



Revisión

Artículo español

Bases genéticas y moleculares del Síndrome de Aicardi-Goutières (AGS)

Genetic and molecular bases of Aicardi-Goutières Syndrome (AGS)

Blanca Lago Solís

Graduada en Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

Resumen

Objetivo: El objeto de este trabajo se basó en demostrar la relación existente entre mutaciones en cualquiera de las subunidades que conforman el complejo RNasaH2 y la sintomatología que mostraban los pacientes afectados con AGS como consecuencia de dicha mutación, debido al fallo en el metabolismo de los ácidos nucleicos que implicaba.

Método: Con este objetivo, serán tomados como referencia una serie de experimentos que usaban como muestras diferentes cepas de levadura, líneas celulares de fibroblastos de ratones con mutaciones en el complejo RNasaH2 ortólogas a las encontradas en células de pacientes con AGS y linfoblastos pertenecientes a estos pacientes. También usaron técnicas como la medida de la pérdida de heterocigosidad (LOH), PCR, el aislamiento de RNA y una sucesiva RT-PCR, siRNA y CRISP/cas9 así como el análisis estadístico de Mann-Whitney y el método de la mediana.

Resultado: A partir de estos experimentos se puede corroborar que debido a una disminución en la actividad específica de reparación por escisión de ribonucleótidos llevada a cabo por el complejo RNasaH2, se produce una acumulación de especies aberrantes de ácidos nucleicos que da lugar a una respuesta autoinmune posiblemente desencadenada por la vía cGAS-STING con la consecuente liberación de INF- α .

Conclusiones: La liberación de INF- α probablemente sea la causa de la sintomatología asociada a este síndrome, tanto a nivel de daños vasculares como neurológicos aunque aún existe cierta incertidumbre en esta afirmación, ya que otros factores también podrían estar implicados.

Palabras clave

Síndrome de Aicardi-Goutières; Interferon- α ; RNasaH2; autoinmunidad; vía cGAS-STING; Reparación por escisión de ribonucleótidos; citoquinas pro-inflamatorias

Abstract

Objective: The purpose of this work was to demonstrate the connection between the mutations in any of the RNaseH2 complex's subunits and the symptoms that showed the patients affected with AGS due to the role that RNaseH2 has in nucleic acid metabolism.

Method: it refers to some experiments that the samples consisted of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells, lymphoblastoid cell line from an AGS patient and fibroblast cell line from mice with orthologous mutations in the RNaseH2 complex to those found in cells of

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: blalagsol@gmail.com (Blanca Lago Solís).

Recibido el 21 de julio de 2017; aceptado el 10 de agosto de 2017.



patients with AGS. They also used techniques such as measurement of loss of heterozygosity (LOH), PCR, RNA isolation and a successive RT-PCR, siRNA and CRISP / cas9 as well as Mann-Whitney statistical analysis and median method.

Results: From these experiments it can be corroborated that due to a decrease in the specific activity of ribonucleotide excision repair, there is an accumulation of unusual species of nucleic acids that results in an autoimmune response possibly triggered by the cGAS-STING pathway with the consequent release of INF- α .

Conclusions: The release of INF- α is probably the cause of the symptoms associated with this syndrome, both in vascular and neurological damage, although there is some uncertainty in this statement, because other factors could also be involved.

Keywords

Aicardi-Goutières Syndrome; Interferon- α ; RNaseH2; cGAS-STING; Autoimmunity; proinflammatory cytokine; ribonucleotide excision repair

Abreviaturas

5-FOA: 5-Fluoroorotic acid

ADAR1: Adenosin desaminasa de RNA.

AGS: Aicardi-Goutières Syndrome

CCL5: Chemokine (C-C motif) ligand 5 (quimioquina)

cGAMP: cyclic GMP-AMP

cGAS: cyclic-GMP-AMP Synthase

CXCL10: chemokine (C-X-C motif) ligand 10

DMEM: [Dulbecco's](#) modified Eagle's medium

IFIT1 y 3: Interferon Induced Protein 1 y 3 respectivamente

IFIH1: Interferon Induced Helicase C Domain 1

IL-1 β , IL-8: interleuquina 1 β y 8 respectivamente.

INF- α : interferon alfa.

IRF3: Interferon regulatory factor 3

ISG: Interferon-Stimulated Genes

LB: Linfocitos B

LOH: Loss Of Heterozygosity

LT: Linfocitos T

Medio YPD: Yeast Extract-Peptide-Dextrose

MEFs: Mouse Embryonic Fibroblasts

PCR: Polymerase Chain Reaction

PRRs: Pattern recognition receptors

RNASEH2 (A, B, C): Ribonucleasa H2 compuesta por 3 subunidades: A, B y C

RNA-seq: RNA sequencing

rNMP: ribonucleótido monofosfato.

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

SAMHD1: SAM and HD Domain Containing Deoxynucleoside Triphosphate Triphosphohydrolase1

siRNA: small interfering RNA

STING: Stimulator of Interferon Genes

TBK1: Serine/threonine-protein kinase 1

TLR9: Toll-like receptor 9

TREX1: Three Prime Repair Exonuclease 1

Aportaciones a la literatura científica

La aportación principal se basa en remarcar la importancia de este síndrome como modelo de estudio de otras enfermedades autoinmunes, así como otra posible perspectiva de enfoque en el abordaje de las mismas, hecho de gran relevancia debido a la actual tendencia a un aumento de la frecuencia de aparición de estas patologías.

Introducción

El Síndrome de Aicardi-Goutières fue descrito por primera vez en 1984 por los neurólogos Jean Aicardi y François Goutières^(1, 2). Se trata de una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por encefalopatía prematura con calcificación de los ganglios basales, atrofia de la sustancia blanca, niveles elevados de INF- α en el líquido cefalorraquídeo y plasma así como leucocitosis en el líquido cefalorraquídeo, acompañado de retraso psicomotor y cognitivo y lesiones cutáneas^(1, 3). Parece que es causada por una respuesta autoinmune consecuencia directa de un déficit en el metabolismo de determinadas especies de ácidos nucleicos provocado por mutaciones en los genes de las enzimas que intervienen en dicho metabolismo⁽⁴⁻⁶⁾. Es un trastorno monogénico pero genéticamente muy heterogéneo, de tal manera que se han identificado hasta 7 genes cuyas mutaciones pueden conllevar a dicho síndrome: TREX1, el complejo RNAsaH2 (conformado por las subunidades RNAsaH2B, RNAsaH2C, RNAsaH2A, codificadas por 3 genes diversos) SAMHD1, ADAR1, IFIH1^(4, 7). Mutaciones en estas 4 enzimas y en el receptor (IFIH1) conllevan una activación del sistema inmune innato mediada por la liberación de INF- α que da lugar a la autoinmunidad que provoca la sintomatología asociada al síndrome^(4, 6-8). Esta revisión, se centrará principalmente en la enzima RNAsaH2 y en como mutaciones hipomorfas (no se han identificado pacientes donde la mutación conlleve una pérdida completa de función) en cualquiera de las subunidades de la misma son las asociadas a casi el 50% de los casos de este síndrome^(9, 10).

El complejo RNAsaH2 Es una ribonucleasa H2 encargada de la degradación del RNA de híbridos DNA-RNA que se generan por inserción errónea y aleatoria de ribonucleótidos en la doble hélice de DNA durante el proceso replicativo (Proceso de reparación por escisión de ribonucleótidos o RER) de la misma⁽⁴⁾ así como el caso de híbridos RNA-DNA generado en los fragmentos de Okazaki⁽³⁾ y en los bucles R (R-loops), mecanismo que comparte con la RNAsaH1. Esta enzima está formada por 3 subunidades siendo la subunidad catalítica RNAsaH2A, mientras las otras dos subunidades (RNAsaH2B y RNAsaH2C) no tienen un papel propiamente catalítico pero se requieren para que la enzima realice dicha función⁽⁶⁾.

Mutaciones hipomorfas y de herencia recesiva en cualquiera de las subunidades de este complejo se han podido asociar con la patogénesis de AGS⁽⁸⁻¹⁰⁾. dado el hecho de que la mayor parte de los casos de AGS son producidos por mutaciones en el gen que codifica para esta enzima y que este síndrome es caracterizado por su fenotipo inflamatorio (manifestado en el biomarcador de diagnóstico ISG, genes estimulados por interferón, presente en todos los pacientes con AGS) derivado de una respuesta autoinmune, partimos de la hipótesis de que mutaciones hipomorfas en RNAsaH2 tienen como consecuencia la liberación de INF- α que provoca la manifestación de un fenotipo inflamatorio^(4, 8, 11). Además, como la función de resolución de bucles R-loops y rNMPs en tándem la comparte con RNAsaH1, a dicha hipótesis incorporamos la premisa de que la actividad que se ve atenuada ante la mutación asociada a AGS es la de reparación por escisión de ribonucleótidos que la polimerasa incorpora durante la replicación⁽¹⁰⁾.

Con el fin de corroborar este modelo, serán tomados como referencia una serie de experimentos: El experimento de D.A.Cornelio *et al.*⁽¹⁰⁾ para demostrar que la RNAsaH2 comparte funciones con la RNAsaH1 pero tiene como función específica la RER y en los experimentos de Mackenzie, K. J. *et al.*⁽⁸⁾ y Pokatayev, V. *et al.*⁽¹¹⁾ para corroborar que un

déficit en su función específica RER da lugar a la activación del sistema inmune innato por la vía cGAS-STING produciendo como consecuencia el fenotipo inflamatorio asociado a AGS^(4, 8). La relevancia de los experimentos tomados como referencia y de ahí el hecho de que hayan sido seleccionados se remonta tanto a su carácter vigente, su especificidad en el estudio de mutaciones en el complejo RNasaH2 que dan como consecuencia el cuadro clínico de AGS así como su enfoque principal en la actividad RER de este complejo, actividad que no comparte con otras RNasaH y que en estos experimentos queda demostrada su posible relación directa con la respuesta autoinmune que causa el síndrome. Otro criterio por el que han sido incluido estos experimentos, es por el carácter sintético y simplificado que presentan, hecho que permite entender sin mucha dificultad, esta compleja enfermedad genética.

Métodos

Instrumentos

Cepas de levadura

D.A.Cornelio *et al.*⁽¹⁰⁾ Utilizaron cepas de levaduras (Tabla 1) que habían sido cultivadas en un medio YPD convencional a 30°C. En este caso, el alelo *rnh201-RED* fue introducido en el locus de *RNH201* del Wild Type mediante un vector pRS306, usando para ello una estrategia de reemplazo de alelos. El gen codificante para la RNasaH1 fue deletado mediante la integración de un cassette de resistencia a la kanamicina en una cepa JAY1161 por el método de ligación mediado por PCR⁽¹⁰⁾.

Tabla 1. Resumen de los genotipos de las cepas de levadura empleadas por D.A. Cornelio *et al.*⁽¹⁰⁾

Mutación	Fenotipo
RNH201	WT
RNH201 <i>rnh1Δ</i>	Cepa con delección del gen que codifica para RNasaH1, solo tiene la actividad de RNasaH2.
<i>rnh201Δ</i>	Cepa con delección del gen que codifica para RNasaH2, solo tiene actividad RNasaH1
<i>rnh201Δ rnh1Δ</i>	Cepa doble mutante con delección de los genes que codifican para ambas RNasaH
<i>rnh201-RED</i>	Cepa sin actividad específica de la RNasaH2: reparación por escisión de ribonucleótidos (RER) pero manteniendo las otras.
<i>rnh201-RED rnh1Δ</i>	Cepa doble mutante con delección en el gen que codifica para RNasaH1 y con una RNasaH2 sin actividad RER.

RER: reparación por escisión de ribonucleótidos.

RNasaH1: ribonucleasa H1

RNasaH2: ribonucleasa H2

Fibroblastos de ratón con mutación RNasa2b^{A174T/A174T} y linfoblastos de pacientes AGS

Mackenzie, K. J. *et al.*⁽⁸⁾ utilizaron 4 líneas celulares diferentes: fibroblastos de ratón (MEFs) con una RNasa2b^{A174T/A174T} que es la mutación ortóloga a la más común presente en la RNasa2B de pacientes con AGS (RNasa2b^{A177T/A177T}), linfoblastos de pacientes con AGS y que por lo tanto tendrán una RNasa2b^{A177T/A177T}, Fibroblastos

WT de ratón y linfoblastos de personas sanas, estos dos últimos serán usados de control. MEFs RNasaH2b^{A174T/A174T} los obtuvieron de embriones de ratón de 13,5 días que presentaba dicha mutación y los cultivaron en medios de cultivo DMEM con 50U/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomina, a 37°C y con concentraciones de CO₂ y O₂ de 5 y 3% respectivamente. Los fibroblastos control también los extrajeron de embriones de 13,5 días pero en este caso WT y se cultivaron bajo las mismas condiciones⁽⁸⁾.

Cepas de ratones RNasaH2^{A174T/A174T}

Mackenzie, K. J. *et al.*⁽⁸⁾ crearon las cepas de ratones RNasaH2^{A174T/A174T} por mutagénesis dirigida al sitio, incorporando una mutación puntual c529G>A en el exón 7 de la RNasaH2B de células madres de ratón a las que previamente se les había introducido también un cassette de resistencia a la neomicina. Esto les permitía su purificación. Mediante PCR y Southern blotting localizaron las células clones de interés y por secuenciación capilar se aseguraron de que la mutación había sido introducida. Este clon de células madres se lo inyectaron al blastocito de un ratón de laboratorio normal (C57BL/6J) y así generaron ratones machos quimera para la mutación (RNasaH2b^{A174T/+}) que cruzarían con hembras normales (C57BL/6J) generando ratones heterocigotos para la mutación, a partir de los cuales y mediante sucesivos cruces obtendrían el individuo homocigoto. Estos individuos y los ratones control: RNasaH2B^{+/+} (que procedían de la misma fuente que los parentales de los que fueron generados los mutantes), crecieron en la misma jaula y en las mismas condiciones⁽⁸⁾.

Fibroblastos de ratones con mutación en RNasaH2^{G37S/G37S}

Pokatayev, V. *et al.*⁽¹¹⁾ emplearon fibroblastos de ratones con una mutación RNasaH2a^{G37S/G37S}, fibroblastos WT y fibroblastos RNasaH2^{G37S/+}. Esta mutación es la presente en la RNasaH2A de las células de pacientes AGS. Estas células las extrajeron de ratones que presentaban una RNasaH2 a la que se le habían introducido dicha mutación puntual. Todos estos fibroblastos los aislaron de embriones de ratones de 13,5 días y los mantuvieron en un medio completo DMEM al que se le ha añadido 100 U/ml de penicilina y 100mg/ml de estreptomina, siendo la temperatura 37°C⁽¹¹⁾.

Metodología

Ensayo de pérdida de heterocigosidad (LOH) y análisis estadístico

D.A.Cornelio *et al.*⁽¹⁰⁾, Para observar la pérdida de heterocigosidad en las cepas de levadura comentadas anteriormente, introducirían en dichas cepas un cassette contra-seleccionable a URA3 cerca del extremo derecho del cromosoma 7 (Chr7), de tal manera que la pérdida de este cassette por mutación podía ser seleccionado por el hecho de que las cepas mostraban resistencia al ácido 5-fluoroorotico (5-FOA) ya que no tendrían la enzima codificada por URA3 (orotidina 5-fosfato descarboxilasa) que convertiría 5-FOA en un compuesto tóxico para las células^(10, 12).

A su vez, D.A.Cornelio *et al.*⁽¹⁰⁾, emplearían el método de la mediana para determinar las tasas de recombinación con un 95% de intervalo de confianza⁽¹⁰⁾.

La prueba paramétrica de Mann-Whitney les permitiría llevar a cabo la comparación entre pares de tasas de LOH pudiendo así determinar si la diferencia entre dichos pares resultaba o no significativa. El software con el que llevaron a cabo esta prueba era GraphPad Prism⁽¹⁰⁾.

siRNA

Mackenzie, K. J. *et al.* ⁽⁸⁾ realizaron una siRNA knock-down para llevar a cabo la depleción de cGAS y STING y así analizar la concentración de CCL5 y CXCL10 en su ausencia ⁽⁸⁾.

CRISP/Cas9

Mackenzie, K. J. *et al.* ⁽⁸⁾ editaron el genoma por CRISP/Cas9, lo que les permitió la eliminación del gen cGAS de fibroblastos RNasaH2^{-/-}⁽⁸⁾.

Aislamiento de RNA y RT-PCR

Pokatayev, V. *et al.* ⁽¹¹⁾ llevaron a cabo un aislamiento de RNA y RT-PCR para amplificarlo. El aislamiento de RNA lo llevaron a cabo mediante el uso del reactivo TRI y a partir de él sintetizaron cDNA con el kit iScript. A continuación procedieron a la realización de la PCR ⁽¹¹⁾.

Resultados

RNasaH2 en la ruta RER y redundancia con RNasaH1

Para demostrar que la RNasaH1 y la RNasaH2 presentaban redundancia funcional en cuanto a la eliminación de R-loops y rNMPs en tándem ^(10, 13) usados como primer en la replicación, y que además la RNasaH2 presentaba una función específica adicional de reparación de escisión de ribonucleótidos (RER), que no compartía con la RNasaH1 se tomará como referencia el experimento que llevaron a cabo D.A.Cornelio *et al.* ⁽¹⁰⁾. Basándose en que mutaciones en ambas RNasaH supondrían una disminución de sus funciones y por lo tanto una acumulación de daños en el DNA relacionados con los R-loops, rNMPs y RER ^(9-11, 13), lo que tendría como consecuencia una disminución de la integridad cromosómica ^(8-10,13), midieron este hecho en tasa de pérdida de heterocigosidad (LOH) para 12 cepas diferentes, todas ellas con una polimerasa II que introducía ribonucleótidos durante la replicación de forma basal ⁽¹⁰⁾, 6 de las cuales (correspondientes con la columna de la izquierda de la figura 1) presentaban una RNasaH1 con una función normal mientras que otras de las 6 cepas (correspondientes con la columna de la derecha de la figura 1) tenían deletado el gen que codificaba para dicha enzima, y por lo tanto carecían de esta RNasa H1. Los resultados que obtuvieron fueron (Figura 1) que la cepa mutante simple *rnh201Δ* con una RNasaH1 normal y una DNA polimerasa que introducía rNMPs de forma basal, presentaba una tasa de LOH 5 veces superior a la del WT (Figura 1, columna izquierda) pero que dicha tasa se hacía aún superior (12 veces con respecto al WT) en la cepa doble mutante *rnh201Δ rnh1Δ* ⁽¹⁰⁾ (Gráfica 1, columna derecha). Por otra parte, la tasa de LOH continuaba siendo la misma en el WT que en el mutante simple *rnh1Δ* ⁽¹⁰⁾. En el caso de la cepa mutante simple *rnh201-RED*, presentaba una tasa de LOH 3 veces superior con respecto a la del WT y se mantenía en el doble mutante *rnh201-RED rnh1Δ* ⁽¹⁰⁾. Otro dato relevante que se puede observar en la figura 1 es que la cepa en la que la topoisomerasa 1 (Δ *top1*) ha sido deletada así como el gen codificante de la RNasaH1, *rnh201Δ* deja de ser viable puesto que carecería por completo de la capacidad para eliminar tanto rNMPs insertados en el DNA como DNA:RNA y primers dando lugar a una gran inestabilidad genómica. A partir de estos datos, podemos concluir que RNasaH1 y RNasaH2 comparten la actividad de eliminar híbridos DNA:RNA y primers pero que RNasaH2 tiene una actividad adicional que no comparte con RNasaH1 y que la pérdida de la misma influye también la estabilidad cromosómica.

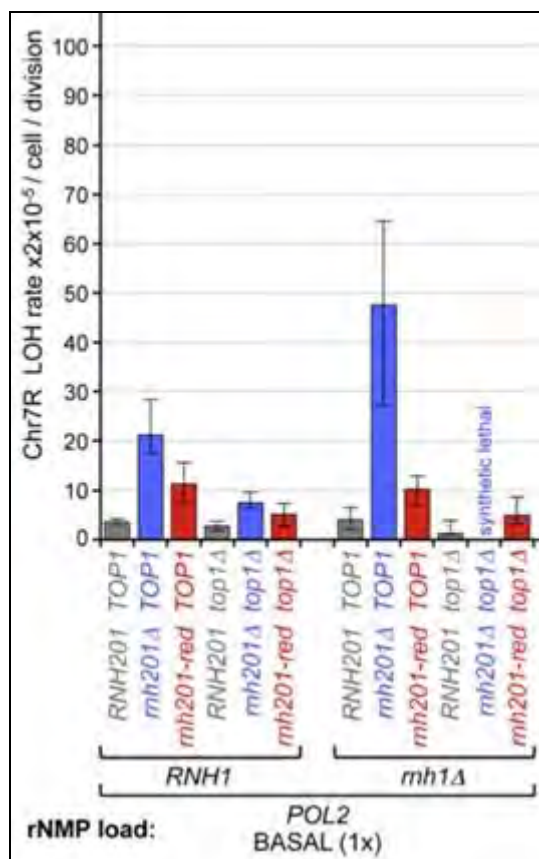


Figura 1. Medida de la tasa de pérdida de heterocigosidad (LOH) en diferentes cepas de levadura. Figura tomada de D.A.Cornelio *et al.* (10)

Acumulación de determinadas especies de ácidos nucleicos

El segundo experimento que se tomará como referencia, fue realizado por Mackenzie, K. J. *et al.* Mackenzie, K. J. *et al.* (8) y el interés del mismo radica en que permite demostrar que los individuos con AGS presentan mayor cantidad de rNMPs en el genoma celular que los individuos sanos. En este experimento (8) emplearon 4 líneas celulares diferentes: Fibroblastos de ratón con RNasaH2b^{A174T/A174T}, linfoblastos de pacientes de AGS con RNasaH2b^{A177T/A177T}, fibroblastos de ratón WT y linfoblastos de individuos sanos (8). En los dos casos mutantes, la actividad de la RNasaH2 se encuentra reducida (8, 14, 15) y al medir el porcentaje de sustratos convertidos en estos mutantes y compararlo con los WT obtuvieron los resultados observables en la figura 2: En fibroblastos de ratón (Figura 2 derecha) con RNasaH2b^{A174T/A174T} la cantidad de RNA: DNA eliminado era un 60% inferior a la presentada en el WT y lo mismo ocurría para la cantidad de rNMPs escindidos (8). En el caso de los linfoblastos con RNasaH2b^{A177T/A177T} (Figura 2 izquierda) se observaba una disminución de la actividad de la RNasaH2b de casi un 50%, lo que suponía que eran resueltos la mitad de híbridos DNA:RNA de los que eran resueltos en el WT (muestras pertenecientes a dos individuos sanos diferentes que se corresponden con control 1 y control 2 en la figura 2) y lo mismo ocurría con los rNMPs (8).

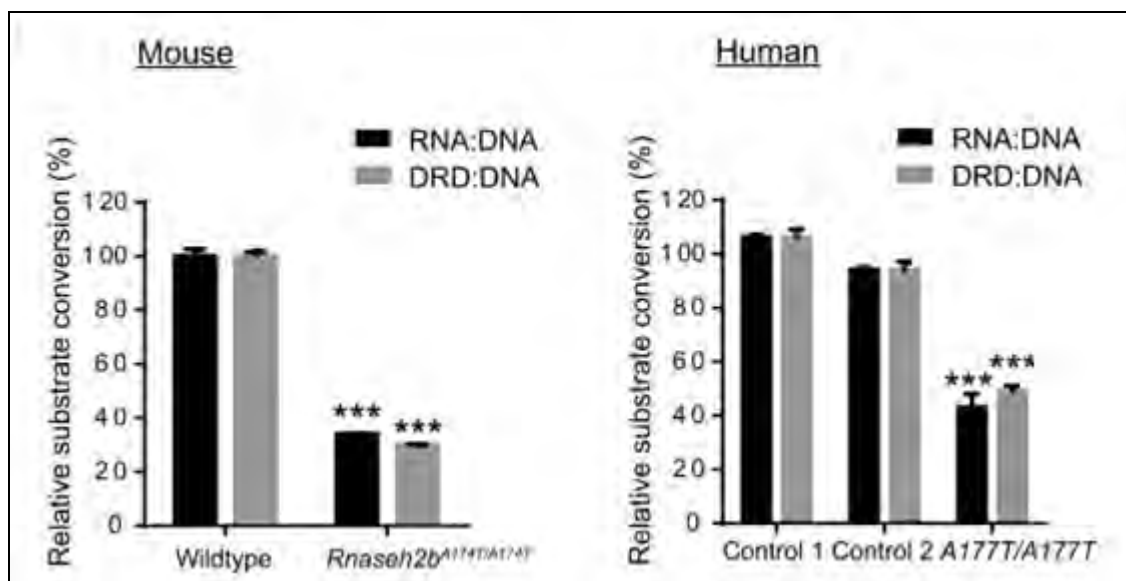


Figura 2. Medida de la actividad de la RNasaH2 en la eliminación de híbridos RNA:DNA y de su actividad de reparación por escisión de ribonucleótidos (DRD:DNA). Figura tomada de Mackenzie, K. J. *et al.* ⁽⁸⁾.

Sobreexpresión de ISG, principal marcador para la diagnosis de pacientes con AGS, en mutantes de RNasaH2

Corroborada por lo tanto la hipótesis de que RNasaH2 tiene una actividad específica cuyo déficit da lugar a la inestabilidad genómica y a la acumulación de especies de ácidos nucleicos ^(9-11, 16), a continuación se hará referencia a un tercer experimento llevado a cabo por Pokatayev, V. *et al.* ⁽¹¹⁾ con el objetivo de mostrar la asociación de la mutación hipomorfa de RNasaH2A con el fenotipo inflamatorio que caracteriza a la enfermedad y que se manifiesta en una sobreexpresión de ISG, relacionando así la disminución de función de este complejo enzimático con AGS ^(4, 8, 11, 17). En este experimento, Pokatayev, V. *et al.* ⁽¹¹⁾ emplearon cepas de ratones que presentaban la misma mutación que en pacientes humanos con AGS asociado a mutaciones en RNasaH2A: G37S ^(11, 14, 17). Observaron que estos ratones en homocigosis sufrían una muerte perinatal aunque en heterocigosis eran viables ⁽²¹⁾. Cuando los embriones de ratones RNasaH2a^{G37S/G37S} eran sometidos a resonancias magnéticas, no mostraban ninguna anomalía a nivel neurológico, contrariamente a lo que sucede en los pacientes con AGS en los que las anomalías cerebrales son la principal característica, aunque este fenotipo diferencial en ratones con respecto humanos también tiene lugar en TREX1^{-/-} y SAMHD1^{-/-} por lo que se piensa que podría deberse a que la enfermedad tiene una manifestación diversa en ratones con respecto a humanos ^(4, 8, 9, 11, 18). Posteriormente procedieron a analizar mediante un análisis RNA-seq el patrón de expresión que presentaban los ISG en fibroblastos de estos embriones RNasaH2a^{G37S/G37S} y compararlo con los patrones de expresión mostrados por el WT y heterocigotos RNasaH2a^{G37S/+} ²¹. Los resultados que obtuvieron les mostraron que los fibroblastos homocigotos para la mutación presentaban 388 genes con un patrón de expresión 2 o más veces superior al que mostraban el WT y el heterocigoto y que la mayoría de estos genes estaban involucrados en la estimulación de la respuesta inmune ⁽²¹⁾. No solo esto, mediante una RT-PCR además pudieron corroborar que la mayoría de estos genes estaban estimulados por INF (eran ISG), encontrándose entre ellos CXCL10, Ifit1 e Ifit3, que codifican para citoquinas pro-inflamatorias ^(8, 9, 11).(Figura 3)

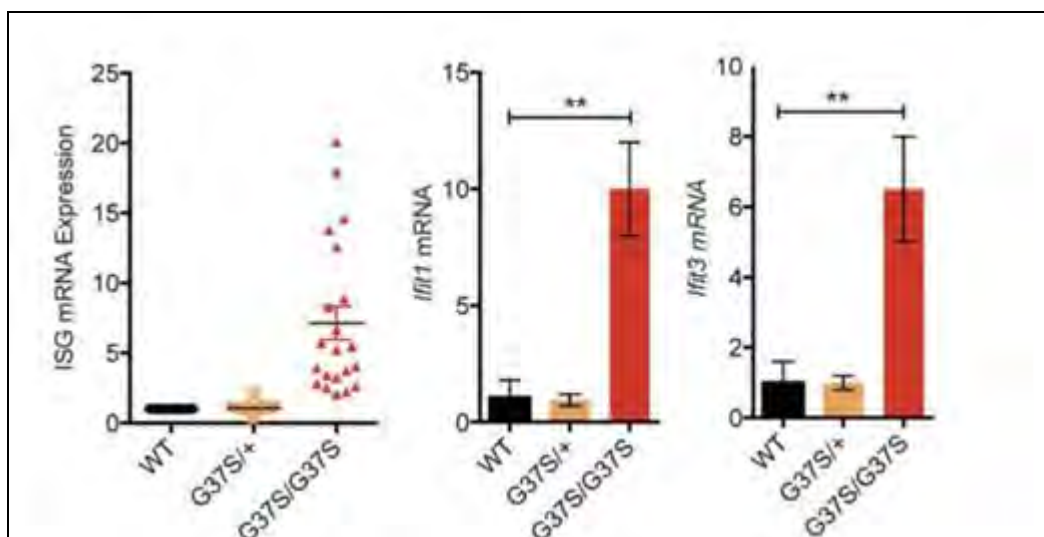


Figura 3. Medida de la expresión de ISG (genes estimulados por interferón) y en concreto de ifi1 e ifi3. Figura tomada de Pokatayev, V. *et al.* ⁽¹¹⁾

La autoinmunidad en pacientes con AGS con mutaciones en RNasaH2 está asociada a cGAS-STING

La vía cGAS-STING junto con el receptor TL9 y la vía del inflasoma son los tres mecanismos celulares principales implicados en la detección de ácidos nucleicos en el citosol ^(4,8,11). Este sistema de detección está encaminado a la estimulación de la respuesta inmune innata ante la infección de un microorganismo, dado que de forma natural, las especies de ácidos nucleicos que reconocen no se encuentran en el citoplasma celular o se encuentran en concentraciones menores ^(4, 8, 11, 16). Sin embargo, un déficit funcional en la RNasaH2 puede conllevar la acumulación de DNA: RNA en el citoplasma así como de DNA con rNMPs incorporados provocando la activación de alguna de estas vías ^(4, 8, 11, 13). Mackenzie, K. J. *et al.* ⁽⁸⁾ sospecharon que la vía implicada en este caso sería la de cGAS-STING dada la ausencia de las citoquinas IL-1 β y IL-8 que son las mediadoras de la respuesta del inflasoma y el déficit en el procesamiento del receptor TL9 que presentaban los fibroblastos RNasaH2b^{A174T/A174T} de ratones estudiados ⁽⁸⁾. Para comprobar esta sospecha Mackenzie, K. J. *et al.* ⁽⁸⁾ llevaron a cabo dos depleciones empleando siRNA. Una de las moléculas de las que disminuyeron la concentración fue cGAS y supuso la disminución de la respuesta ISG y de la producción de CCL5 e IFIT1 (una de las proteínas producto de estos genes) ⁽⁸⁾. La otra depleción fue para STING dando lugar a los mismos resultados que para cGAS (Figura 4A).

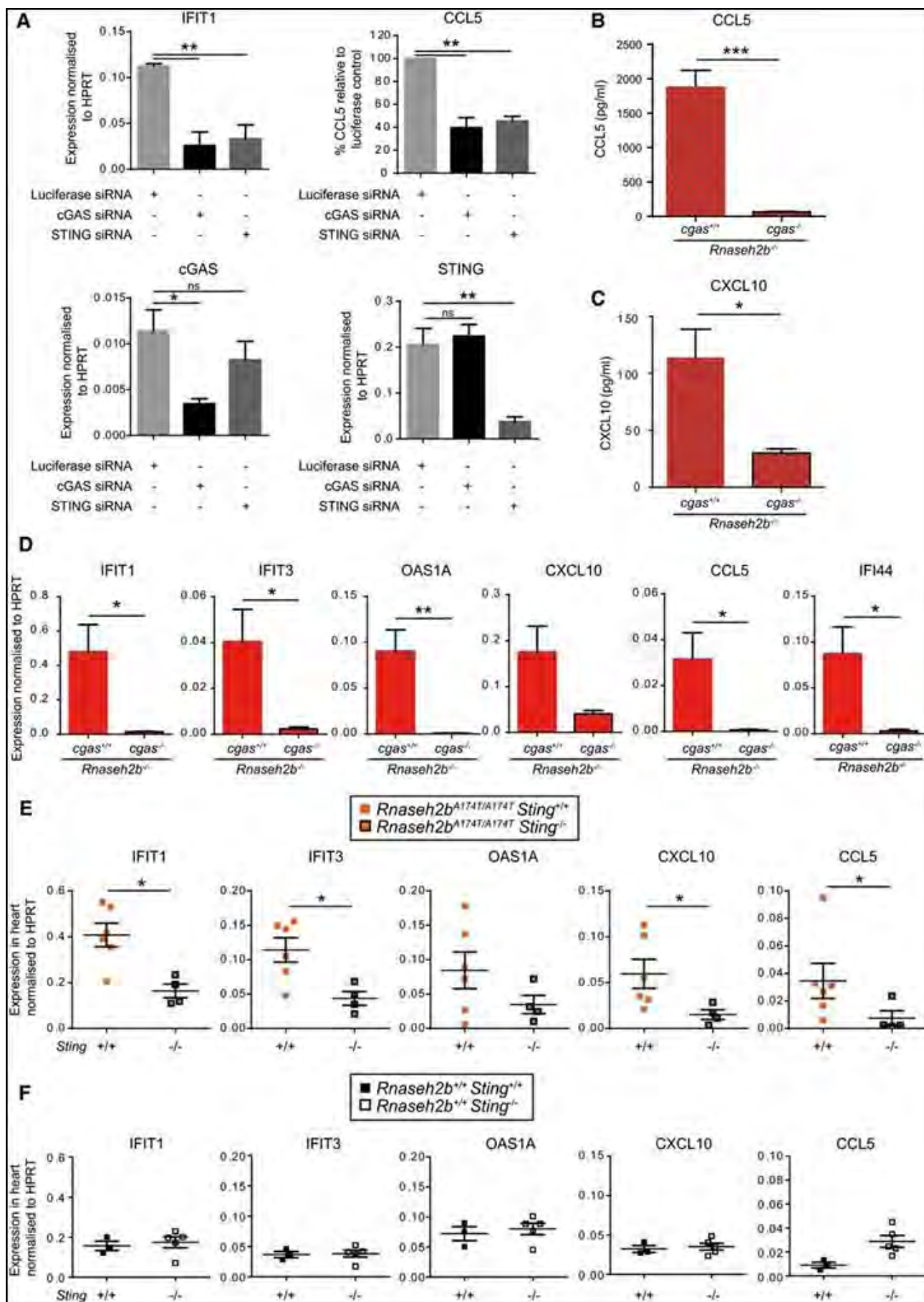


Figura 1. Medida de la expresión de ISG y citoquinas en fibroblastos de ratón *RNaseH2^{-/-}* en cepas donde se lleva a cabo la depleción de cGAS y STING. Figura tomada de Mackenzie, K. J. *et al.* ⁽⁸⁾

Además, los resultados que obtuvieron en un experimento en el que usaban el sistema CRISPR/cas9 reforzaron esta hipótesis⁽⁸⁾ (Figura 4B). En este experimento, eliminaron el gen codificante para cGAS mediante este sistema en un fibroblasto RNasaH2b^{-/-} y compararon la expresión de ISG de estos fibroblastos con otros RNasaH2b^{-/-} cGAS^{+/+}. Los resultados que obtuvieron fueron que los fibroblastos RNasaH2b cGAS^{+/+} presentaban una sobreexpresión de ISG, cosa que no ocurría en el doble mutante donde el gen codificante para cGAS había sido eliminado⁽⁸⁾. Así mismo, también cruzaron entre sí cepas de ratón RNasaH2b^{A174T/A174T} con ratones STING^{-/-} obteniendo un doble mutante RNasaH2b^{A174T/A174T} STING^{-/-}⁸. A continuación, compararon los niveles de expresión de ISG que presentaban las células del tejido cardíaco de estos individuos con los niveles de expresión de ISG que mostraban las de los individuos control: RNasaH2b^{A174T/A174T} STING^{+/+} (Control A), RNasaH2b^{+/+} STING^{-/-} (Control B) y RNasaH2b^{+/+} STING^{+/+} (Control C).

Los resultados obtenidos fueron que los niveles de expresión de ISG que presentaba el individuo doble mutante eran significativamente menores que los presentes en el control A mientras que no había diferencia perceptible si se comparaba con los otros dos controles que presentaban una función normal para la RNasaH2b⁸ (Figura 4C). Se concluye así que el responsable de la activación de la respuesta inmune innata como consecuencia del reconocimiento del sustrato de RNasaH2 en células con déficit de función de dicha enzima, es la vía cGAS-STING^(4,8).

Un déficit en la función RER de RNasaH2 es el desencadenante de la vía cGAS-STING

Una vez determinada la supuesta vía que activa la autoinmunidad en pacientes de AGS como consecuencia de mutaciones en RNasaH2, surge la duda acerca del sustrato de RNasaH2 que es reconocido por cGAS y que activa esta vía dando lugar a la inducción de ISG. Entre estos sustratos recordemos que se encontraban los híbridos de DNA:RNA y el DNA con ribonucleótidos incorporados. cGAS es un sensor citoplásmico que es activado tanto por dsDNA como por híbridos DNA:RNA (al fin y al cabo un dúplex con rNMP incorporados supone una especie de híbrido DNA:RNA) y que por lo tanto tiene la capacidad de reconocer los dos sustratos de RNasaH2 que se acumularían ante un déficit de función de la enzima^(4, 8-11, 13). Con el fin de vislumbrar que actividad mermada es la que evita la inducción de la vía cGAS-STING, se tomará como referencia el experimento realizado por Mackenzie, K. J. *et al.*⁽⁸⁾, en el cual y con el mismo objetivo, llevan a cabo pruebas de complementación⁽⁸⁾. En dichas pruebas, a células RNasaH2b^{-/-} se les induce una sobreexpresión de RNasaH1, los resultados obtenidos fueron la restauración en un 81% ($\pm 10\%$) de la actividad enzimática de resolución de los híbridos DNA:RNA (Figura 5A), aunque la actividad RER permanecía ausente (Figura 5B). La otra prueba de complementación que se realizó fue la de añadir a las células RNasaH2b^{-/-} una RNasaH2b que funcionaba correctamente⁽⁸⁾ (Figuras 5 A y B). El resultado obtenido fue la restauración completa del fenotipo WT, lo que se tradujo en una disminución de CCL5 y CXCL10 en estas células, igualándose a las concentraciones presentes en las células WT)⁽⁸⁾ (Figura 5 C-D). Se concluye por lo tanto que la inducción de ISG está mediada por el déficit de la función RER de la RNasaH2 y que por lo tanto, los sustratos acumulados que son reconocidos por cGAS en consecuencia de esta alteración, son dúplex de DNA con rNMPs incorporados^(8, 11).

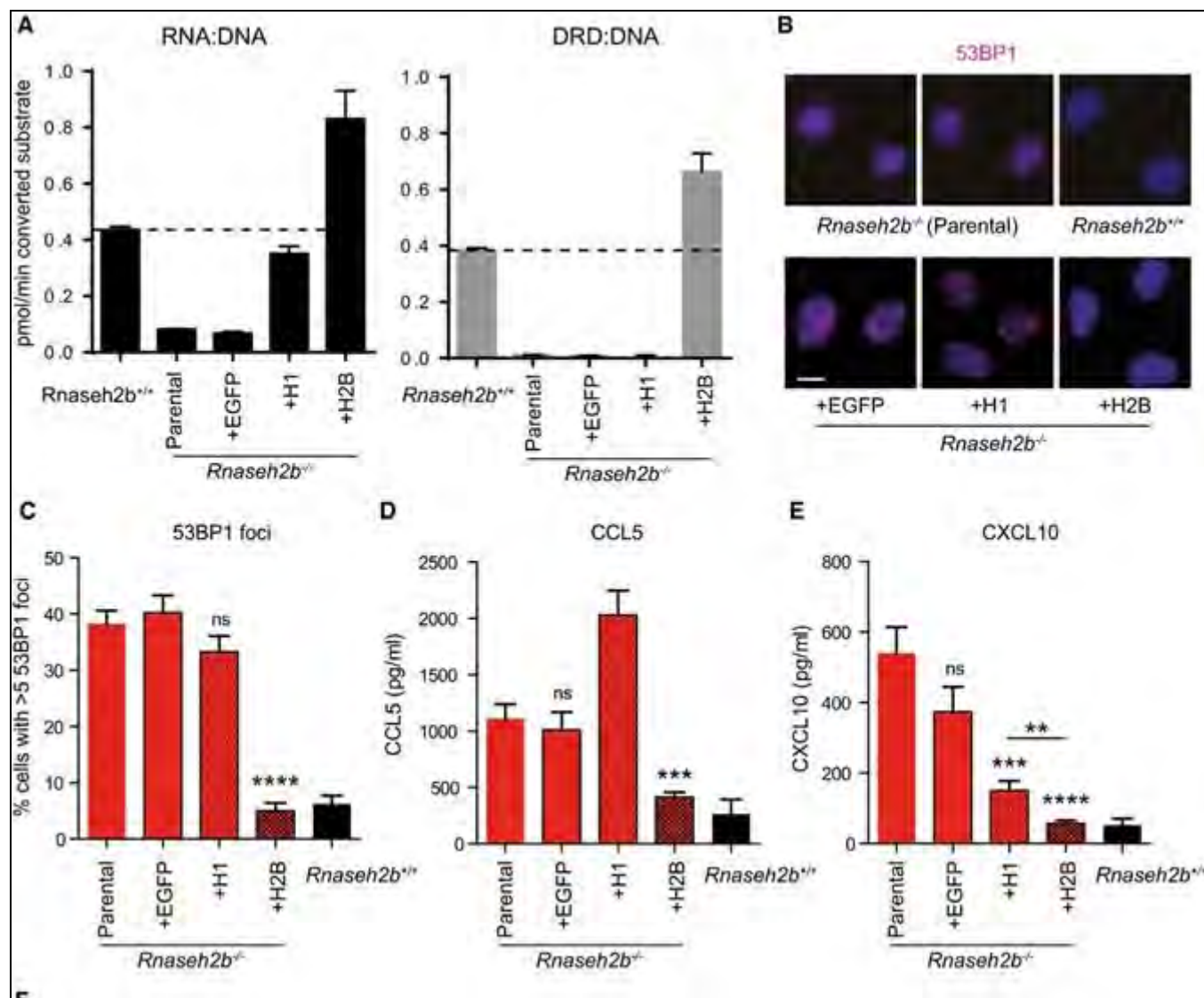


Figura 5. Pruebas de complementación con cepas de fibroblastos de ratones *RNasaH2B^{-/-}* y medida de producción de CCL5 y CXCL10 en dichas cepas. Figura tomada de Mackenzie, K. J. *et al.* (8)

Discusión

A partir del primer experimento presentado, realizado por D.A.Cornelio *et al.* (10), se puede corroborar que RNasaH1 y RNasaH2 realizan la función de eliminar los bucles R (*R-loops*) y rNMPs (8-11, 13), este hecho se manifiesta en que la tasa de LOH sea mayor en el doble mutante *rh201Δ rh1Δ* que en el mutante simple *rh201Δ* y que se mantenga igual que en el WT que en el mutante simple *rh1Δ* (10) (Figura 1). También queda demostrado que RNasaH2 tiene una función adicional relacionada con la reparación por escisión de ribonucleótido, dado que en el caso del mutante simple *rh201Δ*, la tasa de LOH es mayor que en el WT en presencia de RNasaH1, esto es debido a que aunque la actividad de eliminación de *R-loops* y rNMPs en tándem este teniendo lugar, la acumulación de rNMPs en el DNA debida a la incapacidad de la RNasaH1 de llevar a cabo la función RER, aporta inestabilidad genómica (10). Esto también queda demostrado en que la tasa de LOH es igual tanto en el mutante simple *rh201-RED* como en el doble mutante *rh201-RED rh1Δ* (10): una vez más se corrobora que esta función es específica de la RNasaH2 y que la inestabilidad genómica que supone un déficit de RER se mantiene tanto en presencia como en ausencia de la actividad de la RNasaH1, puesto que solo es dependiente de la RNasaH2 (8-11, 13).

Así mismo, tras la revisión del segundo experimento descrito, realizado por Mackenzie, K. J. *et al.* ⁽⁸⁾, se pudo observar que los individuos con RNasaH2b mutada presentaban una acumulación tanto de DNA:RNA como de rNMPs en el DNA que se traducían por lo tanto en un aumento del daño del DNA y de la inestabilidad del mismo ^(4, 8, 9, 11, 17).

Con el tercer experimento al que se hizo referencia, realizado por Pokatayev, V. *et al.* ⁽¹¹⁾, queda corroborada la implicación de la RNasaH2 en el fenotipo inflamatorio de AGS dado que ratones con la misma mutación que la presente en la RNasaH2a de pacientes con AGS mostraban una sobreexpresión de genes estimulados por interferón de tipo I. Estos genes codifican para citoquinas pro-inflamatorias, asociándose por lo tanto a una elevada tasa de liberación de INF en estos ratones y al fenotipo inflamatorio, ambas características englobadas en el cuadro clínico de un paciente con AGS ^(4, 11, 19, 20). Aún así, estos ratones no mostraban las anomalías neuronales que caracterizan a este síndrome pero como ya comenté anteriormente, podría deberse o a la muerte prematura de dichos individuos en los que la homocigosis era letal en una etapa perinatal o bien al hecho de que AGS tenga una manifestación distinta en ratones con respecto a humanos ^(9, 11, 19). Por último, se puede observar en base a los resultados del cuarto y quinto grupo de experimentos en los que me he basado, los cuales fueron realizados por Mackenzie, K. J. *et al.* ⁽⁸⁾, que la activación de la respuesta inmune innata mediada por INF está estimulada por el reconocimiento de especies de ácidos nucleicos, que son sustrato de RNasaH2, por cGAS y la activación consecuente de la vía cGAS-STING y que estos sustratos que activan esta vía son dúplex de DNA con ribonucleótidos incorporados, siendo por lo tanto el déficit de la función RER de la RNasaH2b lo que aparentemente estimula la inmunidad innata por esta vía en pacientes con AGS ^(4, 8, 9, 11).

Sobre la base de los resultados obtenidos y recapitulando toda la información que dichos datos han aportado, se puede concluir que la manifestación de AGS debida a mutaciones en RNasaH2 es consecuencia de la activación errónea de una respuesta inmune innata por la acumulación de DNA con daños debido a la falta de la función RER de esta enzima y la actuación de la topoisomerasa I en la escisión de estos ribonucleótidos añadidos al dúplex DNA generando cortes de doble cadena ^(8, 9, 11, 13). Estos DNA acumulados son aberrantes y por lo tanto pueden ser equivocadamente reconocidos por cGAS, que normalmente actúa reconociendo PRR de ácidos nucleicos de microorganismos patógenos y esto da lugar a la activación de la vía cGAS-STING ^(4, 8, 11, 13). Como estas especies endógenas de ácido nucleico no se encuentran normalmente acumuladas, cGAS las reconoce como extraña dando lugar a la misma respuesta que daría ante ácido nucleico exógeno de origen patógeno. Este hecho tiene como consecuencia la liberación de INF que actuará en última instancia estimulando a una serie de genes (ISG) que codifican para citoquinas pro-inflamatorias responsables del fenotipo inflamatorio característico de este síndrome ^(4, 8, 9, 11, 13).

Conclusiones

La disminución de actividad de la RNasaH2 por mutaciones en cualquiera de sus subunidades da lugar a una acumulación de sustratos de la misma: híbridos RNA:DNA, rNMPs en tándem y rNMPs insertados en dúplex de DNA ^(8, 10, 11, 13). Las dos funciones pueden ser parcialmente realizadas por la RNasaH1 sin embargo, la función de reparación por escisión de ribonucleótidos es específica de este complejo. Ante la acumulación de estos ribonucleótidos insertados en el genoma de forma natural por la DNA polimerasa, y el déficit de función de reparación de los mismos de la RNasaH2, actúa la topoisomerasa I pudiendo generar cortes de doble cadena a la hora de escindir estos ribonucleótidos si los mismos se encuentran en secuencias tándem o en lugares muy cercanos entre sí, se generan por lo tanto especies aberrantes de ácidos nucleicos citoplásmicos ^(8, 9, 11, 13, 18).

cGAS es un receptor de reconocimiento de patrones que se une a especies de ácidos nucleicos que se encuentran en el citoplasma. Al activarse, lleva a cabo su función como sintasa de GAMP cíclico, produciendo así esta molécula que a su vez actuará como ligando para STING (estimulador de los genes de interferones) que activa a su vez la producción de interferones de tipo I mediante la citoquina TBK1 que fosforila a IRF3, que una vez fosforilado entra en

el núcleo y actúa como factor de transcripción para INF-alfa, el cual aumenta por lo tanto sus niveles. Este INF- α a su vez, da lugar a la activación de la transcripción de ISG (genes estimulados por interferones) que actúan como sustancias pro-inflamatorias, un ejemplo de las mismas son CCL5 y CXCL10 que son los que se emplean como los marcadores más potentes de que una activación de la respuesta inmune innata ha tenido lugar para corroborar una diagnosis de paciente con AGS^(4, 8, 11). INF- α además también desencadenan la activación de LT que a su vez dan lugar a la activación de LB produciéndose por lo tanto la estimulación de la respuesta adaptativa del sistema inmune conllevando a un aumento de la respuesta autoinmune⁽⁴⁾. Este incremento de la respuesta autoinmune pro-inflamatoria se traduce en la calcificación a nivel de ganglios basales, la microangiopatía, la atrofia de la sustancia blanca por la llegada incorrecta de sangre consecuencia de inflamación, también es lo que provoca las lesiones cutáneas eritematosas así como la linfocitosis y la leucodistrofia^(1, 3, 4), síntomas presentes en la mayor parte de los individuos que padecen de este raro síndrome del que solo 120 casos han sido descritos hasta la actualidad^(21, 22). Aún hay varias preguntas por resolver como la procedencia de los sustratos para cualquiera de estas enzimas que intervienen en el metabolismo de ácidos nucleicos o como esas especies logran pasar al citoplasma, son algunas de las cuestiones que aún permanecen en el aire pero que no le quitan importancia al hecho de que este modelo de enfermedad es todo un reto para poder entender otras enfermedades autoinmunes más frecuentes y posiblemente complejas, por lo que su estudio podría conllevar a avances que vayan más allá de una terapia efectiva para estos individuos, podría permitir la adquisición de conocimientos y datos que nos permitan entender otras patologías autoinmunes de mayor prevalencia y dificultad^(5, 7).

Referencias

1. Stephenson, J. B. P. Aicardi Goutières syndrome (AGS). *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **12**, 355-358 (2008).
2. Goutières, F. Aicardi–Goutières syndrome. *Brain Dev.* **27**, 201-206 (2005).
3. Rodríguez-Torres, J. Aicardi-Goutieres syndrome. *Int. Pediatr.* **22**, 185 (2007).
4. Crow, Y. J. & Manel, N. Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 429-40 (2015).
5. Lee-Kirsch, M. A., Wolf, C. & Günther, C. Aicardi Goutières syndrome: A model disease for systemic autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* **175**, 17-24 (2014).
6. Crow, Y. J. & Rehwinkel, J. Aicardi Goutières syndrome and related phenotypes: Linking nucleic acid metabolism with autoimmunity. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 130-136 (2009).
7. Crow, Y. J., Vanderver, A., Orcesi, S., Kuijpers, T. W. & Rice, G. I. Therapies in Aicardi Goutières syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **175**, 1-8 (2014).
8. Mackenzie, K. J. *et al.* Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS / STING- dependent innate immune response. *EMBO J.* **35**, 1-14 (2016).
9. Rabe, B. Aicardi Goutières syndrome: Clues from the RNase H2 knock-out mouse. *J. Mol. Med.* **91**, 1235-1240 (2013).
10. Cornelio, D. A., Sedam, H. N. C., Ferrarezi, J. A., Sampaio, N. M. V. & Argueso, J. L. Both R-loop removal and ribonucleotide excision repair activities of RNase H2 contribute substantially to chromosome stability. *DNA Repair (Amst)*. **52**, 110-114 (2017).
11. Pokatayev, V. *et al.* RNase H2 catalytic core Aicardi-Goutières syndrome–related mutant invokes cGAS–STING innate immune-sensing pathway in mice. *J. Exp. Med.* **213**, 329-336 (2016).
12. Boeke, J. D., La Croute, F. & Fink, G. R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet. MGG* **197**, 345-346 (1984).
13. Williams, J. S., Gehle, D. B. & Kunkel, T. A. The role of RNase H2 in processing ribonucleotides incorporated

- during DNA replication. *DNA Repair (Amst)*. **53**, 52-58 (2017).
14. Crow, Y. J. *Aicardi-Goutières Syndrome*. *GeneReviews*(®) (University of Washington, Seattle, 1993).
 15. Manuscript, A. NIH Public Access. *Growth (Lakeland)* **23**, 1-7 (2008).
 16. Gentili, M. & Manel, N. RNase H 2 genetic disease. **35**, 10-11 (2016).
 17. Figiel M, Chon H, Cerritelli SM *et al* The Structural and Biochemical Characterization of Human RNase H2 Complex Reveals the Molecular Basis for Substrate Recognition and Aicardi Goutières Syndrome Defects. *J. Biol. Chem.* **286**, 10540-10550 (2011).
 18. Behrendt, R. & Roers, A. Mouse models for Aicardi Goutières syndrome provide clues to the molecular pathogenesis of systemic autoimmunity. *Clin. Exp. Immunol.* **175**, 9-16 (2014).
 19. Rice GI, Duany T, 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. Publ. Gr.* **46**, 503-509 (2014).
 20. Crow YJ, Chase DS, Lowenstein Schmidt J. Characterization of human disease phenotypes associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, ADAR, and IFIH1. *Am. J. Med. Genet. Part A* **167**, 296-312 (2015).
 21. Orcesi S, Pessagno A, Biancheri R *et al*. Aicardi-Goutières syndrome presenting atypically as a sub-acute leukoencephalopathy. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **12**, 408-411 (2008).
 22. Kohlschütter, A. & Eichler, F. Childhood leukodystrophies: a clinical perspective. *Expert Rev. Neurother.* **11**, 1485-1496 (2011).