2.8) and in DM versus IBM (logFC 2.6) (Figure 2D). *OAS1* and *RSAD2* (viperin) mRNAs, both key antiviral molecules, were up-regulated in DM but not in PM or IBM (Figure 2E, F). In addition, a list of the 25 most up-regulated genes in DM (see supplementary material, Table S1) shows that most of them are related to the IFN-I signature.



**Figure 4.** Immunohistochemistry of RSAD2/viperin in frozen serial sections from muscle biopsies. The DM sample shows over-expression of RSAD2/viperin (A) in MHC-I-positive myofibres (B). RSAD2/viperin was not present in PM (C) and IBM myofibres (E), while MHC-I over-expression was present (D, E, respectively). All pictures were taken at  $\times 100$  magnification; scale bar = 100  $\mu$ m.

#### RIG-I is expressed in MHC-I-positive myofibres of patients with DM

We analysed the expression of RIG-I by IHC to validate the microarray findings. We found RIG-I in the sarcoplasm of 5/5 DM muscle samples. RIG-I expression was more prominent in the perifascicular areas and colocalized with MHC-I-positive muscle fibres in DM patients (Figure 3A–C). In contrast, RIG-I was negative in all PM (Figure 3E), IBM (Figure 3H) and control samples (Figure 3K), except for scattered necrotic fibres in one patient with PM and in one with IBM.

#### RSAD2 (viperin) is expressed in MHC-I-positive myofibres of patients with DM

We validated the up-regulation of RSAD2/viperin at the protein level in muscle biopsies to corroborate our microarray findings. We found RSAD2/viperin-positivity in MHC-I-positive pathological fibres from 5/5 DM patients (Figure 4A, B). In contrast, RSAD2/viperin was not found in PM (Figure 4D), IBM (Figure 4F) or control biopsies (Figure 4H). These results support the role of antiviral immunity in DM.

#### RIG-I is expressed in the sarcoplasm, but not the sarcolemma, of human myotubes

RIG-I was not detected in human cultured myotubes fixed under non-permeabilizing conditions with 4% PFA (Figure 5A). However, RIG-I was detected in the sarcoplasm when myotubes were fixed under permeabilizing conditions using cold methanol (Figure 5B). These results indicate that our *in vitro* model is useful to study the molecules involved in RIG-I signalling pathways.

#### IFIH1 (MDA5) is expressed in the sarcoplasm of human myotubes but not in DM muscle

We analysed the expression of IFIH1 (MDA5) in DM muscle and in human cultured myotubes. IFIH1 was expressed in the sarcoplasm of myotubes fixed under permeabilizing conditions (see supplementary material, Figure S2A). However, IFIH1 was not detected in muscle sections of our DM patients (Figure S2B). These results indicate that RIG-I is the main effector of the RLR innate immunity in these patients.

#### Effect of RIG-I activation in human myotubes

The effect of RIG-I pathway activation was studied in cultured myotubes from control and DM patients after stimulation with 5' ppp-dsRNA. After 48 h of RIG-I stimulation, real-time PCR studies showed  $\beta$ -2 microglobulin mRNA up-regulation in both controls ( $p < 0.05$ ) and DM myotubes ( $p < 0.01$ ) (Figure 6A). *DDX58* mRNA (RIG-I) was also significantly up-regulated in controls ( $p < 0.05$ ) but not in DM myotubes ( $p = 0.08$ ) (Figure 6B). *TLR3* mRNA was significantly up-regulated in controls ( $p < 0.01$ ) and in DM myotubes ( $p < 0.001$ ) (Figure 6C). We observed the same effect in *OAS1* mRNA expression ( $p < 0.05$ ) (Figure 6D). *RSAD2* (viperin) mRNA was up-regulated in controls ( $p < 0.05$ ) but not in patients ( $p = 0.06$ ) (Figure 6E). No differences were observed between stimulated myotubes from DM and control subjects. ELISA studies showed that human myotubes did not constitutively produce detectable levels of IFN $\alpha$  and IFN $\beta$ . At 24 h after stimulation, we did not detect significant levels of IFNs (data not shown). However, after 48 h of RIG-I stimulation, we found significant levels of IFN $\beta$  in DM and control myotube supernatants ( $p < 0.01$ ) (Figure 7A), whereas IFN $\alpha$  was not detectable (data not shown). Western blot suggested increased MHC-I expression in RIG-I-activated DM ( $p = 0.054$ ) and control ( $p = 0.26$ ) myotubes, relative to control agonist (Figure 7B). Further samples are needed to confirm that this increase of MHC-I expression is statistically significant.

Overall, these results indicate that RIG-I pathway activation induces MHC-I over-expression, secretion of IFN $\beta$  and a positive feedback on RIG-I. Thus, the presence of RIG-I in DM biopsies could be a consequence of its own activation. To further assess whether RIG-I effects on myotubes are due to the effect of newly

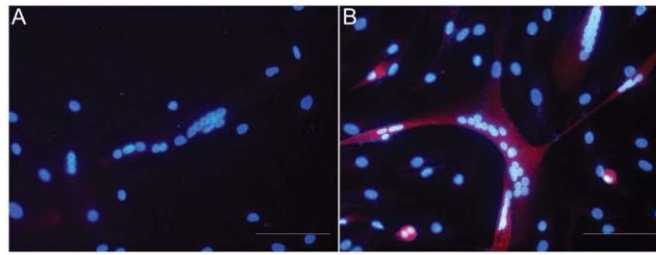


Figure 5. Immunocytochemistry of RIG-I in human myotubes. RIG-I is not detected in non-permeabilized myotubes (A), while it is detected in the sarcoplasm of permeabilized myotubes (B). Both pictures were taken at  $\times 200$  magnification; scale bar =  $100 \mu\text{m}$ .

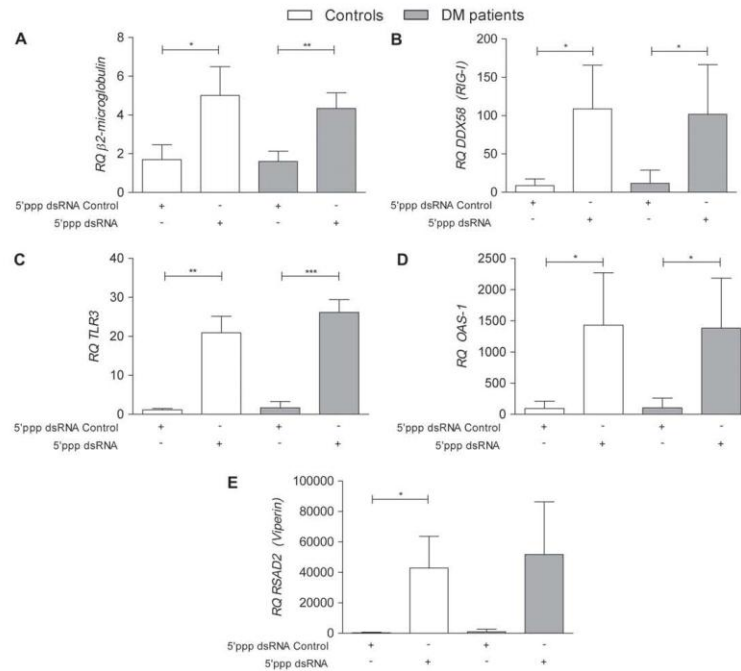


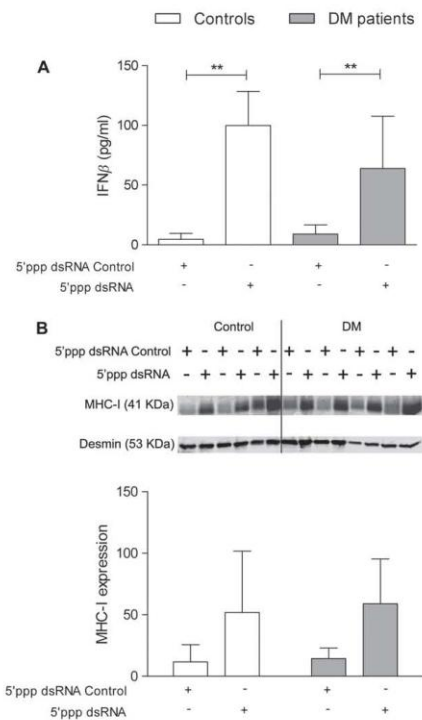
Figure 6. Effect of RIG-I activation on mRNA expression in human myotubes. RIG-I activation (5' ppp dsRNA) for 48 h in control ( $n = 3$ ) and DM ( $n = 3$ ) myotubes induces a significant increase of  $\beta 2$  microglobulin (A), of *DDX58* (*RIG-I*) (B), of *TLR3* (C), of *OAS1* (D) and of *RSAD2* (*viperin*) (E). RQ, relative quantification using *GAPDH* as endogenous control and non-treated myotubes as a calibrator sample. Error bars represent SD; data shown represent one of three independent experiments; samples were analysed in triplicate: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

RIG-I-induced autocrine IFN $\beta$ , we blocked this cytokine with a specific antibody. After 48 h, RIG-I-induced  $\beta$ -2 microglobulin mRNA decreased by 69% ( $p < 0.05$ ) in a dose-dependent manner (Figure 8A). We also found significant down-regulation of *DDX58* (*RIG-I*) (50%) and *TLR3* (75%) mRNAs (Figure 8B, C). These results indicate that the RIG-I activation effects in myotubes are indeed mostly IFN $\beta$ -mediated.

#### TLR3 inhibition in RIG-I-activated myotubes

Since TLR3 also recognizes dsRNAs, we blocked TLR3 signalling in RIG-I-activated myotubes, using chloroquine. These experiments also showed a significant increase of  $\beta$ -2 microglobulin, *DDX58* (*RIG-I*) and *TLR3* mRNAs ( $p < 0.05$ ) (Figure 9), indicating that the RIG-I signalling effects in cultured myotubes are TLR3-independent.





**Figure 7.** *RIG-I* activation in human myotubes induces IFN $\beta$  secretion and up-regulation of MHC-I. *RIG-I* activation (5' ppp dsRNA) for 48 h in control ( $n = 3$ ) and DM ( $n = 3$ ) myotubes induces an increase of IFN $\beta$  in the supernatants (A). Western blot shows that MHC-I is increased after *RIG-I* activation in control ( $n = 3$ ;  $p = 0.26$ ) and DM ( $n = 4$ ;  $p = 0.054$ ) myotubes. Protein quantification is shown in the graph, using desmin as a loading control (B). Data shown represent one of three independent experiments; samples were analysed in triplicate: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

## Discussion

This study indicates that genes involved in innate immunity are dysregulated in patients with inflammatory myopathies (IM). However, the up-regulation of *RIG-I* (*DDX58*) mRNA was highly significant only in DM samples, and *RIG-I* expression colocalized with perifascicular pathological myofibres in DM biopsies. The *in vitro* experiments show that *RIG-I* signalling promotes secretion of IFN $\beta$  and, consequently, MHC-I is up-regulated in a TLR3-independent manner. Thus, *RIG-I* plays a significant role in maintaining the immune dysregulation in DM but not in PM or IBM muscles.

Importantly, we used laser microdissection to obtain MHC-I-expressing muscle fibres for microarray analysis, to reduce the background noise produced by inflammatory cells and healthy muscle fibres. Use of whole muscle could be considered a limitation, due to

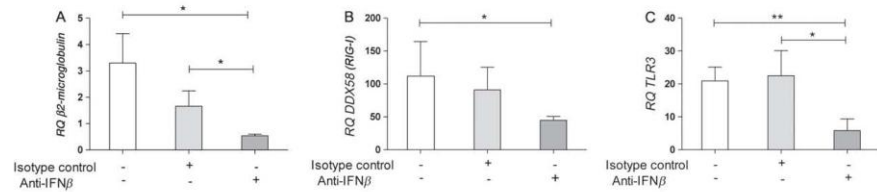
the presence of other cell types. Indeed, other authors have reported up-regulation of TLRs in PM, but have suggested that the results might be due to the large numbers of infiltrating cells rather than muscle fibres [9]. Our analysis confirms the up-regulation of IFN-I-stimulated genes, such as *ISG15*, *MX1*, *DDX58* (*RIG-I*) and *RSAD2* (viperin), previously reported in whole IM muscle samples [10]. The fact that our studies were performed using microdissected muscle fibres indicates a major or unique contribution of muscle fibres, rather than inflammatory infiltrates, not discernible in the previous microarray studies using whole muscle [8,10,11].

We validated the *RIG-I* and *RSAD2*/viperin results at the protein level, in the muscle biopsies of all IM and controls. Interestingly, over-expression of these two proteins was only found in perifascicular areas in DM. Although over-expression of other IFN-induced genes (eg *MX1*, *ISG15*) has been validated at the protein level in perifascicular fibres, we focused our studies on *RIG-I* because it acts upstream [14] and can initiate a persistent local immune response, unlike the rest of the IFN-induced molecules described so far [13]. The cell culture assays (including TLR3-blocking) imply that *RIG-I per se* could be sufficient to over-express MHC-I in DM muscle.

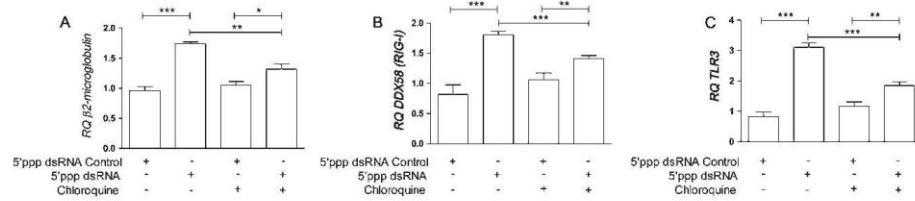
Conversely, *RIG-I* expression might be a consequence of the IFN-I environment in DM. However, the immune response could be perpetuated by the over-expression of *RIG-I*, which can recognize cellular debris containing, among other molecules, RNAs [28]. Along the same lines, it has been recently reported that endogenous ligands released from damaged cells can activate innate immunity in a mouse model of muscular dystrophy with inflammation [29]. The sustained up-regulation of *RIG-I* signalling in DM could similarly be due to the release of self-ligands for *RIG-I* from necrotic cells. A similar mechanism through TLR3 has been proposed for myasthenia gravis [30]. The possibility that *RIG-I* may play a role in perpetuating DM is further supported by the up-regulation of *DDX60*, a factor that promotes the binding of *RIG-I* to dsRNAs but is dispensable for TLR3-mediated signalling [31].

It has been suggested that RLR and TLR may exert different roles, with the RLR pathway being more significant in IFN induction in non-professional immune cells [32]. In agreement with this, we found *RIG-I* over-expression in muscle fibres – non-professional immune cells – as opposed to the TLR3 over-expression found by other authors in the professional immune cells of IM infiltrates [9]. Poly(IC)-activated TLR3 leads to MHC-I up-regulation in immature muscle precursors [17]. However, it is important to note that poly(IC) could also be recognized by *RIG-I* [26]. Therefore, some previous results could be due, at least in part, to *RIG-I* signalling. In fact, several viral recognition receptors probably work synergistically to achieve the appropriate biological antiviral effect.

We observed a significant up-regulation of *RSAD2* (viperin) in DM. This important antiviral molecule interacts with mitochondrial antiviral signalling (MAVS)



**Figure 8.** IFN $\beta$ -blocking experiments in RIG-I activated myotubes. Anti-IFN $\beta$  antibody reduces the expression of  $\beta$ -2 microglobulin mRNA (*MHC-II*) (A), *DDX58* mRNA (B) and *TLR3* mRNA (C) after 48 h of RIG-I activation (5' ppp dsRNA) in control myotubes ( $n = 3$ ). RQ, relative quantification using *GAPDH* as endogenous control and myotubes treated with the RIG-I-negative control agonist as a calibrator sample. Error bars represent SD; data shown represent one of three independent experiments; samples were analysed in triplicate: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 9.** TLR3-blocking experiments in RIG-I-activated myotubes. RIG-I induction of  $\beta$ -2 microglobulin (A), *DDX58* (*RIG-I*) (B), and *TLR3* (C) mRNAs were not abolished after TLR3 blocking with chloroquine in control myotubes ( $n = 3$ ). RQ, relative quantification using *GAPDH* as endogenous control and myotubes treated with the RIG-I-negative control agonist as a calibrator sample. Error bars represent SD; data shown represent one of three independent experiments; samples were analysed in triplicate: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

protein, a key molecule in RLR signalling [33]. This interaction reduces total cellular ATP generation and modulates mitochondrial dynamics. Mitochondrial fusion and fragmentation can thus regulate activation of the RLR pathway through MAVS [34,35]. RSAD2/viperin inhibits the replication of viruses by diverse mechanisms. For example, viperin association with ER reduces the secretion rate of soluble molecules [36]. Thus, RSAD2/viperin may be important in the ER stress previously reported in IM [37].

An antiviral state is further supported by the over-expression of the OAS gene family, activated after a virus infection and promoting dimerization of RnaseL [38]. Dimers of RnaseL break down viral RNAs in the cytoplasm. Interestingly, RnaseL can also act on self-RNA, generating short fragments that can activate RIG-I, amplifying the RLR response [20]. These mechanisms could explain the perpetuation of RIG-I over-expression in DM.

Enhanced expression of several autoantigens in regenerating myofibres has been reported both *in vivo* and *in vitro* [39]. These and other autoantibodies to intracellular molecules, among them IFIH1 (MDA5), have been related to dermatomyositis [3,40]. Interestingly enough, IFIH1 is another member of the RLR family of receptors, and is also up-regulated in our microarrays and those from previous authors. However, we could not detect expression of IFIH1 at the protein level in any of our DM patients, suggesting that RIG-I is the main effector of RLR innate immunity in these patients. The

presence of autoantibodies against intracellular antigens is used as a clinical marker and probably reflects muscle fibre injury. The up-regulation of RNA sensing-related molecules probably reflects a microenvironment rich in RNA, released by damaged fibres, that can be involved in perpetuating the innate immune response.

In conclusion, our results indicate that RIG-I (*DDX58*) plays a significant role in DM through muscle fibres acting as non-professional immune cells. This altered pathway could be a target for new therapies in this inflammatory myopathy.

#### Acknowledgements

This study was supported by a research grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS; Grant Nos Intrasalud 09/1964 and PI 13/937, principal investigator II). XSC was supported by FIS (Intrasalud Grant No. 09/1964) and by the Myositis Association. MN was supported by FIS (Intrasalud Grant No. 09/1964), LQ by Instituto de Salud Carlos III, (FIS Grant Nos CM 09/00017 and FIS JR13/00014) and GNG by Instituto de Salud Carlos III (FIS Grant No. CD10/00027). This study has been performed within the PhD Medicine programme of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). The funding institutions did not have any role in the study design, data collection or analysis. We thank Maria Angeles Artaza, Eulàlia Puigdecamet and Ricardo

Gonzalez for their technical assistance, Ferran Briansó, Josep Lluís Mosquera, Xavier de Pedro and Alex Sánchez for their statistical assistance and Carolyn Newey for editorial support.

#### Author contributions

XSC, performing experiments, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting/revising the manuscript for content and study concept or design; EG, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting/revising the manuscript for content and study concept or design; GNG and LQ, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting/revising the manuscript for content; MN, performing experiments, acquisition, analysis and interpretation of data; JDM and RRG, obtaining muscle samples, acquisition, analysis and interpretation of data, including medical writing for content; and II, drafting/revising the manuscript for content, acquisition, analysis and interpretation of data, including medical writing for content, obtaining muscle samples, study concept or design and obtaining funding.

#### References

- Engel AG, Franzini-Armstrong C. *Myology: Basic and Clinical*. McGraw-Hill Medical: New York, 2004: 1321–1486.
- Dalakas MC, Hohlfeld R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet* 2003; **362**: 971–982.
- Mammen AL. Autoimmune myopathies: autoantibodies, phenotypes and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2011; **7**: 343–354.
- Larman HB, Salajegheh M, Nazareno R, et al. Cytosolic 5'-nucleotidase IA autoimmunity in sporadic inclusion body myositis. *Ann Neurol* 2013; **73**: 408–418.
- Gallardo E, de Andres I, Illa I. Cathepsins are upregulated by IFN- $\gamma$ /STAT1 in human muscle culture: a possible active factor in dermatomyositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; **60**: 847–855.
- Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Lundberg I, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction. *Arthritis Rheum* 2005; **52**: 1824–1835.
- Nagaraju K, Raben N, Loeffler L, et al. Conditional up-regulation of MHC class I in skeletal muscle leads to self-sustaining autoimmune myositis and myositis-specific autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 9209–9214.
- Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS, et al. Interferon- $\alpha/\beta$ -mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol* 2005; **57**: 664–678.
- Cappelletti C, Baggi F, Zolezzi F, et al. Type I interferon and Toll-like receptor expression characterizes inflammatory myopathies. *Neurology* 2011; **76**: 2079–2088.
- Salajegheh M, Kong SW, Pinkus JL, et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy. *Ann Neurol* 2010; **67**: 53–63.
- Greenberg SA, Sanoudou D, Haslett JN, et al. Molecular profiles of inflammatory myopathies. *Neurology* 2002; **59**: 1170–1182.
- Higgs BW, Liu Z, White B, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis* 2011; **70**: 2029–2036.
- D'Cunha J, Knight E, Jr, Haas AL, et al. Immunoregulatory properties of ISG15, an interferon-induced cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 211–215.
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1143**: 1–20.
- Ramos HJ, Gale M Jr. RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity. *Curr Opin Virol* 2011; **1**: 167–176.
- Kim GT, Cho ML, Park YE, et al. Expression of TLR2, TLR4, and TLR9 in dermatomyositis and polymyositis. *Clin Rheumatol* 2010; **29**: 273–279.
- Tourmadre A, Lenief V, Eljaafari A, et al. Immature muscle precursors are a source of interferon- $\beta$  in myositis: role of Toll-like receptor 3 activation and contribution to HLA class I up-regulation. *Arthritis Rheum* 2012; **64**: 533–541.
- Poeck H, Bscheider M, Gross O, et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 $\beta$  production. *Nat Immunol* 2010; **11**: 63–69.
- Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal* 2012; **24**: 835–845.
- Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., et al. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 2007; **448**: 816–819.
- Dalakas MC. Pathogenesis and therapies of immune-mediated myopathies. *Autoimmun Rev* 2012; **11**: 203–206.
- Illa I, Gallardo E, Gimeno R, et al. Signal transducer and activator of transcription 1 in human muscle: implications in inflammatory myopathies. *Am J Pathol* 1997; **151**: 81–88.
- De Luna N, Gallardo E, Sonnet C, et al. Role of thrombospondin 1 in macrophage inflammation in dysferlin myopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; **69**: 643–653.
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; **314**: 994–997.
- Kuznik A, Bencina M, Svajger U, et al. Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimetabolite drugs and imidazoquinolines. *J Immunol* 2011; **186**: 4794–4804.
- de Luna N, Gallardo E, Soriano M, et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation 'in vitro'. *J Biol Chem* 2006; **281**: 17092–17098.
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; **3**: article 3.
- Loo YM GMJ. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011; **34**: 680–692.
- Uaesoontrachoon K, Cha HJ, Ampong B, et al. The effects of MyD88 deficiency on disease phenotype in dysferlin-deficient A/J mice: role of endogenous TLR ligands. *J Pathol* 2013; **231**: 199–209.
- Cufi P, Dragin N, Weiss JM, et al. Implication of double-stranded RNA signaling in the etiology of autoimmune myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2013; **73**: 281–293.
- Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, et al. DDX60, a DEXD/H box helicase, is a novel antiviral factor promoting RIG-I-like receptor-mediated signaling. *Mol Cell Biol* 2011; **31**: 3802–3819.
- Kato H, Sato S, Yoneyama M, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005; **23**: 19–28.
- Seo JY, Yaneva R, Cresswell P. Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication. *Cell Host Microbe* 2011; **10**: 534–539.
- Castanier C, Garcin D, Vazquez A, et al. Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway. *EMBO Rep* 2010; **11**: 133–138.
- Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, et al. Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci Signal* 2009; **2**: ra47.
- Hinson ER, Cresswell P. The antiviral protein, viperin, localizes to lipid droplets via its N-terminal amphipathic  $\alpha$ -helix. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 20452–20457.

37. Li CK, Knopp P, Moncrieffe H, *et al*. Overexpression of MHC class I heavy chain protein in young skeletal muscle leads to severe myositis: implications for juvenile myositis. *Am J Pathol* 2009; **175**: 1030–1040.
38. Chakrabarti A, Jha BK, Silverman RH. New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J Interferon Cytokine Res* 2011; **31**: 49–57.
39. Casciola-Rosen L, Nagaraju K, Plotz P, *et al*. Enhanced autoantigen expression in regenerating muscle cells in idiopathic inflammatory myopathy. *J Exp Med* 2005; **201**: 591–601.
40. Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S, *et al*. The RIG-I-like receptor IFIH1/MDA5 is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxford)* 2010; **49**: 433–440.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL ON THE INTERNET

The following supplementary material may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Immunoguided laser microdissection: representative MHC-I-positive perifascicular area from a DM patient before and after microdissection

**Figure S2.** IFIH1 (MDA5) is not detected in DM muscle by immunohistochemistry but is present in the sarcoplasm of human control myotubes

**Table S1.** Highest differentially up-regulated genes in dermatomyositis compared with controls, polymyositis and inclusion body myositis

#### 50 Years ago in the *Journal of Pathology*...

##### Adenomatoid changes in Bowman's capsule in primary carcinoma of the liver

F. Eulderink

##### Pyloric metaplasia in the small intestine

F. D. Lee

##### Autoradiographic evidence for the outward transport of 3H-cholesterol through rat and rabbit aortic wall

C. W. M. Adams, Olga B. Bayliss, A. N. Davison and M. Z. M. Ibrahim

##### Amyloidosis in parabiotic mice

George Williams

To view these articles, and more, please visit:

[www.thejournalofpathology.com](http://www.thejournalofpathology.com)

Click 'ALL ISSUES (1892 - 2011)', to read articles going right back to Volume 1, Issue 1.

**The Journal of Pathology**  
*Understanding Disease*



## Sustained autoimmune mechanisms in dermatomyositis

Steven A. Greenberg\*

Brigham and Women's Hospital, Department of Neurology, and Children's Hospital Informatics Program, Harvard–MIT Division of Health Sciences and Technology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

\*Correspondence to: SA Greenberg, Brigham and Women's Hospital, Department of Neurology, 75 Francis Street, Boston, MA 02115, USA. E-mail: sagreenberg@partners.org

### Abstract

Dermatomyositis is an autoimmune disease predominantly affecting skin and muscle. Its poorly understood pathogenesis is increasingly being linked to the overproduction of type 1 interferon-inducible gene transcripts and proteins. Mechanisms have been identified by which chronic sustained accumulation of these proteins might occur and thereby injure tissue in dermatomyositis.

Copyright © 2014 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

**Keywords:** dermatomyositis; type 1 interferon; innate immune system

Received 18 March 2014; Revised 20 March 2014; Accepted 21 March 2014

*Conflict of interest:* Dr Greenberg is an inventor of intellectual property owned and managed by the Brigham and Women's Hospital pertaining to dermatomyositis diagnostics, and has had sponsored research from MedImmune, LLC, and Pfizer pertaining to dermatomyositis therapeutics.

Dermatomyositis is an autoimmune disease affecting predominantly skin and muscle. It can result in subacute and chronic disabling muscle weakness, skin disease (which may be highly refractory to treatment [1] and results in low quality of life [2]) and other potential complications, such as disabling calcinosis, interstitial lung disease or cardiac involvement. The muscle tissue pathology of dermatomyositis is unique among all muscle diseases, showing a unique type of myofibre injury located at the border of muscle fascicles and perimysial connective tissue, best described as perimysial perifascicular myofibre atrophy. This border phenomenon is analogous to that seen for keratinocytes in the cell-poor interface dermatitis of dermatomyositis skin lesions [3]. Destruction of muscle capillary endothelial cells is also a feature. Although descriptions in the medical literature date back to at least 1890, the causes and precise immune mechanisms of tissue injury in dermatomyositis are unknown.

Over the last decade, translational studies of dermatomyositis blood, skin and muscle samples have converged on the identification of type 1 interferon-mediated immune mechanisms [4–9]. The human type 1 interferon family consists of 13 subtypes of IFN $\alpha$  and one subtype of each of  $-\beta$ ,  $-\epsilon$ ,  $-\kappa$  and  $-\omega$ . Type 1 interferons signal through the type 1 interferon receptor (IFNAR), resulting in the intracellular production of proteins encoded by type 1 interferon-stimulated genes (ISGs), such as myxovirus resistance gene A (MxA) and interferon-stimulated gene 15 (ISG15). These ISG protein products defend against viral infection through a variety of mechanisms, such as interfering with viral replication [10]. However, sustained overproduction

and intracellular accumulation of these proteins results in cellular toxicity [11]. Within the last decade, type III interferons have been identified that can also up-regulate these ISGs [12].

In the current issue of the *Journal of Pathology*, Suarez-Calvet *et al* [13] have strengthened the link between dermatomyositis and type 1 interferon-driven autoimmunity. First, these investigators performed large-scale gene expression microarray studies of dermatomyositis and other inflammatory myopathy muscle samples. Although studying limited numbers of tissue samples (five each from patients with dermatomyositis, polymyositis and inclusion body myositis), they found, similarly to previous such experiments, that type 1 interferon-induced genes were the highest differentially up-regulated genes in dermatomyositis muscle. These studies were performed on laser capture-dissected myofibres identified by major histocompatibility complex class I (MHC-1) staining. Such myofibres in dermatomyositis biopsy sections are typically located in the perimysial perifascicular region, and are the hallmark lesions of dermatomyositis muscle. The authors performed immunohistochemistry, examining the location of two of these type 1 interferon-induced proteins, retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) and radical S-adenosyl methionine domain-containing 2 (RSAD2; viperin), demonstrating their accumulation intracellularly in the perimysial perifascicular atrophying muscle fibres of dermatomyositis, but not in myofibres in other autoimmune muscle diseases. These dermatomyositis atrophying myofibres had been previously reported to accumulate three other type 1 interferon-induced proteins, MxA, ISG15 and interferon regulatory factor 7

(IRF7) [8], findings again specific to dermatomyositis, supporting the notion that myofibre injury in dermatomyositis is caused by intracellular production of type 1 interferon-induced proteins.

The authors next focused on *RIG-I*, previously identified as among the highest expressed genes in dermatomyositis muscle [8]. *RIG-I* is a member of the family of RIG-like receptors (RLRs) that primarily bind 5'-phosphorylated RNA and long double-stranded RNA. Activation of RIG-I or another member of this family, melanoma differentiation-associated gene 5 (*MDA5*), results in a cascade of events leading to transcription of type 1 interferons. Previous attention had been drawn to this family, given their up-regulation in dermatomyositis muscle samples, and the recognition that *MDA5* was the target of an adaptive immune response in dermatomyositis [14]. Circulating autoantibodies against *MDA5* are present in a subtype of dermatomyositis.

RIG-I and *MDA5* not only induce type 1 interferon production, but are themselves highly transcriptionally up-regulated by type 1 interferons, a mechanism that could potentially result in the sustained autoimmunity seen in dermatomyositis. The authors indeed found that cultured human myotubes produce interferon- $\beta$  (IFN $\beta$ ), but not interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), in response to RIG-I stimulation and that autocrine effects in muscle of IFN $\beta$  can further amplify the expression of type 1 interferon-inducible genes, including *RIG-I*. No differences in the magnitude of these responses were seen in cultured dermatomyositis muscle compared with normal muscle, so that no intrinsic sensitivity of this pathway in dermatomyositis muscle appeared to be present.

Taken together, the studies presented by these authors both strengthen the existing evidence for a type 1 interferon-mediated pathogenesis for dermatomyositis, and provide a conceptual framework by which this pathogenesis, through autocrine effects, could become self-sustaining. Whereas activation of the type 1 interferon system during viral infection is typically self-limited until infection is cleared, Suarez-Calvet *et al* [13] demonstrate, in cultured muscle, mechanisms by which such activation could become sustained and chronic, as appears to be the case in dermatomyositis. Indeed, the observation that IFN $\beta$  production but not IFN $\alpha$  production occurs when cultured human biopsy-derived myotubes are stimulated with RIG-I ligands is of interest, given previous studies demonstrating the correlation of IFN $\beta$ , but not IFN $\alpha$ , with

type 1 gene expression signatures in dermatomyositis blood [15] and skin [9]. Dermatomyositis may be a disease in which tissue injury is largely the result of inappropriate sustained intracellular production of type 1 interferon-inducible proteins.

## References

- Lam C, Vleugels RA. Management of cutaneous dermatomyositis. *Dermatol Ther* 2012; **25**: 112–134.
- Hundley JL, Carroll CL, Lang W *et al*. Cutaneous symptoms of dermatomyositis significantly impact patients' quality of life. *J Am Acad Dermatol* 2006; **54**: 217–220.
- Greenberg SA, Fiorentino D. Similar topology of injury to keratinocytes and myofibres in dermatomyositis skin and muscle. *Br J Dermatol* 2009; **160**: 464–465.
- Greenberg SA, Sanoudou D, Haslett JN *et al*. Molecular profiles of inflammatory myopathies. *Neurology* 2002; **59**: 1170–1182.
- Tezak Z, Hoffman EP, Lutz JL *et al*. Gene expression profiling in DQA1\*0501+ children with untreated dermatomyositis: a novel model of pathogenesis. *J Immunol* 2002; **168**: 4154–4163.
- Greenberg SA, Pinkus JL, Pinkus GS *et al*. Interferon- $\alpha/\beta$ -mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann Neurol* 2005; **57**: 664–678.
- Walsh RJ, Kong SW, Yao Y *et al*. Type I interferon-inducible gene expression in blood is present and reflects disease activity in dermatomyositis and polymyositis. *Arthr Rheum* 2007; **56**: 3784–3792.
- Salajegheh M, Kong SK, Pinkus JL *et al*. Interferon-stimulated gene 15 (*ISG15*) conjugates proteins in dermatomyositis muscle with perifascicular atrophy. *Ann Neurol* 2010; **67**: 53–63.
- Wong D, Kea B, Pesich R *et al*. Interferon and biologic signatures in dermatomyositis skin: specificity and heterogeneity across diseases. *PLoS One* 2012; **7**: e29161.
- Haller O, Kochs G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J Interferon Cytokine Res* 2011; **31**: 79–87.
- Knight E, Jr. Antiviral and cell growth inhibitory activities reside in the same glycoprotein of human fibroblast interferon. *Nature* 1976; **262**: 302–303.
- Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W *et al*. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003; **4**: 63–68.
- Suárez-Calvet X, Gallardo E, Nogales-Gadea G, *et al*. Altered RIG-I/DDX58-mediated innate immunity in dermatomyositis. *J Pathol* 2014; **233**: 258–268.
- Nakashima R, Imura Y, Kobayashi S *et al*. The RIG-I-like receptor IFIH1/*MDA5* is a dermatomyositis-specific autoantigen identified by the anti-CADM-140 antibody. *Rheumatology (Oxf)* 2010; **49**: 433–440.
- Liao AP, Salajegheh M, Nazareno R *et al*. Interferon- $\beta$  is associated with type 1 interferon-inducible gene expression in dermatomyositis. *Ann Rheum Dis* 2011; **70**: 831–6.