



# TREX1 and SAMHD1, and Aicardi-Goutières Syndrome

Lorena Valverde Estrella

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Programa de Doctorat en Biomedicina**

## **TREX1 and SAMHD1, and Aicardi-Goutières Syndrome**

Tesi presentada per

**Lorena Valverde Estrella**

Per a l'obtenció del títol de Doctora per la Universitat de Barcelona

El director de la Tesi

**Dr. Antonio Celada Cotarelo**

Catedràtic d'Immunologia

El director de la Tesi

**Dr. Jorge Lloberas Caveró**

Professor Agregat d'Immunologia



# Índex

|

# Índex

Índex .....	5
Abreviatures .....	9
Llistat de figures .....	15
English summary .....	21
Introducció .....	25
Els macròfags.....	25
Diferenciació i proliferació de macròfags.....	28
Activació dels macròfags .....	30
Els Interferons .....	33
Lipopolisacàrid (LPS).....	35
Interleucina 4 (IL-4) .....	36
Macròfags i inflamació .....	39
La síndrome d'Aicardi-Goutières .....	42
TREX1 .....	45
RNASE H2.....	49
SAMHD1 .....	52
ADAR1.....	57
IFIH1 o MDA5.....	60
Objectius.....	67
Materials i mètodes.....	71
Ratolins .....	71
Cultius cel·lulars.....	71
Reactius .....	72
Extractes Proteics .....	73
Western blot.....	74
Southern blot.....	75
Extracció d'RNA i PCR a temps real (qPCR).....	77
Transfecció d'RNA d'interferència (siRNA).....	78
Assaig de proliferació .....	79
Preparacionsd'immunocitoquímica (ICQ) .....	79
Anàlisi de focis nuclears mitjançant microscopia electrònica.....	80

Plasmidis .....	80
Transfecció per expressió transitòria i assajos marcadors duals de luciferasa-renilla .....	81
Assaig en Gel de Retard (EMSA) .....	82
Assaig d'Immunoprecipitació de cromatina (ChIP).....	84
Citometria de flux (FACS).....	86
Anàlisi proteòmic .....	86
Resultats.....	91
Discussió.....	139
Conclusions .....	149
Annex .....	153
Vector BAC (Bacterial Artificial Chromosome).....	153
Vector pRL-TK.....	154
Vector pCR2.1 .....	154
Vector pGL3-Basic.....	156
Bibliografia .....	159

# Abreviatures





# Abreviatures

Abreviatura	Nom
ADAR1	<i>Adenosine Deaminase Acting on RNA 1</i> , AGS6
AGS	Síndrome d'Aicardi-Goutières
ATP	Adenosina Trifosfat
pb	Parells de bases
CARD	Dominis de reclutament de caspases
CCR2	Receptor de quimiocines C-C 2
CCR7	Receptor de quimiocines C-C 7
CCR8	Receptor de quimiocines C-C 8
CD115	M-CSFR1 o CSF1R
CD11b	Integrina alfa M
CD11c	Integrina alfa X
CD14	Integrina alfa M (humana)
CD16	Receptor de la part Fc de la IgG (humana)
CD62L	L-selectina
CDK1	Cinasa depenent de ciclina 1
CTD	Domini C-terminal
CXCR1	Receptor de la interleucina-8
DC	Cèl·lules dendrítiques
dNTPs	Nucleòsids trifosfat
dsDNA	DNA de cadena doble
dsRBD	Motiu d'unió a dsRNA
ERK1/2	Cinasa regulada per senyals extracel·lulars 1/2
FCL	Lupus familiar amb ferides tipus penellons
GAS	Lloc d'activació per IFN- $\gamma$
GM-CSF	Factor estimulator de colònies de granulòcits i macròfags
HEV	Vènules d'endoteli alt
ICAM-1	Molècula d'adhesió intercel·lular 1
IFIH1	MDA5
IFN- $\alpha$	Interferó alfa
IFN- $\gamma$	Interferó gamma

Abreviatura	Nom
IFN-I	Interferons de tipus I
IFN-II	Interferons de tipus II
IFN-III	Interferons de tipus III
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IRF1	Factor regulador de l'interferó 1
IRF3	Factor regulador de l'interferó 3
IRS	Substrat receptor d'insulina
ISRE	Element de resposta a estímuls d'IFN
LAF-1	Factor activador de limfòcits o IL-1
LBP	Proteïna d'unió a LPS
LCR	Líquid cefaloraquidi
LPS	Lipopolisacàrid
Ly6C	Antigen de diferenciació de monòcits
M1	Macròfags activats de manera clàssica o proinflamatoris
M2	Macròfags activats de manera alternativa o antiinflamatoris
Mac-I	CD11b
MAPK	Proteïna cinasa activada per mitogen
<i>M-CSF</i> o <i>CSF1</i>	Factor estimulador de colònies de macròfags
M-CSFR o CSF1R	Receptor de l'M-CSF
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MDP	Precursor de macròfags i cèl·lules dendrítiques
MEK	MAPK/ERK cinasa
MHC-I	Complex principal d'histocompatibilitat I
MHC-II	Complex principal d'histocompatibilitat II
MKP-1	Proteïna cinasa activada per mitogen 1
MRC1	Receptor de manosa
mRNA	RNA missatger
NO	Òxid nítric
PAMP	Patrons moleculars associats a patògens
PCNA	Antigen nuclear de proliferació cel·lular
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PKR	Proteïna cinasa R
RLR	Família de reconeixement de PAMPsRIG-I-like

<b>Abreviatura</b>	<b>Nom</b>
<b>RNASEH2</b>	<i>Ribonuclease H2</i>
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen
<b>RVCL</b>	Vasculopatia dominant amb leucodistrofia cerebral
<b>SAMHD1</b>	<i>SAM and HD Domain Containing Protein 1</i>
<b>SLE</b>	Lupus Eritematós Sistèmic
<b>ssDNA</b>	DNA de cadena senzilla
<b>ssRNA</b>	RNA de cadena doble
<b>STAT</b>	Transductor de senyals i activador de la transcripció
<b>TGF-β</b>	Factor de creixement transformador beta
<b>Th1</b>	Cèl·lules T <i>helper</i> tipus 1
<b>Th2</b>	Cèl·lules T <i>helper</i> tipus 2
<b>TLR</b>	Receptor tipus <i>toll</i>
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosi tumoral alfa
<b>TREX1</b>	<i>ThreePrimeRepairExonuclease 1</i>
<b>VCAM-1</b>	Proteïna vascular d'adhesió cel·lular 1
<b>tRNA</b>	RNA de transferència
<b>VIH</b>	Virus de la immunodeficiència humana
<b>VLA-4 (α4β1)</b>	Antigen tardà 4



# Llistat de figures

|

# Llistat de figures

Figura 1: Desenvolupament i funció dels subgrups de monòcits a ratolí. ....	26
Figura 2: La duració de la fosforilació d'ERK determina la proliferació o l'activació dels macròfags. ....	29
Figura 3: Model d'activació clàssica i alternativa de macròfags. ....	31
Figura 4: Estímuls M1 i M2. ....	32
Figura 5: Els tres tipus d'IFN amb els seus respectius receptors i les vies de senyalització. ....	34
Figura 6: Estructura del receptor Toll-like receptor i les vies de senyalització. ....	36
Figura 7: Via de senyalització de les interleucines 4 i 13. ....	38
Figura 8: Els cinc signes cardinals de la inflamació. ....	40
Figura 9: Heterogeneïtat dels macròfags durant la inflamació. ....	41
Figura 10: Tomografia computada del cervell de diferents individus. ....	42
Taula 1: Resum de les característiques clíniques de l'AGS en comparació a l'SLE i les infeccions congènites virals. ....	43
Figura 11: Incidència en pacients amb AGS de mutacions en els diferents gens associats a la malaltia. ....	44
Figura 12: Model de patogènesi de la malaltia d'AGS. ....	44
Figura 14: Estructura secundària predita per a TREX1. ....	47
Figura 15: Representació esquemàtica de les mutacions al gen de TREX1 amb les malalties associades a cada mutació. ....	48
Figura 16: Estructura del complex enzimàtic de la RNASE H2 murina. ....	50
Figura 17: Representació esquemàtica del gen de la Rnaseh2a, amb la posició de les mutacions identificades. ....	51
Figura 18: Representació esquemàtica del gen de la Rnaseh2b, amb la posició de les mutacions identificades. ....	52
Figura 19: Representació esquemàtica del gen de la Rnaseh2c, amb la posició de les mutacions identificades. ....	52
Figura 20: Representació esquemàtica del gen de SAMHD1 humà, amb la posició de les mutacions identificades. ....	53
Figura 21: Representació de l'estructura tridimensional del dímer de SAMHD1. ....	54



Figura 22: Model de funcionament de SAMHD1. ....	55
Figura 23: El substrat d'ADAR1 és dsRNA. ....	57
Figura 24: Organització dels dominis de la proteïna ADAR1 humana. ....	58
Figura 25: Representació esquemàtica del gen d'ADAR1 humà. ....	60
Figura 26: La via de senyalització RLR. ....	61
Figura 27: Unió de MDA5 a l'RNA. ....	62
Figura 28: Representació esquemàtica del gen IFIH1 humà. ....	63
Taula 2: Anticossos utilitzats en les diferents tècniques. ....	72
Taula 3: Encebadors utilitzats per a l'amplificació per PCR de les sondes pel Southern Blot. ....	75
Taula 4: Encebadors utilitzats a la PCR quantitativa o qPCR. Aquests oligonucleòtids es dissenyen mitjançant la utilització de l'eina on-line Primer-Blast (NCBI) per a cadascun dels gens. ....	78
Taula 5: Encebadors utilitzats per al clonatge. ....	82
Taula 6: Oligonucleòtids utilitzats en l'assaig de retard (EMSA). Les seqüències van ser dissenyades manualment i demanades a partir de l'eina <i>on-line</i> de Sigma. ....	83
Taula 7: Encebadors utilitzats en l'assaig d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP). Aquests oligonucleòtids es dissenyen mitjançant la utilització de l'eina <i>on-line</i> Primer-Blast (NCBI) per a cadascun dels gens i demanades a partir de l'eina <i>on-line</i> de Sigma. ....	86
Figura 29: Expressió tissular de <i>Samhd1</i> en ratolins. ....	92
Figura 30: L'expressió de <i>Samhd1</i> als macròfags s'indueix per citocines proinflamàtòries. ....	93
Figura 31: Els activadors proinflamatoris indueixen l'expressió proteica de SAMHD1. ....	94
Figura 32: Control del silenciament de SAMHD1. ....	95
Figura 33: Especificitat de la inhibició de <i>Samhd1</i> per siRNA. ....	96
Figura 34: Les cèl·lules deficientes en SAMHD1 tenen un augment de dany al DNA. ....	97
Figura 35: Els macròfags deficientes en SAMHD1 tenen una disminució de la capacitat proliferativa. ....	99
Taula 8: La vida mitjana de l'RNA de <i>Samhd1</i> no es troba afectada en presència d'IFN- $\gamma$ . ....	100
Figura 36: L'expressió de <i>Samhd1</i> en ratolins KO d'STAT1 es troba reprimida. ....	101
Figura 37: L'expressió <i>Samhd1</i> a la línia cel·lular RAW264.7 és augmentada en presència d'estímuls proinflamatoris. Cinètica de l'expressió de <i>Samhd1</i> en presència de diferents citocines proinflamàtòries (IFN- $\gamma$ , LPS o ambdós a la vegada) a la línia cel·lular RAW264.7. Es va extraure RNA de cultius de macròfags leucèmics murins (RAW 264.7) en presència de les diferents citocines i es va utilitzar 1 $\mu$ g d'aquest mRNA per a la retrotranscripció i obtenció del cDNA. Les	

mostres van ser analitzades mitjançant qPCR amb encebadors específics de <i>Samhd1</i> i els resultats es mostren com a quantitat relativa respecte al gen <i>L14</i> . Les figures mostren els resultats promig i la desviació estàndard de tres resultats independents. ....	102
Figura 38: 1500pb són suficients per induir una expressió per IFN- $\gamma$ . ....	102
Figura 39: La regió entre -1400 i -946pb és essencial per a la inducció per IFN- $\gamma$ . ....	103
Figura 40: La regió entre -1107 i -946pb és essencial per a la inducció de <i>Samhd1</i> per IFN- $\gamma$ . ...	104
Figura 41: A la regió F1 s'observa una banda en condicions basals que es perd en presència d'IFN- $\gamma$ a les 6 hores. ....	105
Figura 42: Regió ampliada del promotor de <i>Samhd1</i> amb la posició de les seqüències d'unió i sondes al detall, i EMSA d'algunes de les sondes. ....	106
Figura 43: La proteïna que a les sondes més grans és la mateixa que la que s'uneix a la sonda IRF1. ....	108
Figura 44: La proteïna que s'uneix utilitzant les diferents sondes és la mateixa en tots els casos. ....	108
Figura 45: IRF1 s'uneix a les tres i a les 6 hores en presència d'IFN- $\gamma$ . ....	109
Figura 46: CHIP del promotor de <i>Samhd1</i> . ....	110
Figura 47: Anàlisi de mostres pretractades amb o sense cicloheximida. ....	111
Figura 48: La unió d'IRF1 al promotor de <i>Samhd1</i> s'inhibeix en presència de CHX. ....	112
Figura 49: El segon grup de timidines és essencial per a la unió d'una proteïna en condicions basals. ....	114
Figura 50: IRF1 és induït per IFN- $\gamma$ i no se sintetitza en presència de CHX. A. BMDM van ser exposats a IFN- $\gamma$ i les mostres van ser recollides als temps indicats. Les mostres amb CHX van ser pretractades amb el mencionat inhibidor durant 30 minuts i passat aquest temps es va afegir IFN- $\gamma$ durant 6 hores. Es va extraure l'RNA i es va utilitzar 1 $\mu$ g d'aquest mRNA per a la retrotranscripció i obtenció del cDNA. Les mostres van ser analitzades mitjançant qPCR amb encebadors específics d'Irf1 i els resultats es van analitzar com a quantitat relativa respecte al gen L14. La figura mostra la quantitat relativa, i es mostren els resultats promig i la desviació estàndard de tres resultats independents. B. L'expressió d'IRF1 s'ha mesurat en macròfags incubats en presència dels agents indicats i durant el temps indicat. La determinació de la quantitat de proteïna es va realitzar mitjançant Western Blot utilitzant l'anticòs contra la proteïna murina de SAMHD1 (72KDa). Cada membrana també s'utilitza per al corresponent control de càrrega, mitjançant la utilització de l'anticòs contra la $\beta$ -Actina ( $\beta$ -ACTIN). En aquesta figura es mostra un resultat representatiu de tres experiments realitzats de manera independent. Western blot per a la detecció de la proteïna d'IRF1. IRF1 té un pes molecular de 37KDa. ....	115
Figura 51: Construcció del vector Gene-targeting. ....	117
Figura 52: Resum del procés de la recombinació homòloga. ....	118

Figura 3: Anàlisi per PCR dels clons crescuts prèviament sotmesos a electroporació, i determinació de la recombinació homòloga .....	119
Figura 54: Disseny de les sondes per a l'assaig de Southern Blot.....	120
Figura 55: Injecció de les cèl·lules embrionàries modificades (ES) i selecció dels animals positius. ....	121
Figura 56: Genotipat dels cinc primers animals de la colònia condicional de TREX1. Dels 5 animals analitzats, dos d'ells van sortir heterozigots per a la modificació gènica.....	122
Figura 57: Representació del creuament entre el KO condicional i la soca que expressa CRE sota el promotor de Socs2.....	123
Figura 58: Genotipacions de la descendència entre els ratolins knockout condicional de TREX1 i CRE <sup>LysM</sup> .....	123
Figura 59: Anàlisi d'una progènie de l'encreuament del ratolí KO condicional i un ratolí CRE <sup>Socs2</sup> . ....	124
Figura 60: Imatge d'un ratolí WT i un KO per TREX1. A la imatge es veuen dos animals de la mateixa colònia i de la mateixa edat (8setmanes) però normal o deficient en TREX1, respectivament. Imatge cedida per Pereira et al.....	125
Figura 61: Anàlisi d'una progènie de l'encreuament del ratolí KO condicional i un ratolí CRE <sup>Socs2</sup> . ....	126
Figura 62: Corbes de supervivència de ratolins TREX1.....	126
Figura 63: Morfologia i pes d'òrgans de ratolins WT i KO. A. Es van extraure òrgans de ratolins WT i KO de TREX1 provinents del creuament amb CRE <sup>Socs2</sup> . Es mostra una imatge representativa de duplicats d'animals que van ser analitzats. Posteriorment, es va fer un anàlisi dels pesos dels respectius òrgans i es va fer la mitjana i la desviació estàndard dels mateixos. El resultat es mostra a la figura B. ....	128
Figura 64: Anàlisi per FACS dels BMDM de ratolins negatius i positius per a CRE <sup>Socs2</sup> .....	129
Figura 65: Anàlisi per FACS dels BMDM de ratolins negatius i positius per a CRE <sup>Socs2</sup> .....	130
Figura 66: Anàlisi d'una progènie de l'encreuament del ratolí KO condicional i un ratolí CRE <sup>Socs2</sup> . ....	131
Figura 67: Anàlisi d'una progènie de l'encreuament del ratolí KO condicional i un ratolí CRE <sup>Socs2</sup> . ....	132
Figura 68: Representació del creuament entre el KO condicional i la soca que expressa CRE de manera regulada pel promotor de la Lisozima M (CRE <sup>LysM</sup> ).A la descendència d'aquest creuament, CRE és expressat a les cèl·lules de la línia mieloide. Aquestes cèl·lules doncs no tindran expressió de TREX1. A qualsevol altre òrgan del ratolí, l'expressió de TREX1 és completament normal. ....	133
Figura 69: Exemple de genotipat dels primers animals heterozigots per a la modificació de <i>Trex1</i> i que expressen CRE <sup>LysM</sup> . Els animals heterozigots per a la modificació de <i>Trex1</i> i positius per a <i>Cre</i>	

es van creuar entre sí per a la obtenció de ratolins homozigots per a la modificació i que expressin *Cre*. ..... 134

Figura 70: Exemple de genotipat de les primeres descendències entre el ratolí conticional de TREX1 i el ratolí CRE<sup>LysM</sup>. Dels animals heterozigots per a la modificació de *Trex1*, només els animals homozigots negatius per a la modificació expressen CRE, mentre que els animals homozigots positius no expressen CRE. .... 134

Figura 71: Genotipació d'una ventrada obtinguda del creuament entre el KO condicional i la soca que expressa CRE regulada pel promotor de la Lisozima M (CRE<sup>LysM</sup>). ..... 135

Figura 1: Mecanismes de regulació de l'expressió gènica a eucariotes. El diagrama mostra cinc tipus de mecanismes generals que poden ser presents. .... 141

Figura 2: Hipòtesi de la inducció de *Samhd1*. ..... 143



# English summary

Aicardi-Goutières Syndrome (AGS) is a rare encephalopathy which mimics a viral intrauterine infection and is characterized by calcifications of the basal ganglia, cerebral atrophy and IFN- $\alpha$  in the cerebrospinal fluid. AGS is a heterogenic disease associated with mutations in the gene of the exonuclease TREX1, in any of the genes codifying for the ribonuclease H2, in the phosphohydrolase SAMHD1, in the deaminase ADAR1 or in the cytoplasmic sensor MDA5. The knowledge of these functions is basic for the comprehension of the beginning of the pathogenesis of AGS. In this thesis we focused in the mechanism of *Samhd1* transcription. We have seen that *Samhd1* is induced by pro-inflammatory stimuli but neither by anti-inflammatory stimuli nor TNF- $\alpha$ , and that the induction of *Samhd1* is through STAT1 pathway. We wanted to know a bit more about *Samhd1* induction so we focused on the study of its promoter. We did a construct in a luciferase-reporter vector with 1500bp of *Samhd1* promoter, and we saw that this region of the promoter is enough to induce luciferase expression. From this construct, we did new plasmids and when deleting an specific region, the luciferase expression was abolished, indicating that in *Samhd1* promoter, 161bp are critical for *Samhd1* induction. EMSA assays showed that *Samhd1* expression is repressed in basal conditions by an unknown protein, and ChIP assays also showed that IRF1 is involved in *Samhd1* induction by IFN- $\gamma$ . We hypothesized that the regulation mechanism is depending in an STAT1-depending pathway, through IRF1, and also in an STAT1-independing pathway, through an unknown mechanism up to date. We checked with proteomics analysis the protein which might be involved in *Samhd1* repression but the results were not significant. We also constructed a conditional KO mouse for TREX1, and now we are crossing it with different CRE-expressing strands. Homozygous KO expressing CRE<sup>Socs2</sup> litter, show a similar phenotype to TREX1 total KO. We are in the process to obtain homozygous KO expressing CRE<sup>LysM</sup>, but due to problems with the penetrance of this CRE allele we have some difficulties. All together, the results of this thesis will shed light in the inner operation of AGS.

|

# **Introducció**



|

# Introducció

## *Els macròfags*

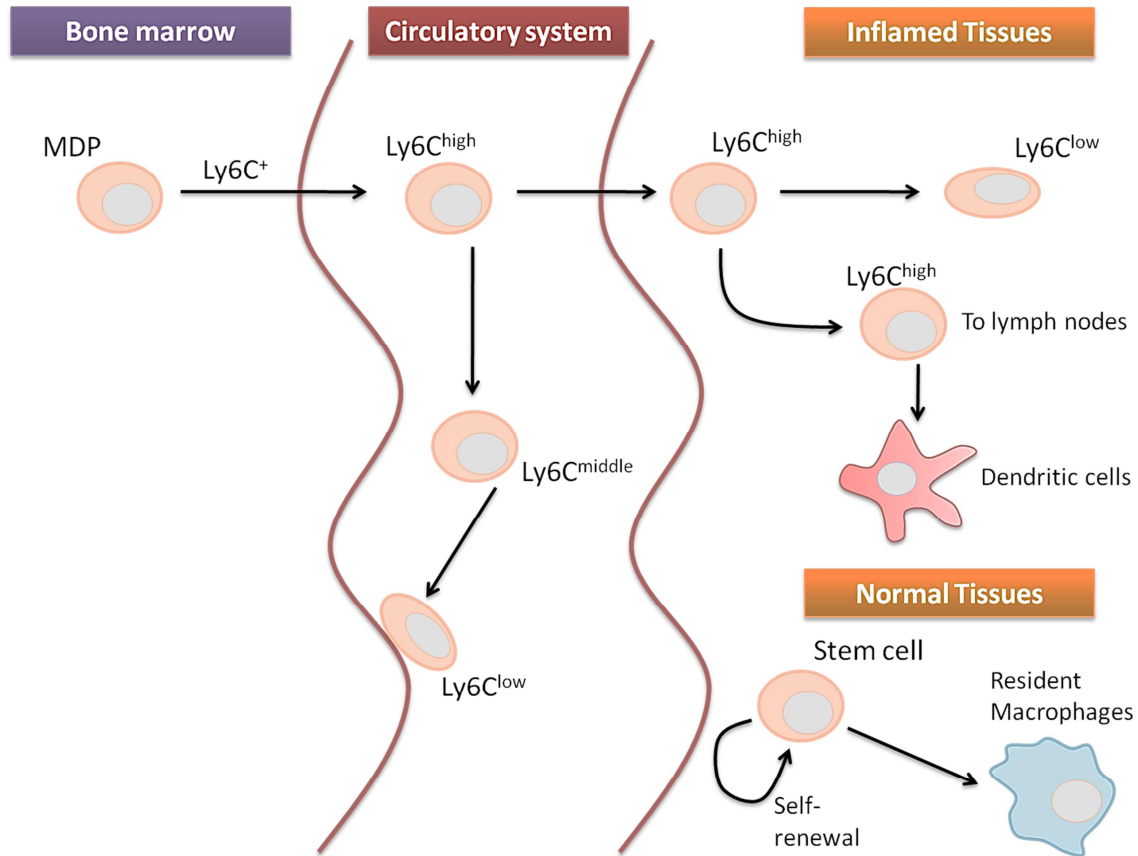
---

Els monòcits són cèl·lules que es diferencien a partir del precursor anomenat *macrophage-DC precursor* (MDP), principalment resident al moll de l'os. Inicialment, els monòcits van ser dividits en funció del marcador CCR2. El subgrup CCR2<sup>+</sup> mostrava una major capacitat migratòria i d'infiltració que el subgrup CCR2<sup>-</sup>, per aquest motiu es va considerar com el monòcit murí inflamatori (Palframan et al., 2001). Ly6C (Gr1) és un altre marcador d'inflamació de monòcits i actualment és acceptada la divisió dels subconjunts de monòcits murins com a Ly6C<sup>+</sup> (o Ly6C<sup>high</sup>) i Ly6C<sup>-</sup> (o també anomenat Ly6C<sup>low</sup>), en funció dels nivells d'expressió a la superfície cel·lular de Ly6C. Els marcadors de superfície i els receptors de quimiocines a ratolins pel subgrup Ly6C<sup>high</sup> són CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> i CCR2<sup>high</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>, mentre que els marcadors de superfície i els receptors de quimiocines pels monòcits Ly6C<sup>low</sup> són CD11b<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup> i CCR2<sup>low</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>high</sup>. Les poblacions equivalents a humans són CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> i CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> (Si et al., 2010) (Figura 1).

Els monòcits Ly6C<sup>high</sup> tenen una gran capacitat antimicrobiana degut a la seva potent habilitat de fagocitar, de secretar espècies reactives d'oxigen (*Reactive Oxygen Species*(ROS)), el factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α)), òxid nítric (NO), interleucina-1β (IL-1β), i IL-10 en front a una infecció bacteriana (Serbina et al., 2008). Com a resposta a lligands virals, aquestes cèl·lules produeixen una gran quantitat d'interferons de tipus I (IFN-α, -β i d'altres) (Barbalat et al., 2009). Els monòcits Ly6C<sup>+</sup> són reclutats als teixits inflamats, els quals expressen el lligand CCL2, mitjançant la interacció amb CCR2. La senyalització CCR2-CCL2 als monòcits Ly6C<sup>+</sup>, provoca un canvi conformacional de la integrina VLA-1 (α4β1), el lligand del qual és VCAM-1, portant a una gran afinitat d'interacció i a la transmigració dels monòcits (Audoy-Rémus et al., 2008).

En estat estacionari, els monòcits Ly6C<sup>high</sup> es diferencien en monòcits Ly6C<sup>low</sup> a la circulació. Aquest subconjunt recorre el costat luminal de l'endoteli dels vasos sanguinis i s'uneixen a l'endoteli vascular mitjançant el receptor de quimiocines CX<sub>3</sub>CR1, de manera dependent a LAF-1/ICAM-1. Originalment es van considerar aquests monòcits Ly6C<sup>low</sup> com a precursors immediats dels macròfags residents (Geissmann et al., 2003), mentre que les cèl·lules

Ly6C<sup>high</sup> eren reclutades sota condicions d'inflamació mitjançant la interacció amb CCR2. Tot i això, l'alternativa proposada és que les cèl·lules Ly6C<sup>low</sup> representen un punt final funcional (Yona et al., 2013). Els monòcits Ly6C<sup>high</sup> tenen una vida mitja aproximada de 18 hores, mentre que els monòcits Ly6C<sup>low</sup> tenen una vida mitja estimada de 5-7 dies (Tacke et al., 2006; Yona et al., 2013).



**Figura 1: Desenvolupament i funció dels subgrups de monòcits a ratolí.** Els monòcits Ly6C<sup>high</sup> al moll de l'os són alliberats a la circulació perifèrica. Aquests monòcits responen als senyals inflamatoris i són reclutats a les lesions inflamatòries. Es creu que la majoria dels monòcits inflamatoris es diferencien en macròfags. Alguns monòcits Ly6C<sup>high</sup> entren als teixits (un procés que requereix CCR7 and CCR8) i romanen indiferenciats, adquireixen antígen i migren al gangli limfàtic on es desenvoluparan en cèl·lules dendrítiques. Una menor proporció de monòcits Ly6C<sup>high</sup> es diferencien en monòcits Ly6C<sup>low</sup>, que adoptaran la funció de macròfags vasculars. Els macròfags tissulars es mantenen principalment per autorenovació.

Els monòcits Ly6C<sup>low</sup> secreten IL-10, una citocina antiinflamatòria, davant d'una infecció bacteriana. En una inflamació vascular, els monòcits Ly6C<sup>low</sup> són reclutats al teixit i es diferencien principalment en macròfags M2 o activats de manera alternativa, secretant citocines antiinflamatòries i d'aquesta manera contribuint a la reparació tissular (Auffray et al., 2007).

La CD62L (L-selectin), expressada pels monòcits, és important per a la circulació cap als nòduls limfàtics a través de les vècules d'endoteli alt (HEV) (Palframan et al., 2001). Els receptors de quimiocines CCR7 i CCR8 són responsables del tràfic al nòdul limfàtic i són selectivament expressats pels monòcits amb fenotip  $CCR2^+CCR7^+CCR8^+Ly6C^{middle}$  (Qu et al., 2004). Aquestes cèl·lules amb un fenotip intermedi, estan predisposades particularment cap a la migració als nòduls limfàtics de drenatge i cap a la diferenciació en cèl·lules dendrítiques (DC). Després de la migració als teixits inflamats, els monòcits  $CCR2^+$  regulen positivament l'expressió de CD11C i de molècules MHC de classe II. Algunes de les cèl·lules  $CD11C^+MHC-II^+$  es diferencien en DC i poden ser recuperades dels nòduls limfàtics de drenatge (Geissmann et al., 2003).

Els macròfags tissulars tenen diverses funcions en el manteniment de l'homeòstasi del teixit a través de l'eliminació de les cèl·lules senescentes i la reparació de teixits després de la inflamació. Es va considerar que provenien de macròfags circulants, però s'ha vist que tenen una autorenovació *in situ*. Aquestes poblacions residents existeixen independentment de monòcits i poden ser originats des de diferents línies embrionàries del sistema hematopoètic. Els monòcits d'origen fetal en alguns teixits d'un adult, impliquen l'autorenovació de poblacions de macròfags tissulars com ara macròfags cardíacs, cèl·lules de la micròglia al cervell, etc (Sieweke and Allen, 2013; Yona et al., 2013). Davant de determinades condicions genètiques o experimentals, ratolins o humans monocitopènics al moll de l'os, no tenen deficiències en macròfags tissulars (Bigley et al., 2011; Emile et al., 2000; Hambleton et al., 2011; Vinh et al., 2010). Aquesta observació indica que els macròfags tissulars són capaços de reemplaçar-se a si mateixos sense necessitat d'un precursor provinent del moll de l'os.

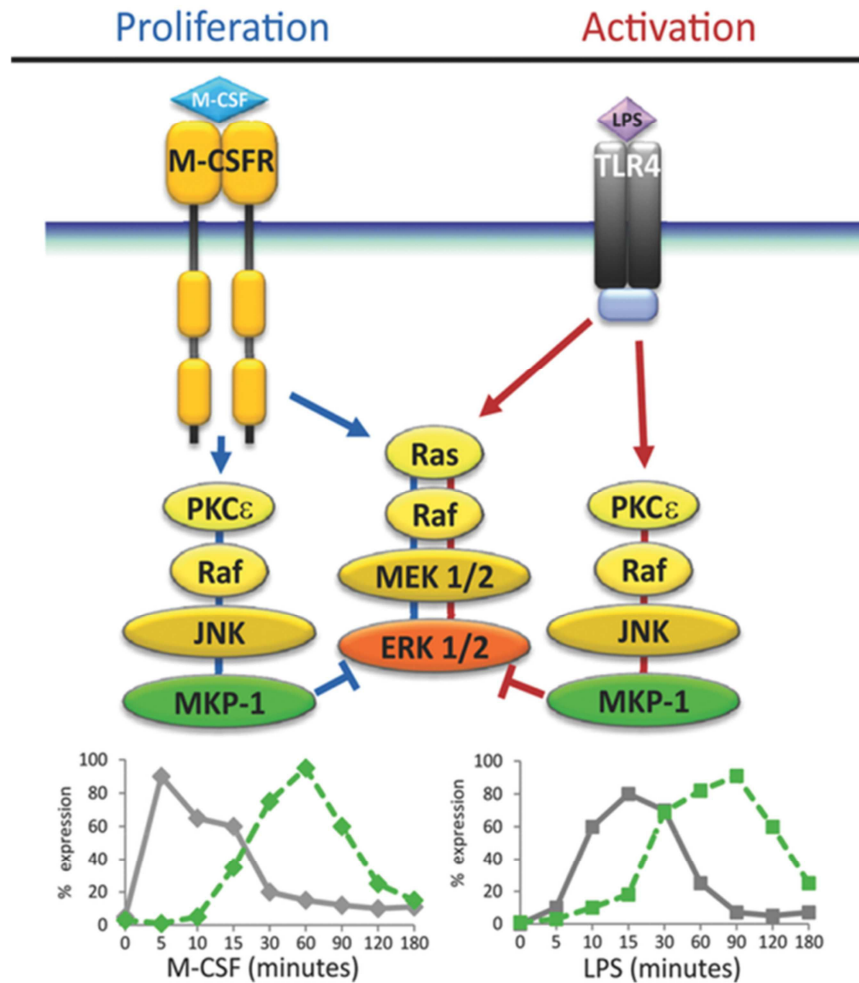
Depenent de l'ambient on estiguin exposats els macròfags, aquests actuen de diferent formes. Davant de factors de creixement, i depenent de les molècules d'adhesió presents, els macròfags proliferen, mentre que en front d'estímuls proinflamatoris, citocines o elements bacterians, la proliferació està bloquejada i els macròfags s'activen (Xaus et al., 1999, 2001a) i es dóna una inducció de les seves activitats funcionals com la secreció de citocines, producció de metabòlits tòxics, o fagocitosi (Plowden et al., 2004; Schroder et al., 2004). Si no hi ha estímul, els macròfags moren per apoptosi, mantenint el balanç entre cèl·lules efectores amb un flux constant de sortida des del moll de l'os (Celada and Nathan, 1994; Xaus et al., 2001b). A més, l'activació alternativa dels macròfags mitjançant la IL-4, indueix una aturada de la proliferació (Arpa et al., 2009).

## ***Diferenciació i proliferació de macròfags***

El moll de l'os és el lloc de generació de totes les cèl·lules circulants en els organismes adults. El procés mitjançant el qual es formen les cèl·lules s'anomena hematopoesi. Totes les cèl·lules sanguínies s'originen a partir d'una cèl·lula mare hematopoètica comuna que és capaç de diferenciar-se en diferents llinatges. Aquestes cèl·lules hematopoètiques són part del sistema fagocític mononuclear, regulada principalment per l'M-CSF (Valledor et al., 1998).

L'M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor* o CSF1) és el principal regulador de la proliferació, la diferenciació i la supervivència (Comalada et al., 2004) dels macròfags i dels seus precursors i, mitjançant sinèrgia amb altres citocines, pot ser capaç d'intervenir en la proliferació d'altres progenitors hematopoètics més primerencs. Aquest factor de creixement és una glicoproteïna secretada, sintetitzada per una gran varietat de tipus cel·lulars incloent cèl·lules endotelials, fibroblats, cèl·lules estromals de moll de l'os, osteoblasts, cèl·lules epitelials tímiques, queratinòcits, astròcits, condrocits, mioblasts, cèl·lules mesotelials, cèl·lules mesangials, cèl·lules de les glàndules endometrials, i estroma trofoblast de la placenta decidual (Fixe and Praloran, 1997; Hamilton, 1997).

L'M-CSF s'uneix al seu receptor específic (M-CSFR o CSF1R), només present a macròfags, provocant així l'activació de gens primerencs i tardans a través de diferents vies de senyalització per iniciar el cicle cel·lular (Barreda et al., 2004; Stanley et al., 1994). Una de les principals vies activades després de la interacció del receptor amb el lligand M-CSF, és la via d'activació Raf-MEK (MAPK/ERKkinase)-ERK1/2 (*Extracellular signal Regulated Kinase 1/2*), la fosforilació de la qual ha demostrat tenir un paper crític en la proliferació dels macròfags (Valledor et al., 1999). En funció del temps de fosforilació d'ERK, els macròfags entren en proliferació o aturen la fosforilació i s'activen. Una activació curta i primerenca d'ERK està associada amb la proliferació, mentre que una fosforilació més tardana i llarga induïx l'activació proinflamatòria dels macròfags (Valledor et al., 2000). De fet, la fosforilació d'ERK depèn de la fosfatasa MKP-1. En funció de quan s'indueix aquesta fosfatasa, en dependrà la duració de l'activació d'ERK. La incubació dels macròfags amb LPS o IFN- $\gamma$ , aturen la proliferació mitjançant el control de la inducció d'MKP-1, el qual produeix llavors un allargament del temps de la fosforilació d'ERK (Valledor et al., 2008). Totes aquestes dades han sigut revisades recentment pel nostre grup (Comalada et al., 2012) (Figura 2).



**Figura 2: La duració de la fosforilació d'ERK determina la proliferació o l'activació dels macròfags.** Després de la unió del lligand als receptors indicats, els dos estímuls per a la proliferació (M-CSF) o per a l'activació (LPS) indueixen Raf-1, PKCε i l'activació de JNK, així com també la fosforilació de c-Jun. De la durada de la fosforilació d'ERK en depèn que els macròfags proliferin (esquerra) o s'activin (dreta). Finalment, la fosforilació d'ERK depèn de la inducció de MKP-1. (Comalada et al., 2012).

L'M-CSF és essencial en la regulació de macròfags tròfics durant el desenvolupament (Pollard, 2009). El receptor M-CSFR és un dels primers marcadors expressats en aquestes cèl·lules, indicant així la importància de l'M-CSF en la diferenciació i en la propagació dels macròfags des d'estadis primerencs del desenvolupament (Ovchinnikov et al., 2008; Sasmono et al., 2003). Una absència d'M-CSF resulta en un rang d'anormalitats del desenvolupament, incloent defectes en l'esquelet, neurològics, en el creixement i la fertilitat (Dai et al., 2002; Wiktor-Jedrzejczak et al., 1990; Yoshida et al., 1990), derivats principalment de la severa deficiència en macròfags tissulars. L'M-CSF no té funcions redundants en el desenvolupament, ja que l'administració de GM-CSF no és capaç de corregir els dèficits en el creixement i en els defectes esquelètics en els models murins deficientes en M-CSF (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1994). Curiosament, en humans, l'M-CSF està associat amb la polarització dels macròfags cap a un

fenotip antiinflamatori, mentre que el GM-CSF s'associa amb característiques fenotípiques proinflamatòries (Fleetwood et al., 2007; Hamilton, 2008; Verreck et al., 2004).

### ***Activació dels macròfags***

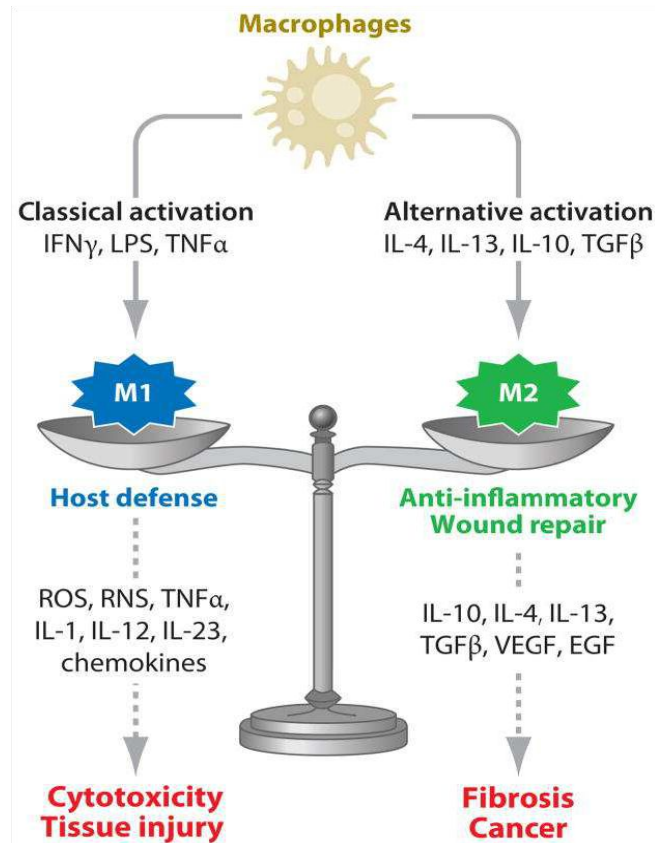
Els macròfags juguen una funció clau en el sistema immunitari com a cèl·lules efectores reguladores. Aquestes cèl·lules poden jugar papers centrals en la immunitat innata i adaptativa, i actuar a partir de diferents mecanismes: a) directament, mitjançant la destrucció de bacteris, paràsits, virus i cèl·lules tumorals; b) indirectament, com a reguladors d'altres cèl·lules gràcies a l'alliberació de mediadors com ara IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, factors de creixements, proteïnes del complement, i mediadors de la inflamació (leucotriens i prostaglandines); c) com a cèl·lules accessòries, processant antígens i presentant-los als limfòcits T, induint la seva activació; i d) mitjançant la reparació de teixits danyats (cicatrització de ferides) i l'eliminació de cossos apoptòtics i de restes cel·lulars (Mantovani et al., 2002; Xaus et al., 2001b).

El terme "activació" dels macròfags va ser introduït inicialment per Mackaness a la dècada del 1960 en un context infecció per tal de descriure l'activitat bactericida dels macròfags dependent d'antigen, però no específicament augmentada, en front a una segona exposició al bacil Calmette-Guerin (BCG) i a la Listèria (Mackaness, 1962). L'augment de l'activació estava vinculada a una resposta Th1 i a la producció d'IFN- $\gamma$  a través de les cèl·lules immunitàries activades per antigen (Celada et al., 1984; Nathan et al., 1983; Pace et al., 1983). Aquesta activitat proinflamatòria es diu activació clàssica o M1.

L'activació dels macròfags és un procés complex i altament regulat. Aquest procés comporta diversos canvis morfològics, bioquímics i modificacions funcionals que porten a l'increment de l'habilitat de les cèl·lules en activitats complexes, com per exemple en la presentació d'antígens i en l'activitat bactericida. El principal activador endogen dels macròfags és l'IFN- $\gamma$ . Altres molècules presents en microorganismes com el lipopolisacàrid (LPS), un component de la membrana externa dels bacteris Gram-negatius, també són potents activadors. A més, altres molècules com el GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-2 i IL-4, i TNF- $\alpha$  poden augmentar o directament activar els macròfags (Adams and Hamilton, 1987; Celada and Nathan, 1994) (Figura 3 i Figura 4 M1).

D'altra banda, l'activació antiinflamatòria dels macròfags anomenada alternativa, o M2, és induïda *in vitro* per citocines Th2 com la IL-4 i la IL-13, i tenen efectes oposats a l'activació clàssica (Martinez and Gordon, 2014). Aquest tipus d'activació inhibeix l'activació clàssica i

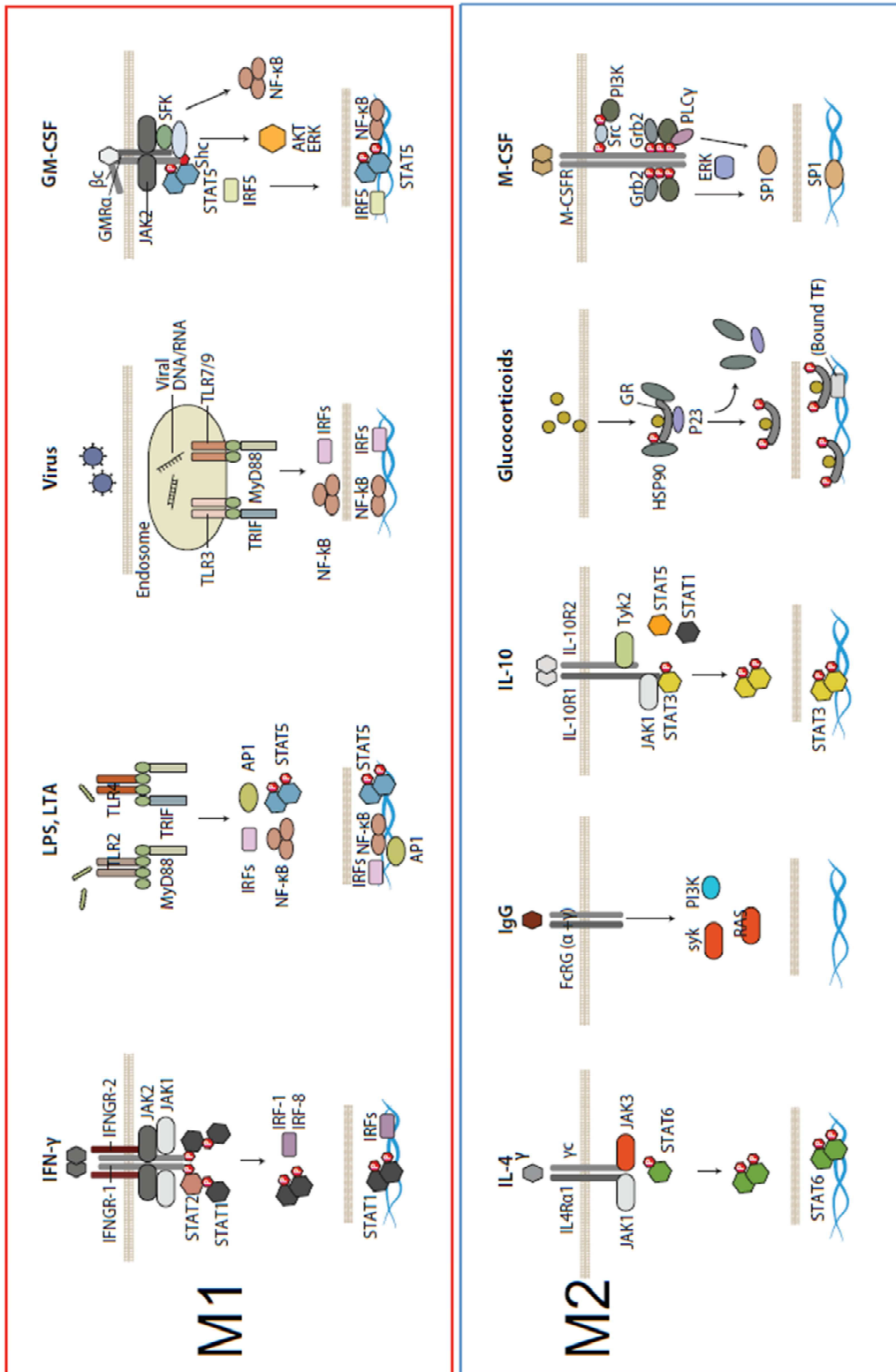
indueix els seus efectes, els quals són antiinflamatoris i de reparació dels danys als teixits, i poden exercir funcions immunoreguladores i actuar en el procés de cicatrització dels teixits (Figura 3 i Figura 4 M2) (Laskin et al., 2011).



**Figura 3: Model d'activació clàssica i alternativa de macròfags.** En presència de diferents citocines, els macròfags esdevenen en cèl·lules activades M1 o M2, i actuen ja sigui en la defensa de l'hoste o en la reparació de teixits. La cronicitat de qualsevol dels dos tipus provoca diverses malalties. (Laskin et al., 2011).

La població M1 té activitat proinflamatòria i contribueix a la lesió tissular. L'activitat dels macròfags M1 s'equilibra amb la població M2 (antiinflamatoris), que estan implicats principalment en la regulació negativa de la inflamació i en l'inici de la reparació de danys tissulars. Tot i això, cal dir que la classificació dels macròfags en dos estats polaritzats (M1 i M2) simplifica en excés les complexes activitats funcionals d'aquestes cèl·lules (Mosserand Edwards, 2008).





**Figura 4: Estímuls M1 i M2.** Dins del model d'activació de macròfags M1-M2, l'IFN- $\gamma$ , l'LPS, partícules virals, GM-CSF i TNF- $\alpha$  estan induint a una activació amb fenotip M1. L'activació M2 és subdividida per donar cabuda a les similituds i diferències entre la IL-4, la IL-10 i el GM-CSF, amb el complex immune=ligands de TLR, i glucocorticoids. (Martinez and Gordon, 2014).

## **Els Interferons**

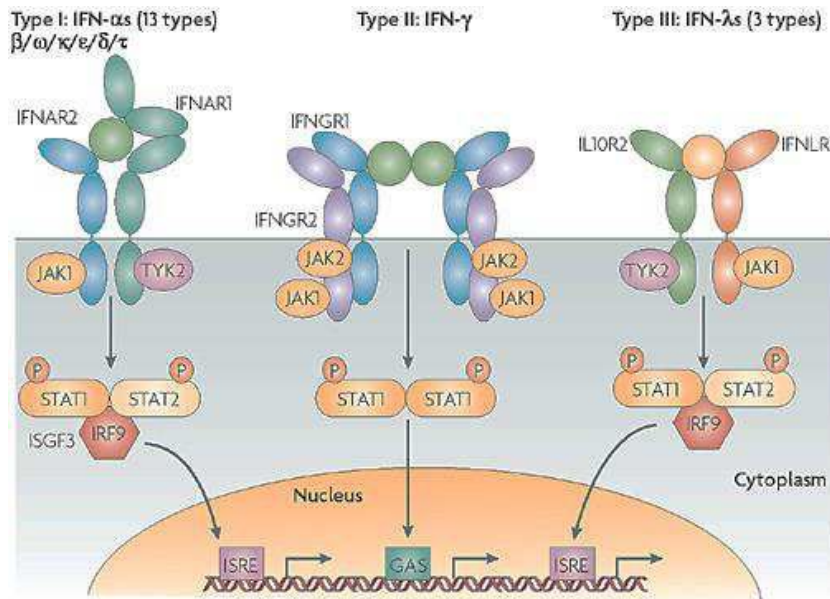
Els interferons són citocines que juguen una funció molt important en la resistència a mamífers en front de patògens (Stark et al., 1998). Els interferons de tipus I són una gran família de citocines estructuralment relacionades, les quals intervenen en la resposta primerenca innata en front d'infeccions virals. Hi ha molts tipus d'IFN de tipus I, on tots tenen una considerable homologia estructural i estan codificats per gens situats en un únic clúster al cromosoma 9. En humans, els IFN-I inclouen l'IFN- $\alpha$  (el qual a la vegada es pot dividir en 13 subtipus diferents), IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  i IFN- $\omega$  (Borden et al., 2007).

La família d'IFN de tipus III consisteix en tres subtipus d'IFN- $\lambda$ , els quals estan coproduïts amb IFN- $\beta$  i activen la mateixa via de senyalització que els IFN-I. La diferència entre ambdós tipus d'IFN és que els IFN-III han evolucionat cap a una estructura de receptor completament diferent (Uzé and Monneron, 2007).

En contrast als tipus I i III d'IFN, només hi ha un tipus d'IFN de tipus II, l'IFN- $\gamma$ . Aquesta molècula és la principal citocina endògena activadora de macròfags, i té funcions crítiques en la immunitat innata i adaptativa mediada per cèl·lules, en front de microbis intracel·lulars. L'IFN- $\gamma$  no té cap semblança estructural amb els IFN-I, encara que també és important per a l'eliminació de la infecció vírica. L'IFN- $\gamma$  també té altres activitats funcionals incloent els efectes antiproliferatius en un ampli rang de tipus cel·lulars (Valledor et al., 2008; Xaus et al., 1999) (Figura 5). A més a més, l'IFN- $\gamma$  activa o inhibeix a macròfags més de 400 gens diferents (Borden et al., 2007).

L'IFN- $\gamma$  és una proteïna homodimèrica produïda per les cèl·lules NK i les cèl·lules T (CD4<sup>+</sup> Th1 i CD8<sup>+</sup>). Estudis posteriors van demostrar que les cèl·lules B també secreten IFN- $\gamma$  (Carnaud et al., 1999; Harris et al., 2000). Les cèl·lules NK secreten IFN- $\gamma$  en resposta a lligands activadors a la superfície de les cèl·lules hoste infectades o estressades, o en resposta a la IL-12. L'IFN- $\gamma$  té una funció rellevant en l'eliminació d'infeccions bacterianes intracel·lulars. Juntament amb el lligand CD40, IFN- $\gamma$  millora la funció microbicida dels macròfags mitjançant l'estimulació de la síntesi de ROS i d'NO. L'IFN- $\gamma$  fa aquests efectes principalment mitjançant la inducció de l'activació transcripcional dels gens que codifiquen pels enzims requerits. Aquesta citocina també és una forta inductora de l'expressió del complex principal d'histocompatibilitat (MHC) de classe I i II, conduint així a l'activació del sistema immunitari adaptatiu a través de la presentació d'antígens (Bruce et al., 2004; Cullell-Young et al., 2001). Finalment, l'IFN- $\gamma$  indueix l'expressió d'IFN-I. L'efecte net d'aquestes activitats de l'IFN- $\gamma$ , és promoure reaccions inflamatòries en els

macròfags. No obstant això, l'expressió aberrant d'IFN- $\gamma$  s'associa amb un elevat número de malalties autoinflamatòries i autoimmunitàries (Borden et al., 2007; Meyer, 2009).



**Figura 5: Els tres tipus d'IFN amb els seus respectius receptors i les vies de senyalització.** Les vies de senyalització depenen de la fosforilació i la dimerització d'STAT. (Borden et al., 2007).

L'IFN- $\gamma$  és expressat en forma d'homodímer no covalent, el qual es compon per dues cadenes polipeptídiques amb una massa molecular de 17kDa cadascuna. El dímer biològicament actiu és format per dos monòmers de forma antiparal·lela N-glicosilada i una massa molecular de 50kDa. L'estructura antiparal·lela permet a l'IFN- $\gamma$  d'unir-se a dos receptors de manera simultània. El receptor d'IFN- $\gamma$  es troba expressat a la superfície de tots els tipus de cèl·lules nucleades. Aquest receptor és un heterodímer complex format per dues subunitats: la cadena  $\alpha$  (IFN $\gamma$ R1) de 90kDa, i responsable de la unió amb el lligand; i la cadena  $\gamma$  (IFN $\gamma$ R2), amb un pes molecular d'aproximadament 65kDa i associat amb la maquinària d'activació de la senyalització cel·lular (Bach et al., 1997). Quan l'IFN- $\gamma$  s'uneix a la subunitat IFN $\gamma$ R1 del receptor, s'indueix l'heterodimerització de les subunitats IFN $\gamma$ R1 i IFN $\gamma$ R2, cosa que induïx a l'associació de les cinases Jak1 i Jak2 al receptor. En aquest complex, Jak1 i Jak2 es transactiven l'una a l'altra i a la vegada fosforilen IFN $\gamma$ R1, cosa que forma un parell de llocs d'unió d'STAT1, anomenats SH2. Després d'associar-se als llocs SH2, les dues molècules de STAT1 queden molt pròximes a les cinases associades al receptor, fent que les molècules d'STAT1 es fosforilïn en la posició tirosina 701. Aquestes molècules d'STAT1 fosforilades en la tirosina, es transloquen al nucli i actuen com a factor de transcripció. Les seqüències d'unió d'STAT1 presents a determinats gens, s'han anomenat caixes GAS (*Gamma-Activated Site*) i caixes ISRE (*Interferon-Stimulated Response*

*Element*). Els gens amb seqüències GAS o ISRE són coneguts com a gens estimulats per IFN (ISG, de l'anglès *IFN-Stimulated Gens*), i és necessària la unió d'STAT1 per tal d'induir la seva expressió (Kearney et al., 2013).

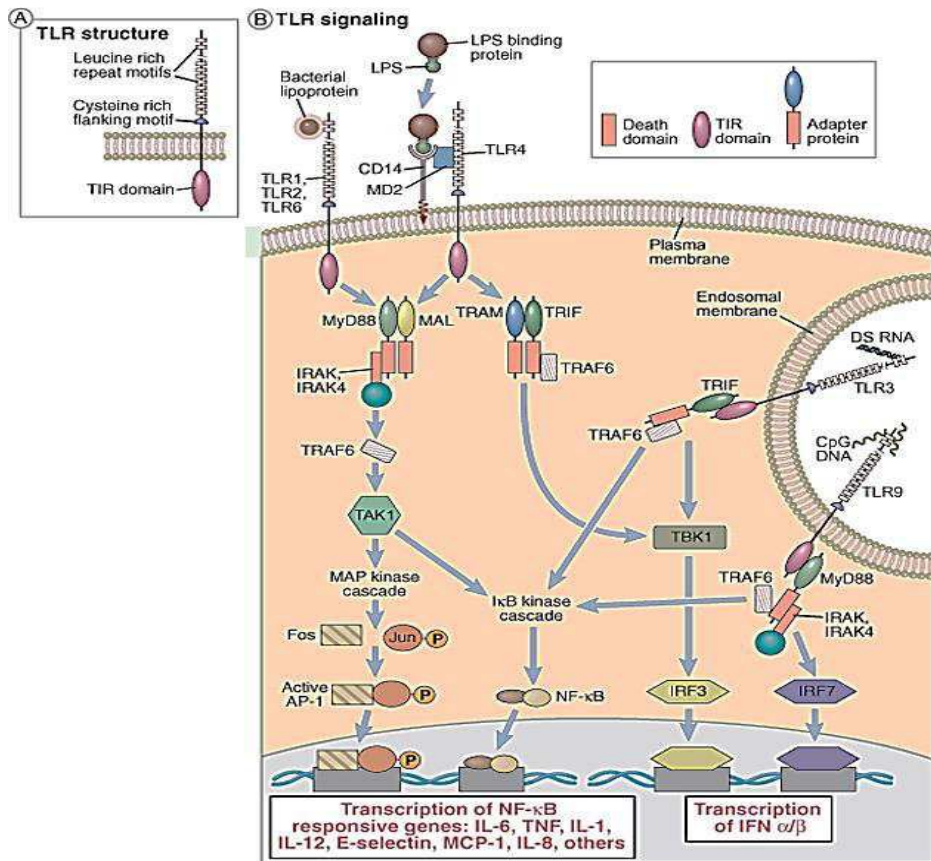
La majoria dels vertebrats també contenen un segon lloc de fosforilació a l'extrem C-terminal, de manera regulada per estímuls. En aquest cas, es tracta d'una serina continguda dintre d'un motiu P(M)SP, el qual es troba no només a STAT1 sinó també a STAT3, STAT4, STAT5a i STAT5b. La serina en posició 708 (S708) d'STAT1, és fosforilada en resposta a IFN-I a través de IKK $\epsilon$ , una modificació necessitada per ISGF3 per activar un grup de gens estimulats per IFN (Tenoever et al., 2007). De manera similar, STAT1 requereix de la fosforilació en S708 per tal d'activar l'expressió del gen *Ifit2*, activant la immunitat innata que restringeix la infecció pel virus WestNile (Perwitasari et al., 2011). Recentment, també s'ha vist que la fosforilació S708 inhibeix l'homodimerització d'STAT1 però no la formació de ISGF3, regulant així de manera diferencial les senyals dependent d'STAT1 en resposta a IFN-I i IFN-II (Ng et al., 2011). Per tant, mutacions en aquesta posició provoquen una alteració de l'activitat del factor de transcripció STAT1, independentment de la fosforilació en tirosina (Decker and Kovarik, 2000).

### Lipopolisacàrid (LPS)

L'LPS, també conegut com a lipoglicà o endotoxina, es troba a la membrana externa dels bacteris Gram-negatius. Es comprèn de l'antigen O, un nucli d'oligosacàrid i el lípid A. Mentre que l'antigen O varia en funció de l'espècie, el lípid A és una regió invariable i és l'únic que és detectat pel sistema immunitari, amb un efecte proinflamatori (Miller et al., 2005). L'LPS s'uneix a una proteïna present en el plasma anomenada proteïna d'unió a LPS (LBP), i és llavors que aquest complex s'uneix al receptor CD40 present a la superfície cel·lular de macròfags i de cèl·lules dendrítiques. La part de l'LPS és llavors reconeguda pel receptor TLR4 (*toll-like receptor 4*). En macròfags, l'LPS indueix la síntesi de citocines com ara TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN $\alpha/\beta$ , TGF- $\beta$  i altres metabòlits com ROS i NO, a través de la inducció de NOS2 o iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*).

L'estructura del TLR4 es compon de repeticions extracel·lulars riques en leucina (LRRs) en forma de ferradura. La part intracel·lular del TLR4 està composta per dominis del receptor *toll/interleukine-1* (TIR). Quan l'LPS s'uneix al receptor, el TLR4 acobla dues vies diferents de senyalització, cadascuna de les quals utilitza un parell diferent d'adaptadors de proteïnes de la família TIR. En la via dependent de MyD88, es troben involucrades MyD88 i Mal/TIRAP en l'activació de NF- $\kappa$ B a través d'IRAK, TRAF-6 i TAK1. La segona via de senyalització és MyD88

independent però TRIF dependent, on TRAM i TRIF porten a l'activació de l'IRF-3 (*Interferon Response Factor-3*) a través de TBK1 (Fitzgerald et al., 2003). IRF-1 és un factor de transcripció que augmenta l'expressió d'IFN-I. Per tant, de la senyalització a través de TLR4 també en pot resultar l'expressió d'una àmplia varietat de gens inflamatoris i antivírics (Abul K. Abbas et al., 2007; Dauphinee and Karsan, 2005) (Figura 6).



**Figura 6: Estructura del receptor Toll-like receptor i les vies de senyalització.** El TLR4 és activat per LPS, activant al seu torn les dues vies de senyalització MyD88 dependent i MyD88 independent. La senyalització a través de la via dependent de MyD88 és responsable de l'activació d'NF-κB de manera primerenca i de l'activació de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), les quals faciliten la inducció de citocines proinflamàtoies. La senyalització dependent de TRIF porta a l'activació d'IRF3, la qual culmina en la inducció d'IFN-β i de gens induïbles per IFN. Aquestes vies de senyalització també porta a l'activació de manera secundària d'NF-κB i de MAPK, la qual cosareforça la resposta de defensa. (Abul K. Abbas et al., 2007).

### Interleucina 4 (IL-4)

La IL-4 és una glicoproteïna amb un pes molecular de 20kDa, i produïda per limfòcits Th2, eosinòfils, basòfils i macròfags. Tant la IL-4 com la IL-13 són citocines Th2 que normalment són sobreexpressades en desordres al·lèrgics, tenen efectes profibròtics i remodeladors, i estan implicades en diverses malalties que inclouen l'asma, la dermatitis atòpica, l'esquistosomiasi i la

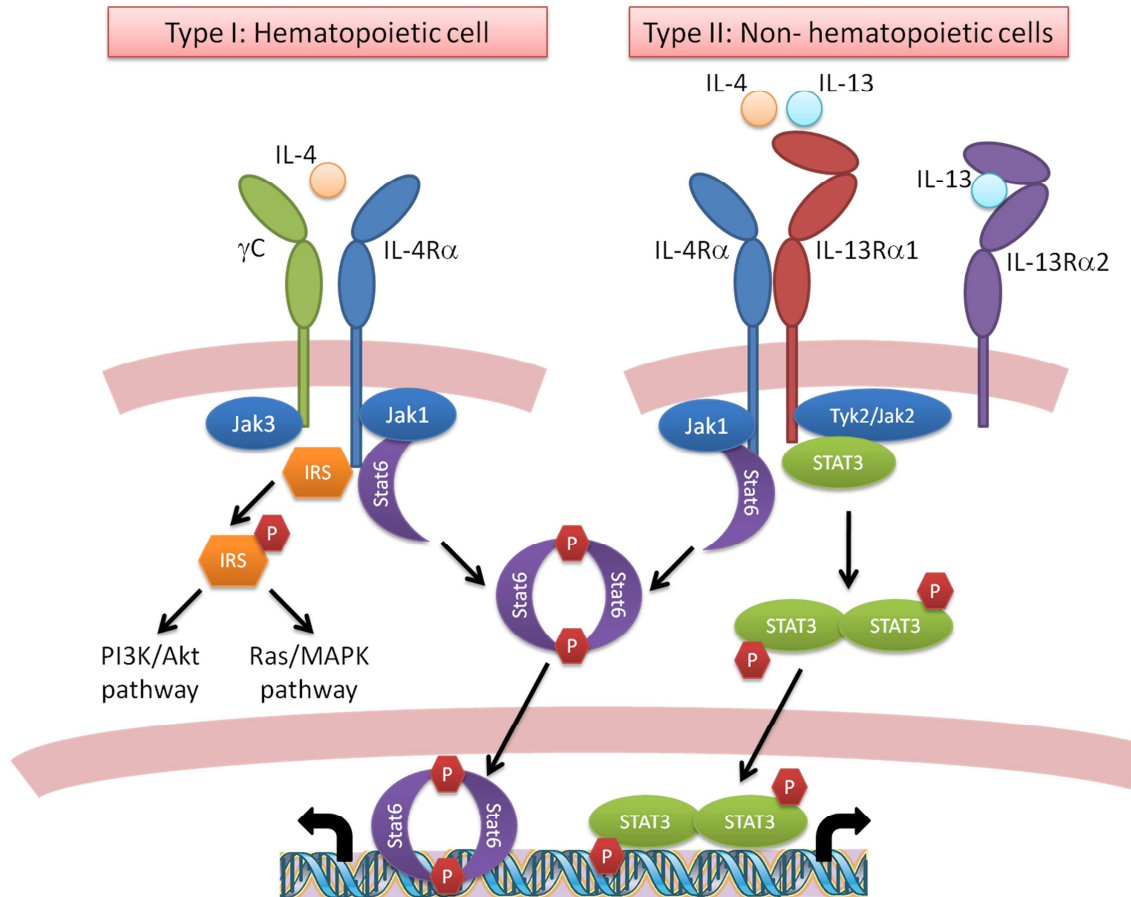
colitis crònica (Fulkerson et al., 2006; Kaviratne et al., 2004; Wynn, 2008). La IL-4 indueix la fusió dels macròfags i provoca el decreixement de la funció de fagocitosis. També actua com a molècula antiinflamatòria al bloquejar la síntesi d'IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6, inhibint l'activació clàssica i promovent l'activació alternativa dels macròfags cap a M2. Aquests sintetitzaran el receptor de manosa (MRC1), IL-10 i TGF- $\beta$ , resultant en una disminució de la inflamació patològica i activant el procés de reparació de ferides i fibrosi.

Tant la IL-4 com la IL-13 indueixen l'expressió de marcadors d'activació de fibroblasts ( $\alpha$ -SMA, fibronectina, CTGF) i, a fibroblasts humans i cèl·lules estrellades, regulen l'expressió de proteïnes de la matriu (col·lagen, MMP, periostina) (Aoudjehane et al., 2008; Liu et al., 2011; Moriya et al., 2011; Postlethwaite et al., 1992). A més d'aquests efectes profibròtics, les dues citocines també poden provocar la inducció dels fibroblasts per a la producció de substàncies proinflamatòries, incloent la eotaxina quimioattractant d'eosinòfils (Hoeck and Woisetschlager, 2001a, 2001b).

La subunitat IL-4R $\alpha$  del receptor de la IL-4, pot heterodimeritzar amb la subunitat cadena- $\gamma$  ( $\gamma$ C), formant el receptor de tipus I de la IL-4, mentre que la subunitat IL-13R $\alpha$ 1 no pot formar aquest heterodímer (Kelly-Welch et al., 2003). Aquest receptor de tipus I és predominant en cèl·lules d'origen hematopoètic com ara limfòcits i granulòcits. La subunitat  $\gamma$ C està associada amb Jak3, la qual s'activa amb la unió de la IL-4 al receptor (Figura 7). El receptor de tipus II és majoritàriament expressat en cèl·lules d'origen no hematopoètic, com cèl·lules epitelials i fibroblasts. Quan la IL-4 o la IL-13 s'uneixen al receptor, les dues subunitats del receptor heterodimeritzen i incrementen l'activitat de Jak. La subunitat IL-13R $\alpha$ 1 activa Jak2 i/o Tyk2. La subunitat IL-4R $\alpha$  activa Jak1. Posteriorment, es dona la fosforilació de molècules de senyalització com STAT3 o STAT6, així com també es produeix la fosforilació del substrat receptor d'insulina (IRS). Una vegada fosforilat, STAT6 dimeritza i es transloca al nucli per tal d'iniciar la transcripció dels seus gens diana com l'eotaxina-3 (Blanchard et al., 2007). De manera similar, STAT3 dimeritza després de la fosforilació i es transloca al nucli per iniciar la transcripció (Figura 7).

La IL-4 i la IL-13 comparteixen molts dels efectes biològics, probablement perquè ambdues citocines s'uneixen al receptor tipus II de la IL-4, el qual es compon per les subunitats IL-4R $\alpha$  i la IL-13R $\alpha$ 1 (Jiang et al., 2000; Kelly-Welch et al., 2003; Kruse et al., 2002). Les cues citoplasmàtiques d'aquestes subunitats estan associades amb tirosina cinases de la família Janus (Jak 1-2 i Tyk2). Així doncs, la variabilitat en l'activació de les subunitats del receptor és el que pot donar les diferències funcionals entre la IL-4 i la IL-13 (Fallon et al., 2000; Kruse et al., 2002; McKenzie et al., 1998). Algunes cèl·lules com els macròfags, poden expressar ambdós tipus de

receptors (Junttila et al., 2008). La IL-13 també s'uneix amb una elevada afinitat a la subunitat IL-13R $\alpha$ 2 (Lupardus et al., 2010), que es creu que funciona com a receptor de reclam (Chiaramonte et al., 2003), encara que es tenen evidències del seu potencial senyalitzador en determinades



circumstàncies (Fichtner-Feigl et al., 2006; Zuo et al., 2010).

**Figura 7: Via de senyalització de les interleucines 4 i 13.** Quan els lligands s'uneixen als seus respectius lligands es dona l'heterodimerització, cosa que activa l'activitat de la Janus cinasa (JAK). Posteriorment, les molècules de senyalització STAT6 i STAT3, i el receptor d'insulina IRS, són fosforilades i activades. L'IRS pot iniciar altres vies de transcripció com ara PI3K/Akt i Ras/MAPK, regulant la supervivència i la proliferació. La funció de la subunitat IL-13R $\alpha$ 2 no és clara.

Les proteïnes IRS són una família de proteïnes citoplasmàtiques les quals funcionen com a intermediàries de la senyalització quan els seus residus de tirosina són fosforilats pels receptors de superfície cel·lular activats. La via de senyalització de l'IRS s'acobla a dues vies, PI3K/Akt i Ras/MAPK (Figura 7). En general, la via PI3K/Akt regula el creixement cel·lular, la supervivència i la síntesi de proteïnes, mentre que la via Ras/MAPK media la proliferació i la diferenciació cel·lular (Wynes and Riches, 2003; Wynes et al., 2004). Al 2004, el nostre grup va demostrar que la inducció de p21<sup>Waf1</sup> a través de la via PI3K/AKT és una resposta de

supervivència en macròfags. Els nostres resultats van demostrar que els factors de creixement en els macròfags funcionen a partir de dues vies: una per a la proliferació, mediada per ERK, i una segona per a la supervivència, la qual requereix les cinases PI3K/Akt i p21<sup>Waf1</sup> (Comalada et al., 2004).

El dèficit d'IL-4 en models animals, no afecta al nombre de macròfags així com tampoc afecta a la seva maduració, sinó que només té una afectació a la resposta immunitària en front de nematodes i algunes infeccions víriques (Van Dyken and Locksley, 2013; Martinez et al., 2009). En humans, els polimorfismes del receptor de la IL-4 estan associats amb el desenvolupament d'asma i atòpia (Beghé et al., 2003; Ford et al., 2009).

### ***Macròfags i inflamació***

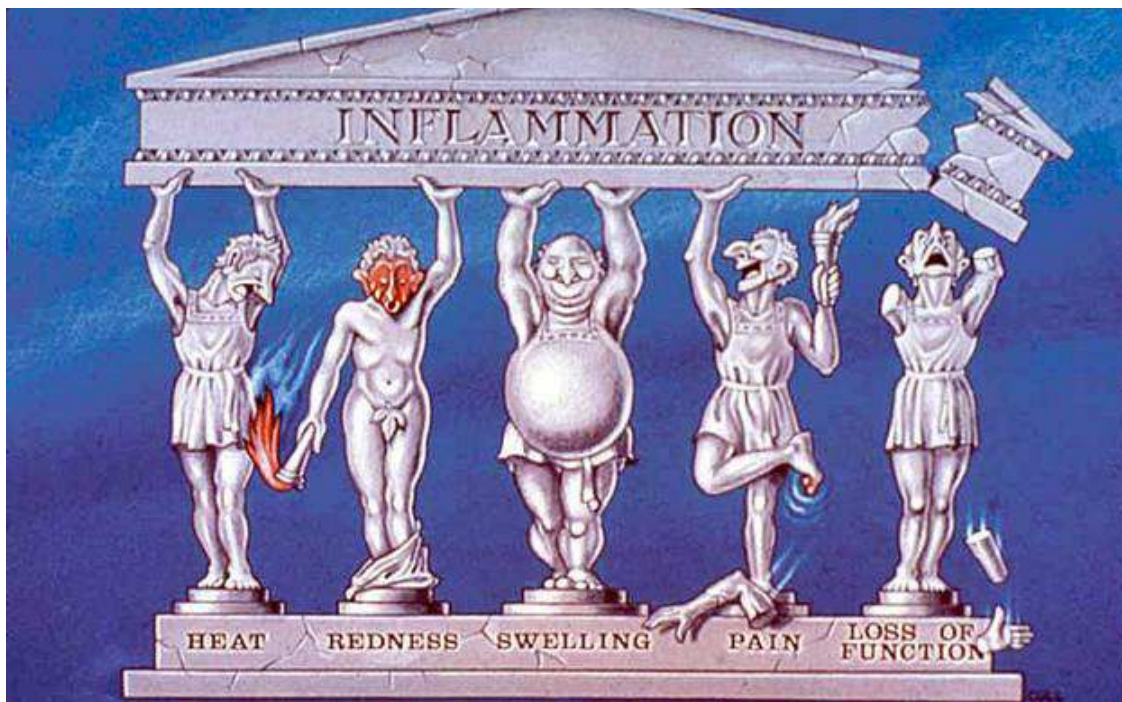
La inflamació és la resposta biològica dels teixits en front d'estímuls nocius de qualsevol origen, incloent danys físics, químics o agents biològics com patògens, cèl·lules danyades, etc. La inflamació és un intent de protecció de l'organisme per tal d'eliminar els estímuls nocius i tot seguit iniciar el procés de cicatrització. Els símptomes cardinals de la inflamació són: calor, envermelliment, tumor, dolor i pèrdua de funció, els quals ja van ser descrits per Celsus fa més de 2000 anys (Lawrence et al., 2002) (Figura 8). No obstant, molt poc se sap dels mecanismes que controlen la inflamació. En els últims anys, els estudis sobre inflamació han arribat a un gran moment. Durant la última dècada, s'ha acceptat àmpliament que la inflamació és una força impulsora darrere de les malalties cròniques que provoquen la mort a una gran part de la població: càncer, diabetis, obesitat, Alzheimer i aterosclerosi (Couzin-Frankel, 2010). Recentment, la diabetis s'ha associat amb la inflamació i diversos assajos clínics s'han dut a terme utilitzant silicilats (Donath and Shoelson, 2011), cosa que indica el canvi de conceptes sobre la inflamació.

La inflamació aguda és la resposta inicial del cos als estímuls nocius i s'aconsegueix mitjançant l'augment a la circulació de plasma i leucòcits als teixits lesionats. Una cascada d'esdeveniments moleculars es propaga i fa madurar la resposta inflamatòria, implicant el sistema vascular local, el sistema immunitari i diverses cèl·lules en el teixit lesionat. Si no s'eliminen els agents que causen la inflamació, llavors es dona una inflamació prolongada o inflamació crònica. Aquesta inflamació crònica condueix a un canvi progressiu en el tipus de cèl·lules presents al lloc de la inflamació, i es caracteritza per la destrucció i la curació del teixit després del procés inflamatori. Una destrucció progressiva del teixit posaria en perill la supervivència de l'organisme.



D'altra banda, la inflamació està associada a diverses situacions com ara la remodelació de teixits, que podrien tenir una participació fisiològica (com per exemple remodelació de la placenta durant l'embaràs o el desenvolupament dels canalicles de la mama), o en condicions patològiques com el càncer. Com s'ha dit anteriorment, un gran nombre de malalties cròniques estan associades amb la inflamació com l'esclerosi múltiple, l'aterosclerosi, la malaltia de Crohn i l'artritis reumatoide. Per aquesta raó, el procés inflamatori ha de ser estrictament regulat pel cos.

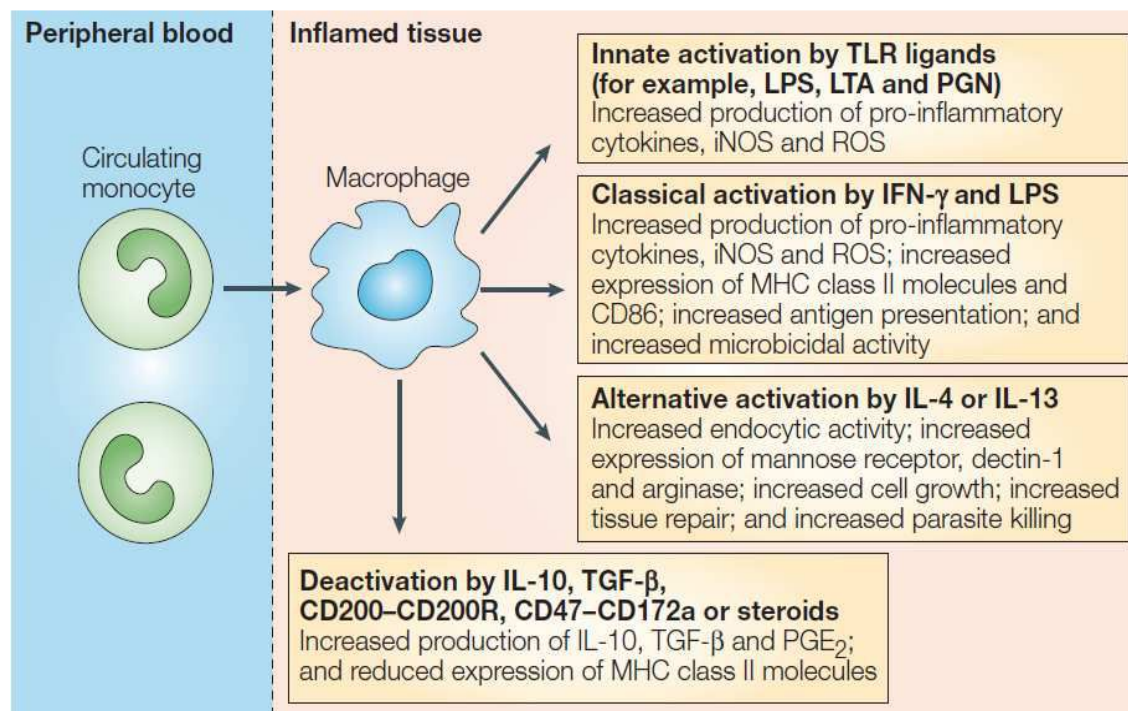
La cinètica d'arribada de les cèl·lules al focus inflamatori varia en funció del tipus cel·lular. Els neutròfils són les primeres cèl·lules que arriben al lloc d'inflamació, dins de les 24 hores següents a l'inici de la inflamació. Aquests elements del sistema immunitari són molt potents i destrueixen la majoria dels agents infecciosos mitjançant la fagocitació i la destrucció dels patògens.



**Figura 8: Els cinc signes cardinals de la inflamació.** Celsus ja va descriure els cinc símptomes de la inflamació fa més de 2.000 anys. Aquests signes són: calor, vermellor, tumoració, dolor i pèrdua de funció. (Lawrence et al., 2002).

Seguidament arriben els monòcits inflamatoris entre les 24 i les 48 hores següents, i aquests es diferencien en macròfags (Van Furth et al., 1973). Inicialment, els macròfags destrueixen els agents infecciosos restants i eliminen els cossos apoptòtics. Aquesta fase pro-inflamatòria, o M1, pot ser induïda en cultiu *in vitro* de macròfags amb IFN- $\gamma$  i/o LPS, i s'associa

amb una elevada activitat microbicida i amb la producció de citocines proinflamatòries. Després d'això, els macròfags reparen la majoria del dany als teixits. Per tal de fer aquesta activitat antiinflamatòria, els macròfags modifiquen el seu fenotip cap a una activació alternativa o M2. Aquesta activació alternativa pot ser induïda en cultiu *in vitro* mitjançant el cultiu dels macròfags juntament amb IL-4 o IL-13 (Gordon and Taylor, 2005). No obstant, malgrat la classificació dels macròfags en M1 i M2, la extensa plasticitat d'aquestes cèl·lules fa que sigui poc clar si el destí dels macròfags està marcat o és constantment mal·leable, i pot canviar de fenotip en funció de l'entorn al qual es troben exposats (Mosser and Edwards, 2008) (Figura 9).



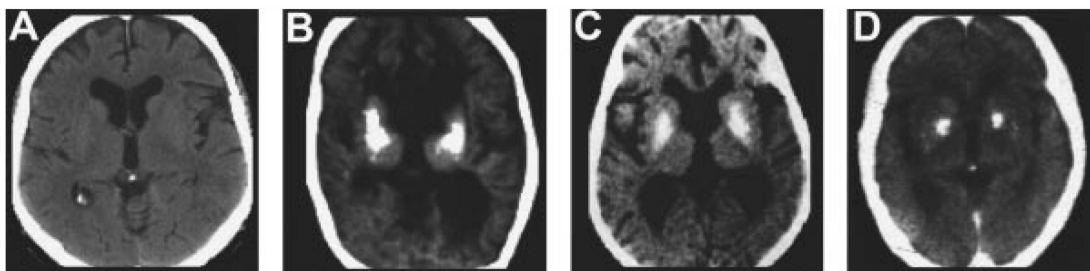
**Figura 9: Heterogeneïtat dels macròfags durant la inflamació.** En teixits inflamats, els monòcits inflamatoris mostren una elevada activitat microbicida i produeixen ROS (fase pro-inflamatòria). Després d'això, els macròfags generen un fenotip que promou la reparació dels teixits i suprimeix la inflamació (fase antiinflamatòria). (Gordon and Taylor, 2005).

A la inflamació vascular, els monòcits Ly6C<sup>high</sup> es converteixen principalment en macròfags inflamatoris M1, els quals es distingeixen per una secreció de citocines pro-inflamatòries, TNF- $\alpha$  i IL-6, i contribueixen a la degradació del teixit i a una activació de cèl·lules T. Aquests macròfags clàssicament activats i hipersensibles, poden causar danys en els teixits. D'altra banda, els macròfags M2 secreten citocines antiinflamatòries i contribueixen a la reparació del teixit. Tot i això, l'activació dels macròfags és, de fet, un procés dinàmic: les mateixes cèl·lules poden prendre part inicialment en una fase proinflamatòria i més tard participar en la resolució de la inflamació i en la cicatrització de ferides. No obstant això,

l'activació descontrolada de macròfags involucrats en la cicatrització de ferides poden ser causants de l'exacerbació de respostes citotòxiques i de respostes al·lèrgiques, així com també poden contribuir a la progressió de la hiperplàsia (Laskin, 2009; Mantovani et al., 2002; Martinez and Gordon, 2014; Mosser and Edwards, 2008).

## ***La síndrome d'Aicardi-Goutières***

La síndrome d'Aicardi-Goutières (AGS) va ser inicialment descobert el 1984 per Jean Aicardi i Françoise Goutières (Aicardi and Goutières, 1984). El primer pacient era un nen portuguès, el qual va ser erròniament diagnosticat inicialment com a una infecció vírica composta per toxoplasmosi, rubèola, citomegalovirus i l'herpes símplex. No obstant això, cap dels assajos serològics va donar cap pista d'una infecció viral. Clínicament, el nen mostrava espasticitat bilateral, distònia, espasmes oculars, microcefàlia adquirida i progressiva, i un curs ràpid cap a un profund deteriorament i finalment, la mort. A més de les calcificacions dels ganglis basals, un escàner de tomografia computada va mostrar una atròfia cerebral difusa i progressiva, i hipodensitats a la substància blanca. Més endavant es van trobar dos germans amb un mateix diagnòstic, que va donar la pista per poder proposar que es tractava d'un trastorn genètic amb herència autosòmica recessiva. Basats en casos previs relatats a la literatura, Jean Aicardi i Françoise Goutières van trobar altres 9 casos amb els mateixos símptomes (Figura 10). Posteriorment, es va detectar la presència d'alts nivells d'IFN- $\alpha$  al líquid cefaloraquídi (LCR) de la majoria dels nens afectats per aquesta malaltia (Lebon et al., 1988).



**Figura 10: Tomografia computada del cervell de diferents individus.** A les figures B i C es pot observar una calcificació als ganglis basals i una destrucció de la substància blanca. **A.** Individu normal. **B.** Pacient d'AGS. **C.** Infecció congènita del VIH. **D.** Lupus eritematós sistèmic. (Rigby et al., 2008).

La majoria dels noutats afectats per AGS no mostren signes o símptomes de la malaltia en néixer. Encara que la combinació de símptomes i indicis porten a una resposta del sistema immunitari en front d'una infecció congènita per la presència de l'elevada concentració d'IFN- $\alpha$ ,

no es troba cap infecció als lactants. Per això, s'ha referit a l'AGS com a un imitador d'una infecció congènita. Durant el primer any de vida, la majoria dels individus amb AGS, experimenten durant alguns mesos un episodi de disfunció cerebral greu (encefalopatia). Durant aquesta fase de la malaltia, els nadons afectats són molt irritables i no s'alimenten bé. Tot i l'absència d'infecció, poden desenvolupar febre (pirèxies estèrils) i poden patir convulsions. Aquests nens no només deixen de desenvolupar noves habilitats, sinó que també comencen a perdre les habilitats que ja han adquirit (regressió del desenvolupament). El creixement del cervell i del crani s'alenteix, del que resulta una mida de cap anormalment petita (microcefàlia). En aquesta fase de la malaltia es poden detectar al LCR leucòcits i molècules associades amb la inflamació. Aquestes troballes són consistents amb la inflamació i el dany tissular al sistema nerviós central (Chahwan and Chahwan, 2012; Fazzi et al., 2013).

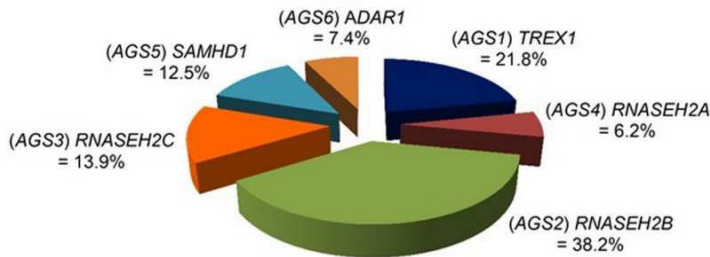
El fet que aquesta malaltia tingui símptomes autoimmunes, i el fet que alguns pacients amb l'AGS també es poden veure afectats pel lupus eritematós sistèmic (SLE), porta a pensar que hi ha una relació entre l'AGS i l'SLE (De Laet et al., 2005; Rice et al., 2007a). Una alteració de l'homeòstasi de l'IFN- $\alpha$  és una característica central dels trastorns autoimmunitaris. Com a l'SLE, la pertorbació del metabolisme de l'IFN- $\alpha$  és una característica molt important en el fenotip de l'AGS (Taula 1) (Rigby et al., 2008).

		AGS	SLE	Congenital viral infection
Origin		Genetic (single gene)	Multifactorial: complex genetic and environmental factors	Viral infection
Age at presentation		From birth to approx. 12 months	Generally late teens – 40 years of age	At birth
Neurological features	Basal ganglia calcification	+	+	+
	Destruction of white matter	+	+	+
	Microcephaly	+	-	+
Immunological features	Elevated levels of CSF IFN- $\alpha$	+	+	+
	Hypergammaglobinemia	+	+	+
	Autoantibodies	+/- <sup>a</sup>	+	-
Systemic features	Immunoglobulin deposits in skin <sup>b</sup>	+	+	-
	Thrombocytopenia	+	+	+
	Haemolytic anaemia	+ <sup>c</sup>	+	+
	Hepatosplenomegaly	+	- <sup>d</sup>	+
	Fever	+	+	+

**Taula 1: Resum de les característiques clíniques de l'AGS en comparació a l'SLE i les infeccions congènites virals.** <sup>a</sup>Els auto-anticossos nuclears s'han reportat en alguns pacients amb AGS. <sup>b</sup>Lesions similars a penellons amb deposició d'IgM. <sup>c</sup>En un petit nombre de pacients d'AGS també es pot trobar esplenomegàlia. (Rigby et al., 2008).

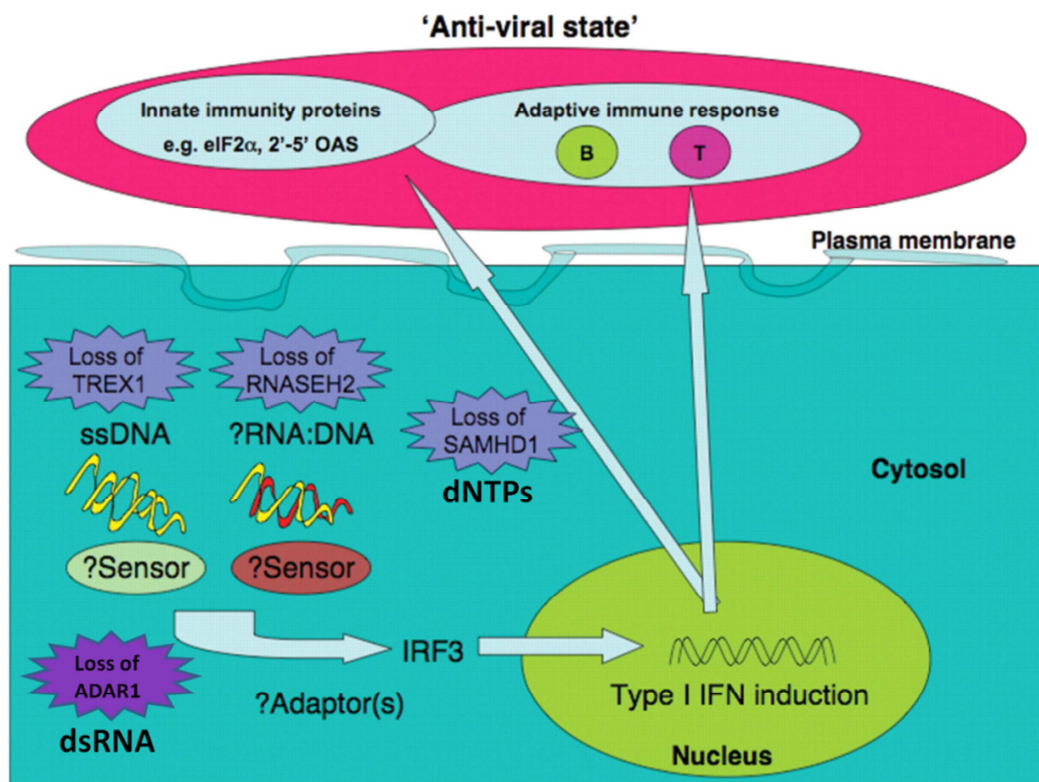
L'AGS és una malaltia genètica heterogènia associada amb mutacions al gen que codifica per a l'exonucleasa TREX1 (*Three Prime Repair Exonuclease 1*, AGS1) (Crow et al., 2006a), a qualsevol dels gens codificants per a les components de la RNASE H2 (*Ribonuclease H2*, RNASE H2B, AGS2; RNASE H2C, AGS3; RNASE H2A, AGS4) (Crow et al., 2006b), a la fosfo-hidrolasa

SAMHD1 (*SAM and HD domain containing protein 1*, AGS5) (Rice et al., 2009) o a la recentment descoberta ADAR1 (*Adenosine Deaminase Acting on RNA 1*, AGS6) (Crow, 1993; Rice et al., 2012) (Figura 11). Encara que més del 90% dels pacients tenen mutacions en algun d'aquests 6 gens, hi ha pacients amb AGS als quals no se'ls hi ha trobat cap mutació que pugui explicar el desenvolupament de la malaltia. Per aquest motiu, se segueixen investigant possibles gens associats amb l'AGS.



**Figura 11: Incidència en pacients amb AGS de mutacions en els diferents gens associats a la malaltia.** El gen que més freqüentment es troba mutat entre els pacients amb AGS és el codificant per a la subunitat RNASE H2B. (Crow, 2014).

Aquests gens tenen en comú que tenen com a substrat diferents tipus d'àcids nucleics. Una mutació en qualsevol d'aquests gens, provoca una acumulació d'àcids nucleics que comporta una sobreexpressió d'IFN- $\alpha$  i conseqüentment, l'activació del sistema immunitari (Figura 12).



**Figura 12: Model de patogènesi de la malaltia d'AGS.** Les mutacions que produeixen una disfunció de les proteïnes TREX1, RNASE H2, SAMDH1 o ADAR1, provoquen una acumulació de diferents tipus d'àcids nucleics, els quals són reconeguts per sensors citoplasmàtics encara desconeguts. Aquesta detecció porta

a la inducció d'IFN's de tipus I a través del factor de transcripció IRF3 d'una manera TLR-independent. (Adaptada de Crow and Rehwinkel, 2009).

Les funcions fisiològiques d'aquests enzims determinaran la naturalesa dels àcids nucleics que s'acumularan en cas d'una mutació o una pèrdua d'activitat de les proteïnes i, per tant, el coneixement d'aquestes funcions és fonamental per tal d'entendre la patogènesi de l'AGS.

Recentment s'ha descobert que mutacions al sensor citoplasmàtic de dsRNA *Irf1*, o també anomenat *Mda5*, estan associades amb l'AGS (Oda et al., 2014; Rice et al., 2014). Es van estudiar pacients amb AGS, basats en criteris neuroradiològics i amb sobreexpressió d'IFN- $\alpha$  al LCR i/o expressió a sang perifèrica de gens estimulats per IFN- $\alpha$ , i negatius per mutacions a qualsevol dels gens *TREX1*, *RNASEH2A*, *RNASEH2b*, *RNASEH2C*, *SAMHD1* o *ADAR1*. D'aquesta manera es van trobar tres casos que portaven una única variació de mutació al gen de *MDA5* (Oda et al., 2014; Rice et al., 2014).

## ***TREX1***

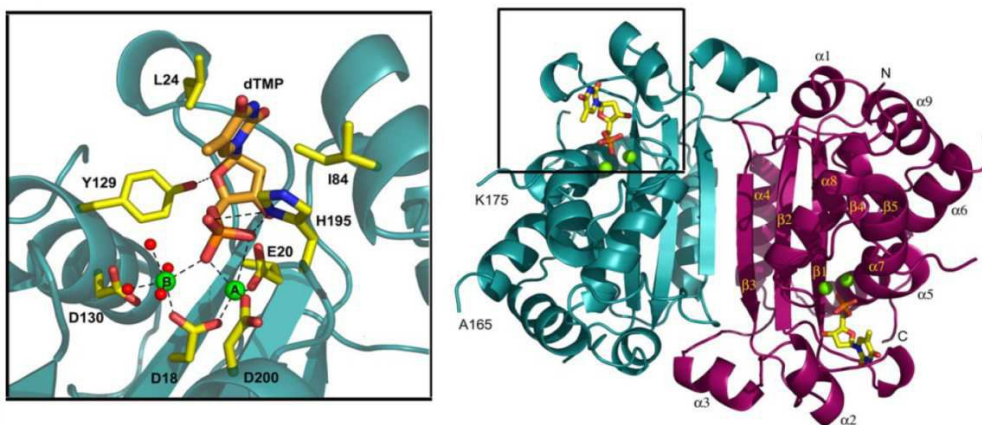
La proteïna *TREX1*, també anomenada DNASEIII, és l'exonucleasa més abundant en cèl·lules de mamífer. Actua en sentit 3'-5' (Lindahl et al., 1969) i no té ortòlegs en eucariotes inferiors, incloent el llevat. *TREX1* té una elevada expressió a la cèl·lula, tot i que la major part de la seva activitat enzimàtica es troba dins del nucli (Mazur and Perrino, 2001). Estudis *in vitro* van mostrar que *TREX1* degrada preferentment DNA de cadena senzilla (ssDNA), eliminant nucleòtids no coincidents a l'extrem 3' i, d'aquesta manera demostrant una funció molt important de *TREX1* en l'edició del DNA durant el procés de reparació per escissió de bases, i també durant la replicació del DNA (Höss et al., 1999). Tot i això, el ratolí knockout de *TREX1* (*TREX1*<sup>-/-</sup>) no exhibeix una major freqüència de mutacions espontànies o una major susceptibilitat a tumors, cosa que suggereix que *in vivo* pot tenir altres activitats funcionals (Morita et al., 2004). D'altra banda, de la mateixa manera que en els pacients d'AGS, els ratolins *TREX1*<sup>-/-</sup> presenten un fenotip inflamatori, però al contrari que en els pacients d'AGS, els ratolins mostren una cardiomiopatia inflamatòria i una afectació neurològica (Morita et al., 2004; Pereira-Lopes et al., 2013).

També s'ha proposat una altra funció de *TREX1* com a component del complex SET. Aquest complex està format per múltiples proteïnes associades al reticle endoplasmàtic. El complex SET representa una via de mort cel·lular independent de caspases, el qual també conté

l'endonucleasa NM23-H1 i la seva proteïna inhibidora. Quan aquest complex s'activa per la Granzima A o per un estrés oxidatiu, l'inhibidor SET és degradat i NM23-H1 es relocalitza al nucli per iniciar la mort cel·lular, actuant conjuntament amb TREX1 per a la degradació del DNA genòmic (Chowdhury et al., 2006).

Atès que TREX1 és una exonucleasa autònoma no processiva, s'han proposat diverses funcions biològiques per a aquest enzim, incloent la seva participació en funcions de correcció (*proofreading*). Una activitat similar s'ha observat per a la proteïna relacionada TREX2. Aquesta exonucleasa s'expressa àmpliament a teixits de ratolí i línies cel·lulars humanes (Chen et al., 2007), i interactua amb la DNA polimerasa  $\delta$ , augmentant així la fidelitat de copia de la polimerasa en condicions adverses (Shevelev et al., 2002).

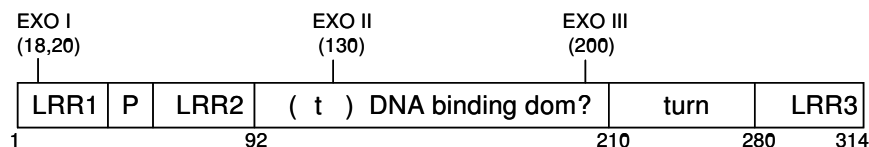
També s'ha demostrat que TREX1 es transloca al nucli després d'un dany cel·lular, ja que la colocalització de la proteïna amb BrdU al focus de replicació suggereix un paper en la reparació del DNA durant la replicació (Yang et al., 2007). Les cèl·lules amb un dèficit de TREX1 produeixen fragments de ssDNA de 60-65 parells de bases, els quals s'acumulen al reticle endoplasmàtic. Això fa pensar que TREX1 actua per prevenir la persistència de fragments ssDNA generats a partir dels àcids nucleics intermediaris de la replicació (O'Driscoll, 2008). La pèrdua de TREX1 també s'associa amb una activació crònica de la senyalització de la progressió del cicle cel·lular per ATM, i amb defectes en la progressió de  $G_1/S$  de fibroblasts embrionaris de ratolí i fibroblasts primaris humans amb mutacions a TREX1 (Yang et al., 2007).



**Figura 13: Estructura de TREX1.** A la dreta, es mostra l'homodímer de TREX1 (cada monòmer en un color diferent). A l'esquerra, es mostra el centre actiu de la proteïna, amb els residus participants en la unió amb el nucleòtid (àtoms grocs). També es mostren els dos ions de magnesi (MgA i MgB) i les molècules d'aigua (esferes verdes i vermelles, respectivament). (Brucet et al., 2007).

En el nostre grup, es va purificar i caracteritzar la proteïna recombinant de TREX1 sola o unida a DNA (Bruçet et al., 2007) (Figura 13). L'estructura de TREX1 està composta per tres regions repetides riques en leucina, dues a l'extrem N-terminal i una al mig, elevadament hidrofòbic. La regió C-terminal forma una regió hèlix transmembrana, i aquest domini és d'elevada importància per a la retenció de TREX1 al citoplasma. La pèrdua d'aquesta regió transmembrana provoca una translocació permanent al nucli (Bruçet et al., 2007). A més, es va demostrar que la unió al DNA no és aleatòria i que depèn d'una seqüència específica.

El gen de *TREX1* a humans es troba al cromosoma 3, mentre que a ratolí es troba al cromosoma 9, però en ambdós casos codifica a la cadena complementària. El gen comprèn dos exons, però el primer no és codificant. El centre actiu de la regió catalítica de TREX1 està compost per quatre residus essencials: Asp18, Glu20, Asp130 i Asp200, els quals determinen els motius Exo I, II i III, responsables de l'assemblatge dels dos ions de magnesi i l'oxigen dels fosfats de la molècula dels nucleòtids. Finalment, a la superfície de TREX1 hi ha una regió rica en prolines amb un motiu conservat "PPPVPRPP", la qual pot interactuar amb altres factors. Com que aquest motiu no té aminoàcids aromàtics, pot interactuar amb dominis tipus SH3 o tipus WW2. Mitjançant experiments de ressonància magnètica nuclear, es va demostrar que el domini poliprolina de TREX1 interactua amb el domini WW2 del factor d'elongació de la transcripció CA150 (Bruçet et al., 2007) (Figura14).



**Figura 14: Estructura secundària predita per a TREX1.** LRR, regió rica en leucines (*leucine rich repeat*); P, regió rica en prolines; turn, bucle sense estructura secundària determinada; EXO, motius exonucleasa (Bruçet et al., 2007).

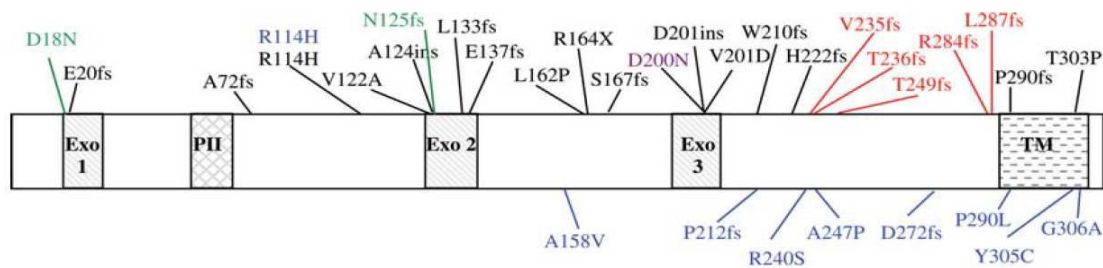
TREX1 pertany a la família DEDDh (també anomenada superfamília DnaQ), la qual es caracteritza per tenir quatre residus àcids, tres aspartats (D) i un glutamat (E), distribuïts en una seqüència dividida en tres fragments (Exo I, Exo II i Exo III). Els residus que formen aquest motiu DEDD contenen dos llocs d'unió per a dos ions divalents metàl·lics, essencials per a la catàlisi. En el cas de TREX1, els dos ions necessaris són dues molècules de magnesi, els quals li confereixen l'activitat exonucleasa. Aquesta activitat exonucleasa de TREX1 és inhibida per liti i sodi, els quals s'ha demostrat que tenen efectes inhibitoris en la hidròlisi d'unions fosfodièster (Albert et al., 2000; Patel et al., 2002). El liti i el sodi s'uneixen al lloc d'unió dels metalls catalítics, competint



directament amb la unió dels ions de magnesi i afectant a la coordinació, inhibint així l'activitat exonucleasa (Bruce et al., 2008).

La majoria de les mutacions en recessivitat de *TREX1* associades a l'AGS, es prediuen com a al·lels nuls. No obstant això, seguint la identificació de mutacions bial·lèliques a *TREX1* en pacients d'AGS, es van descriure mutacions en heterozigosi de *TREX1* en una malaltia anomenada *Familial Chilblain Lupus* (FCL), una forma cutània de SLE (Lee-Kirsch et al., 2006, 2007; Rice et al., 2007b). En casos rars, es dona una herència dominant d'AGS (Rice et al., 2007b), associada amb pacients amb un inici de microangiopatia cerebral-retinal associada amb el fenomen de Raynaud amb leucodistròfia cerebral (RVCL) (Richards et al., 2007).

Les mutacions patogèniques al gen de *TREX1*, així com també la variabilitat fenotípica dels malalts d'AGS, es pot explicar, almenys en part, pels residus implicats i la posició de les mutacions (Crow and Rehwinkel, 2009) (Figura 15).



**Figura 15: Representació esquemàtica de les mutacions al gen de *TREX1* amb les malalties associades a cada mutació.** Mutacions: en negre, recessives d'AGS; en violeta, dominants d'AGS; en verd, FCL; en blau, SLE; en vermell, RVCL. Exo1, 2 i 3 dominis; PII, domini poliprolina II; TM, domini transmembrana. (Crow and Rehwinkel, 2009).

La regió C-terminal del gen codifica per al domini transmembrana de *TREX1*, responsable de la immobilització de la proteïna al reticle endoplasmàtic i, és en aquesta regió on es troben totes les mutacions associades a la malaltia RVCL i la majoria de les causants de Lupus. Per tant, a les mutacions de *TREX1* associades amb RVCL i Lupus, s'ha demostrat que la causa de la malaltia és una mala localització de *TREX1*, més que no pas una pèrdua d'activitat de la proteïna. D'altra banda, mutacions en heterozigosi a D18 i D200 impliquen residus catalítics clau que, *in vitro*, s'ha demostrat que redueixen significativament l'activitat exonucleasa en front de ssDNA i inhibeixen l'activitat de la proteïna normal codificada per l'altre al·lel normal (Lehtinen et al., 2008). Cal fer l'incís de que alguns pacients d'AGS tenen mutacions al marc de lectura a l'extrem C-terminal, amb una considerable superposició amb les mutacions de pèrdua de sentit observades en pacients amb Lupus (Rice et al., 2007a). Aquestes observacions suggereixen que

alguns pacients d'AGS i els seus pares heterozigots tenen una elevada probabilitat de desenvolupar RVCL i SLE.

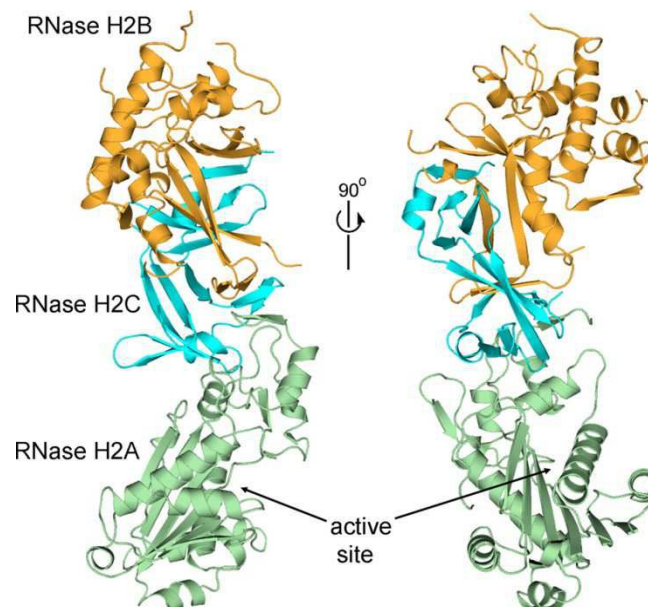
Al nostre laboratori, es va demostrar que *Trex1* es troba regulat per IFN- $\gamma$  durant l'activació dels macròfags. L'IFN- $\gamma$  regula positivament l'expressió del gen a nivell transcripcional a les poques hores d'activar les cèl·lules, però no afecta a la vida mitjana de l'mRNA, que es manté en 70 minuts. L'IFN- $\gamma$  activa la via d'STAT1, el qual es va veure que s'uneix a dues seqüències d'activació al promotor de *Trex1*, així com també s'hi uneix la proteïna c-Jun a una seqüència adaptadora de complex proteic 1 (Serra et al., 2011). A més a més, *Trex1* s'indueix per LPS i en resposta a altres estímuls proinflamatoris, incloent els lligands de TLR7 i TLR9. En absència de TREX1, també es va veure que els macròfags mostren una resposta proinflamatòria exacerbada. Aquestes cèl·lules mostren un augment de la producció d'IFN- $\alpha$  i TNF- $\alpha$ , elevats nivells de CD86 i un augment de la presentació d'antígens a cèl·lules T CD4<sup>+</sup>, així com també una disminució de la funció d'eliminació de cèl·lules T. Aquests resultats evidencien que TREX1 és un regulador negatiu de l'activació inflamatòria dels macròfags. Aquestes modificacions als macròfags poden explicar l'associació amb malalties autoimmunitàries com el SLE i a més, és una de les primeres evidències que associen la disfunció dels macròfags amb l'autoimmunitat (Pereira-Lopes et al., 2013).

## ***RNASE H2***

Les Ribonucleases H (RNASEH) són enzims que eliminen RNA dels híbrids d'RNA/DNA formats durant la replicació i la reparació. Hi ha dos tipus d'RNASE H en eucariotes: RNASE H1 (RNASE HI en procariotes), que ha adquirit un domini d'unió híbrid que confereix processivitat i afinitat pel substrat; i la RNASE H2, la qual està composta per tres subunitats diferents: RNASE H2A, la subunitat catalítica i similar en funció a la procariòtica i monomèrica RNASEHII, i les subunitats RNASE H2B i RNASE H2C, sense cap homòleg procariota (Shaban et al., 2010) (Figura 16).

Aquestes RNASEs comparteixen un motiu de plegament comú, l'anomenat RNASE H-fold, i comparteixen el mecanisme catalític basat en dos ions. El primer ió és requerit per a l'assistència en la formació del substrat amb nucleòtid i per a l'alliberació del producte, mentre que el segon ió és requerit per a la desestabilització del complex enzim-substrat, d'aquesta manera promouen la reacció de transferència del grup fosforil (Nowotny and Yang, 2006; Nowotny et al., 2005; Yang et al., 2006).

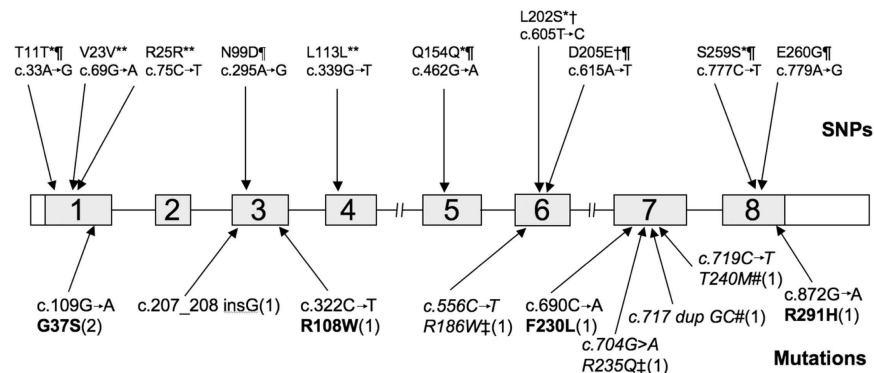
Els dos tipus d'RNASE H (H1 i H2) són capaços de degradar els híbrid RNA:DNA de manera endonucleolítica, però amb diferents funcions enzimàtiques i lloc d'activitat específics (Ohtani et al., 1999). Els enzims de tipus 2 tenen la capacitat distintiva de reconèixer ribonucleòtids únics incrustats a cadenes dúplex de DNA, mentre que els enzims de tipus 1 requereixen com a mínim quatre ribonucleòtids consecutius per tal de dur a terme la seva activitat (Eder and Walder, 1991; Hogrefe et al., 1990). A eucariotes, la RNASE H2 és la principal font cel·lular d'activitat ribonucleasa (Frank et al., 1998). A més, l'activitat RNASE H es troba a retrovirus com a un component crucial de la transcriptasa inversa, la qual converteix el genoma retrovíric ssRNA a dsDNA (Wöhrl and Moelling, 1990).



**Figura 16: Estructura del complex enzimàtic de la RNASE H2 murina.** El complex consisteix en les subunitats RNASE H2A (verd), RNASE H2B (groc) i RNASE H2C (blau), on la subunitat catalítica està situada a la subunitat H2A. (Shaban et al., 2010).

La RNASE H2A té la capacitat de degradar per si mateix poli(rA)/poli(dT) d'una manera processiva. Donades les diferències en processivitat entre la RNASEHII procariota i la RNASE H2 eucariota, l'habilitat de la RNASE H2 d'eliminar ribonucleòtids de manera processiva s'ha d'atribuir a la contribució dels components H2B i H2C. Es va veure que la subunitat H2B interactua amb l'antigen nuclear de proliferació cel·lular (PCNA) en el seu extrem C-terminal (Majka and Burgers, 2004). La PCNA és una proteïna essencial per a replicació i la reparació del DNA, ja que és responsable d'apropar a la forquilla de replicació la polimerasa d'elongació i altres factors que intervenen en el processament dels fragments d'Okazaki.

Una mutació a la glicina 37 (G37S) al gen de la subunitat H2A, provoca la pèrdua de la major part de l'activitat RNASE H. Aquesta glicina és molt conservada i es troba molt propera al centre catalític, provocant una disminució de l'activitat de la proteïna quan aquesta posició es troba mutada (Crow et al., 2006b; Rohman et al., 2008). També s'han vist pacients d'AGS amb mutacions a les subunitats H2B i H2C, on la mutació A177T a la subunitat H2B és la més observada entre els pacients (Crow et al., 2006b; Rice et al., 2007a).

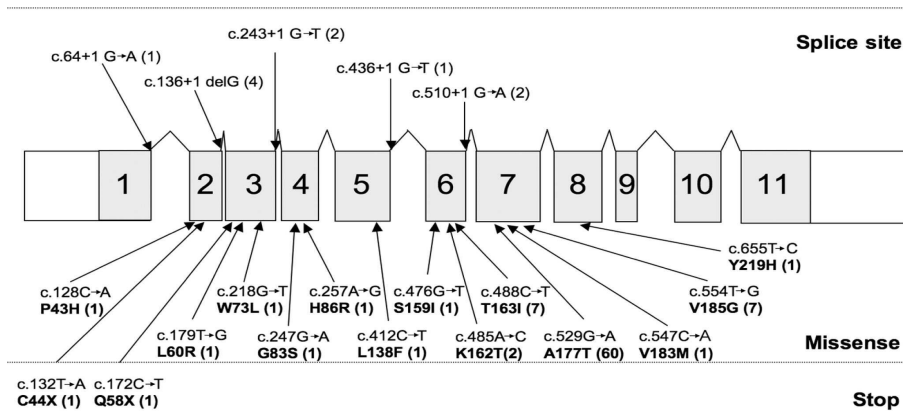


**Figura 17: Representació esquemàtica del gen de la Rnaseh2a, amb la posició de les mutacions identificades.** Les zones ombrejades amb els números indiquen els exons. Els números entre parèntesi després de les mutacions representen el nombre d'al·lels mutats trobats en pacients d'AGS. (Rice et al., 2007a).

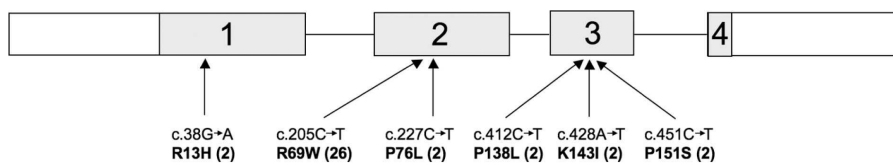
A diferència de *Trex1*, la gran majoria de les mutacions a qualsevol dels gens codificants per a qualsevol de les subunitats de la RNASE H2 són hipomòrfiques, i cal fer un incís en què no s'han observat mai mutacions bial·lèliques a qualsevol d'aquests gens (Rice et al., 2007a). Aquesta observació suggereix que aquests tipus de mutació pot ser letal o pot donar lloc a fenotips no reconeguts (Figures 17, 18 i 19). Estudis recents demostren que la majoria de les mutacions al complex de la RNASE H2, no alteren l'activitat endonucleasa. El fet de no trobar diferències en l'activitat *in vitro*, suggereix que els canvis en el muntatge, l'estabilitat o la localització del complex podrien ser importants en l'establiment del fenotip de la malaltia (Chon et al., 2009; Perrino et al., 2009).

El ratolí knock-out de la RNASE H2 ha sigut dissenyat de dues maneres diferents, les quals s'han dirigit a l'afectació de les subunitats H2B o H2C del complex (Hiller et al., 2012; Reijns et al., 2012). Els dos estudis van mostrar que la deficiència en la RNASE H2 en mamífers no és compatible amb la vida. Aquesta observació també la vam confirmar al nostre laboratori quan vàrem intentar construir un KO de la subunitat RNASE H2A sense èxit, ja que els animals es morien abans del naixement. Això és consistent amb el fet que totes les mutacions patogèniques

conegudes de la RNASE H2 són hipomòrfiques, cosa que també suggereix que individus amb cap tipus d'activitat RNASE H2 no són viables (Crow et al., 2006b; Reijns et al., 2012).



**Figura 18: Representació esquemàtica del gen de la Rnaseh2b, amb la posició de les mutacions identificades.** Les zones ombrades amb els números indiquen els exons. Les variants d'*splicing* i les mutacions que provoquen un *stop*, sempre són a mutacions sense sentit. (Rice et al., 2007a).



**Figura 19: Representació esquemàtica del gen de la Rnaseh2c, amb la posició de les mutacions identificades.** Les àrees ombrades amb números indiquen els exons. (Rice et al., 2007a).

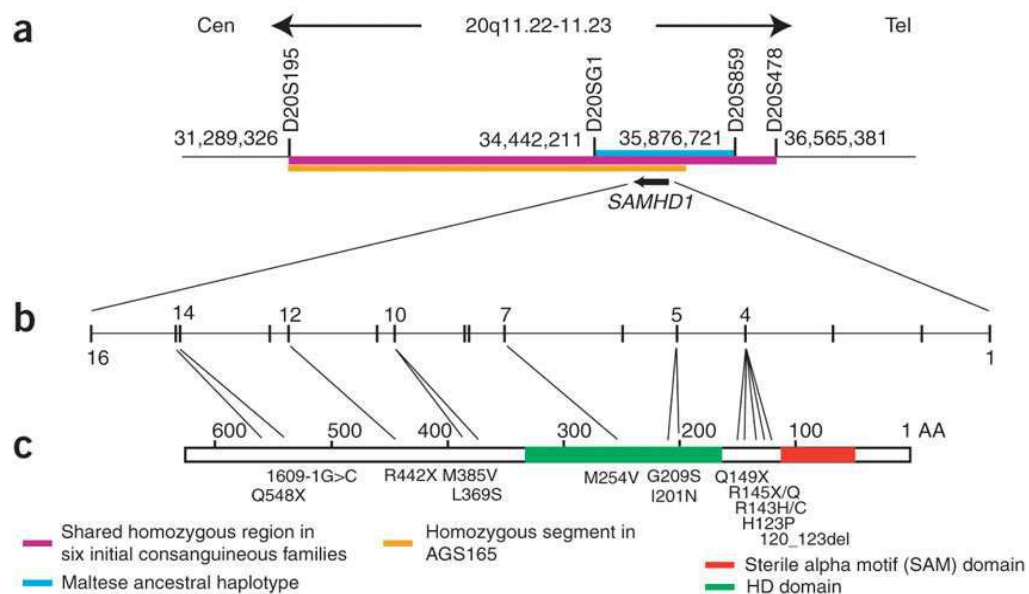
### SAMHD1

Al 2009, es van identificar mutacions al gen de *SAMHD1* com a una altra proteïna associada a l'AGS (Rice et al., 2009). Fins a dia d'avui, s'han reportat 7 mutacions que provoquen un truncament i 15 mutacions de canvi de sentit al gen de *SAMHD1* humà (Figura 20). *SAMHD1* evita probablement l'estimulació del sistema immunitari mitjançant la hidròlisi del reservori de dNTPs. Les mutacions trobades en pacients d'AGS al gen de *SAMHD1*, es troben en el domini enzimàtic responsable d'aquesta funció, recolzant així aquesta idea.

*SAMHD1* va ser identificat inicialment com a la proteïna ortòloga humana de la MG11 a ratolí, que és induïda pel tractament d'IFN- $\gamma$  a macròfags i a cèl·lules dendrítiques (Li et al., 2000). L'expressió de *SAMHD1* també és induïda a macròfags humans amb el tractament d'interferó i de TNF- $\alpha$  de manera dependent d'IRF-1 (Liao et al., 2008; Rice et al., 2009). Donat

que SAMHD1 és una proteïna moduladora implicada en la inflamació i en la producció d'IFN-I, això suggereix un paper de SAMHD1 en les respostes immunitàries.

SAMHD1 és la única proteïna humana identificada que consisteix en un domini SAM estèril (*sterile alpha motif*) i un domini HD (histidina i àcid aspàrtic) situats en tàndem (Figura 20C). El domini SAM és un motiu conservat en els organismes des dels llevats fins als humans. Aquest domini conté 626 aminoàcids i té una funció important en la interacció amb altres dominis SAM, amb proteïnes sense dominis SAM, i en la unió amb RNA (Aviv et al., 2003; Kim and Bowie, 2003; Qiao and Bowie, 2005). El domini HD es caracteritza per un doblet de residus d'histidina (H) i àcid aspàrtic (D). Aquest domini es troba present a una superfamília de fosfohidrolases dependent de metall les quals estan implicades en el metabolisme d'àcids nucleics i en la transducció de senyals (Aravind and Koonin, 1998). Tant el domini SAM com l'HD són dos dominis conservats evolutivament que juguen funcions molt importants en el metabolisme d'àcids nucleics i en la senyalització cel·lular.

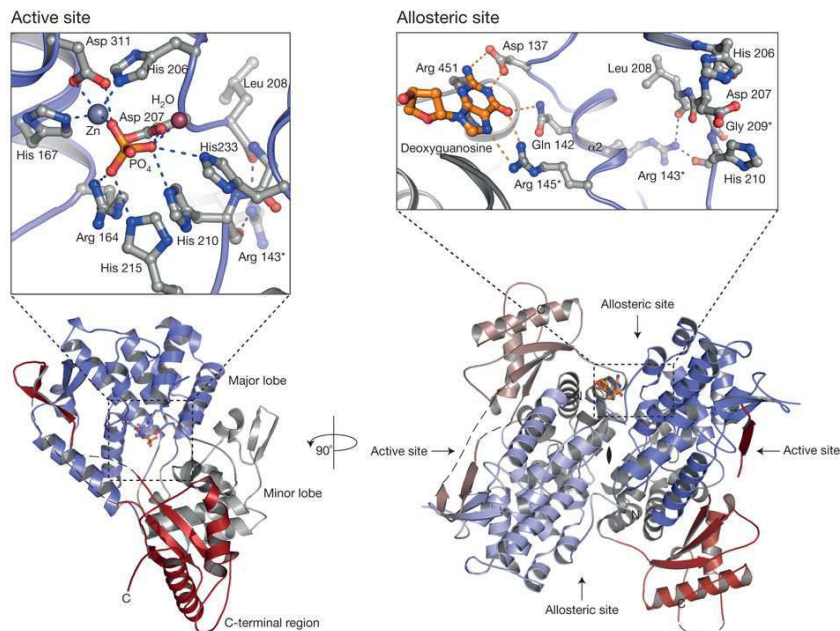


**Figura 20: Representació esquemàtica del gen de SAMHD1 humà, amb la posició de les mutacions identificades.** **A.** Mapa genètic del cromosoma 20q, on es troba situat el gen de SAMHD1 en humans. **B.** El gen de SAMHD1 humà comprèn 59532pb, en una seqüència de 16 exons i codificant per 626 aminoàcids que donaran una proteïna d'un pes molecular de 72KDa. **C.** Representació esquemàtica de la proteïna SAMHD1 indicant els dominis conservats i les substitucions identificades (Rice et al., 2009).

L'anàlisi basada en estructures i en assajos d'unió d'àcids nucleics, mostren que SAMHD1 és incapaç d'unir-se a diferents àcids nucleics com ara ssRNA, *stem-loop* d'RNA, ssDNA o dsRNA (Rice et al., 2009). D'altra banda, les activitats fosfohidrolasa i fosfodiesterasa del domini HD exerceixen funcions crucials en el metabolisme de nucleòtids i en la senyalització. Com a

conseqüència, mitjançant l'ús de la proteïna recombinant *in vitro*, s'ha demostrat que posseeix funció intrínseca trifosfat deoxinucleòsid trifosfohidrolasa, regulada per GTP (Goldstone et al., 2011; Powell et al., 2011) (Figura 21).

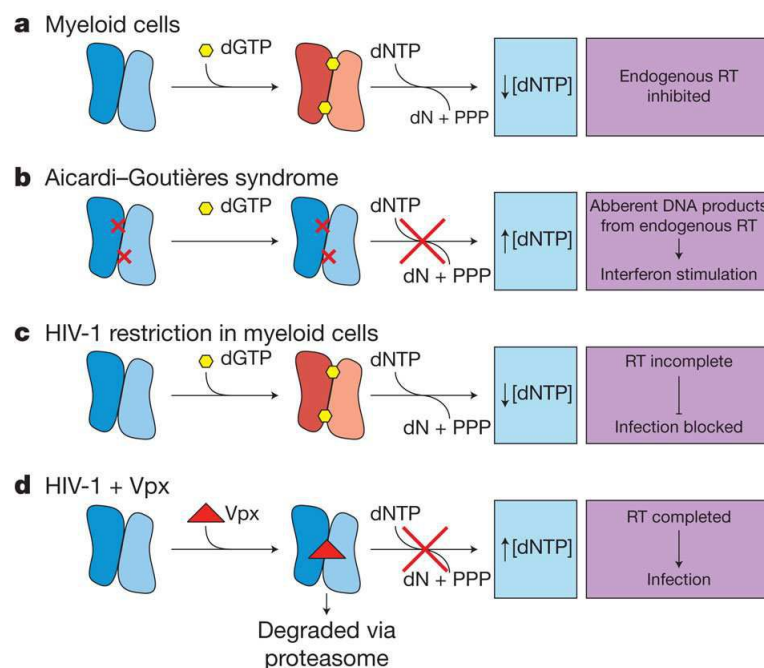
Així doncs, SAMHD1 està directament implicat en la regulació del reservori intracel·lular de dNTPs a través de la seva funció hidrolasa activada per GTP. Per aquest motiu, SAMHD1 és capaç de restringir a macròfags la replicació del virus del VIH, mitjançant la reducció a un nivell tan baix de dNTPs que no permet la síntesi del DNA víric per la transcriptasa reversa del virus. Tot i això, la proteïna VPX del virus impedeix l'acció de SAMHD1 induït de la seva degradació (Lahouassa et al., 2012).



**Figura 21: Representació de l'estructura tridimensional del dímer de SAMHD1.** Es mostren el lòbul principal (blau), el lòbul menor (gris) i el domini C-terminal (vermell). El centre actiu de SAMHD1 es troba a la intersecció entre les hèlix  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_7$  i  $\alpha_{11}$ , a la cavitat de la cara del monòmer. Els residus de coordinació entre el lloc actiu del zinc i el fosfat es mostren en forma d'àtom. A la figura expandida es veu el lloc al·lostèric a la interfície del dímer. (Goldstone et al., 2011).

SAMHD1 existeix principalment com a dímer (Goldstone et al., 2011), però no és clar que es requereixi la formació d'oligòmers per a la seva correcta activitat (Figura 22). En alguns estudis s'ha demostrat que cal una tetramerització de la proteïna per al seu normal funcionament (Yan et al., 2013), mentre que en d'altres no es requereix la oligomerització per a la seva activitat (Brandariz-Nuñez et al., 2012; White et al., 2013a).

SAMHD1 és predominantment una proteïna nuclear dotada d'una senyal de localització nuclear situada a la seva seqüència N-terminal <sup>11</sup>KRPR<sup>14</sup>. Tot i això, una fracció de SAMHD1 també es troba present al citoplasma (Baldauf et al., 2012). La breu seqüència ubicada a l'extrem C-terminal, és responsable del reclutament de la proteïna SAMHD1 humana per Vpx cap a la ubiquitin ligasa E3 CRL4<sup>DCAF1</sup> i la seva posterior degradació (Ahn et al., 2012). Se sap que Vpx altera la funció de SAMHD1 a cèl·lules en un estat no proliferatiu i promou la seva degradació proteasomal (Figura 22D) (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011).



**Figura 22: Model de funcionament de SAMHD1.** SAMHD1 actua de forma dimèrica (blau). Amb la unió de dGTP es torna una proteïna activa (vermell), catalitzant l'escissió de dNTPs en deoxinucleòsids i un trifosfat inorgànic. Quan el reservori de deoxinucleòtid decreix, o bé l'activitat endògena de la transcriptasa reversa (RT) és inhibida (A) o la infecció per VIH bloquejada (C). Les mutacions al lloc d'unió al·lostèric de SAMHD1 eviten la unió de dGTP, fent que la proteïna es torni inactiva i augmentin els àcids nucleics acumulats a la cèl·lula, produint així una activació del sistema immunitari i l'activació de l'expressió d'IFN- $\alpha$  observats en l'AGS (B). En presència de VPX, SAMHD1 és reclutat i degradat pel proteasoma, permetent que el VIH completi el seu cicle. (D). (Goldstone et al., 2011).

L'activitat de SAMHD1 pot ser regulada per una sèrie de factors, incloent la fosforilació i la presència d'IFN-I. L'expressió de la proteïna no sembla estar induïda per IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  en cèl·lules dendrítiques humanes, macròfags o cèl·lules T, encara que es va observar un augment transitori en els nivells d'RNA missatger (mRNA) (Dragin et al., 2013; St Gelais et al., 2012). No se sap perquè en alguns determinats tipus cel·lulars s'augmenta l'expressió de SAMHD1 quan



aquestes estan exposades a certes combinacions de citocines, tot i que s'ha vist que poden estar involucrats canvis en l'estat de metilació del promotor (Silva et al., 2013).

L'expressió de SAMHD1 està influenciada per l'estat del cicle cel·lular. Els nivells més alts d'expressió es troben durant l'estat de quiescència, mentre que l'expressió és tot just perceptible en cèl·lules en cicle. SAMHD1 és essencial per la prevenció de l'acumulació de cèl·lules en G<sub>1</sub> i la detenció del cicle cel·lular, indicant la importància de la proteïna al cicle cel·lular (Franzolin et al., 2013). SAMHD1 es troba, *in vivo*, fosforilada a la treonina 592 (T592) per mitjà de la cinasa dependent de ciclina 1 (CDK1) i la ciclina A2 (Cribier et al., 2013), o *in vitro* per la ciclina B (White et al., 2013b). Tot i que s'han trobat altres llocs de fosforilació a la proteïna, no s'ha vist una associació amb el cicle cel·lular o amb una restricció retrovírica (Cribier et al., 2013; Welbourn et al., 2013; White et al., 2013b). SAMHD1 exerceix la seva funció antivírica només en cèl·lules diferenciades o cèl·lules no proliferants, com ara les cèl·lules dendrítiques i els macròfags, però no en cèl·lules no diferenciades o en divisió. Això es deu en part a causa de l'alta taxa de producció/absorció de dNTPs, suficient per complementar els dNTPs esgotats per SAMHD1 o perquè el procés d'hidròlisi activa per part de SAMHD1 ha estat regulada en aquestes cèl·lules.

La inactivació de SAMHD1 per la ciclina A2 ocorre probablement durant la fase S del cicle cel·lular, moment en el qual la ciclina A2 és altament expressada i hi ha un requeriment de dNTPs per a la replicació cromosòmica. A cèl·lules tractades amb IFN- $\alpha$ , hi ha un decreixement de la fosforilació a T592, indicant així una relació entre la senyalització d'IFN de tipus I i l'activació de SAMHD1 que pot involucrar a p21<sup>Waf/Cip1</sup>, un inhibidor del VIH regulat pel cicle cel·lular, i a CDK1, una cinasa de replicació induïda per IFN- $\alpha$  (Cribier et al., 2013).

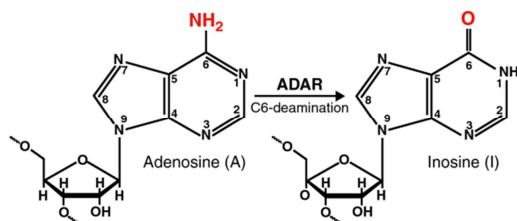
Independentment de l'estat de fosforilació, SAMHD1 és capaç d'hidrolitzar dNTPs *in vitro*, així com tampoc té efecte sobre l'oligomerització, la degradació intervinguda per Vpx, la unió a RNA o la localització nuclear (Welbourn et al., 2013; White et al., 2013b). És probable que altres factors o mecanismes addicionals contribueixin a la modulació de l'activitat de SAMHD1.

S'han trobat evidències de que un desequilibri a la concentració de dNTPs cel·lulars, està associat amb l'estrès en la replicació del DNA i amb una alteració de la velocitat del complex de replicació. Pertorbacions a la maquinària de replicació s'ha demostrat que condueixen a un augment de la mutagènesi, la inestabilitat genòmica i el desenvolupament de càncer (Bester et al., 2011; Chabosseau et al., 2011). Recentment s'ha descobert que mutacions homozigòtiques de *SAMHD1* a la línia germinal són causants de leucèmia limfocítica crònica (CLL) en un pacient ja

afectat d'AGS. En el mateix estudi es va demostrar que SAMHD1 pot participar interaccionar específicament amb dany al DNA i així regular la supervivència cel·lular en resposta a agents inductors del dany al DNA. SAMHD1 també s'ha trobat colocalitzat amb 53BP en el focus de reparació del DNA, demostrant així una altra funció de SAMHD1 en resposta al dany del DNA (Clifford et al., 2014).

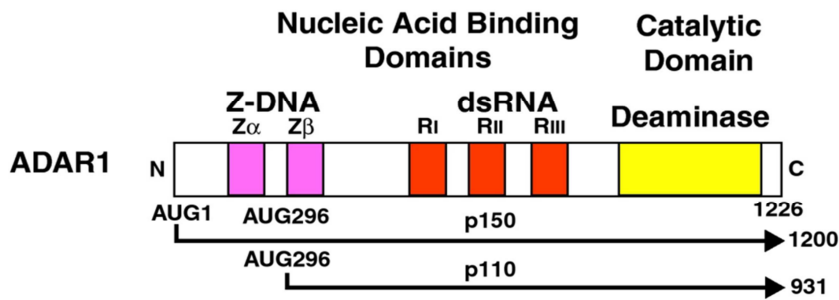
## ADAR1

Les proteïnes ADAR són RNA adenosina deaminases que catalitzen la desaminació hidrolítica a C6 de l'adenosina (A) per tal de produir inosina (I) en substrats d'RNA que contenen regions de doble cadena (Figura 23). S'han descrit quatre proteïnes ADAR en mamífers: ADAR1, ADAR2, ADAR3 i TENR, tot i que només ADAR1 i ADAR2 se saben amb activitat catalítica (Jin et al., 2009; Pfaller et al., 2011).



**Figura 23: El substrat d'ADAR1 és dsRNA.** ADAR1 p150 i p110 catalitzen la desaminació a la posició C6 A-to-I en dsRNA. (Pfaller et al., 2011).

El gen d'*Adar1* a ratolí es troba codificat al cromosoma 3 banda F2 i consisteix en 15 exons. Les homologies entre les espècies humana i murina que es dedueixen de les seqüenciacions del cDNA, són extenses: hi ha una identitat de més del 85% a nivell nucleotídic. L'expressió gènica d'*Adar1* murí és impulsat per dos promotors alternatius. El primer promotor és induïble per IFN- $\gamma$  (P<sub>1</sub>A), no conté seqüència TATA i conté una seqüència ISRE (*IFN-stimulated response element*) consensus de 12pb característic de gens regulats per IFN- $\gamma$ . El segon promotor comporta l'expressió constitutiva d'*Adar1*, contenint els exons 1B i 1C però sense la regió ISRE i, per tant, no induïble per IFN- $\gamma$  (George and Samuel, 1999a; George et al., 2008; Kawakubo and Samuel, 2000).



**Figura 24: Organització dels dominis de la proteïna ADAR1 humana.** Promotors alternatius donen com a resultat dues formes proteïques diferents, una forma induïble per IFN, p150, i una forma expressada constitutivament, p110. (Pfaller et al., 2011).

La proteïna ADAR1 induïble (p150) és tracta d'una forma més extensa a partir de la regió N-terminal de la forma p110, la proteïna constitutiva, i inclou dins la regió terminal dues còpies d'una regió d'unió Z-DNA (Z $\alpha$  i Z $\beta$ ). Les dues versions, p150 i p110, són deaminases actives i les dues contenen el domini catalític a la regió C-terminal i tres còpies del motiu d'unió a RNA de cadena doble (dsRNA) (dsRBDR<sub>I</sub>, R<sub>II</sub> i R<sub>III</sub>) a la regió central de la proteïna. Estudis bioquímics i mutacionals han establert la importància funcional de cadascun d'aquests dominis, així com també les seqüències importants per a la sumoilació, la localització nuclear i l'exportació nuclear d'ADAR1 (Figura 24) (Toth et al., 2006).

La regió C-terminal d'ADAR1 conté el domini catalític. His910 i Glu912 són aminoàcids essencials de motiu CHAE al centre catalític, característic d'enzims deaminases. La substitució de la histidina 910 per una glutamina, i l'àcid glutàmic 912 per una alanina, suprimeix completament l'activitat d'edició A-to-I (Lai et al., 1995; Liu and Samuel, 1996). La forma catalíticament activa d'ADAR1 és un dímer (Cho et al., 2003; Gallo et al., 2003; Valente and Nishikura, 2007), però ADAR1 pot formar heterodímers conjuntament amb ADAR2 i realitzar la seva funció de manera independent d'RNA (Cenci et al., 2008; Chilibeck et al., 2006).

Les tres còpies de dsRBD, designades com a R<sub>I</sub>, R<sub>II</sub> i R<sub>III</sub>, es troben presents a les dues versions d'ADAR1, p150 i p110, i són homòlogues a les repeticions dsRBD descobertes a la proteïna cinasa dependent d'RNA, PKR (Kim et al., 1994; McCormack et al., 1992; O'Connell et al., 1995; Patterson and Samuel, 1995). Una mutació a una lisina conservada de la seqüència central de cadascun dels dominis dsRBD (Lys554, Lys665 i Lys777), va demostrar la seva importància relativa tant per a la unió d'RNA com per a l'activitat enzimàtica (Fierro-Monti and Mathews, 2000; McCormack et al., 1994). El domini R<sub>III</sub> és el més important de la regió dsRBD

per a l'activitat A-to-I, més o menys relacionat amb la seva importància en la unió de dsRNA (George and Samuel, 1999b; Liu and Samuel, 1996).

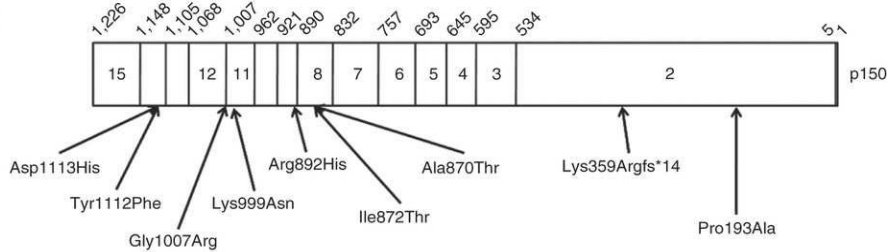
Les diferències en la seqüència N-terminal addicional present a la proteïna induïble p150 però absent a p110, són originades a causa de l'estructura alternativa de l'exó 1 i dels diferents llocs d'iniciació de la traducció. La regió N-terminal de la forma p150 d'ADAR1, inclou dues còpies d'un domini d'unió a Z-DNA (Herbert et al., 1997). La funció fisiològica d'aquests dominis no s'ha definit clarament, però mutacions en aquest domini fan disminuir l'eficiència d'ADAR1 per a l'edició de seqüències curtes (15pb) del seu substrat, dsRNA (Herbert and Rich, 2001).

L'activitat d'edició A-to-I es produeix amb mRNAs cel·lulars i també virals. L'activitat modificadora d'ADAR1 es troba implicada en dos processos. En el primer procés, la desaminació pot ser selectiva i es produeix en un o pocs llocs. En el segon procés, l'edició pot ocórrer en diverses posicions quan el substrat d'RNA té un caràcter de doble cadena. En alguns casos la funció d'ADAR1 pot implicar interaccions amb altres proteïnes o ser independent d'RNA, a més de la seva activitat catalítica RNA deaminasa (Gommans and Maas, 2008; Wang and Samuel, 2009). En els limfòcits infectats pel VIH, ADAR1 interactua amb PKR i fa augmentar la replicació viral sense el requeriment de l'activitat d'edició (Clerzius et al., 2009; Doria et al., 2009).

S'ha descrit un ratolí knockout per ADAR1 (Wang et al., 2000, 2004). Les mutacions nul·les d'*Adar1* en homozigosi provoquen la destrucció del fetge, defectes en hematopoesi i la mort embrionària (Hartner et al., 2004, 2009). No se sap què provoca l'increment de l'apoptosi i la letalitat embrionària, si l'absència de p110, de p150, o de les dues isoformes, ja que els trastorns al gen d'*Adar1* descrits fins al moment eliminen ambdues isoformes.

Entre els pacients d'AGS s'han identificat vuit substitucions d'aminoàcids (Figura 25) (Rice et al., 2012). Set d'aquestes vuit mutacions impliquen residus situats en el domini catalític d'ADAR1 i, d'aquestes, cinc es troben al llarg de la superfície de la proteïna que interactua amb l'RNA de doble cadena. Les altres dues mutacions restants es troben internament al domini de l'estructura i són predites com a desestabilitzadores de la proteïna. La última mutació, Pro193, es troba al domini d'unió Z-DNA, el qual fa contacte directe amb l'àcid nucleic. La mutació d'aquest residu elimina importants interaccions atòmiques entre la proteïna i l'àcid nucleic. Al voltant de 130 mutacions diferents d'ADAR1 s'han relacionat amb una malaltia anomenada discromatosi simètrica hereditària (DSH), un trastorn autosòmic dominant caracteritzat per l'aparició a la infància de màcules hipo- i hiperpigmentades a la cara i als dorsals de les extremitats (Li et al., 2010; Miyamura et al., 2003). Excepte una, totes les mutacions detectades

al gen d'*ADAR1* en pacients d'AGS són variants de pèrdua de sentit. En aquests pacients es troba sovint el fenotip de la DSH, però tenen una expressió normal de les dues formes d'*ADAR1*, tant la constitutiva com la induïble per IFN- $\gamma$ .

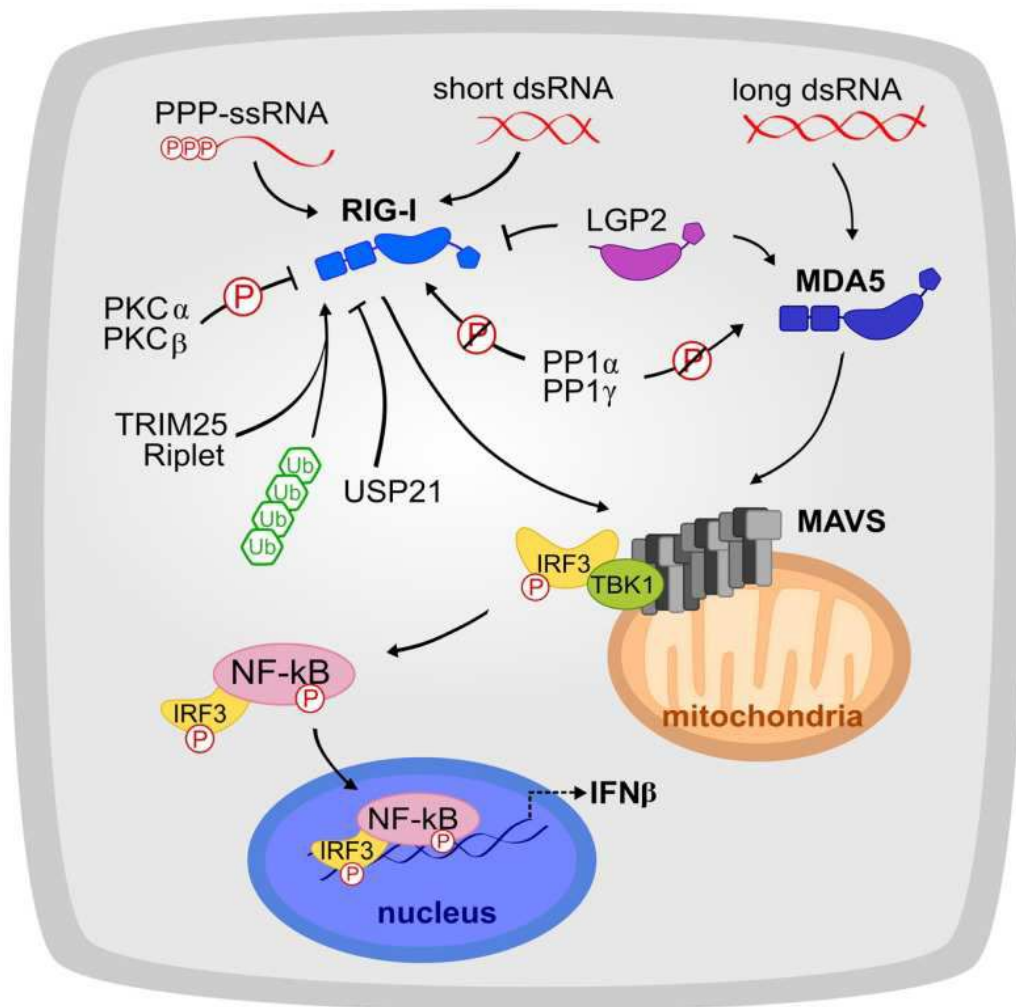


**Figura 25: Representació esquemàtica del gen d'*ADAR1* humà.** Posició de les mutacions identificades dins de la proteïna p150 d'*ADAR1* causants d'AGS. Els números per sobre de la seqüència són el recompte d'aminoàcids en els límits entre exons. (Rice et al., 2012).

### ***IFIH1* o *MDA5***

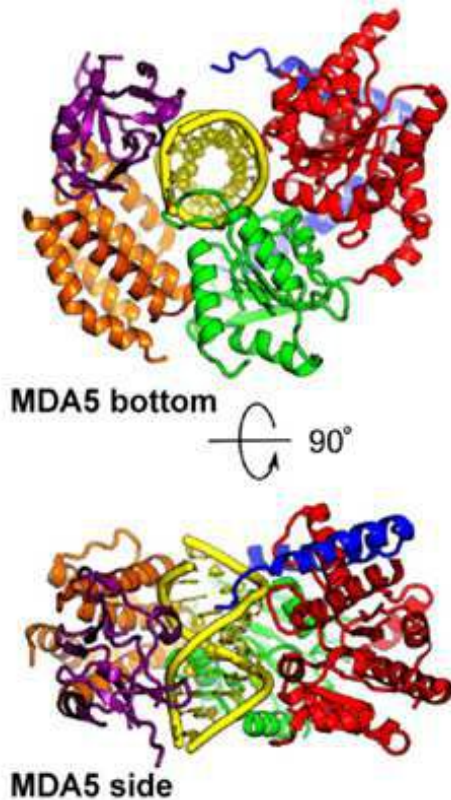
*MDA5* i *RIG-I* són dos receptors essencials de la immunitat innata, situats al citosol cel·lular (Kato et al., 2006), amb funcions complementàries de reconeixement d'RNA víric. Mentre que *RIG-I* reconeix lligands curts d'RNA (<300pb) amb extrems roms fosforilats a 5'. *MDA5* s'uneix preferencialment a cadenes llargues d'RNA (>1000pb) i a intermediaris de la replicació sense especificitat d'extrem (Figura 26) (Reikine et al., 2014). Ambdues proteïnes pertanyen a la família de reconeixement de receptors de patrons moleculars associats a patògens (PAMPs), anomenada *RIG-I-like* (RLRs). Aquests sensors consisteixen en dominis en tàndem a l'extrem N-terminal de reclutament de caspases (CARDs), amb plecs de domini mort, una seqüència helicasa DExD/H (consistent en dos dominis helicasa RecA-like, Hel1 i Hel2, i un domini insertat, Hel2i), i un domini C-terminal (CTD) (Figura 28C).

La senyalització a través de RLR, és regulada per nombrosos factors vírics i del propi hoste a través de diversos mecanismes, entre ells la degradació proteolítica depenent d'ubiquïtina i l'escissió de MAVS per proteases codificades per virus (Arimoto et al., 2007; Li et al., 2005). Una tercera proteïna pertanyent a la família RLR, *LGP2*, no conté el domini CARDs i té funcions de co-estimulació i funcions inhibidores sobre *MDA5* i *RIG-I*, respectivament (Childs et al., 2013; Rothenfusser et al., 2005; Yoneyama et al., 2005).



**Figura 26: La via de senyalització RLR.** RIG-I i MDA5 reconeixen lligands dsRNA vírics al citoplasma. La seva activació es troba altament regulada per fosforilació, ubiquitinització i proteïnes com LGP2. RIG-I i MDA5 activen MAVS, la qual inicia la senyalització de la producció d'IFN-I. (Reikine et al., 2014).

Els dominis helicasa de MDA5 envolten el dsRNA, i el domini CTD també entra en contacte amb el domini Hel1, cosa que fa que MDA5 formi un anell tancat al voltant del dsRNA (Figura 27). Aquesta orientació del domini CTD promou la formació cooperativa de filaments a través del dsRNA. S'ha vist que la unió d'ATP i la hidròlisi estan implicats en la formació dels filaments, ja que la unió de l'ATP reforça la interacció entre MDA5 i l'RNA de cadena doble (Berke and Modis, 2012). En canvi, la hidròlisi de l'ATP causa la dissociació de MDA5 de l'RNA (Peisley et al., 2012). Als extrems dels filaments de MDA5-RNA, la hidròlisi d'ATP provoca la despolimerització, proporcionant un mecanisme per a la desactivació de la via de senyalització i per al reciclatge de MDA5. La dinàmica del muntatge i desmuntatge de filaments proporcionen l'especificitat de MDA5 per a dsRNA llargs (Peisley et al., 2012).



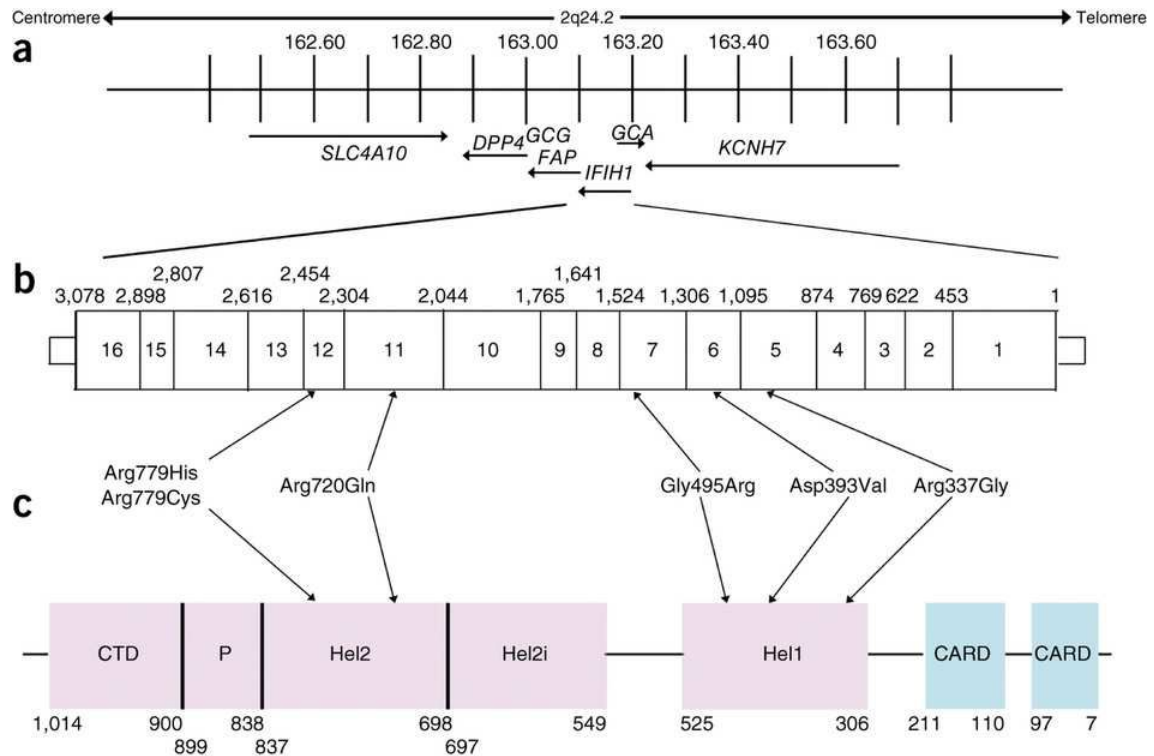
**Figura 27: Unió de MDA5 a l'RNA.** Dues visions ortogonals de la proteïna MDA5 unida al seu lligand, dsRNA. El domini CTD rota 20° respecte a Hel2, permetent que MDA5 polimeritzi al llarg de l'RNA. Vermell, domini Hel1; taronja, domini Hel2i; verd, domini Hel2; blau, domini pinça; violeta, domini CTD. (Adaptada de Reikine et al., 2014).

S'hipotetitza que el tàndem CARD, interactuen un amb altre i activen MAVS, el qual es troba a la membrana externa mitocondrial. La oligomerització de MAVS indueix l'activació de TBK1, la fosforilació d'IRF3 i la inducció de la transcripció d'IFN-I, resultant en l'activació d'un elevat número de gens estimulats per IFN-I (Oda et al., 2014) (Figura 26).

Les troballes neurològiques en individus amb mutacions en aquest gen, són típiques de pacients d'AGS on, a més, s'hi va trobar una elevada producció d'IFN-I i una elevada expressió de gens estimulats per interferó de tipus I. Les substitucions d'aminoàcids trobades als individus afectats amb AGS, es troben als dominis helicasa (Figura 28). Aquestes mutacions augmenten la funció d'activació intrínseca de MDA5, ja que estarien afectant probablement a l'afinitat d'unió amb l'RNA i a la seva activitat d'hidròlisi d'ATP. Estudis recents de seqüenciació massiva han mostrat l'associació de mutacions a *MDA5* amb diverses malalties autoimmunitàries, entre les quals es troben el SLE, Diabetis de tipus I, psoriasis i vitiligo (Gateva et al., 2009; Jin et al., 2012; Smyth et al., 2006).

A diferència de les mutacions en *TREX1*, qualsevol de les subunitats de la *RNASEH2*, *SAMHD1* o a *ADAR1*, on les mutacions provoquen una pèrdua de funció de la proteïna que porta a l'acumulació de diferents espècies d'àcids nucleics i la conseqüent activació del sistema

immunitari, mutacions a *MDA5* provoquen un guany de funció que provoca una activació constant de *MDA5*, provocant una síntesi d'IFN-I i finalment portant a una activació del sistema immunitari (Oda et al., 2014; Rice et al., 2014).



**Figura 28: Representació esquemàtica del gen IFIH1 humà. A.** Situació del gen al cromosoma 2q24.2, on abasta 51624pb. També s'hi troben representants els gens colindants. **B.** Posició de les variants identificades dins la seqüència genòmica d'IFIH1. Els exons es troben numerats dins de les caixes. Els números per sobre indiquen les posicions de les fronteres entre exons. **C.** Esquema de les posicions dels dominis proteics dins de la proteïna de 1025 residus de IFIH1. CARD, domini de reclutament de caspases; Hel, dominis helicasa, on Hel1 i Hel2 són dos centres catalítics amb funció helicasa conservats i Hel2i és un domini inserit que està conservat a la família helicasaRIG-I-like; P, domini de pinça o de pont que connecta els dominis Hel2 i el domini C-terminal (CTD), i el qual es troba involucrat a la unió amb dsRNA. Entre B i C es mostren les mutacions associades a l'AGS. (Rice et al., 2014).



|

# Objectius

|

# Objectius

Aquesta tesi té els següents objectius:

- Anàlisi de l'expressió de *Samhd1* i caracterització del seu promotor
- Construcció d'un ratolí knockout condicional de TREX1
- Caracterització de la descendència dels descendents del ratolí condicional de TREX1 amb ratolins que expressen CRE sota regulació de diferents promotors

|

# Materials i mètodes

|

# Materials i mètodes

## *Ratolins*

---

Es van utilitzar ratolins Balb/C i C57Bl/6j de la casa comercial Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Els animals de laboratori van ser mantinguts i manipulats a l'estabulari del Parc Científic de Barcelona, que té la qualificació de *SpecificPathogenFree* (SPF), i els procediments experimentals es van realitzar de conformitat amb el protocol animal aprovat de la IACUC (Comitè ètic d'experimentació animal de la Generalitat de Catalunya, número 2523). La construcció del vector portador del gen *Trex1* flanquejat per les regions de recombinació LoxP, així com també la injecció de les cèl·lules a blastocists i la implantació d'aquests a mares de lloguer, va ser realitzat per la *Mouse Mutant Core Facility* de l'Institut de Recerca Biomèdica (IRB, Barcelona).

## *Cultius cel·lulars*

---

Els macròfags derivats de medul·la òssia de ratolí (BMDM) es van extraure de mascles Balb/C de 8 setmanes d'edat com ja s'ha descrit (Celada et al., 1984). Els macròfags són derivats a partir del moll de l'os del fèmur, tibia i húmer del ratolí. S'obtenen els ossos mencionats i, després d'eliminar les epífisis es perfundeix la medul·la amb medi DMEM (Lonza; Verviers, Bèlgica) injectat mitjançant una agulla. Una vegada obtinguda la medul·la de l'animal, la suspensió cel·lular resultant es distribueix en plaques de cultiu de plàstic de 150mm de diàmetre (4 plaques per animal), en un 50% de medi DMEM suplementat amb un 20% v/v de sèrum boví fetal (FBS) inactivat per calor (56°C durant 30 minuts) (Gibco, NY) i un 30% v/v del medi condicionat L-Cell, com a font de M-CSF, 100U/ml de penicil·lina i 100µg/ml d'estreptomicina (Sigma-Aldrich). Les plaques van ser incubades a 37°C en una atmosfera humida amb un 5% de CO<sub>2</sub>. Després de 7 dies de cultiu, es va obtenir una població homogènia de macròfags adherents (99% de puresa). En promig, als 7 dies s'obtenen 14-12x10<sup>7</sup> milions de macròfags per animal.

Per obtenir macròfags quiescents i sincronitzats abans dels estímuls, se'ls priva del medi condicionat L-cell durant 16-18 hores i s'incuben amb medi *Starved*. Aquest medi està compost per un 90% v/v de DMEM, un 10% v/v de FBS i no conté antibiòtics.



La línia cel·lular de macròfags RAW 264.7 (American TissueTypeCollection) va ser mantinguda amb medi DMEM amb un 10% v/v de FCS inactivat, i suplementat amb 100U/ml de penicil·lina i 100µg/ml d'estreptomicina.

## Reactius

Les citocines murines utilitzades han estat d'origen recombinant i són: IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 i IL-10; van ser adquirides a R&D Systems (Minneapolis, MN). L'LPS i la Cicloheximida (CHX) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), i la Tricostatina A (TSA) de Tocris Bioscience (UK). La resta de reactius químics, de la màxima puresa, es van comprar a Sigma-Aldrich. L'aigua destil·lada es va tractar i purificar mitjançant el sistema Milli-Q de la casa comercial Millipore (Bedford, MA). Per a estudis d'estimulació, es van utilitzar concentracions saturants de les citocines indicades (10ng/ml). Els anticossos específics que s'han utilitzat es troben indicats a la Taula 2. Tots els enzims de restricció utilitzats són de Takara (Otsu, Shiga, Japó). L'actinomicina D (ActD) i el DRB (5,6-Dichlorobenzimidazole Riboside) són ambdós de Sigma-Aldrich.

Nom	Referència	Dilució de Treball	Casa comercial
TREX1	(propi)	1:1.000	Vivotecnia
IRF-1	sc-640	1:500	Santa Cruz Biotechnology
C/EBP $\beta$	sc-150	1:500	Santa Cruz Biotechnology
SAMHD1	ab119751	1:500	Abcam
RPA32/2	sc-25376	1:100	Santa Cruz Biotechnology
$\beta$ -actina	A-5441	1:2.000	Sigma-Aldrich
IgG-HRP-antimouse	A9044	1:5.000	Sigma
IgG-HRP-antirabbit	18-8816-31	1:5.000	eBioscience
CD16/CD32	553142	1:20	BD Pharmingen
AlexaFluor® 568	A-11011	1:100	Invitrogen
F4/80	17-4801	1:100	eBioscience
CD11b	25-0112	1:1.000	eBioscience
CD11c	557401	1:50	BD
Ly6C	553104	1:50	BD
IgG-isotip FITC	553929	1:50	BD
IgG-isotip PE	IC006P	1:50	RD Systems
IgG-isotip APC	17-4321	1:100	eBioscience

Taula 2: Anticossos utilitzats en les diferents tècniques.

## ***Extractes Proteics***

---

### ▪ **Extractes proteics totals**

Els extractes proteics totals van realitzar com s'ha descrit prèviament (Xaus et al., 1999). Per fer aquest assaig es replaquejen entre  $2 \times 10^6$  i  $5 \times 10^6$  macròfags en 3ml de medi Starved en plaques de 60mm de diàmetre i es deixen durant 16-18 hores a l'incubador. Després dels estímuls pertinents, es realitza un rentat amb PBS i es lisen amb 150µl de tampó de lisi (1% v/v Tritó X-100, 10% v/v glicerol, 50mM Hepes pH7.5, 250mM NaCl, i els inhibidors 1mM d'ortovanadat de sodi, 1mM PMSF, 1mM iodoacetamida, 1mM DTT, 10µg/ml aprotinina i 1 g/ml leupeptina). Després de 30 minuts de rotació a 4°C, els extractes cel·lulars totals van ser centrifugats a 12.000g i es van analitzar les concentracions dels sobrenedants mitjançant el sistema Bradford (BioRad Laboratories GmbH; Múnic, Alemanya). En aquest assaig, es mesura la quantitat de proteïna per absorbància a 595nm de la barreja del reactiu Bradford amb 1µl de lisat proteic. S'obté una recta patró amb quantitats conegudes d'albumina bovina d'una solució inicial d'1mg/ml en aigua destil·lada (Sigma), i a partir d'ella s'infereixen les concentracions dels lisats. Les mostres es guarden en eppendorfs a -80°C fins a la seva utilització. En el moment de la seva utilització, les mostres es mantenen en tot moment a 4°C per evitar la degradació de les proteïnes així com també per evitar la pèrdua d'altres modificacions com per exemple fosforilacions.

### ▪ **Extractes nuclears**

L'obtenció dels extractes nuclears es va realitzar tal i com ja s'ha descrit (Casals-Casas et al., 2009), a partir de  $20 \times 10^6$  BMDM cultivats en plaques de 150mm en medi Starved, utilitzant dues plaques per punt. Després dels estímuls pertinents, els cultius confluents de macròfags es van raspar suaument i centrifugats a 400g, durant 5 minuts a 4°C. El sediment amb les cèl·lules es renta amb 1ml de PBS fred dues vegades mitjançant un pipeteig suau i centrifugacions de 400g de 5 minuts a 4°C. Posteriorment els sediments són resuspesos amb un pipeteig suau en cinc volums de tampó hipotònic (10mM HEPES pH 7,9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT, pH 7,4) i centrifugats a 400g durant 5 minuts a 4°C. El sediment obtingut és resuspès de nou en tres volums (respecte al sediment) de tampó hipotònic i es deixa en gel durant 10 minuts. Les cèl·lules són lisades per homogeneïtzació amb un *pottergruixut* (Tight) (Dounce Tissue Grinder, Wheaton, USA), fins a la obtenció dels nuclis, durant aproximadament dos minuts. La obtenció de nuclis es comprova per tinció amb Tripán Blue al microscopi òptic. Els nuclis són centrifugats en eppendorfs a 2.500g durant 20 minuts a 4°C, quedant recollits al

sediment, mentre que els extractes citosòlics romanen al sobrenedant. El sediment de nuclis és resuspès en mig volum de tampó *low-salt* (20mM HEPES pH 7,9, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 25% v/v glicerol, 20mM KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT, pH 7) i seguidament es lisa per addició de mig volum de tampó *high-salt* (20mM HEPES pH 7,9, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 25% v/v glicerol, 1,2M KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT, pH 7). El lisat es completa a 4°C durant 30 minuts amb agitació orbital continua. Els lisats són centrifugats a 16.000g durant 30 minuts a 4°C i es descarten els sediments. Els final del sobrenedant (aproximadament 200µl són llavors dialitzats en front de 100ml de tampó de diàlisi (20mM HEPES pH 7,9, 20% v/v glicerol, 100mM KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT, pH 7) a 4°C durant tota la nit, amb el kit de diàlisi Mini Dialysis (AmershamBioscience, San Francisco, USA). Després de la diàlisi, els extractes són centrifugats a 16.000g durant 20 minuts a 4°C i es recuperen els extractes finals del sobrenedant. La concentració proteica de les mostres es mesura mitjançant el mètode de Bradford com s'ha explicat prèviament. Les mostres són dividides en alíquotes de 10µg i conservades a -80°C per tal que totes les mostres mantinguin les mateixes propietats que des del començament.

## ***Western blot***

---

Quantitats iguals del lisat total de cada estímul (80 g a la majoria de casos) van ser separades per electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE), i posteriorment transferides a una membrana de PVDF (Hybond<sup>TM</sup>-P, AmershamBioscience; Bucking-hamshire, UK) per transferència en sec utilitzant el sistema Scie-Plas (Scie-Plas, UK), durant una hora i amb un amperatge de 75mA per membrana. Posteriorment es bloquegen les membranes per incubació amb una solució de llet en pols desnatada (Central Lechera Asturiana) al 5% v/v en TBS-T (0,15M NaCl, 0,05% Tween<sup>TM</sup> 20, 0,05M tampó Tris-HCl pH 7,6) i després de tres rentats amb tampó TBS-T, s'incuben les membranes durant tota la nit en un falcó de 50ml i en agitació a 4°C, amb les dilucions dels corresponents anticossos primaris (especificacions a la Taula 2) en 5ml de tampó TBS-T. Es realitza llavors una incubació amb l'anticòs secundari corresponent conjugat a peroxidasa en 10ml de tampó TBS-T (especificacions a la Taula 2) i es realitzen tres rentats amb TBS-T per tal d'eliminar l'excés d'anticossos. Finalment, les membranes es revelen amb el kit de detecció ECL (ECL Western BlotDetectionReagents, Amersham) seguint les indicacions del kit, utilitzant pel·lícules de rajos X SuperRX (FujiFilm, Düsseldorf, Alemanya). Els temps d'exposició varien en funció de la intensitat de la senyal i poden anar dels segons fins el 2-5 minuts. Finalment la pel·lícula es processa al revelador automàtic Hyperprocessor

(AmershamPharmaciaBiotech). Després d'aquest assaig, es realitza un rentat de la membrana de 30 minuts amb TBS-T i es realitza el mateix procés amb l'anticòs per a la detecció de la  $\alpha$ -actina, la qual s'utilitzarà com a control de càrrega.

## Southern blot

### ▪ Obtenció de les sondes

Les sondes per al Southern Blot es van obtenir a partir d'un vector BAC (Annex 1) amb la inserció del gen de *Trex1* (cedit per la Mouse Mutant CoreFacility). Es va amplificar la regió mitjançant PCR (Taula 3) i el fragment de DNA resultant va ser clonat dins del vector linearitzat pCR2.1 amb el TA Cloning Kit (Annex 1) (Invitrogen; Carlsbad, CA).

Nom	Encebador directe (Fwd)	Encebador revers (Rev)
Sonda A (extrem 5')	5'ATGTCATTGGCCCAACCAT 3'	5'TGCCTCAAAAGGCAAAATAAA 3'
Sonda B (extrem 5')	5'CATCTTCGGGGTTGTTTTGT 3'	5'TGCACACACACACACACA 3'
Sonda C (extrem 3')	5'TATGGGACCCCTTTTCATT 3'	5'GCCCAAGTCACAGCATTCTT 3'
Sonda D (extrem 3')	5'ATCGGGGTGAGTATGGTGTG 3'	5'TGGTACATACCTACATGCTCACG 3'

Taula 3: Encebadors utilitzats per a l'amplificació per PCR de les sondes pel Southern Blot.

Es va marcar 1 $\mu$ g de la sonda amb 50 $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP(3000Ci/mmol 10mCi/ml) dePerkinElmer (Waltham, Massachusetts) mitjançant el kit de marcatge Megaprime DNA Labeling System (GE Healthcare; Buckinghamshire, UK) seguint el protocol especificat per la casa comercial. Després del marcatge, la sonda es va purificar amb les columnes IllustraMicroSpin G-25, de GE Healthcare seguint el protocol de la casa comercial. Per valorar l'eficàcia del marcatge, es va barrejar 1 $\mu$ l de la solució d'oligonucleòtids marcats amb 2ml de líquid de centelleig Ecolite (MPBiomedicals LLC, CA, USA) i es comptabilitza durant un minut en un comptador de centelleig Packard TRI-CARB 2900 (Packard), seguint el protocol de valoració de <sup>32</sup>P.

### ▪ Obtenció del DNA genòmic

Es recullen les cèl·lules d'una placa mitjanada cultiu confluent de cèl·lules mare embrionàries (entre 5 i 20x10<sup>6</sup> cèl·lules per placa) en un tub falcó de 15ml i es realitza una centrifugació de 400g durant 5 minuts a 4°C. Es realitzen dos rentats amb PBS fred a 4°C, realitzant a cada pas una centrifugació de 5 minuts a 4°C. Tot seguit s'afegeix 1ml de tampó de

digestió per cada  $10^8$  cèl·lules (100mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA, 0,5% SDS, 50µl Proteïnasa K 10mg/ml, 5µl RNasa A1 1mg/ml) i es deixen incubar les cèl·lules durant 18 hores (una nit) a 50°C amb agitació suau. Passat el temps, s'afegeix un volum (de tampó de digestió) de cloropan (fenoll/cloroform/alcohol isoamil en proporció 25:24:1) i es centrifuga durant 10 minuts a 1700g a 4°C. Es recull la fase superior aquosa a un tub eppendorf net i es repeteix el procés. Un cop repetit, es posa la fase aquosa a un eppendorf nou i s'afegeix mig volum del volum de la fase aquosa d'acetat d'amoni (NH<sub>4</sub>Ac pH 7,5) i dos volums de la fase aquosa d'etanol 100%. Es barreja lentament fins que apareix un precipitat blanc. S'arrossega el precipitat amb una punta de pipeta fins a un eppendorf nou i aquest es centrifuga durant 5 minuts a 10.000g a 4°C. S'extrau el sobrenedant i s'afegeix 1ml d'etanol al 70% al pellet. Es barreja suament i es centrifuga durant 5 minuts a 10.000g a 4°C. Després d'eliminar el sobrenedant, es deixa assecar el pellet durant aproximadament dues hores. Passat aquest temps, el pellet es resuspèn en 400µl de tampó TE 1x (10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA) i s'afegeix 1µl de Ribonucleasa A (referència R4642, Sigma).

Després de quantificar el DNA genòmic, es van digerir 20µg mitjançant l'enzim de restricció EcoRI, en una barreja que conté a més del DNA, 5µl de l'enzim, 10µl del buffer corresponent indicat per la casa comercial i aigua fins a un volum final de 50µl. Del producte, es va fer una electroforesi en gel d'agarosa a l'1% en tampó TAE 1x (40mM Tris, 20mM Acetat i 1mM EDTA, pH 7,6) d'una mida de 132x148mm, amb un voltatge de 20V durant tota una nit. Posteriorment es va sotmetre el gel a una desnaturalització (tampó de desnaturalització: 0,5M NaOH, 1,5M NaCl) i neutralització (tampó de neutralització: 0,9M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH 7,5) per tal de facilitar la transferència. La transferència es va fer per capil·laritat a una membrana de niló (Amersham) en presència del tampó 10xSSC (NaCl 1,5M, Citrat de Sodi 0,15M pH7), a temperatura ambient durant una nit. La membrana es va exposar immediatament després a radiació ultravioleta (150mJ, durant 10 segons) en un Stratalinker de BioRad, per tal de fixar el DNA a la membrana. Les membranes es van posar en un tub roller d'hibridació (ThermoHybaid) i van ser prehibridades durant 30 minuts amb 10ml de la solució ExpressHyb (Clontech; MountainView, CA) a 60°C. En aquesta mateixa solució es va afegir el volum total aconseguït de la sonda marcada amb <sup>32</sup>P (independentment de les cpm) i, es van deixar hibridant durant la nit a 60°C en un forn d'hibridació (Shake-N-Stack, Hybaid). Després de la hibridació, es van fer els següents rentats: 40 minuts a temperatura ambient amb la solució I (2x SSX, 0,05% SDS), canviant la solució als 20 minuts per evitar soroll de fons; 40 minuts a 50°C amb la solució II (0,1x SSC, 0,2% SDS). Les membranes es van deixar exposant a un cassette amb una pantalla

Phosphoimager Molecular Dynamics (Amersham) i es van llegir els resultats amb un aparell Typhoon 8600 (Amersham).

## ***Extracció d'RNA i PCR a temps real (qPCR)***

---

Es va extraure l'RNA de  $5 \times 10^5$  macròfags mitjançant el kit PureLink™ RNA Mini Kit d'Ambion (LifeTechnologies) segons el protocol especificat pel fabricant, prèviament replaquejats en plaques de 12 pous (un pou per punt de l'experiment) i sincronitzats en el cicle cel·lular (incubació durant 18 hores en medi Starved). L'RNA va ser quantificat i valorat mitjançant un espectrofotòmetre Nanodrop (ThermoScientific). Per a la síntesi del cDNA, es va transcriure l'RNA mitjançant una retrotranscripció, per a la qual es va utilitzar  $1 \mu\text{g}$  de l'RNA total extret, la transcriptasa reversa M-MLV sense RNase H (Promega), encebadors oligo(dT)<sub>15</sub> i una barreja de nucleòtids per a PCR (tots els components de Promega Corporation; Madison, WI). La barreja de l'RNA amb els oligo (dT) es deixa durant 5 minuts a  $65^\circ\text{C}$  perquè hibridin i immediatament després es posa en gel durant 2 minuts. S'afegeix llavors la barreja que conté el tampó comercial de la reacció, els dNTPs i la MLV, i es deixa durant 50 minuts a  $40^\circ\text{C}$ , amb un últim pas de 15 minuts a  $70^\circ\text{C}$  per a la inactivació de l'enzim. La PCR a temps real es va realitzar mitjançant Power SYBR Green Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, CA), amb un volum final d' $11,5 \mu\text{l}$ . La reacció de PCR té un primer pas de  $95^\circ\text{C}$  durant 10 minuts, seguit per 35 cicles de 30 segons a  $95^\circ\text{C}$ , 30 segons a  $60^\circ\text{C}$  i 30 segons a  $72^\circ\text{C}$ , seguits d'un pas final de dissociació (per tal de comprovar l'especificitat dels primers). La PCR va ser realitzada per triplicats i detectada mitjançant un aparell ABI Prism 7900 SequenceDetection System (AppliedBiosystems). A la mateixa PCR, s'inclou una recta patró per tal de calcular la quantitat de cDNA detectat. Aquesta recta patró es realitza mitjançant una dilució seriada d'una de les mostres, diluint 1/2 cada cop. A més, a la mateixa PCR s'analitza de cadascuna de les mostres l'expressió d'un gen invariable en la seva expressió encara que les cèl·lules hagin estat exposades a estímuls. En aquest cas, el nostre gen invariable, o *housekeeping*, és *L14*. Un cop obtinguda la quantitat de cada gen a cadascuna de les mostres, aquesta quantitat és referida a la quantitat de *L14* detectada a la mateixa mostra. Els resultats són expressats com a nivell d'mRNA en relació amb l'expressió del gen *L14* a cada mostra i seguint les MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). Els oligonucleòtids utilitzats es troben anotats a la Taula 4. Aquests oligonucleòtids es dissenyen mitjançant la utilització de l'eina *on-line* Primer-Blast (NCBI) per a cadascun dels gens, escollint com a opció vàlida aquells encebadors que es troben separats per un intró o més de distància a la seqüència genòmica (aquest últim pas no seria necessari ja que durant l'extracció de l'RNA

s'afegeix un pas de tractament amb DNAsa, cosa que evita que hi hagi una amplificació inespecífica de DNA genòmic.

Gen	Encebador directe (Fwd)	Encebador revers (Rev)
<i>Trex1</i>	5'ACTATTGGCAACGAGCGGTTC 3'	5'AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC 3'
<i>Samhd1</i>	5'CAGCTCATTCGGGTGTACTGT 3'	5'GTGGCTTGGTGAAGTCCCT 3'
<i>Oas1</i>	5'GGGCCTCTAAAGGGGTCAAG 3'	5'TCAAACCTTCACTCCACAACGTC 3'
<i>Il-18</i>	5'TGGGCCTCAAAGGAAAGAAT 3'	5'CAGGCTTGTGCTCTGCTTGT 3'
<i>Tnf-α</i>	5'CCAGACCCTCACACTCAGATC 3'	5'CACTTGGTGGTTTGCTACGAC 3'
<i>Irf-1</i>	5'GAGATGTTAGCCCGGACACTT 3'	5'CCATATCCAAGTCTGACCCA 3'
<i>Irf-3</i>	5'GAGAGCCGAACGAGGTTTCAAG 3'	5'CTCCAGGTTGACACGTCCTG 3'
<i>L14</i>	5'TCCCAGGCTGTTAACGCGGT 3'	5'GCGCTGGCTGAATGCTCTG 3'

**Taula 4: Encebadors utilitzats a la PCR quantitativa o qPCR.** Aquests oligonucleòtids es dissenyen mitjançant la utilització de l'eina on-line Primer-Blast (NCBI) per a cadascun dels gens.

## ***Transfecció d'RNA d'interferència (siRNA)***

Per a aquest assaig, es va utilitzar un oligonucleòtid específic de SAMHD1 GAUAUACUCUGUGUUCAGA(dTdT). Es van utilitzar també dos oligonucleòtids control, dirigits contra dues seqüències no presents als macròfags, com són la luciferasa, GL3 AACUUACGCUGAGUACUUCGA(dTdT), i la proteïna verda fluorescent, GFPGGCUACGUCCAGGAGCGCACCC(dTdT). Aquests oligonucleòtids es dissenyen mitjançant la utilització de l'eina *on-line* MWG Eurofins (Ebersberg, Germany) per a cadascun dels gens. La transfecció del siRNA es va fer mitjançant electroporació amb el sistema Neon Transfection System (Life Technologies), seguint el protocol de la casa comercial. Per cada punt s'utilitzen  $10^6$  BMDM, les quals són resuspeses en 100µl de Buffer R (subministrat amb el kit) i amb 0,2µM del corresponent siRNA, i aquestes són sotmeses a l'electroporació amb l'aparell subministrat per la casa comercial (Life Technologies) amb 1400V, 20ms i dos pulsos. Després de l'electroporació, les cèl·lules ( $10^6$ ) van ser incubades durant 24 hores en plaques de 6 pous amb 3ml de medi Complet (veure apartat de cultius cel·lulars), i després d'aquest temps es va procedir a fer els estímuls de manera normal.

## ***Assaig de proliferació***

---

Es van cultivar  $10^5$  macròfags en plaques de 24 pous, amb medi Starved (veure apartat de cultius cel·lulars). Després de 16-18 hores, es van afegir els estímuls pertinents durant 24 hores (per triplicat). Passat aquest temps, es va afegir medi Complet (veure apartat de cultius cel·lulars) suplementat amb timidina tritiada [ $^3\text{H}$ ], i es van obtenir mostres al mateix moment d'afegir la timidina, i a les 3, 6 i 9 hores. Les mostres es fixen amb  $500\mu\text{l}$  de metanol fred al 70% mínim 30 minuts a  $4^\circ\text{C}$  (es pot deixar fins a tota una nit) i seguidament es fan tres rentats de 5 minuts amb  $500\mu\text{l}$  de TCA al 10%. S'afegeix  $500\mu\text{l}$  per pou de solució de solubilització (0,3M NaOH, 1% SDS) i després de 30 minuts en agitació suau (a temperatura ambient) es recullen les mostres, cadascuna en tub que conté 2ml de líquid de centelleig Ecolite (MPBiomedicals LLC). Els tubs es valoren durant tres minuts en un comptador de centelleig Packard TRI-CARB 2900 (Packard) amb el programa de  $^3\text{H}$ .

## ***Preparacions d'immunocitoquímica (ICQ)***

---

Es van cultivar  $10^5$  cèl·lules en medi complet, en plaques de 24 pous amb un vidre cubreobjectes rodó al fons. Després del tractament desitjat, les cèl·lules es renten un cop amb  $200\mu\text{l}$  de PBS i es fixen amb paraformaldehid al 4% en PBS durant 10 minuts. Després d'un altre rentat amb PBS, les cèl·lules es permeabilitzen durant 5 minuts a temperatura ambient amb  $150\mu\text{l}$  de Tritó al 0,5% en PBS. Immediatament després, s'incuben les cèl·lules amb tampó de bloqueig (TBS 1x, BSA 3%, CD16/32 1:3000;  $100\mu\text{l}$ /pou) durant 30 minuts a  $4^\circ\text{C}$ , el qual conté l'anticòs anti CD16/CD32 (BD Pharmingen; San Diego, CA), un bloquejador dels receptors Fc dels macròfags (Receptor Fc $\gamma$ III/II). A la mostra s'afegeix directament l'anticòs primari desitjat (Taula 2) per assolir la concentració adequada. Posteriorment es fa un rentat de 5 minuts amb PBS fred i tot seguit s'afegeix l'anticòs secundari fluorescent corresponent en  $100\mu\text{l}$  de tampó de bloqueig. A partir d'aquí les plaques es tracten en tot moment en la foscor i a  $4^\circ\text{C}$ . Finalment, les cèl·lules es renten tres cops amb  $500\mu\text{l}$  de PBS fred i s'incuben amb DAPI  $0,1\mu\text{g}/\text{ml}$ , i tot seguit es realitza el muntatge utilitzant Mowiol (Calbiochem; Darmstadt, Alemanya).



## ***Anàlisi de focis nuclears mitjançant microscopia electrònica***

---

A partir de les mostres preparades (apartat d'ICQ), s'obtenen les imatges amb un microscopi de fluorescència ScanR (Olympus; Japó). De cada mostra s'agafa una regió d'on es prenen 250 imatges (50x50), i de cadascuna es fan 50 imatges en l'eix Z. Es va crear llavors un programa en Fiji per tal de quantificar els focis dintre del nucli. El programa es basa en apilar les imatges en Z de cadascuna de les imatges i fer una mitjana de la intensitat a cada nucli, descartant totes aquelles cèl·lules que no es trobin completament dintre de la imatge. Es compten llavors el número de focis a cada nucli cel·lular segons els píxels (els focis més petits de 9 píxels són detectats com a negatius) i altres paràmetres d'intensitat, i les cèl·lules són llavors classificades en funció del número de focis que contenen (d'u a 5 focis, o >5 focis).

## ***Plasmidis***

---

La regió promotora de *Samhd1* va ser clonada a partir del DNA genòmic murí extret de  $10^7$  macròfags BMDM (veure apartat del Southern Blot, extracció de DNA genòmic). Aquesta regió (-1400+95) va ser amplificada per PCR (Taula 5) i clonada dins d'un plasmidi pCR2.1 del kit TA Cloning (Invitrogen) seguint les especificacions de la casa comercial (Annex 1). Donat que per les conformacions naturals de plegament que pot fer el vector pGL3-BASIC, no va ser possible la digestió amb l'enzim de restricció EcoRI (Takara), es van dissenyar encebadors de manera que generin una diana de restricció per poder incloure la seqüència del promotor al vector pGL3-BASIC (Taula 5). Després de l'electroforesi (en gel d'agarosa a l'1% en tampó TBE 1x) i la purificació de la banda amb el kit PCR (GenAllBiotechnology, Korea), es va digerir 1µg de la mostra amb SacI i BglII (Takara) durant una hora a 37°C. Es realitza una altra electroforesi i es purifica la banda, d'una mida de 1500pb corresponent al promotor de *Samhd1* i, després de la quantificació amb un espectrofotòmetre Nanodrop (ThermoScientific), es fa una lligació a 14°C durant tota la nit amb la lligasa T4 DNA Ligase (Roche), amb 50ng de lligand i 50ng de vector digerit. Després de la lligació es fa una transformació utilitzant 1µl de la lligació amb 100µl de cèl·lules *E. coli* competents (soca BL21) seguint el protocol següent: es deixa la barreja de cèl·lules amb el vector durant 30 minuts en gel, barrejant als 15 minuts, després d'aquest temps es posa a un bloc preescalfat a 42°C durant 1 minut i 30 segons, i immediatament després es deixa reposar en gel durant 2 minuts. S'afegeix 1ml del medi 2xYT (1,6% Triptona, 1% extracte de llevat, 0,5% NaCl, pH 7) i es deixa incubar a 37°C durant una hora amb agitació suau. Finalment, es fa una centrifugació a velocitat màxima durant 10 segons per recuperar les cèl·lules i es

plaquegen en plaques de cultiu bacterià en medi LB(10gr/L Triptona, 5gr/L extracte de llevat, 10gr/L NaCl, 20gr/L agar, pH 7) suplementat amb ampicil·lina (100µg/ml), a 37°C durant una nit. De les colònies crescudes en placa se'n fa un cultiu bacterià líquid en 3ml de medi 2xYT suplementat amb ampicil·lina 1:100 i se'n fa una miniprep mitjançant el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) segons el protocol de la casa comercial. Tots els plasmidis van ser finalment seqüenciats mitjançant el kit BigDye 3.1 (PerkinElmer; Wellesley, MA) per comprovar que el fragment estava ben inserit i la seqüència era la correcta.

## ***Transfecció per expressió transitòria i assajos marcadors duals de luciferasa-renilla***

Per a la transfecció dels plasmidis, es cultiven  $10^5$  cèl·lules RAW264.7 en 1ml de DMEM amb un 10% v/v de FCS en plaques de 12 pous. Es fa la transfecció amb 1µg del plasmidi per pou, cotransfectant amb un ratio 100:1 del vector pRL-TK-Renilla (Annex 1), utilitzant Superfect (Qiagen) seguint les indicacions de la casa comercial, i per triplicat per cada punt. 24 hores després, les cèl·lules són estimulades amb les citocines i al temps desitjats. L'obtenció del extractes per valorar l'activitat luciferasa i renilla es fa utilitzant el kit Dual Luciferase Reporter Assay (Promega), seguint les instruccions de la casa comercial, amb una lectura a un luminòmetre TD20/20 (Turner Designs; Sunnyvale, CA).

Nom	Seqüència
p1498 (Fwd)	5'GATAGGTACCGAGCTCTTACGGTCCTTGACACAACAC 3'
p1373 (Fwd)	5'GATAGGTACCGAGCTCTTACGCTCTCCAGCCCTCTCT 3'
p1205 (Fwd)	5'GATAGGTACCGAGCTCTTACGGGGTAATGAACATCGG 3'
p547 (Fwd)	5'GATAGGTACCGAGCTCTTACGAAAGGCGTGCGCCACC 3'
p272 (Fwd)	5'GATAGGTACCGAGCTCTTACGGCTCTGGGATAGGAGT 3'
p97 (Fwd)	5'GATAGGTACCGAGCTCTTACGGGCGATCGCGTAGGCA 3'
Reverse (Rev)	5'CCAAGCTTACTTAGATCGCAGATCTCGAGATTAGCTGTTG 3'
CEBPmut.site (Fwd)	5'GGCCCCGCCCGGAGACAGGGATTCACTGTGTAGCCCTG 3'
CEBPmut.site (Rev)	5'GGGGGGCGGGGCCAAAAACAACAAGCTCGAGGCCCGATG 3'
CEBPdel.site (Fwd)	5'CATCGGGCCTCGAGCCGAGACAGGGATTCACTGTGTAGCCC 3'
CEBPdel.site (Rev)	5'GTGAATCCCTGTCTCGGCTCGAGGCCCGATGTTTATTACCC 3'
F3-F4 Del (Fwd)	5'CTGTGTAGCCCTGGGGCTAGCCTCAAACCTCAGAAATCAGC 3'
F3-F4 Del (Rev)	5'GAGTTTGAGGCTAGCCCCAGGGCTACACAGTGAATCCCTG 3'

**Taula 5: Encebadors utilitzats per al clonatge.** Els encebadors van ser dissenyats manualment i demanats mitjançant l'eina *on-line* de Sigma. Els encebadors p1498, p1373, p1205, p547, p272 i p97, es van utilitzar amb l'encebador comú "Reverse (Rev)".

## *Assaig en Gel de Retard (EMSA)*

### ▪ Marcatge de les sondes

Els assajos de retard en gel (EMSA; *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) s'han realitzat com s'ha descrit anteriorment (Casals-Casas et al., 2009). Els oligonucleòtids utilitzats (Taula 6) són marcats radioactivament amb ATP [ $\gamma$ - $^{32}$ P] (3.000Ci/mmol, 10mCi/ml; PerkinElmer) al seu extrem 5' terminal utilitzant la T4 Polinucleotide Kinase (PNK; New England Biolabs, NEB; USA). Les parelles d'oligonucleòtids complementaris (Taula 6), són barrejats (0,83 $\mu$ l de cadascun a 100 $\mu$ M, en un volum final de 20 $\mu$ l d'aigua destil·lada) i escalfades a 95°C, durant 5 minuts. Posteriorment es deixen 30 minuts a temperatura ambient refredant per aconseguir la seva hibridació. La barreja de reacció per al marcatge conté 1 $\mu$ l d'oligonucleòtid de doble cadena (del preparat de 20 $\mu$ l), 1 $\mu$ l de la T4, 2,5 $\mu$ l de BSA (1mg/ml), 5 $\mu$ l del tampó T4 PNK (NEB) i 5 $\mu$ l d'ATP [ $\gamma$ - $^{32}$ P], en un volum final de 50 $\mu$ l. S'incuba la barreja durant una hora a 37°C i s'atura la reacció mitjançant l'escalfament de la barreja durant 10 minuts a 65°C. Després d'aquest temps es deixa reposar durant 10 minuts a temperatura ambient i els oligonucleòtids són purificats mitjançant columnes Illustra MicroSpin G-25 (GE Healthcare) seguint el protocol de la casa comercial. El marcatge radioactiu dels oligonucleòtids es comprova mitjançant centelleig. Per fer-ho, es barreja 1 $\mu$ l de la solució d'oligonucleòtids purificats amb 2ml de líquid de centelleig Ecolite (MP Biomedicals LLC, CA, USA) i es comptabilitza durant un minut en un comptador de centelleig Packard TRI-CARB 2900 (Packard) amb el protocol per a  $^{32}$ P.

Nom	Seqüència
<b>F1 (Fwd)</b>	5'GGGTAATGAACATCGGGCCTCGAGCTTGTTTTGTTTTGGTTTTGTTTTTCG 3'
<b>F1 (Rev)</b>	5' CGAAAAACAAAACCAAAAACAAAACAAGCTCGAGGCCCGATGTTTACCC3'
<b>F2 (Fwd)</b>	5'TGTTTTGTTTTGGTTTTGTTTTTCGAGACAGGGATTCACTGTGTAGCCCTGG 3'
<b>F2 (Rev)</b>	5' CCAGGGCTACACAGTGAATCCCTGTCTCGAAAAACAAAACCAAAAACAAAACA3'
<b>F3 (Fwd)</b>	5'AGACAGGGATTCACTGTGTAGCCCTGGCTGTCTGGAACCTCACTTTGTAGACCA 3'
<b>F3 (Rev)</b>	5' TGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTACACAGTGAATCCCTGTCT3'
<b>F4 (Fwd)</b>	5'CTGTCCTGGAACCTCACTTTGTAGACCAGGCTAGCCTCAAACCTCAGAAATCAGCC 3'
<b>F4 (Rev)</b>	5' GGCTGATTTCTGAGTTTGAGGCTAGCCTGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAG3'
<b>F5 (Fwd)</b>	5'GGCTAGCCTCAAACCTCAGAAATCAGCCTGCCTCTGCCTCCAAATGCTGGGATT 3'

<b>F5 (Rev)</b>	5' AATCCCAGCATTTGGGAGGCAGAGGCAGGCTGATTCTGAGTTTGAGGCTAGCC3'
<b>IRF-1 (Fwd)</b>	5'TTTTTGGTTTTGTTTTTCGAGA 3'
<b>IRF-1 (Rev)</b>	5' TCTCGAAAAAACAAAACCAAAAA3'
<b>C/EBP (Fwd)</b>	5'TTGTTTTGTTTTGGTTTTGTTTTT 3'
<b>C/EBP (Rev)</b>	5' AAAAAACAAAACCAAAAACAAAACAA3'
<b>F1-F2 (Fwd)</b>	5'TGTTTTGTTTTGGTTTTGTTTTTCGAGA 3'
<b>F1-F2 (Rev)</b>	5' TCTCGAAAAAACAAAACCAAAAACAAAACA3'
<b>F2-F3 (Fwd)</b>	5'CAGGGATTCACTGTGTAGCCCTGG 3'
<b>F2-F3 (Rev)</b>	5' CCAGGGCTACACAGTGAATCCCTG3'
<b>F3-F4 (Fwd)</b>	5'CTGTCCTGGAACACTTTGTAGACCA 3'
<b>F3-F4 (Rev)</b>	5' TGGTCTACAAAGTGAGTTCCAGGACAG3'
<b>F5-last (Fwd)</b>	5'TGCCTCTGCCTCCAAATGCTGGGATT 3'
<b>F5-last (Rev)</b>	5' AATCCCAGCATTTGGGAGCAGAGGCA3'

**Taula 6: Oligonucleòtids utilitzats en l'assaig de retard (EMSA).** Les seqüències van ser dissenyades manualment i demanades a partir de l'eina *on-line* de Sigma.

#### ▪ Barreja d'incubació

Per fer els gels d'EMSA, s'incuben 10µg d'extractes nuclears amb el tampó d'unió (12mM HEPES pH 7,9, 60mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 12% v/v glicerol, 0,12mM EDTA, 0,3mM DTT, 0,3mM PMSF) i 1,5µg de poly(dI-dC) (AmershamBioscience), portats fins a un volum final de 15µl amb tampó de diàlisi (20mM HEPES pH 7,9, 20% v/v glicerol, 100mM KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT, pH 7). La barreja és incubada a temperatura ambient durant 8 minuts i tot seguit s'afegeixen 20.000cpm de l'oligonucleòtid marcat (els oligonucleòtids marcats es dilueixen amb aigua destil·lada de manera que hi hagi 20.000cpm/µl, així doncs, s'afegeix 1µl per reacció). La barreja resultant s'incuba durant 15 minuts a temperatura ambient i les mostres es carreguen al gel.

#### ▪ Gel EMSA

Per a la separació de les mostres es realitza un gel de poliàcrilamida no desnaturant de 16x18x0,15cm al 5% (5% acrilamida:bisacrilamida 29:1, amb un 5% de glicerol i 0.25% de tampó TBE 1x (0,22M Tris, 180mM Borat, 5mM EDTA, pH 8,3), 260µl d'APS 10% i 25µl TEMED). Una vegada polimeritzat (15 minuts de temps de polimerització aproximat), el gel es col·loca a la cubeta d'electroforesi i s'afegeixen els tampons: TBE 0,5x al càtode i TBE 0,25x a l'ànode, i es

realitza un rentat dels pous pipetejant el mateix tampó per eliminar l'acrilamida i altres substàncies que puguin haver quedat als pous. Se li realitza una electroforesi prèvia al gel, sense mostres, durant unes dues hores a 4°C i 300V, fins que l'amperatge ha disminuït a la meitat de l'inicial. Després d'aquesta electroforesi prèvia, es canvien els tampons de la cubeta (TBE 0,5x a càtode i TBE 0,25x a l'ànode) i es tornen a fer rentats dels pous mitjançant pipeteig. És llavors quan es carreguen les mostres (Barreja d'incubació: extractes nucleics i oligonucleòtids marcats) i es prossegueix amb l'electroforesi a 4°C i 300V durant tres hores més. Al gel també s'afegeix un carril que únicament conté els oligonucleòtids marcats i se li afegeixen 2µl de tampó de càrrega (30% v/v glicerol, 0,25% w/v blau de bromofenol, 0,25% xilè cianol). Una vegada finalitzat la electroforesi (quan la banda de xilè cianol arriba a 3/4 parts del recorregut), el gel resultant és assecat en paper Whatmann 3M dins d'un dessecador BioRad 583 (BioRad) al buit durant una hora. El paper s'exposa a una pantalla Phosphoimager (Molecular Dynamics) durant tota una nit dins d'un cassette. La pantalla s'escaneja a un aparell d'escàner Typhoon Scan 8600 (Amersham), on es visualitzen les bandes amb la generació d'un fitxer d'imatge del format *tiff*. Pels assajos de competició amb oligonucleòtids no marcats radioactivament, aquests s'afegeixen a la barreja inicial amb una concentració de fins a 100 vegades superior respecte a l'oligonucleòtid marcat. Pels assajos de competició amb els anticossos (*Supershift*), s'afegeix 1µg d'anticòs a la barreja inicial, abans d'afegir els oligonucleòtids marcats. En ambdós casos, el temps d'incubació s'amplia fins als 30 minuts.

## ***Assaig d'Immunoprecipitació de cromatina (ChIP)***

---

En aquest assaig, després dels estímuls pertinents,  $20 \times 10^6$  BMDM a una placa de 150mm de diàmetre són fixats directament mitjançant l'addició de formaldehid a una concentració final del 2% v/v sobre el medi de cultiu (calen dues plaques per punt de condició experimental). La reacció de fixacions realitza a temperatura ambient durant 20 minuts amb una lleugera agitació. Seguidament es realitzen dos rentats seqüencials de la placa amb 10ml de PBS a 4°C i finalment, els macròfags són recollits en un tub amb un raspall suau amb 3ml per placa de Tris-HCl 0.1M pH 9,4 amb DTT 10mM. Les cèl·lules són incubades durant 15 minuts a 30°C i recollides per centrifugació (800g, 4°C, 5 minuts). El sediment resultant és resuspès i centrifugat (800g, 4°C, 5 minuts) seqüencialment amb 1ml de PBS, 1ml de tampó I (10mM HEPES pH 6.5, 0.25% Triton-X100, 10mM EDTA, 0.5mM EGTA i els inhibidors de proteases: 1mM PMSF, 1mM iodacetamida, 1mM ortovanadat, 10µg/ml aprotinina i 1µg/ml leupeptina) i 1ml de tampó II (10mM HEPES pH 6,5, 20mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA i els inhibidors de proteases). Finalment, les cèl·lules

són resuspeses en 300µl de tampó de lisi a temperatura ambient (1% SDS, 10mM EDTA, 0,5mM Tris-HCl pH 8,1 i els inhibidors de proteases) i sonicades en el sonicador Bioruptor (Diagenode; Lieja, Bèlgica). Les condicions de sonicació del lisat són de 10 minuts de sonicació en el mode *High*, amb lapses de 0,5/0,5 minuts de sonicació/descans, repetit tres vegades (30 minuts totals de sonicació). La mida dels fragments de DNA obtinguts es confirma mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa, sent la mida òptima entre 200 i 1200 parells de bases. La cromatina soluble obtinguda és centrifugada durant 10 minuts a 16.000g i el sobrenedant és diluït amb el tampó de dilució (1% Triton X-100, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8,1, i inhibidors de proteases) fins a un volum final de 1,1ml. D'aquesta suspensió, se'n guarden 100µl a 4°C, els quals serviran per a un control o *Input*. La resta se sotmet a una preincubació en presència de 2µg de Sonicated Salmon Sperm DNA (Amersham), 2,6µg de IgG inespecífiques i 20µg de Magna ChIP Protein A Magnetic Beads (Millipore). Aquesta preincubació es realitza durant tota una nit a 4°C, i amb agitació suau, amb la finalitat de reduir les unions inespecífiques.

Després de centrifugar (16.000g durant 10 segons) les mostres per eliminar les partícules de la preincubació, les mostres són diluïdes novament amb tampó de dilució i separades en volums idèntics (1ml) per a les immunoprecipitacions que segueixen, per a l'anticòs específic i per al control amb anticossos inespecífics. Cada immunoprecipitació s'incuba amb quantitats iguals (2µg) d'anticòs específic o d'IgGs, segons correspongui, durant 6 hores a 4°C. Seguidament, s'addiciona a cada punt 20µl de les Magnetic Beads i es deixa en agitació suau durant tota una nit a 4°C. Les partícules són seqüencialment rentades durant 10 minuts a 4°C amb una lleugera agitació, centrifugades (10 segons, 16.000g) i disposades a la gradeta magnètica facilitada per la casa comercial (Millipore) amb 1ml de TSE I (150mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8,1), 1ml de TSE II (500mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8,1) i 1ml de tampó III (0,25M LiCl, 1% NP-40, 1% w/v deoxicolat, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH8,1). Finalment, es renten les partícules amb 1ml de PBS a 4°C i s'elueixen els immunoprecipitats amb 300µl de solució d'elució (0,1M NaHCO<sub>3</sub>, 1% SDS), en tres rentats seqüencials de 100µl de 20 minuts cadascun. Entre rentats es realitzen centrifugacions (10 segons, 16.000g), es disposen les mostres a la gradeta magnètica, i es recupera el sobrenedant, el qual es reserva en un nou eppendorf. Una vegada obtingut l'eluït, es realitza la reversió de l'entrecruament dels 300µl d'immunoprecipitats així també com dels *Inputs* que han estat reservats a 4°C, mitjançant la incubació de les mostres a 65°C durant tota una nit. El DNA, alliberat després de la reversió de les mostres dels *Inputs* i de les immunoprecipitacions específiques i inespecífiques, és purificat amb el kit Qiaquick PCR purification (Qiagen; Hilden, Alemanya) segons les especificacions del fabricant i eluïts en un

volum final de 60µl. Les mostres resultants s'analitzen per qPCR (veure apartat de PCR quantitativa) utilitzant els encebadors de les zones promotores indicades a la Taula 7. Els càlculs inclouen una normalització dels immunoprecipitats amb els seus *Inputs* corresponents i una posterior normalització amb els resultats de l'anàlisi d'una regió no promotora per a les unions inespecífiques (36B4, corresponent a l'expressió d'una proteïna ribosomal).

Nom	Encebador directe (Fwd)	Encebador revers (Rev)
<b>Samhd1</b>	5'GGGTAATGAACATCGGGCCTCG 3'	5'GAGAGCCGGGTGTGGTGGCGC 3'
<b>36B4</b>	5'AGATGCAGCAGATCCGCAT 3'	5'GTTCTTGCCCATCAGCACC 3'

**Taula 7: Encebadors utilitzats en l'assaig d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP).** Aquests oligonucleòtids es dissenyen mitjançant la utilització de l'eina *on-line* Primer-Blast (NCBI) per a cadascun dels gens i demanades a partir de l'eina *on-line* de Sigma.

## Citometria de flux (FACS)

Al dia 7, els macròfags BMDM es recullen mitjançant un raspap suau del cultiu cel·lular adherit a la superfície de la placa i s'utilitzen 10<sup>6</sup> cèl·lules per pou i per condició, en plaques de 96 pous. Es fa una centrifugació de la placa durant tres minuts a 4°C i 500g, i un cop eliminat el sobrenedant, es resuspenen les cèl·lules en 100µl de PBS FACS (PBS 1x, 10% FCS, 4mM EDTA). S'afegeix llavors 2µl per pou de l'anticòs anti CD16/CD32 (Taula 2) i es deixa incubar durant 15 minuts a 4°C. Es centrifuga la placa de nou durant tres minuts a 500g a 4°C, i es resuspenen les cèl·lules en PBS FACS fred. Es fa una barreja amb els anticossos desitjats (o els isotips si és el cas) (Taula 2), s'afegeixen als pous corresponents i es deixen incubar durant 30 minuts a 4°C, i en fosc. S'afegeixen 100µl de PBS FACS fred per pou per aturar la reacció i la placa es centrifuga a 500g durant tres minuts i a 4°C. Es resuspenen les cèl·lules de nou en 200µl de PBS FACS fred i s'afegeix 1µl per mostra d'una solució inicial de DAPI 10mg/ml (Sigma). Les mostres s'adquireixen en un citòmetre Gallios™ Flow Cytometer (Beckman Coulter).

## Anàlisi proteòmic

- **Digestió proteica**

Es realitza un gel d'acrilamida no desnaturant i es fa un assaig en gel de retard amb la sonda marcada radioactivament (control) i en paral·lel al mateix gel, el mateix assaig amb sonda no marcada. Se segueix el mateix procés de l'EMSA radioactiu (veure l'apartat "Assaig en

gel de retard (EMSA)”) fins al moment d’assecar el gel. En aquest cas, se situa el gel sota una campana d’extracció de gasos per a la protecció de la mostra, i es talla el gel separant la part radioactiva de la no radioactiva. La part radioactiva es deixa assecar durant una hora a l’assecador de gels i passat aquest temps es deixa exposar durant dues hores a la pantalla phosphoimager; mentrestant, la part no radioactiva es conserva durant el temps que dura l’assecat i l’exposició, a 4°C dins d’una cambra humida. Passat el temps corresponent, es revela el gel radioactiu i es calcula la posició de les bandes al gel no radioactiu. El gel és manualment tallat sota la campana d’extracció i amb les mesures de seguretat pertinents per evitar la contaminació de les mostres, i portat pel seu anàlisi al servei de Proteòmica de l’Idibell.

La digestió del gel va ser realitzada seguint el protocol descrit per Shevchenko et al. amb modificacions menors. Les bandes són rentades breument amb aigua, bicarbonat d’amoni (50mM) i acetonitril al 50%. A continuació, les mostres es redueixen mitjançant la incubació amb ditiotreitòl (10mM) a 60°C durant 45 minuts i alquilades amb iodacetamida (50mM) durant 30 minuts en foscor. Finalment, es digereixen les proteïnes amb tripsina (13ng/μl) durant tres hores a 37°C (Trypsin Gold, Promega). La digestió s’atura mitjançant l’addició d’àcid fòrmic al 5% i els pèptids s’extrauen dues vegades amb acetonitril 70% i àcid fòrmic 5% (sonicació de 10 minuts). Els extractes peptídics es deixen evaporant fins que s’han assecat i seguidament es resuspenen amb acetonitril al 2% i àcid fòrmic al 0,1%, i s’analitzen mitjançant nano-HPLC-MSMS.

- **Anàlisi de l’LC-MSMS i recerca de seqüències de proteïnes a la base de dades**

Els pèptids són analitzats utilitzant un Easy-nanoLCII (Proxeon, Dinamarca) acoblat a un segrestador d’ions Amazon ETD (Bruker Daltonics). Els pèptids són primerament atrapats a una Easycolumn™ C18 (2cm, 5μm, 100μm ID; Thermo Scientific), i posteriorment separats utilitzant una columna analítica nanocapil·lar C18 (75μm ID, 15cm, Acclaim® PepMap 100; Thermo Scientific). El gradient del cromatògraf s’aconsegueix mitjançant l’augment del percentatge del tampó B de 0 a 35% a una velocitat de flux de 300nI/minut durant 30 minuts (tampó A: àcid fòrmic al 0,1%; tampó B: àcid fòrmic al 0,1% i acetonitril al 100%). Els pèptids eluïts són llavors introduïts a un segrestador d’ions Amazon ETD per ionització en electro spray mitjançant Captive-Spray ion Source (Bruker Daltonics), amb un voltatge aplicat de 1450V i N<sub>2</sub> com a gas assecant. Les masses de pèptids (400-1400m/z) són analitzades en un anàlisi complet amb una gran resolució. Els 10 pèptids més intensos són seleccionats i fragmentats en un segrestador d’ions de tres dimensions utilitzant tant la fragmentació induïda per col·lisió de dissociació com la transferència de dissociació, utilitzant com a gasos de col·lisió heli i metà, respectivament. Les dades són generades amb el software Data Analyst 4.1 (Bruker Daltonics).



Les dades MS i MS/MS, són analitzades amb el software Protein Scape 3.1.2 (Bruker Daltonics) utilitzant Mascot 2.4.0 (Matrix Science) com a motor de cerca i la base de dades SwissProt (2013-10, 541.561 seqüències; 192.480.382 residus). Els paràmetres específics per a la recerca a la base de dades per a la seqüència de les proteïnes, inclouen la taxonomia de *Mus musculus*, l'oxidació de metionina i modificacions variables i la carbamilació de cisteïnes com a modificació fixa. Altres paràmetres de cerca van ser: digestió de tripsina amb dues divisions perdudes, estats de càrrega +1, +2 i +3 per a l'ió precursor, error de massa de 50ppm d'ió precursor i 0,5Da per a ions fragmentats. Per a la identificació d'un llistat de significància dels pèptids (Mascot) s'utilitza un  $p < 0,05$ , i només es consideren els pèptids amb un valor Mascot mínim de 25 i proteïnes amb un Mascot mínim de 35. Els espectres de pèptids acetilats també són examinats manualment.

# Resultats

|

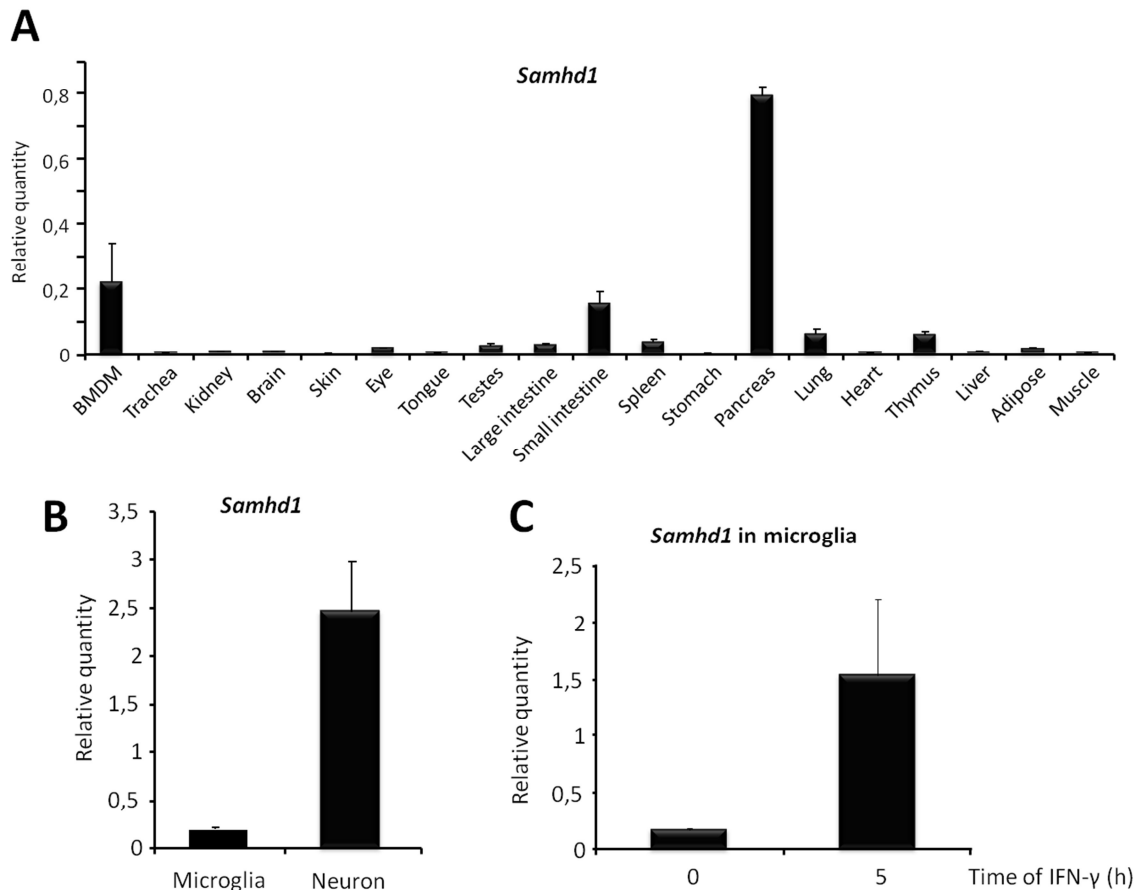
# Resultats

## Caracterització de l'expressió de *Samhd1*: els macròfags expressen *Samhd1*

Degut a la importància de SAMHD1 com a protector front al dany al DNA en els macròfags, vàrem caracteritzar el seu perfil d'expressió en diferents teixits, tipus cel·lulars i en front d'estímuls tant pro- com antiinflamatoris. Inicialment, a partir de la obtenció d'mRNA de diversos teixits de ratolí i per qPCR, hem vist que *Samhd1* es troba expressat de forma molt intensa a teixits, com a l'intestí prim i al pàncrees, i també es troba expressat però en menor quantitat als pulmons i al timus (Figura 29A). En aquesta figura hem afegit l'expressió en BMDM per mostrar que segurament la forta expressió en aquests teixits pugui ser deguda a la presència del macròfags dins dels mateixos.

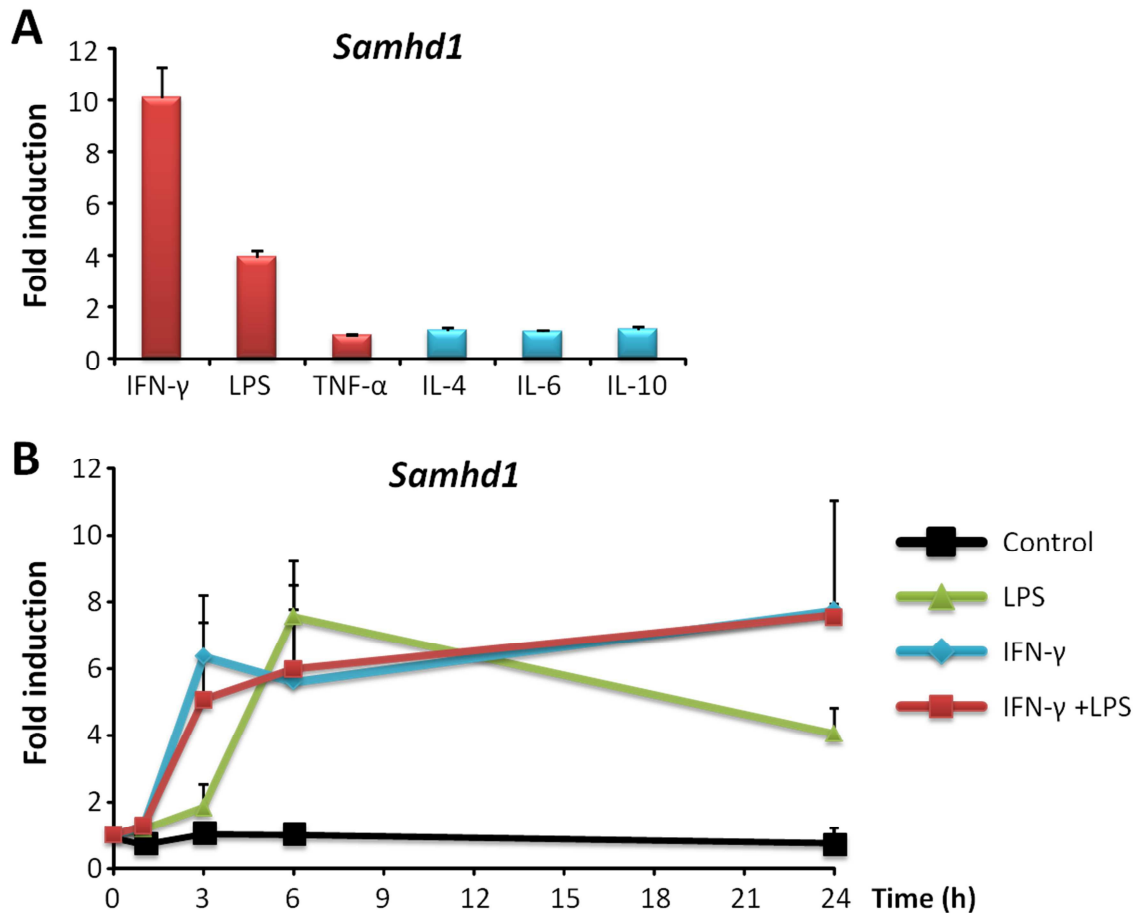
La síndrome d'Aicardi-Goutières té una especial afectació al cervell (Aicardi, 2002), per aquest motiu també es va analitzar l'expressió de *Samhd1* a neurones i micròglia. Està prou demostrat que les cèl·lules de la micròglia provenen d'un origen comú amb els macròfags i que s'originen durant l'etapa fetal. Per tant, podem parlar de macròfags residents al sistema nerviós central (Corraliza, 2014). En un nivell basal, les neurones tenen una expressió de *Samhd1* de fins a 9 cops més elevada que l'expressió a micròglia (Figura 29B). Tot i això, l'expressió en aquest tipus de cèl·lules pot ser induïda en presència d'IFN- $\gamma$ , provocant un augment de l'expressió de fins a 15 vegades (Figura 29C).

Per tal de saber si l'expressió de *Samhd1* a macròfags és només constitutiva o pot ser modulada, es van cultivar aquestes cèl·lules en presència de citocines i factors de creixement. Per a l'obtenció de macròfags, es va cultivar durant 7 dies el moll de l'os de ratolins mascles Balb/c en presència d'M-CSF. Després d'aquest temps, les cèl·lules van ser replaquejades i es van deixar durant 18 hores sense el factor de creixement. Aquest pas provoca l'aturada de la diferenciació i de la proliferació dels macròfags, que queden estacionats a la fase G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular. Aquestes cèl·lules van ser exposades a citocines pro i antiinflamatòries, i es va analitzar l'expressió de *Samhd1* mitjançant PCR quantitativa. Es pot observar que *Samhd1* és induït en presència d'IFN- $\gamma$ , així com també d'LPS, però no es troba induït quan les cèl·lules són exposades a citocines antiinflamatòries (IL-4, -6 i -10) ni tampoc en front de TNF- $\alpha$  (Figura 30A).



**Figura 29: Expressió tissular de *Samhd1* en ratolins. A.** Expressió de *Samhd1* a diferents teixits murins. **B.** Expressió de *Samhd1* en cultius primaris de micròglia i neurones. **C.** Expressió de *Samhd1* en micròglia, en condicions basals i després de 5 hores en presència d'IFN- $\gamma$ . En tots els casos es va extraure l'RNA dels diferents teixits indicats, o cultius cel·lulars, i es va fer una retrotranscripció amb 1 $\mu$ g d'aquest RNA. L'expressió de l'RNA es va analitzar mitjançant PCR quantitativa (qPCR) utilitzant els encebadors específics de *Samhd1* i els resultats es mostren en relació a la quantitat d'*L14* detectada per qPCR a les mateixes mostres. A la figura es mostren les mitjanes i la desviació estàndard de tres experiments independents.

Es va analitzar llavors l'expressió de *Samhd1* en funció del temps amb cadascun dels estímuls proinflamatoris (Figura 30B). S'observa que l'expressió de *Samhd1* en presència d'LPS té el punt màxim d'expressió després de 6 hores d'inducció. No obstant això, cada citocina provoca una cinètica diferent de la inducció. L'IFN- $\gamma$  provoca un augment d'expressió a les tres hores i després s'estabilitzaria. La presència en macròfags d'IFN- $\gamma$  i LPS de manera conjunta, no produeix una sinèrgia ja que l'expressió de *Samhd1* es troba dintre dels mateixos nivells que cada citocina per separat (Figura 30B).

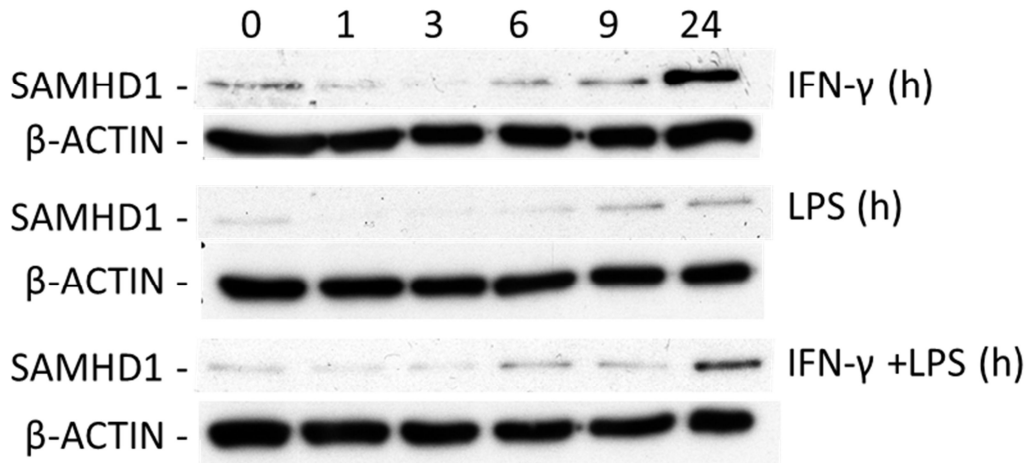


**Figura 30: L'expressió de *Samhd1* als macròfags s'indueix per citocines proinflamàtories.** **A.** Expressió de *Samhd1* en BMDM després de 24 hores en presència d'estímuls proinflamatoris (vermell) i antiinflamatoris (blau). El resultat en "Fold induction" s'indica respecte al valor control. **B.** Cinètica de l'expressió de *Samhd1* en presència de diferents citocines proinflamàtories. En ambdós casos es va extraure RNA de cultius de macròfags en presència de diferents citocines i es va utilitzar 1 $\mu$ g d'aquest mRNA per a la retrotranscripció i obtenció delcDNA. Les mostres van ser analitzades mitjançant qPCR amb encebadors específics de *Samhd1* i els resultats es mostren com a quantitat relativa respecte al gen *L14*. Les figures mostren els resultats promig i la desviació estàndard de tres resultats independents.

### Caracterització de l'expressió de la proteïna de SAMHD1

Es va realitzar llavors una extracció proteica total de macròfags i es va realitzar un anàlisi per Western Blot de la quantitat de proteïna de SAMHD1 cel·lular. En presència dels diferents estímuls proinflamatoris, es veu un augment de l'expressió de SAMHD1 en fer l'anàlisi mitjançant la tècnica del Western Blot. Es veu un augment de la quantitat de proteïna de SAMHD1 a les 24 hores en presència d'IFN- $\gamma$ , mentre que el pic en presència d'LPS i d'IFN- $\gamma$  i LPS a la vegada seria a les tres hores (Figura 31). Aquest retard en relació de l'RNA amb la proteïna és normal ja que, una vegada sintetitzat l'RNA, es necessita el reclutament de tota la maquinària

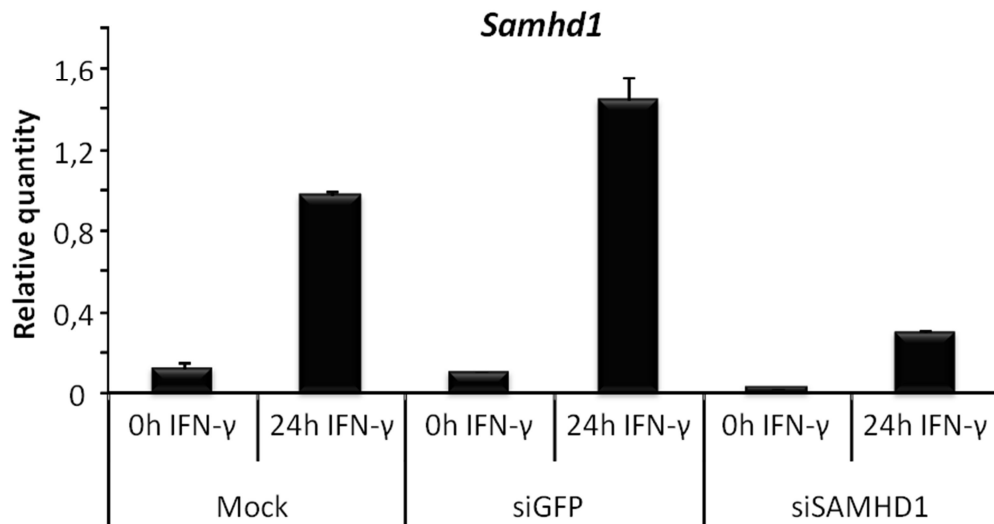
per a la traducció, el que comporta que hi hagi una diferència d'unes quantes hores entre el pic màxim d'expressió de l'RNA i el pic màxim de proteïna. La diferència pot ser de minuts, hores o, fins i tot, dies, ja que la traducció i la transcripció es donen de manera separada tant en temps com en l'espai. En aquest cas, la diferència estaria entre 3 i 9 hores.



**Figura 31: Els activadors proinflamatoris indueixen l'expressió proteica de SAMHD1.** L'expressió de SAMHD1 s'ha mesurat en macròfags incubats en presència dels agents indicats i durant el temps indicat. La determinació de la quantitat de proteïna es va realitzar mitjançant Western Blot utilitzant l'anticòs contra la proteïna murina de SAMHD1 (72KDa). Cada membrana també s'utilitza per al corresponent control de càrrega, mitjançant la utilització de l'anticòs contra la β-Actina (β-ACTIN). En aquesta figura es mostra un resultat representatiu de tres experiments realitzats de manera independent.

#### **Funció de SAMHD1: protecció front del dany al DNA**

S'ha descrit que les mutacions en homozigosi de *Samhd1* poden provocar leucèmia limfàtica crònica (CLL) en pacients amb AGS, suggerint una possible funció de SAMHD1 en la regulació i la proliferació cel·lular, així com també en resposta a agents inductors de dany al DNA (Clifford et al., 2014). Se sap que l'activació proinflamatòria indueix trencaments de DNA als macròfags degut a la gran producció d'NO, ROS i altres (Dauphinee and Karsan, 2005; Schroder et al., 2004). Per tal de contrarestar els efectes nocius d'aquestes productes oxidants, els macròfags desenvolupen una sèrie de mecanismes de protecció per a la reparació de les lesions induïdes al DNA. Creiem que SAMHD1 pot ser un element clau dins d'aquests mecanismes i, donada la importància de SAMHD1 a la patogènia de l'AGS, hem volgut caracteritzar el seu funcionament així com també el seu perfil d'expressió.

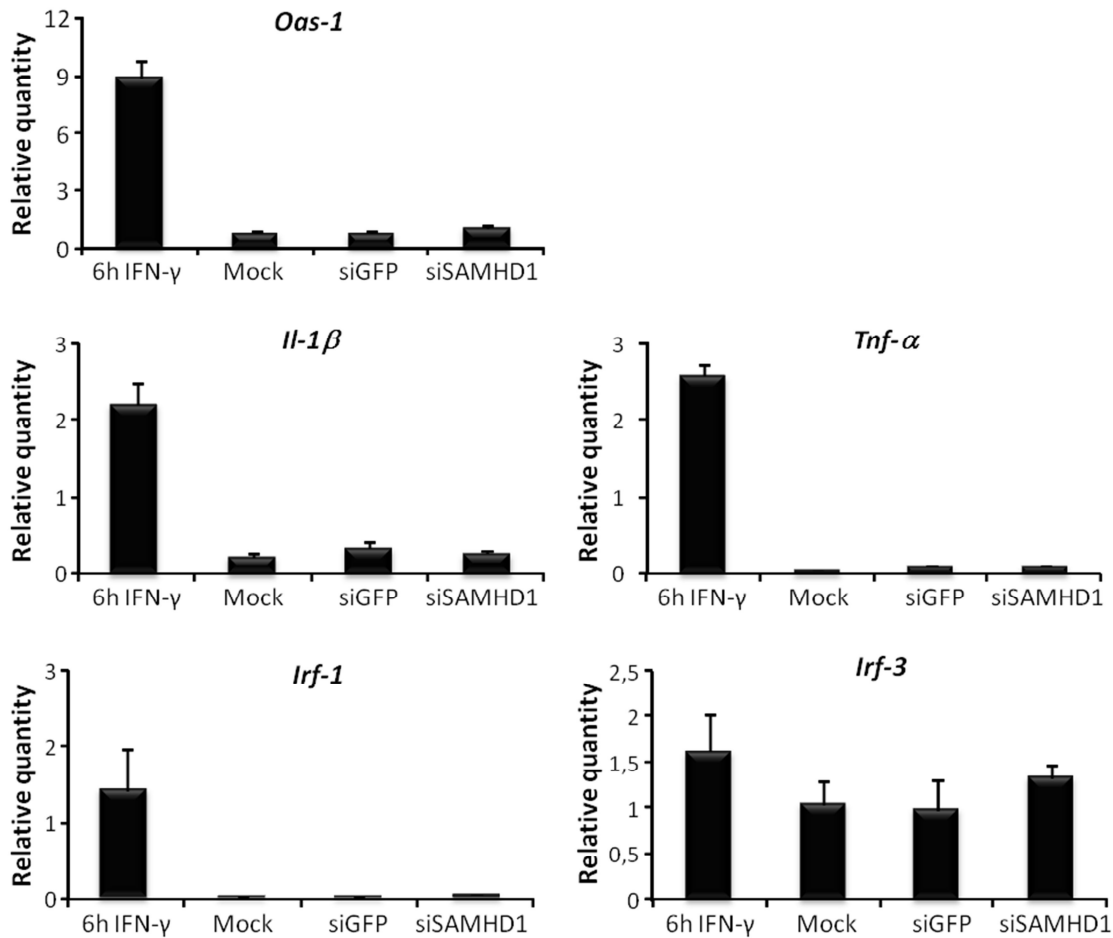


**Figura 32: Control del silenciament de SAMHD1.** Es va extraure l'RNA de  $5 \times 10^5$  cèl·lules electroporades per comprovar mitjançant qPCR l'expressió de *Samhd1* després del silenciament. Mock: cèl·lules sotmeses a electroporació sense siRNA; siGFP: cèl·lules electroporades amb siRNA d'un gen que no existeix a ratolí, en aquest cas de la proteïna verda fluorescent (GFP); siSAMHD1: cèl·lules electroporades amb l'siRNA de SAMHD1. A la figura es mostra un experiment representatiu de tres experiments independents. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard entre els triplicats d'una mostra a la mateixa qPCR.

Per tal de comprovar si SAMHD1 té una funció en resposta al dany del DNA, es va realitzar un assaig de silenciament en macròfags. Les cèl·lules (BMDM) van ser electroporades amb l'RNA de silenciament per a GFP (control) o per a SAMHD1 (siSAMHD1), o simplement sotmeses a electroporació sense siRNA (Mock). A la Figura 32 es pot apreciar la capacitat de silenciament dels oligossiSAMHD1 escollits.

Per comprovar que aquests efectes són provocats directament pel dèficit de SAMHD1 i no per possibles efectes indirectes sobre altres gens, es va analitzar l'expressió de gens importants en el desenvolupament de la resposta immunitària innata com són les proteïnes OAS-1 (*2'-5'-oligoadenylate synthetase 1*, detector de dsRNA al citosol), les citocines IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  i els factors de transcripció IRF1 i IRF-3. Com a control de la inducció d'aquest gens, es va utilitzar una mostra d'RNA total de BMDM tractats amb IFN- $\gamma$  durant 6 hores (Figura 33). En tots els experiments on es va fer servir el siSAMHD1 es va fer el control corresponent per comprovar el correcte silenciament del gen.

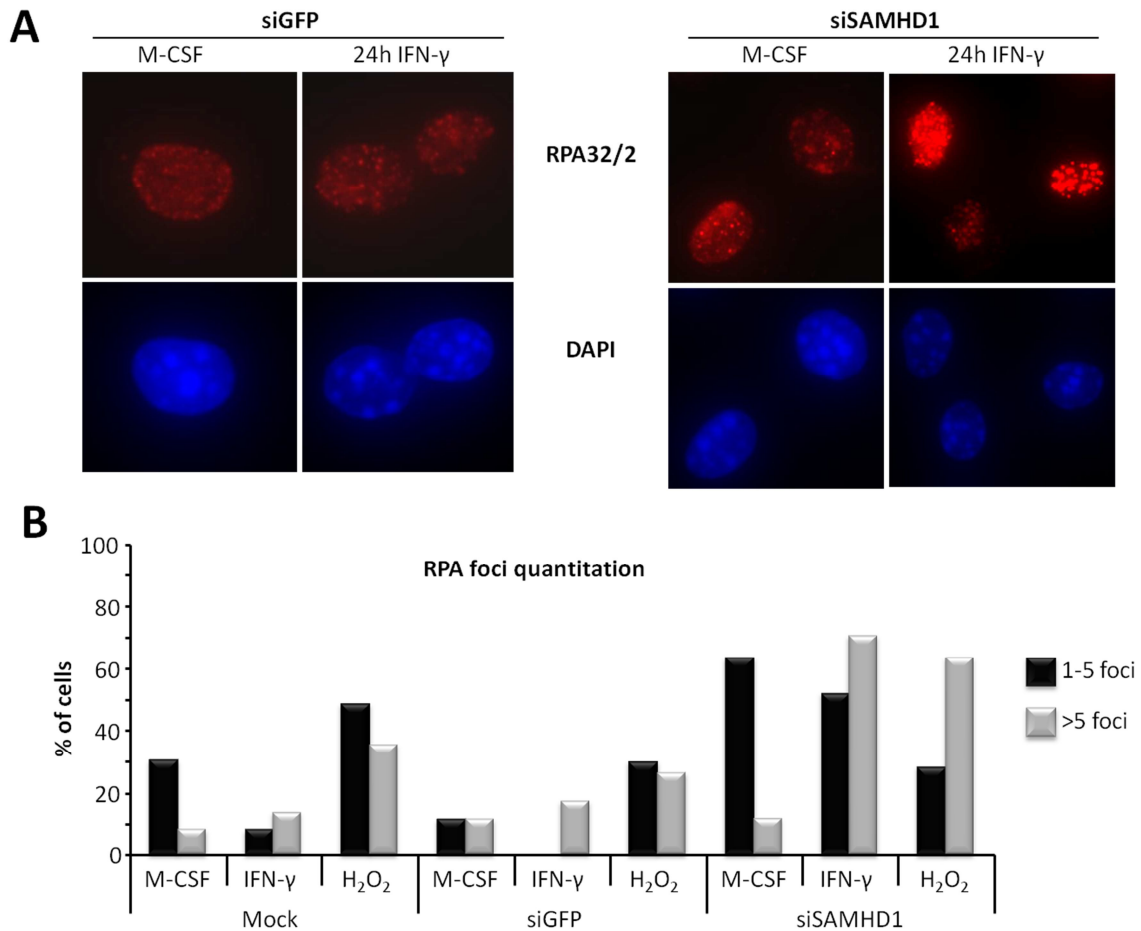




**Figura 33: Especificitat de la inhibició de *Samhd1* per siRNA.** Es va extraure l'RNA de cèl·lules electroporades amb el corresponent siRNA i es va analitzar l'expressió mitjançant qPCR de gens essencials per a la resposta immunitària innata indicats. Com a control de la inducció d'aquests gens, es va utilitzar una mostra de BMDM estimulats durant 6 hores amb IFN-γ. Experiment representatiu de tres experiments independents. Les barres d'error corresponen a la desviació estàndard entre els triplicats d'una mostra a la mateixa qPCR.

Després del temps de recuperació (24 hores), els macròfags van ser sotmesos a estímuls proinflamatoris com l'IFN-γ i a peròxid d'hidrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el qual se sap que crea trencaments al DNA deixant cadenes de ssDNA. Els macròfags es van replaquejar en plaques de 24 pous (500.000 cèl·lules per pou) i es va procedir a fer una immunocitoquímica (ICQ) utilitzant un anticòs contra la proteïna A de replicació (subunitat RPA32/2). Els macròfags van ser analitzats per immunocitoquímica. D'aquesta forma es va voler detectar la formació de ssDNA i focis nuclears deguts a l'acció dels estímuls utilitzats, en cèl·lules normals (siGFP) o cèl·lules deficientes en SAMHD1 (siSAMHD1). RPA és un component del complex de replicació alternatiu A (aRPA), el qual fa d'intermediari en interaccions entre la unió de ssDNA i proteïnes. Aquest complex s'uneix i estableix intermediaris de ssDNA formats durant la replicació del DNA o en front d'estrès al DNA (Ben-Yehoyada et al., 2007). En la resposta cel·lular en front a un dany al DNA, el complex

RPA controla la reparació de DNA i l'activació del punt de control de dany al DNA mitjançant la unió a ssDNA i recluta la cinasa ATR i la proteïna associada que interacciona amb ATR (ATRIP) (Namiki and Zou, 2006; Zou and Elledge, 2003).

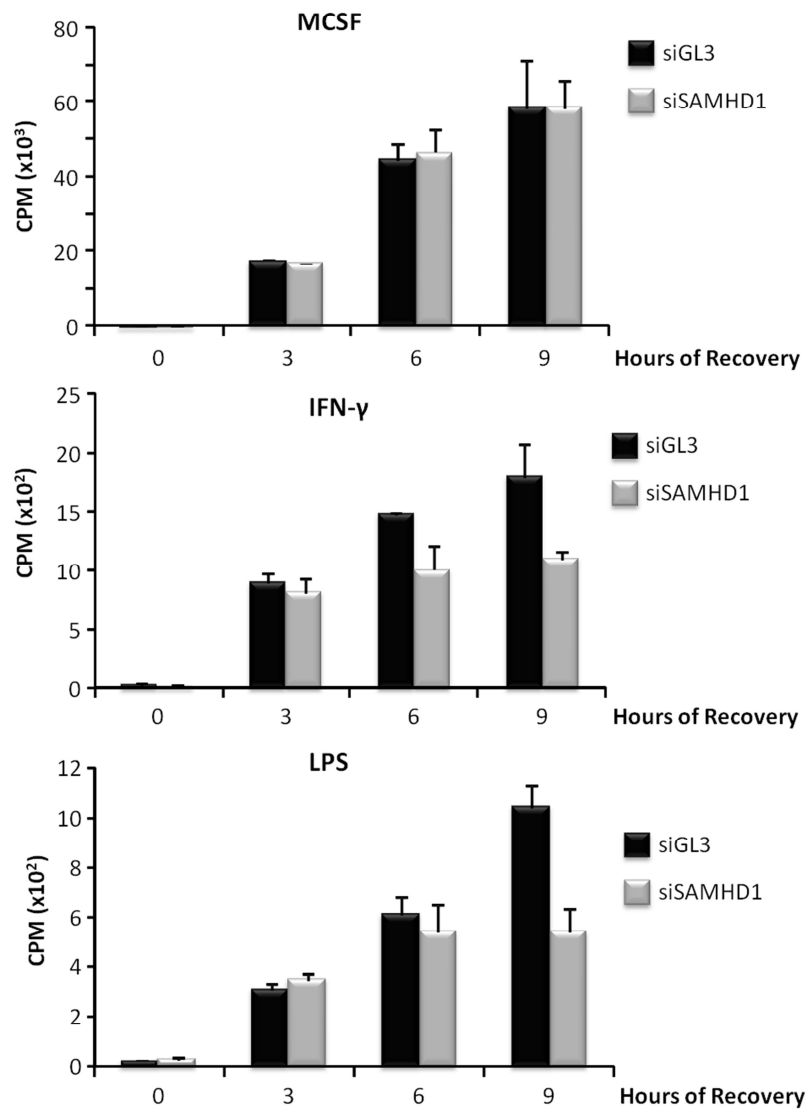
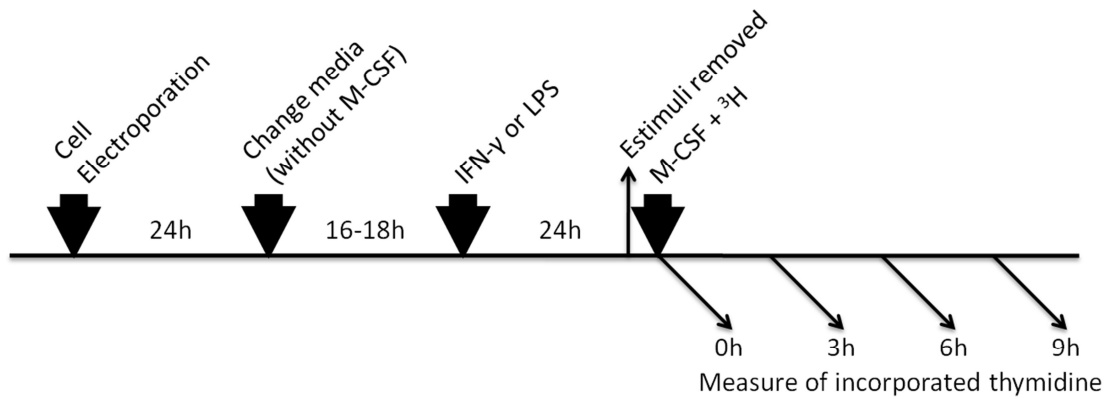


**Figura 34: Les cèl·lules deficientes en SAMHD1 tenen un augment de dany al DNA. A.** BMDM van ser sotmesos a electroporació amb siRNA per GFP (control) o per SAMHD1. Després del temps de recuperació, els macròfags van ser exposats a agents inductors de dany de DNA (IFN-γ or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). 24 hores més tard, es va realitzar una ICQ utilitzant l'anticòs anti RPA32/2 i DAPI com a control. Les imatges es van prendre amb un microscopi ScanR. A la part superior de cada imatge es mostra el tractament al qual les cèl·lules van ser exposades. Es mostra una imatge representativa de cadascun dels tractaments al qual van ser sotmeses les cèl·lules. L'experiment es va realitzar per triplicat. **B.** A partir de les imatges del microscopi, es van comptar i classificar les cèl·lules en funció del nombre de foci nuclears trobats mitjançant el programa Fiji (Veure apartat "Anàlisi de foci nuclears mitjançant microscòpia electrònica" a Materials i Mètodes). Així doncs, les cèl·lules es van classificar en dos grups segons si tenen d'u a 5 foci, o cèl·lules amb més de 5 foci. Aquest experiment és un resultat representatiu de tres experiments independents.

Els resultats mostren que les cèl·lules deficientes en SAMHD1 tenen un major nombre de foci nuclears ja que la detecció al canal vermell (corresponent a l'anticòs anti-RPA) és més elevat en comparació amb els controls, Mock i siGFP (Figura 34A). Donat que totes les cèl·lules tenen presència en el nucli de DNA de cadena senzilla (ssDNA), ja sigui per replicació o per

trencaments al DNA esporàdics, les cèl·lules van ser classificades en funció del número de focis: d'u a 5, ssDNA format de manera natural; o més de 5 focis, causat per agents inductors de dany al DNA. En les cèl·lules on hem silenciats SAMHD1, més del 60% presenten més de 5 focis davant dels estímuls proinflamatoris respecte a les condicions control, que contenen menys del 20% de cèl·lules amb més de 5 focis, confirmant que SAMHD1 protegeix en front d'un dany al DNA (Figura 34B).

Seguidament es va voler comprovar si aquest dany al DNA en absència de SAMHD1 afecta a la proliferació dels macròfags. Per a això, es van electroporar macròfags amb RNA de silenciament de SAMHD1 (siSAMHD1) o el corresponent control (siGL3), i després del temps de recuperació (24 hores) els vam exposar a agents que provoquen dany al DNA, com els estímuls proinflamatoris IFN- $\gamma$  i LPS, durant 24 hores. Després d'aquest temps vam quantificar la proliferació cel·lular mitjançant un assaig d'incorporació de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ ) en les cèl·lules normals i en les cèl·lules deficientes en SAMHD1 (Figura 35). En l'experiment control (Figura 35, M-CSF), on les cèl·lules no han estat exposades a cap estimul proinflamatori i en tot moment han estat en presència d'M-CSF, no es veuen diferències en la proliferació entre les cèl·lules control i les deficientes en SAMHD1. En comparació amb la condició control, les cèl·lules deficientes en SAMHD1 van mostrar una disminució de fins al 50% de la capacitat proliferativa quan es van veure exposades als agents proinflamatoris, ja sigui IFN- $\gamma$  o LPS, en comparació amb les cèl·lules electroporades amb un siRNA inòcua (siGL3) utilitzades com a control (Figura 35). Inicialment no es veuen diferències entre cèl·lules normals i cèl·lules deficientes en SAMHD1 en cap dels casos. Això és degut a que fins al moment d'afegir l'M-CSF juntament amb la timidina, les cèl·lules han estat aturades en el cicle cel·lular i són necessàries unes hores fins que tornen a entrar en el cicle. Encara que els estímuls proinflamatoris siguin activadors i, per tant, provoquin l'aturada de la proliferació cel·lular, les cèl·lules són capaces de respondre a l'estímul d'M-CSF i proliferar, sempre en menor quantitat que les cèl·lules que no han estat activades.



**Figura 35: Els macròfags deficients en SAMHD1 tenen una disminució de la capacitat proliferativa.** BMDM van ser electroporats amb siRNA de GL3 o SAMHD1. Després del temps de recuperació, es va canviar el medi per un sense factors de creixement (M-CSF) i es van deixar incubant durant 16-18 hores per tal de sincronitzar totes les cèl·lules a l'estadi G<sub>1</sub>/S del cicle cel·lular (esquema superior). Després d'aquest temps, els macròfags van ser exposats a agents proinflamatoris (que indueixen dany al DNA (IFN-γ or LPS)), mentre altres cèl·lules eren mantingudes en presència d'M-CSF de forma permanent. 24 hores després, el medi va ser canviat de nou per un de normal (que conté M-CSF) suplementat amb <sup>3</sup>H, i es van

prendre mostres als temps indicats. Sobre de cada gràfic s'indica l'agent al qual han estat exposades les cèl·lules. Experiment representatiu de tres experiments independents.

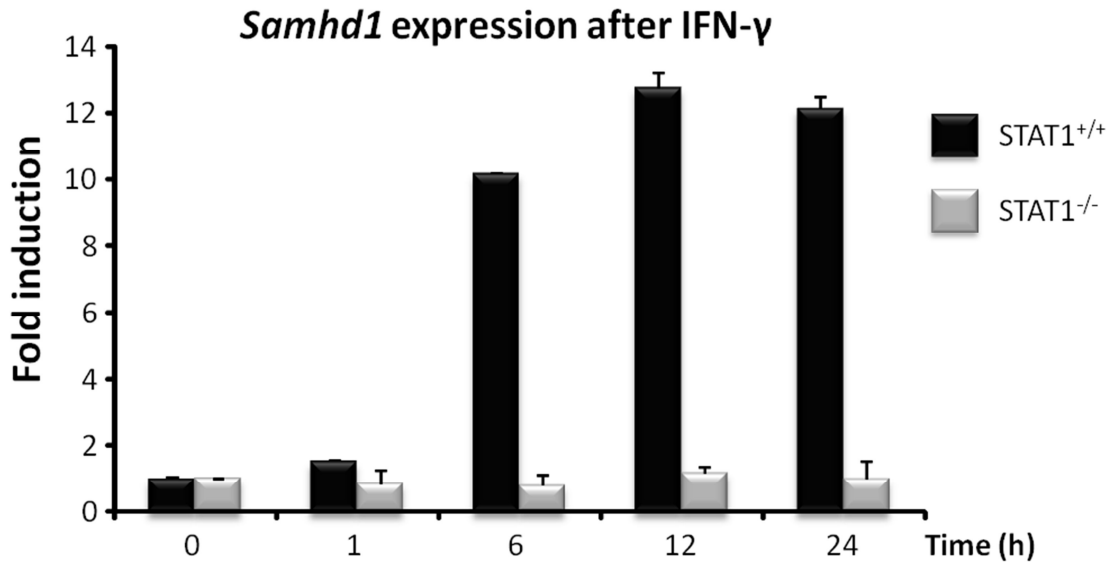
### Mecanismes d'expressió de *Samhd1*

Per comprovar si aquest augment de *Samhd1* és degut a un augment de la transcripció o a què l'RNA es torna més estable, es va analitzar la vida mitjana de l'RNA de *Samhd1*. Es van replaquejar macròfags i es van deixar durant 16-18 hores en medi sense factor de creixement per a la sincronització de les cèl·lules al mateix punt del cicle cel·lular. Passat aquest temps, les cèl·lules van ser exposades als estímuls desitjats durant 6 hores i en aquest moment es va afegir Actinomicina D (ActD) i DRB (5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole), els quals inhibeixen l'elongació de la transcripció. Es van agafar mostres a les 0; 0,5; 1; 1,5; 2 i 3 hores després d'afegir els inhibidors i se'n va fer l'extracció de l'RNA. Després de fer la retrotranscripció d'1μg d'RNA, es va analitzar l'expressió de *Samhd1* per qPCR. A la Taula 8, es mostra la vida mitjana de *Samhd1*. Com es pot veure, la vida mitjana de l'RNA de *Samhd1* en presència d'IFN-γ es manté similar a la vida mitjana sense presència d'estímul (Taula 8, Control). Així doncs, podem dir que la inducció de *Samhd1* és degut a un augment de la producció o transcripció i no pas per una estabilització i durada en el temps de l'mRNA.

Stimuli	Time (h)
Control	16,34
IFN-γ	17,36

**Taula 8: La vida mitjana de l'RNA de *Samhd1* no es troba afectada en presència d'IFN-γ.** A la taula es mostra (en hores) la vida mitjana de *Samhd1* en presència d'IFN-γ o sense cap estímul (Control). L'experiment es va realitzar tres vegades i es mostra un experiment representatiu.

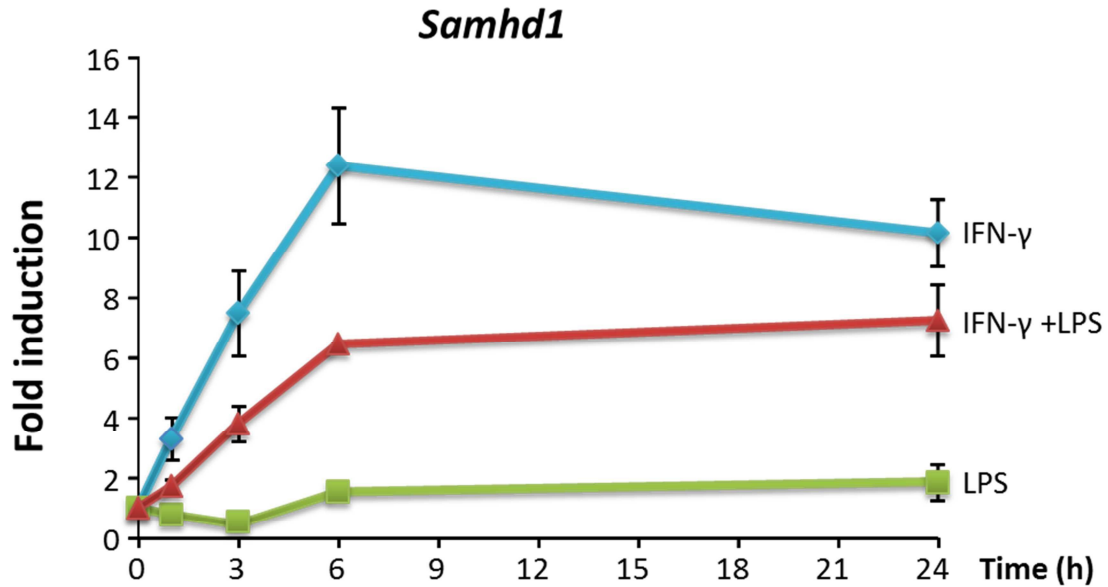
Per tal d'esbrinar la via de transducció de la senyal d'activació per a l'expressió de *Samhd1* i tenint en compte els estímuls activadors, es va decidir d'explorar la via d'STAT1 utilitzant ratolins KO per a aquest factor. Es van extraure macròfags provinents de ratolins knockout d'STAT1 i els corresponents controls. STAT1 és la proteïna implicada a la via de la transducció de la senyal d'activació perIFN-γ. Comparant l'expressió de *Samhd1* en macròfags deficients d'STAT1 (STAT1<sup>-/-</sup>) amb macròfags normals (STAT1<sup>+/+</sup>), es pot veure que la inducció a les 6 hores troba completament reprimida en macròfags STAT1<sup>-/-</sup>, indicant que l'expressió de *Samhd1* en front a l'estímul d'IFN-γ és a través i dependent d'STAT1 (Figura 36).



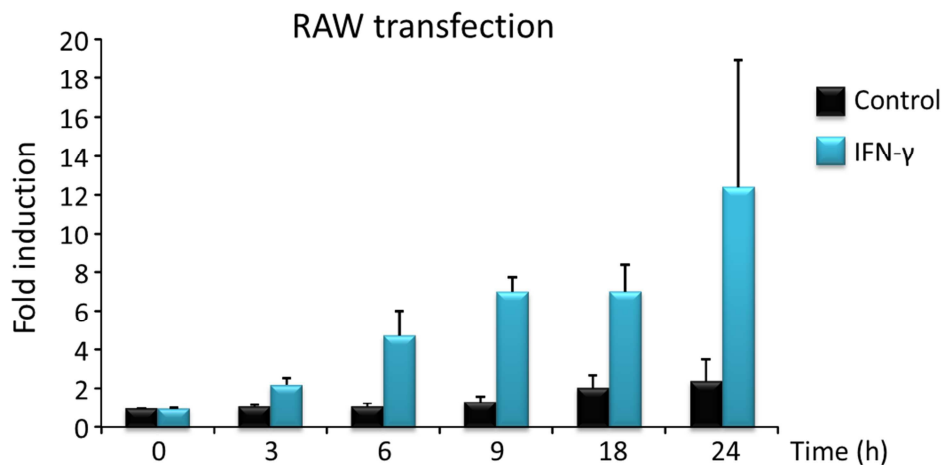
**Figura 36: L'expressió de *Samhd1* en ratolins KO d'STAT1 es troba reprimida.** Expressió de *Samhd1* a BMDM derivats de ratolins normals (STAT1<sup>+/+</sup>) o deficients (STAT1<sup>-/-</sup>) en presència d'IFN- $\gamma$  i en funció del temps. Es va extraure RNA de cultius de macròfags en presència de diferents citocines i es va utilitzar 1 $\mu$ g d'aquest mRNA per a la retrotranscripció i obtenció delcDNA. Les mostres van ser analitzades mitjançant qPCR amb encebadors específics de *Samhd1* i els resultats es mostren com a quantitat relativa respecte al gen *L14*. Experiment representatiu de tres experiments independents, on les barres d'error corresponen a la desviació estàndard entre els triplicats d'una mostra a la mateixa qPCR.

### Caracterització del promotor de *Samhd1*

Per tal d'estudiar amb més detall el mecanisme d'inducció de *Samhd1*, es van clonar aproximadament 1500 parells de bases (-1400+98) corresponents al promotor de *Samhd1*. Aquesta seqüència es va clonar dins d'un vector pGL3-Basic, davant del gen de la luciferasa que conté el mateix plasmidi. Aquesta construcció va ser transfectada a una línia cel·lular de macròfags, RAW 264.7, ja que fins ara ningú no ha aconseguit transfectar macròfags primaris amb èxit. Com a control, es va realitzar l'anàlisi de l'expressió de *Samhd1* en cèl·lules RAW (Figura 37). Aquesta línia cel·lular mostra una expressió de *Samhd1* similar als macròfags primaris en presència d'IFN- $\gamma$ . Es va realitzar llavors la transfecció als macròfags de la línia RAW i es van exposar aquestes cèl·lules ja transfectades a estímuls proinflamatoris. Els resultats mostren un increment de l'expressió de luciferasa en alguns casos de fins a 60 vegades més respecte del control (Figura 38). Això ens indica que aquesta regió és suficient per a la inducció de l'expressió de *Samhd1* per IFN- $\gamma$ . No obstant això, en presència d'LPS no hi ha expressió de luciferasa, cosa que podria estar explicada per la no estimulació de *Samhd1* a la línia cel·lular RAW, com ja s'ha vist a la Figura 37.



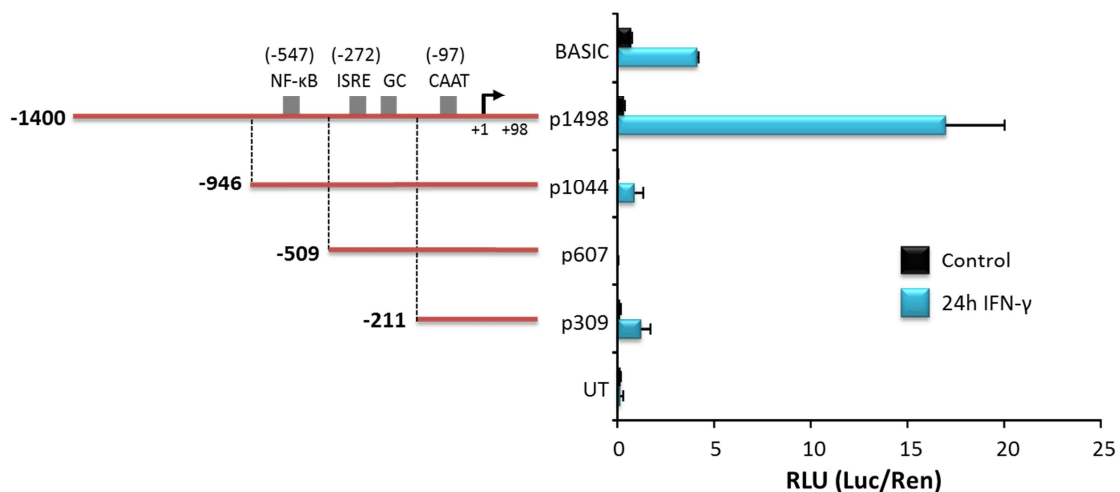
**Figura 37: L'expressió *Samhd1* a la línia cel·lular RAW264.7 és augmentada en presència d'estímuls proinflamatoris.** Cinètica de l'expressió de *Samhd1* en presència de diferents citocines proinflamatòries (IFN- $\gamma$ , LPS o ambdós a la vegada) a la línia cel·lular RAW264.7. Es va extraure RNA de cultius de macròfags leucèmics murins (RAW 264.7) en presència de les diferents citocines i es va utilitzar 1 $\mu$ g d'aquest mRNA per a la retrotranscripció i obtenció del cDNA. Les mostres van ser analitzades mitjançant qPCR amb encebadors específics de *Samhd1* i els resultats es mostren com a quantitat relativa respecte al gen *L14*. Les figures mostren els resultats promig i la desviació estàndard de tres resultats independents.



**Figura 38: 1500pb són suficients per induir una expressió per IFN- $\gamma$ .** Es va clonar el promotor de *Samhd1* (1498pb, figura superior) dins d'un vector pGL3-Basic, el qual conté el gen que codifica per a la luciferasa, i aquesta construcció es va transfectar a una línia cel·lular de macròfags leucèmics murins (RAW 264.7). 24 hores després, les cèl·lules van ser exposades a estímuls proinflamatoris i es van prendre mostres als temps indicats. A la figura es mostra la mitjana i la desviació estàndard de tres experiments realitzats de

manera independent. L'expressió de luciferasa és normalitzada amb l'expressió de la renilla, la qual és expressada pel plasmidi pRL-TK, co-transfectat amb cadascunadeles construccions en pGL3-Basic.

En un primer estudi del promotor de *Samhd1* mitjançant un anàlisi bioinformàtic (TF Search), es va veure una seqüència ISRE a la regió proximal del promotor, i també una seqüència d'unió de p65, una subunitat d'NF- $\kappa$ B. Donat que l'expressió de *Samhd1* és depenent d'STAT1, aquesta seqüència ISRE podria estar implicada en la unió d'STAT1 i la conseqüent activació de l'expressió de *Samhd1*. Per aquest motiu, es va fer el disseny i la construcció de nous plasmidis als quals se'ls hi ha eliminat regions consecutives del promotor, delecionant cada cop una seqüència d'unió de les proteïnes mencionades que podrien estar implicades en la inducció (Figura 39). De manera contrària al que s'esperava, la seqüència d'unió ISRE no és fonamental en la inducció de *Samhd1*, ja que la delecció d'una regió prèvia del promotor ja està provocant la pèrdua total de la inducció del gen de *Samhd1* (Figura 39).

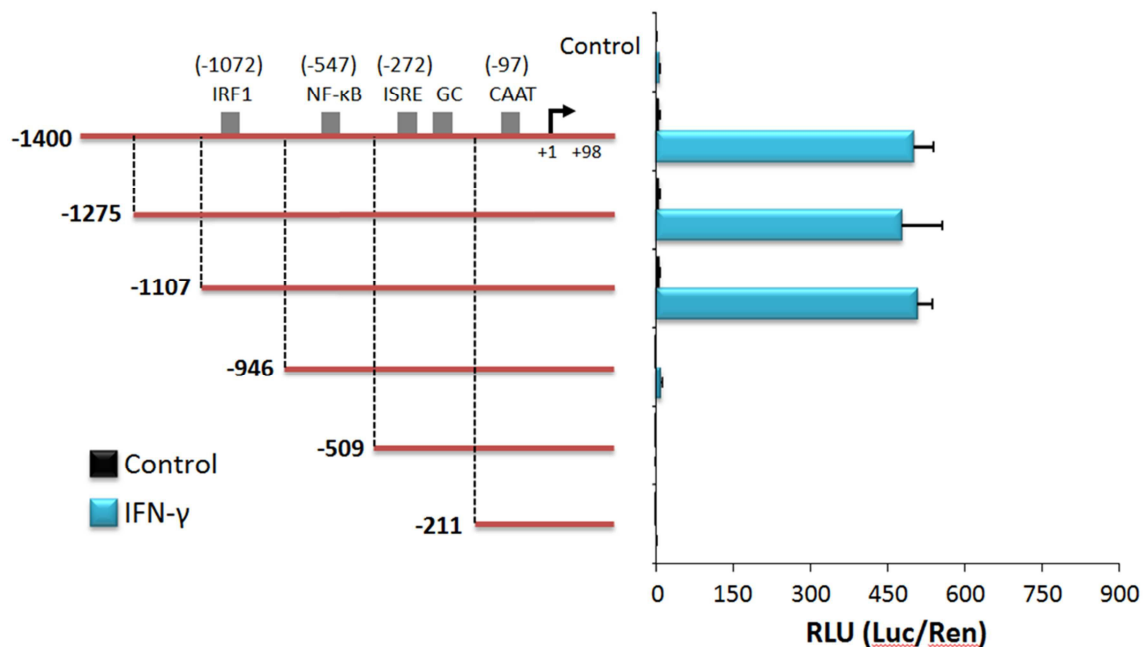


**Figura 39: La regió entre -1400 i -946pb és essencial per a la inducció per IFN- $\gamma$ .** Construccions del promotor de *Samhd1* dins del vector pGL3-Basic. El promotor s'inclou just davant del gen de la luciferasa que conté el vector, de manera que si hi ha una regulació del promotor de *Samhd1*, aquesta es veurà reflectida en l'expressió de luciferasa. Transfecció a la línia cel·lular RAW 264.7 dels vectors que expressen luciferasa sota la regulació dels diferents constructes del promotor de *Samhd1*. "p1498" és el constructe amb el promotor inicial sencer, de 1498pb, utilitzat també a la Figura 38. Després de la transfecció, les cèl·lules es van deixar en període de recuperació durant 24 hores i, després d'aquest temps, van ser exposades durant 24 hores a IFN- $\gamma$ , si desitjat. "BASIC" correspon a la transfecció a la línia cel·lular amb el vector pGL3-Basic buit, i "UT" són cèl·lules a les quals no se'ls hi ha transfectat cap vector; tots dos són utilitzats com a controls negatius. L'expressió de luciferasa és normalitzada amb l'expressió de la renilla, la qual és expressada pel plasmidi pRL-TK, co-transfectat amb cadascun dels plasmidis pGL3-Basic. Experiment representatiu de tres experiments independents, on les barres d'error corresponen a la desviació estàndard entre els triplicats d'una mateixa mostra on s'hi llegeix luciferasa i renilla per separat.

Per determinar de manera més detallada la regió implicada en la inducció de *Samhd1*, es van fer nous constructes a partir del promotor clonat inicialment, delecionant cada cop una zona



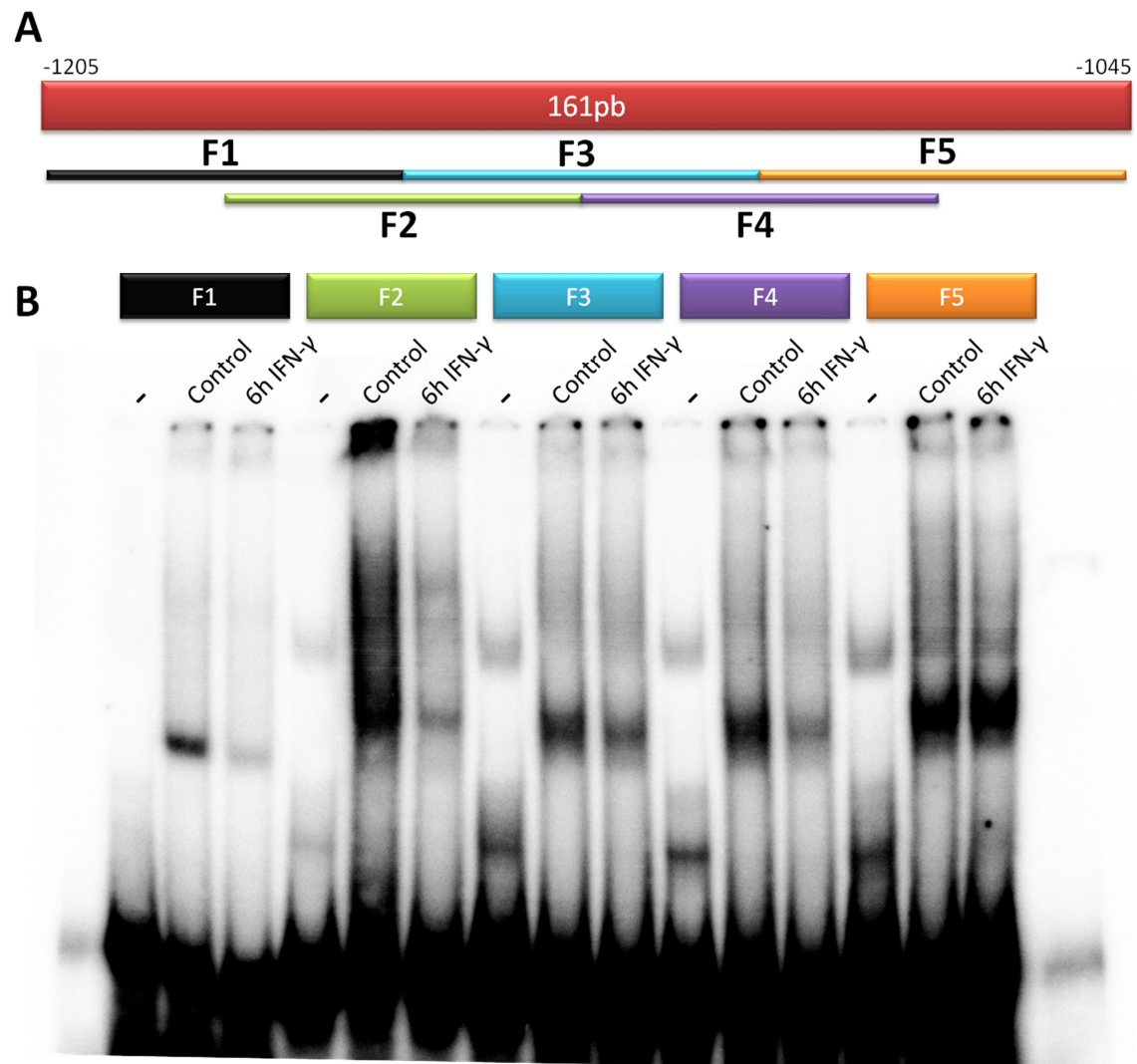
d'una mida aproximada de 160pb (Figura 40). En una d'aquestes regions es va identificar, de nou mitjançant eines bioinformàtiques (TF Search), una seqüència d'unió de la proteïna IRF1, la qual també pot estar implicada en la via d'activació d'STAT1. Es va fer llavors la transfecció a cèl·lules RAW d'aquests nous constructes i es va fer la lectura de l'expressió de la luciferasa. Els resultats van mostrar que la regió crítica per a la inducció de *Samhd1* es troba situada entre les posicions -1205 i -1044, ja que en deletar aquesta regió, l'expressió induïda per IFN- $\gamma$  (sol o en combinació) de luciferasa es troba completament abolida (Figura 40). És clar doncs que aquesta regió de 161pb és important, coincidint amb la regió on s'havia fet previsió de seqüència d'unió d'IRF1, confirmant un possible rol d'IRF1 a la via que porta a la inducció de *Samhd1*. L'eliminació de regions anteriors del promotor no afecten al nivell d'expressió de la luciferasa, cosa que indica que no hi ha cap seqüència implicada en la inducció del gen de *Samhd1*.



**Figura 40: La regió entre -1107 i -946pb és essencial per a la inducció de *Samhd1* per IFN- $\gamma$ .** Construccions amb el promotor de *Samhd1* dins del vector pGL3-Basic. Les línies negres intermitents indiquen el lloc de tall del promotor a cadascun dels constructes. A sobre del primer constructe, s'indica la posició (entre parèntesi) i el nom de la seqüència d'unió dels factors de transcripció trobada. A l'esquerra, al costat de cada línia vermella, s'indica la posició del nucleòtid de tall. A la dreta, expressió de luciferasa després de 24 hores en presència dels estímuls indicats. "Control" és el vector buit, utilitzat com a control negatiu. L'expressió de luciferasa és normalitzada amb l'expressió de la renilla, la qual és expressada pel plasmidi pRL-TK, co-transfectat amb cadascuna de les construccions realitzades en pGL3-Basic. Experiment representatiu de tres experiments independents, on les barres d'error corresponen a la desviació estàndard entre els triplicats d'una mateixa mostra on s'hi llegeix luciferasa i renilla per separat.

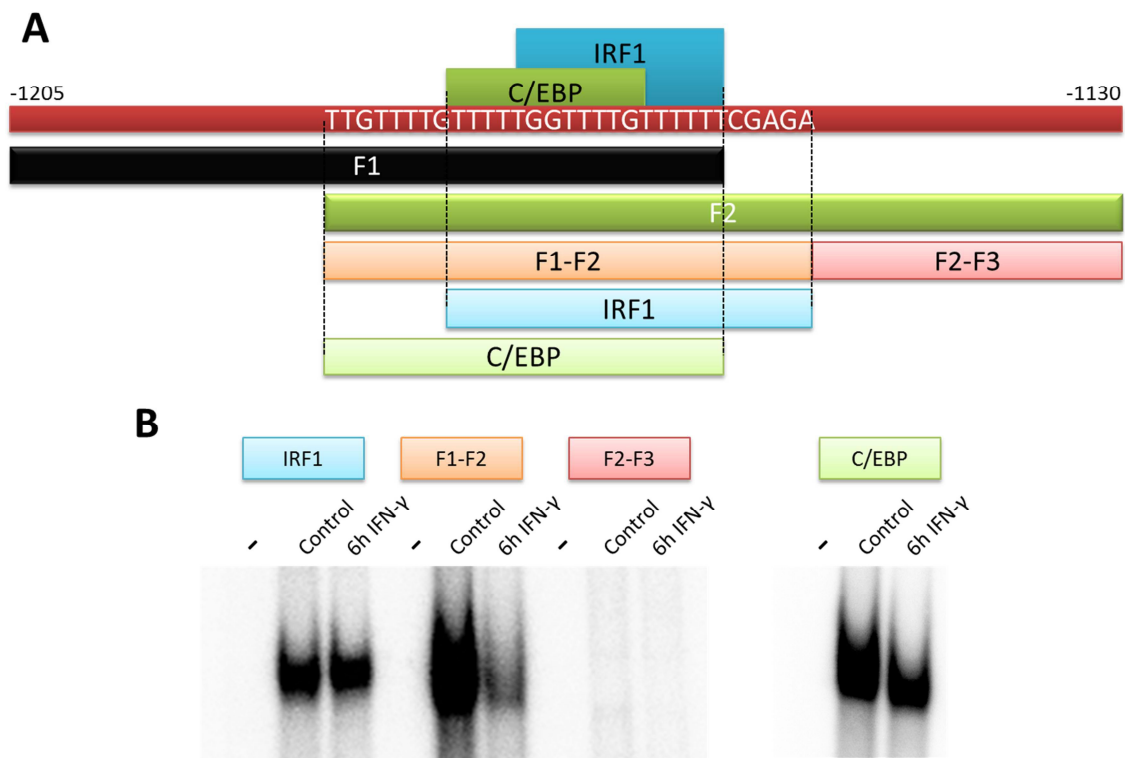
**Anàlisi del fragment de 165 pb**

Per acabar de determinar la regió crítica en el promotor de *Samhd1*, es van dissenyar 5 sondes de 50pb de la regió de 161pb, solapant-se entre sí en 25pb (Figura 41A). Aquestes sondes van ser marcades amb  $^{32}\text{P}$  i analitzades mitjançant un assaig de retard (EMSA) utilitzant extractes nuclears de macròfags en condicions basals o tractats amb IFN- $\gamma$  durant 6h. Els resultats mostren que quan s'utilitzen les sondes F1 i F2 apareix una banda de retard en condicions basals que desapareix en presència d'IFN- $\gamma$  (Figura 41B).



**Figura 41: A la regió F1 s'observa una banda en condicions basals que es perd en presència d'IFN- $\gamma$  a les 6 hores. A.** En vermell es mostra la regió de 161pb crítica per a la inducció de *Samhd1*. Les línies amb el nom F1 a F5, corresponen a les sondes dissenyades, les quals se solapen entre si en 25pb i, per tant, tota la seqüència de 161pb serà analitzada en busca d'unions. **B.** Experiment EMSA utilitzant les sondes de la F1 a la F5 marcades amb  $^{32}\text{P}$ , utilitzant extractes nuclears de macròfags sense tractar i de macròfags tractats amb IFN- $\gamma$  durant 6 hores. Els carrils "-" són els controls negatius, on s'ha carregat la sonda respectiva marcada però sense extractes proteics. Experiment representatiu de tres experiments realitzats de manera independent.

En aquesta regió, justament en el lloc on les sondes F1 i F2 se superposen, és on prèviament s'havia detectat la seqüència d'unió d'IRF1. En aquest tram de 25pb també s'hi troba una seqüència d'unió de C/EBP $\beta$ , superposada amb la seqüència d'IRF1 en 8pb a l'extrem 5'd'aquesta (Figura 42A). Vam dissenyar noves sondes centrades en aquestes seqüències i es va realitzar de nou un assaig EMSA (F1-F2 i C/EBP, Figura 42A). Amb les sondes F1-F2 i C/EBP es va veure en ambdós casos el mateix resultat: una banda d'unió en condicions basals que desapareix en utilitzar extractes de cèl·lules tractades durant 6 hores amb IFN- $\gamma$  (Figura 42B). En canvi, utilitzant la sonda IRF1, la qual acaba just a l'extrem de la seqüència d'unió de C/EBP $\beta$ , es pot veure que hi ha una unió però no es veuen diferències entre els extractes controls i els que han estat exposats a IFN- $\gamma$  (Figura 42B). A més a més, es va dissenyar una sonda centrada a la regió adjacent F2-F3 (Figura 42A). Es pot descartar una unió proteica en aquesta regió, ja que al realitzar l'EMSA utilitzant aquesta sonda, no es veu cap retard en el gel, ni en mostres controls així com tampoc en mostres tractades amb IFN- $\gamma$  (Figura 42B). Aquest resultat també confirma doncs que la unió proteica és específica a la regió de solapament de 25pb d'entre la sonda F1 i la F2.

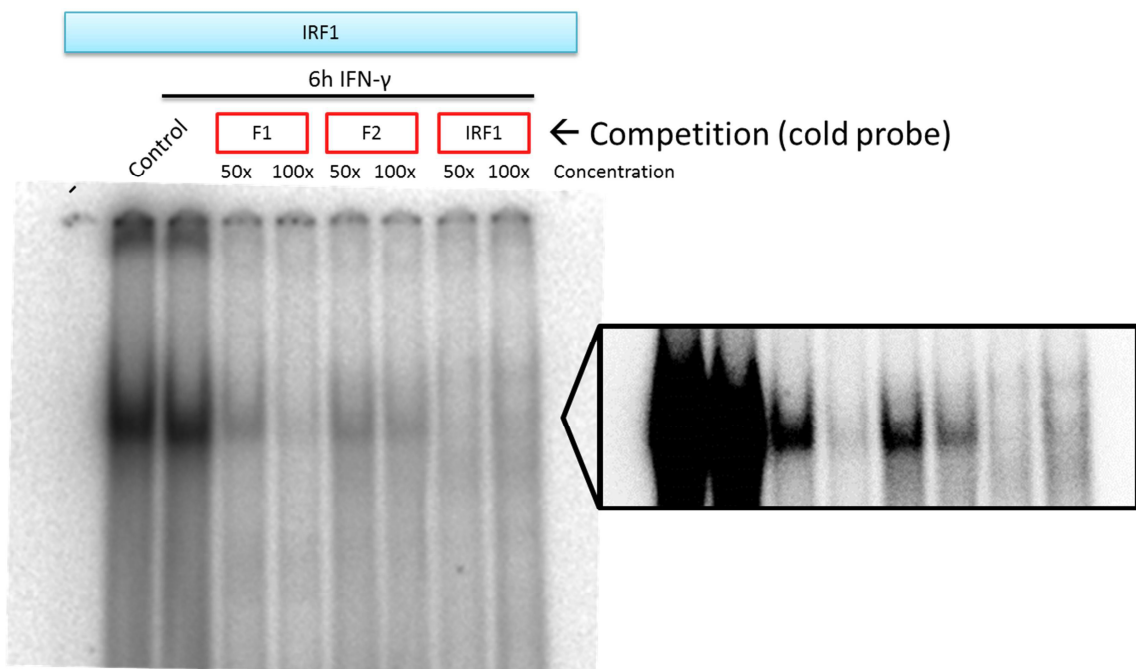


**Figura 42: Regió ampliada del promotor de *Samhd1* amb la posició de les seqüències d'unió i sondes al detall, i EMSA d'algunes de les sondes. A.** Regió ampliada del promotor de *Samhd1* amb la seqüència de la regió, i la posició de les seqüències d'unió de C/EBP $\beta$  i d'IRF1 (en rectangles sobre la línia vermella) i les sondes utilitzades (rectangles sota la línia vermella, en diferents colors i amb el nom de la sonda corresponent en cada cas). Les línies puntejades indiquen el començament i el final de les sondes de C/EBP i IRF1, en alguns casos corresponents a d'altres sondes. **B.** Experiment de retard en gel utilitzant

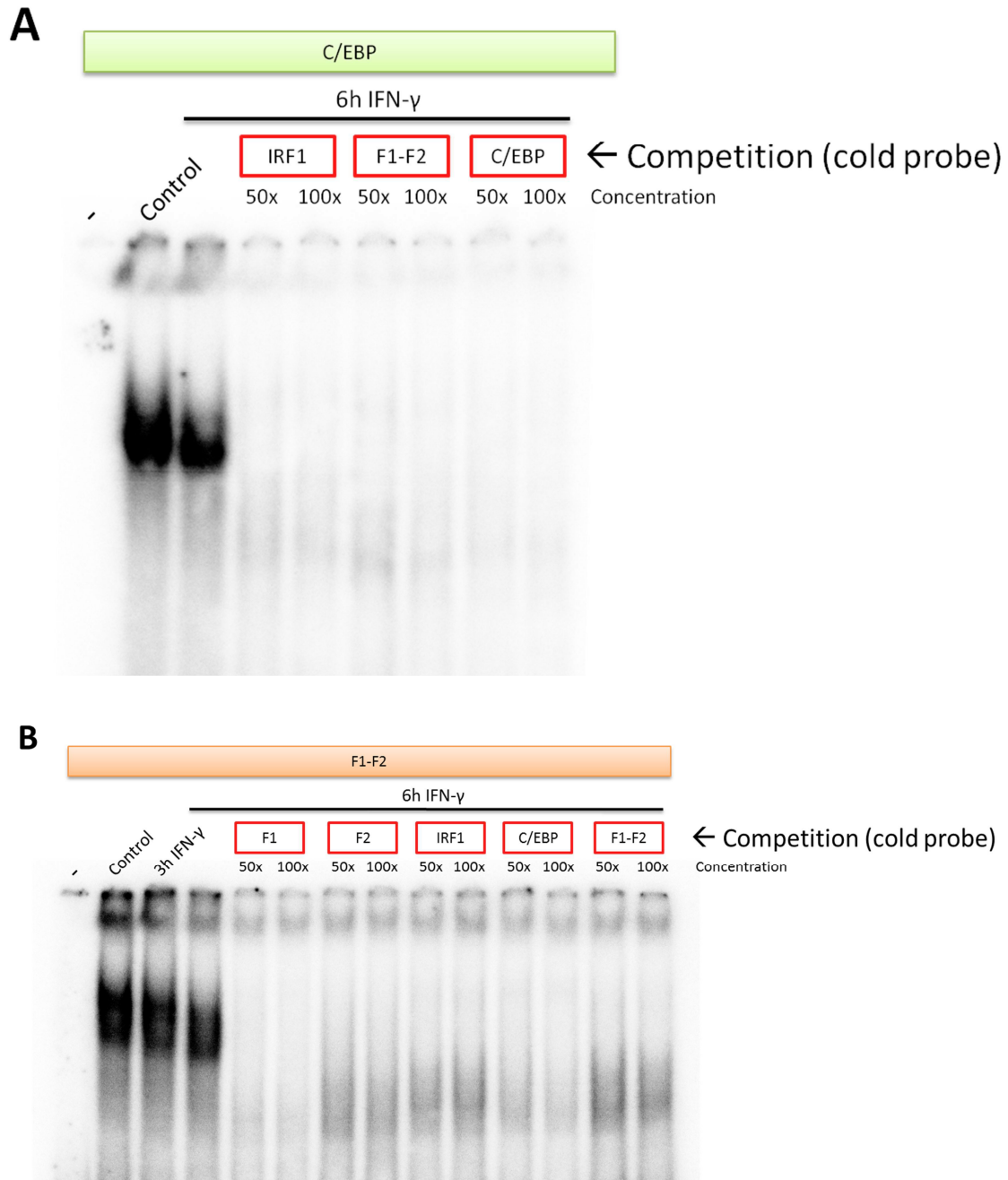
**TREX1 and SAMHD1, and Aicardi-Goutières Syndrome**

diferent sondes mencionades a la Figura 42A (a sobre, en requadres) utilitzant extractes nucleics de macròfags no tractats o tractats amb IFN- $\gamma$  durant 6 hores. El carril "-" correspon al control negatiu, el qual conté la sonda respectiva marcada amb  $^{32}P$  però sense extractes proteics. Experiment representatiu de tres experiments realitzats de manera independent.

Per comprovar si la proteïna que es troba unida a les sondes més grans F1 i F2 és la mateixa en ambdós casos, així com també si és la mateixa que s'uneix a la sonda IRF1 i C/EBP, es van realitzar EMSAs de competició. En aquest cas, es va utilitzar la sonda IRF1 marcada amb  $^{32}P$  i es van utilitzar les sondes F1, F2 i la mateixa IRF1 com a sonda freda (no radioactives) a diferents concentracions. Com estava previst, a l'utilitzar la sonda no radioactiva cent vegades més concentrada que la mateixa marcada, desapareix completament el retard. També desapareix quan la sonda freda es troba 50 vegades més concentrada, cosa que també era d'esperar perquè al ser la mateixa seqüència, aquesta sonda freda és extremadament competitiva. En el cas de les sondes F1 i F2, també es veu la desaparició del retard, cosa que demostra que el que s'està unint a la regió és el mateix en tots els casos (Figura 43). En el cas de les sondes F1 i F2, es veu que quan està 50 cops concentrada encara queda una banda d'unió. Això és degut a que les sondes són més grans i tenen regions no comunes entre elles. De la mateixa manera, també es van realitzar assajos de competició amb les sondes C/EBP (Figura 44A) i F1-F2 (Figura 44B). En tots els casos es veu una desaparició de la banda, el que indica que en tots els casos la proteïna que s'està unint a la regió és la mateixa.



**Figura 43: La proteïna que a les sondes més grans és la mateixa que la que s'uneix a la sonda IRF1.** Es van utilitzar 10µg d'extractes nucleics i es van sotmetre a la sonda marcada radioactivament (IRF1). Per fer la competició, es van utilitzar les sondes fredes mencionades (F1, F2 i IRF1, requadrades en vermell) a diferents concentracions: 50 vegades més concentrat (50x) o cent vegades més concentrat (100x). El carril "-" és el control negatiu, el qual conté la sonda marcada amb <sup>32</sup>P sense extractes nuclears. El rectangle a la dreta correspon a la mateixa regió de la imatge amb una major exposició. Experiment representatiu de tres experiments realitzats de manera independent.

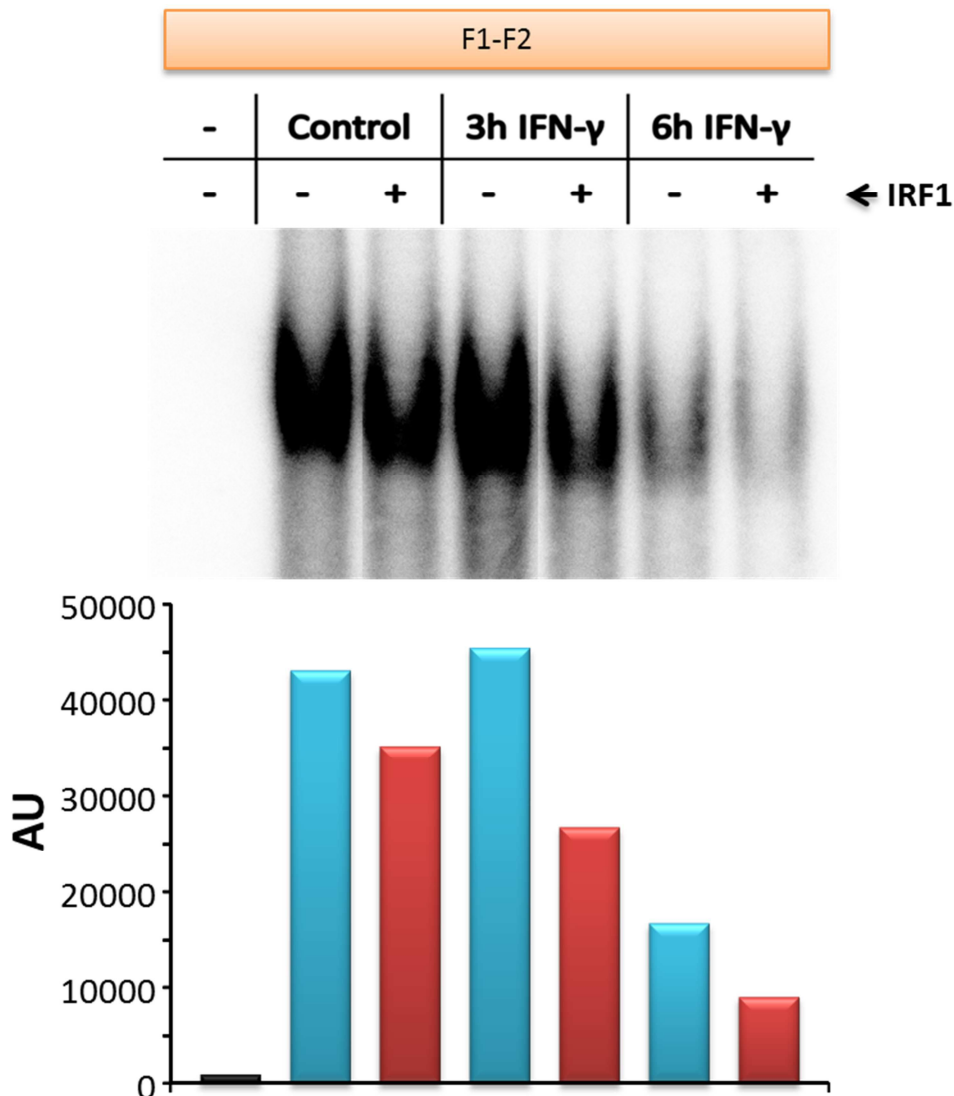


**Figura 44: La proteïna que s'uneix utilitzant les diferents sondes és la mateixa en tots els casos.** Es van utilitzar 10µg d'extractes nucleics i es van sotmetre a la sonda marcada radioactivament: C/EBP en **A** i F1-F2 en **B**. Per fer la competició, es van utilitzar les sondes fredes mencionades (requadrades en vermell) a diferents concentracions ja sigui 50 vegades més concentrat (50x) o cent vegades més concentrat (100x).

El carril "-" és el control negatiu, el qual conté la corresponent sonda marcada amb <sup>32</sup>P sense extractes nuclears. Experiment representatiu de tres experiments realitzats de manera independent.

**Possibles proteïnes que interaccionen a la caixa C/EBPβ del promotor de Samhd1**

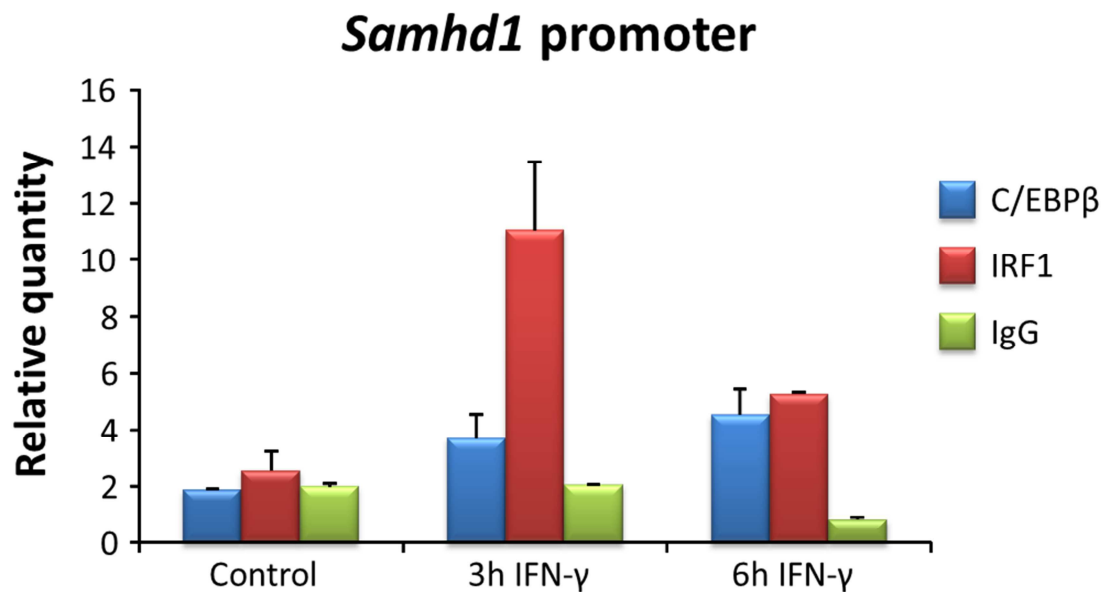
El següent pas a la caracterització del promotor és veure si realment aquests dos factors de transcripció, C/EBPβ i IRF1, s'uneixen a les respectives seqüències trobades al promotor. Primerament, es va realitzar un assaig de retard amb la utilització d'anticossos (*Super-shift*) per a les proteïnes desitjades. Els resultats mostren que la banda es redueix o desapareix a les mostres no tractades i tractades amb IFN-γ a les tres i a les 6 hores en presència d'anticossos, indicant així que les mencionades proteïnes s'estan unint en aquesta regió del promotor (Figura 45).



**Figura 45: IRF1 s'uneix a les tres i a les 6 hores en presència d'IFN-γ.** A la taula sobre del gel s'especifiquen les condicions utilitzades a cada carril, i els noms sobre la taula corresponen a la mostra d'extractes nuclears utilitzats (Control, 3h IFN-γ, 6h IFN-γ). El carril sense cap mostra ni anticòs correspon

al control negatiu, el qual conté la sonda marcada (en aquest cas F1-F2) amb  $^{32}\text{P}$  però sense extractes nuclears. Sota del gel s'ensenya la quantificació de l'EMSA, cada columna relativa a la banda que li queda directament sobre. Experiment representatiu de tres experiments realitzats de manera independent.

Per confirmar el resultat obtingut per *super-shift*, es van utilitzar els mateixos anticossos per a la realització d'un assaig d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP), i uns encebadors que amplifiquen de manera específica i acotada la regió prèviament determinada. Els resultats del ChIP confirmen que IRF1 i C/EBP $\beta$  s'uneixen en aquesta regió precisa del promotor de *Samhd1* (Figura 46).

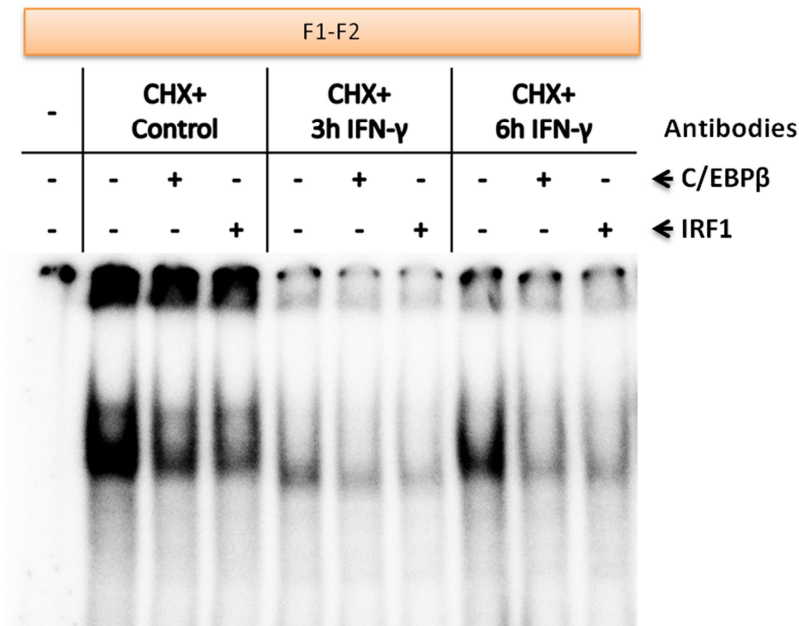


**Figura 46: ChIP del promotor de *Samhd1*.** BMDM van ser tractats amb IFN- $\gamma$  durant tres o 6 hores. Una vegada obtinguda la cromatina, aquesta va ser dividida i posada en presència dels anticossos mencionats (IRF1 i C/EBP $\beta$ ) o IgG inespecífiques. El DNA obtingut va ser mesurat per PCR quantitativa amb encebadors específics acotats a la seqüència (-1204 a -1015) del promotor de *Samhd1*, i els resultats es mostren com a quantitat relativa respecte al gen *36B4*. Experiment representatiu de tres experiments independents, on les barres d'error corresponen a la desviació estàndard entre els triplicats d'una mostra a la mateixa qPCR.

### Una proteïna no caracteritzada s'uneix al promotor de *Samhd1* i en reprimeix l'expressió

Fins ara hem vist que una o potser més proteïnes s'estarien unint al promotor de *Samhd1* i inhibeixen la seva expressió. Per poder esbrinar més sobre aquest procés, vam exposar els macròfags a cicloheximida (CHX) i als diferents estímuls proinflamatoris que ja hem vist que provoquen la sobreexpressió de *Samhd1*, i es va fer una extracció d'RNA. La cicloheximida és un inhibidor efectiu de la biosíntesi de proteïnes, el qual exerceix el seu efecte interferint en el pas

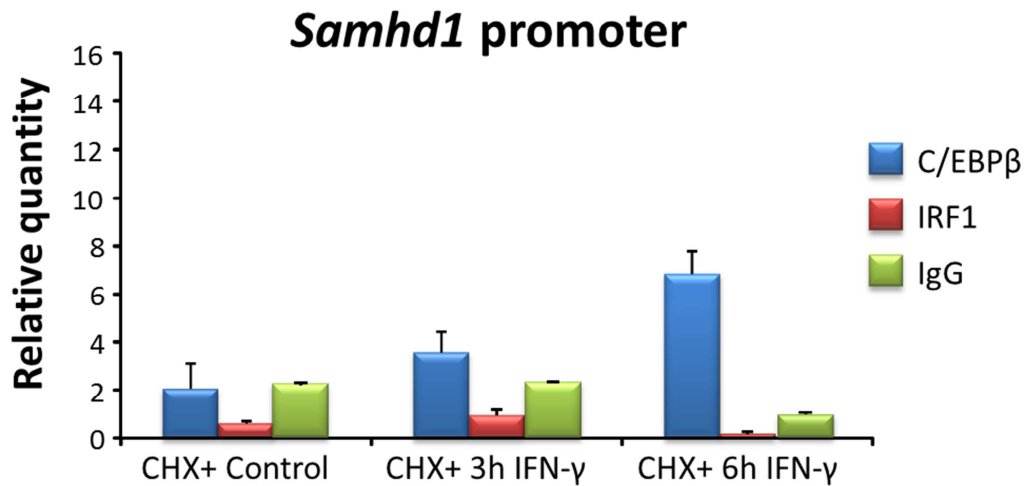
de translocació (moviment de dues molècules de tRNA i mRNA en relació al ribosoma) i, per tant, bloqueja l'elongació de la translació.



**Figura 47: Anàlisi de mostres pretractades amb o sense cicloheximida.** A. BMDM van ser exposats a un preestímul de CHX (10µg/ml) durant mitja hora i, just després, van ser exposats a IFN-γ. En el cas de les mostres mencionades com a "CHX", es va fer el preestímul amb cicloheximida però les cèl·lules no van ser exposades a cap estímul inflamatori. Les mostres van ser obtingudes en els temps indicats. En ambdós casos es va extraure RNA de cultius de macròfags en presència d'IFN-γ i es va utilitzar 1µg d'aquest mRNA per a la retrotranscripció i obtenció del cDNA. Les mostres van ser analitzades mitjançant qPCR amb encebadors específics de *Samhd1* i els resultats es van analitzar com a quantitat relativa respecte al gen *L14*. La figura mostra la quantitat relativa al control (Foldinduction), i es mostren els resultats promig i la desviació estàndard de tres resultats independents. B. Previ a l'estímul amb IFN-γ, els macròfags van ser pretractats amb CHX durant 30 minuts. El carril "-" correspon al control negatiu, al qual s'hi ha posat la sonda corresponent marcada amb <sup>32</sup>P i sense extractes nucleics. Experiment representatiu de tres experiments realitzats de manera independent.

Es va fer llavors un nou experiment de retard amb mostres tractades amb cicloheximida (Figura 47). Els resultats mostren que en presència de cicloheximida, C/EBPβ i IRF1 estan units al promotor en condicions basals i en presència d'IFN-γ després de tres i 6 hores. Això indicaria que hi hauria una altra proteïna implicada en la regulació de *Samhd1*. A més a més, també es va fer un ChIP amb els anticossos anti- C/EBPβ i IRF1 amb mostres tractades amb CHX. La unió de C/EBPβ al promotor de *Samhd1* no es veu afectada, mentre que la unió d'IRF1 es troba completament inhibida (Figura 48).





**Figura 48: La unió d'IRF1 al promotor de *Samhd1* s'inhibeix en presència de CHX.** BMDM van ser tractats amb IFN- $\gamma$  durant tres o 6 hores i amb un preestímul de cicloheximida (CHX, 10 $\mu$ g/ml). Una vegada obtinguda la cromatina, aquesta va ser dividida i posada en presència dels anticossos mencionats (IRF1 i C/EBP $\beta$ ) o IgG inespecífiques. El DNA obtingut va ser mesurat per PCR quantitativa amb encebadors específics acotats a la seqüència del promotor de *Samhd1*, i els resultats es mostren com a quantitat relativa respecte al gen *36B4*. Experiment representatiu de tres experiments independents, on les barres d'error corresponen a la desviació estàndard entre els triplicats d'una mostra a la mateixa qPCR.

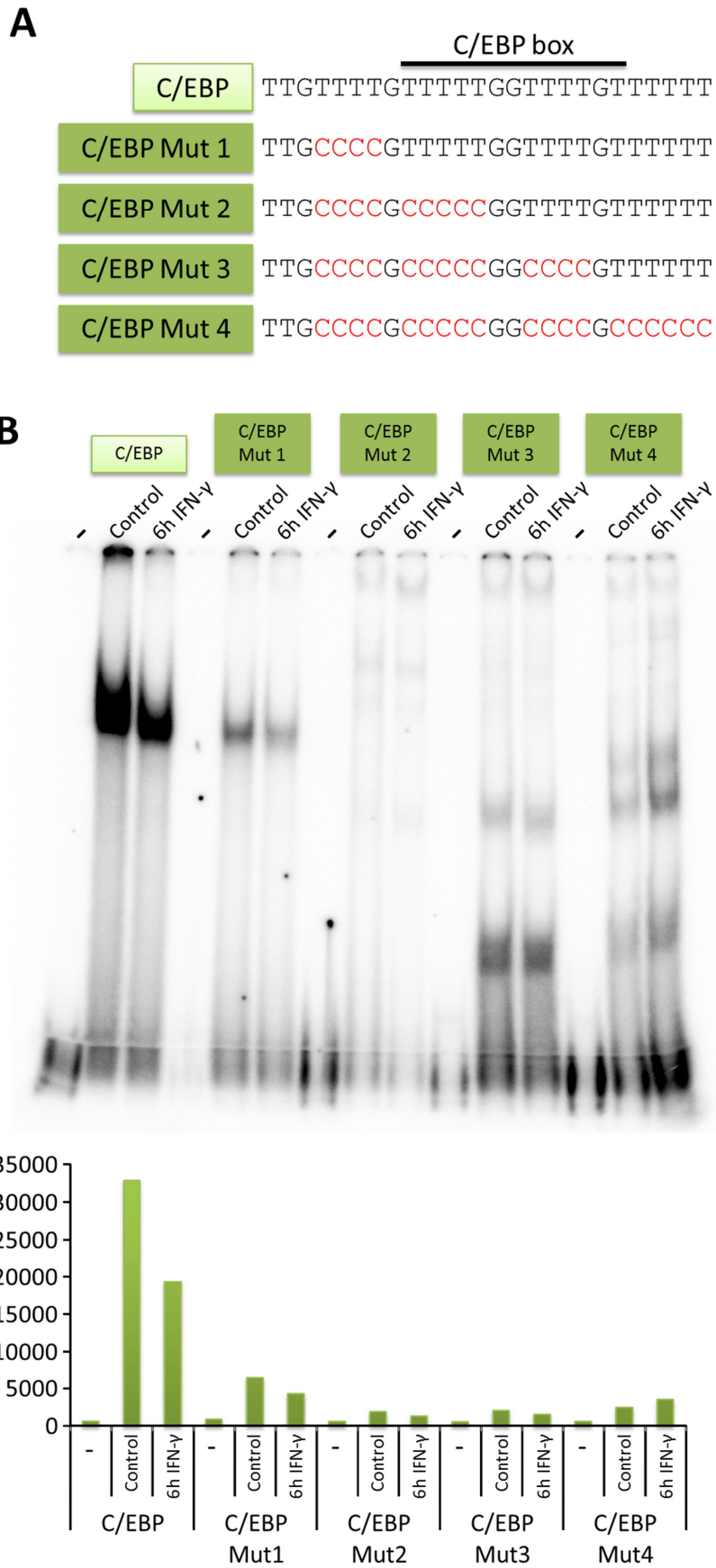
#### La regió d'unió de C/EBP $\beta$ al promotor de *Samhd1* no és crítica per a l'expressió

Fins ara hem vist que C/EBP $\beta$  podria tenir un paper important en la inhibició de l'expressió de *Samhd1* en condicions basals. Per comprovar si C/EBP $\beta$  s'està unint a la regió detectada al promotor de *Samhd1*, es van dissenyar noves sondes per provar-les en un experiment de retard en gel (Figura 49A). Aquesta seqüència del promotor és força característica: inclou una regió repetida la qual conté dos grups de quatre i cinc timines (T) separades per una guanina (G). Pel disseny de les sondes per a l'EMSA, es va mutar cada cop un d'aquests grups de T pel corresponent número de citosines (C). La mutació del primer grup de T per C, provoca una disminució de la banda de retard, però tot i així encara es pot veure que hi ha una unió en condicions basals que es perd en presència d'IFN- $\gamma$  (Figura 49B, C/EBP Mut1). En mutar els dos primers grups de T, la unió al promotor es perd completament, indicant la importància d'aquesta segona regió de timines per a la unió proteica al promotor (Figura 49B, C/EBP Mut2). La mutació de tres regions o de tots quatre grups de timines provoca noves unions al promotor, però que es consideren inespecífiques donat que en cap cas s'ha vist una mutació natural que provoqui aquesta seqüència (Figura 49B, C/EBP Mut i C/EBP Mut4). Per confirmar la desaparició de la banda, es va fer una quantificació de la mateixa mitjançant ImageQuant i el resultat es mostra a la Figura 49C. Com es pot veure, la quantificació de l'experiment demostra

la pèrdua de banda i, per tant, la pèrdua d'unió entre la regió del DNA i la proteïna que s'hi uneix.

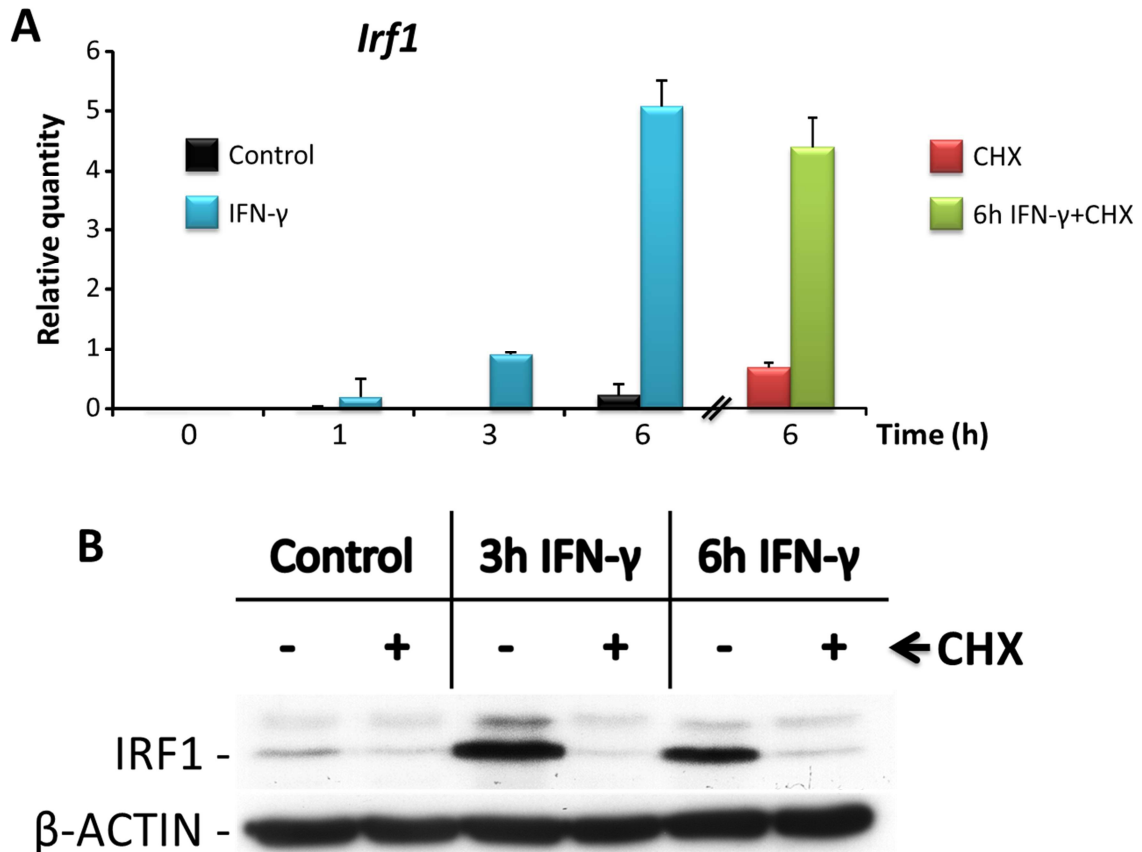
Per finalitzar, es va estudiar l'efecte de l'IFN- $\gamma$  sobre *Irf1*. Es va extraure RNA de BMDM en presència o no d'IFN- $\gamma$  i es va quantificar la seva expressió mitjançant qPCR. Els resultats mostren que *Irf1* es troba induït en presència d'IFN- $\gamma$  d'una manera significativa ja a les tres hores, i encara de manera més significativa a les 6 hores (Figura 50A). Donat que *Irf1* té una vida mitjana curta, podria ser que l'efecte que estem veient és degut a una estabilització de l'RNA. Per descartar aquesta hipòtesi, al mateix experiment es van incloure dos punts per quantificar l'expressió d'*Irf1* amb CHX i amb CHX conjuntament amb IFN- $\gamma$ . Els resultats mostren que la quantitat d'*Irf1* no varia en presència de CHX, el que ens indica que aquest augment d'*Irf1* amb un estímul d'IFN- $\gamma$  és degut a un augment de la síntesi i no pas a una estabilització de l'RNA (Figura 50A, dreta).

Per confirmar l'efecte de la cicloheximida sobre la síntesi de la proteïna d'IRF1, es van cultivar macròfags primaris amb d'IFN- $\gamma$  i en presència o no de cicloheximida. Es pot veure com hi ha una inducció de la traducció d'IRF1 a les tres i a les 6 hores en presència d'IFN- $\gamma$ , però aquesta síntesi es veu completament reprimida quan les cèl·lules han sigut pretractades amb cicloheximida (Figura 50B).



**Figura 49: El segon grup de timidines és essencial per a la unió d'una proteïna en condicions basals. A.** La regió que conté la seqüència d'unió de C/EBP $\beta$ , està composta per quatre grups de T. Les sondes de C/EBP

Mut1 a 4, mostren en cada cas les mutacions realitzades. A cada sonda, un grup de T es va substituir pel corresponent número de C (en vermell). **B.** EMSA amb les sondes mutades. Els carrils indicats amb "-", corresponen als controls negatius, els quals contenen la respectiva sonda marcada amb  $^{32}\text{P}$  però sense extractes nucleics. Experiment representatiu de tres experiments realitzats de manera independent. **C.** Quantificació de les bandes de retard de l'EMSA.



**Figura 50: IRF1 és induït per IFN-γ i no se sintetitza en presència de CHX.** **A.** BMDM van ser exposats a IFN-γ i les mostres van ser recollides als temps indicats. Les mostres amb CHX van ser pretractades amb el mencionat inhibidor durant 30 minuts i passat aquest temps es va afegir IFN-γ durant 6 hores. Es va extraure l'RNA i es va utilitzar 1μg d'aquest mRNA per a la retrotranscripció i obtenció del cDNA. Les mostres van ser analitzades mitjançant qPCR amb encebadors específics d'*Irf1* i els resultats es van analitzar com a quantitat relativa respecte al gen *L14*. La figura mostra la quantitat relativa, i es mostren els resultats promig i la desviació estàndard de tres resultats independents. **B.** L'expressió d'IRF1 s'ha mesurat en macròfags incubats en presència dels agents indicats i durant el temps indicat. La determinació de la quantitat de proteïna es va realitzar mitjançant Western Blot utilitzant l'anticòs contra la proteïna murina de SAMHD1 (72KDa). Cada membrana també s'utilitza per al corresponent control de càrrega, mitjançant la utilització de l'anticòs contra la β-Actina (β-ACTIN). En aquesta figura es mostra un resultat representatiu de tres experiments realitzats de manera independent. Western blot per a la detecció de la proteïna d'IRF1. IRF1 té un pes molecular de 37KDa.

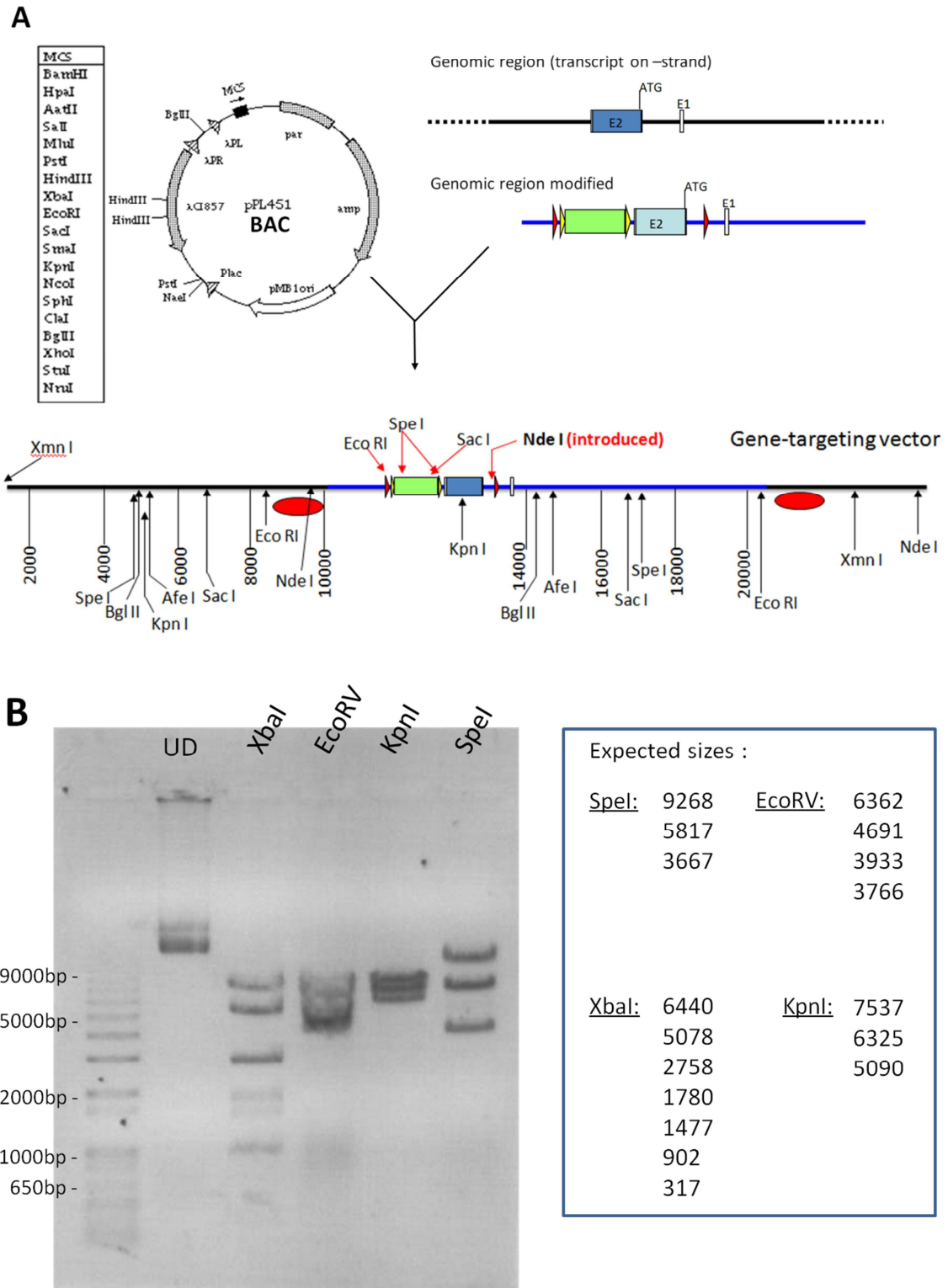
## Construcció d'un ratolí knockout condicional de TREX1

La comprensió de la funció de cada proteïna és bàsica pel coneixement de la patogènesi del síndrome d'Aicardi-Goutières. L'estudi de models murins, més simplificats pel que fa al context genètic, facilita aquesta feina. En estudis anteriors, es va dissenyar un ratolí knockout (KO) total per a TREX1 (Morita et al., 2004). No obstant això, les grans diferències entre el fenotip dels ratolins i la malaltia en humans, van fer encara més difícil els intents d'investigar l'AGS a través del model murí. Per aquesta raó, hem volgut construir un ratolí KO condicional i estudiar més a fons la implicació de TREX1 a cada tipus cel·lular i la participació d'aquests tipus cel·lulars a la patogènesi de la malaltia.

### Preparació del vector

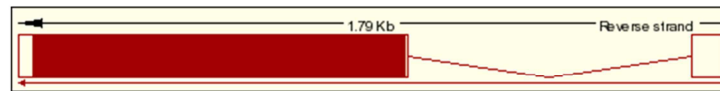
El primer pas per a l'obtenció del KO condicional és la modificació genètica de la regió a estudiar. Per aquest motiu, el primer que es va fer va ser l'extracció del DNA genòmic de cèl·lules mares embrionàries. Vàrem fer doncs una PCR per a l'amplificació de la regió d'interès, en aquest cas la que conté el gen de *Trex1*. Un cop obtingut i purificat el DNA, es va modificar la seqüència genètica per a la inclusió de les seqüències dels llocs de recombinació flanquejants (*LoxP* i *FRT*), cassettes de selecció positius i negatius (Neomicina i DTA respectivament, d'un plasmidi PGK), i algunes dianes per a enzims de restricció (Figura 51A). Aquesta seqüència també conté una regió de DNA corresponent als gens situats a 5' i a 3' de *Trex1* per tal de permetre la recombinació homòloga (Figura 52A). Tota la seqüència es va incloure dins d'un vector BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*, un plasmidi d'alta capacitat), formant el vector diana del gen (Figura 51A i 52B, *Gene-targeting vector*). Per comprovar que el vector estigués ben construït, primerament es va fer un primer anàlisi mitjançant una digestió amb diferents enzims de restricció (Figura 51B).

Es fa un primer control de les sondes del Southern Blot utilitzant 20µg de DNA genòmic de BMDM de ratolins Balb/c (per tant, WT) i només 1µg del vector BAC. Del vector es necessita molta menys quantitat de DNA perquè a cada còpia es troba un cop la seqüència desitjada, mentre que en els 20µg del DNA genòmic hi ha menys còpies, i amb menys quantitat de DNA seria difícil veure-hi senyal. Les sondes i la tècnica del Southern Blot permeten veure les diferències entre les seqüències WT i les modificades genèticament (Figura 54A i 54B).

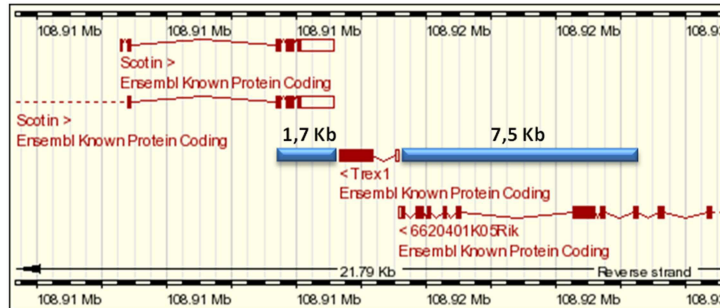


**Figura 51: Construcció del vector Gene-targeting.** **A.** Es va inserir a un vector BAC (pPL451) la regió genòmica corresponent a *Trex1* modificada. El resultat és el vector *gene-targeting*, el qual conté diferents dianes de restricció (fletxes) així com també el gen de *Trex1* flanquejat per les dianes de recombinació *LoxP* i *FRT*, i el gen de selecció positiva de Neomicina (quadrat en verd). Les el·lipses en vermell indiquen les posicions de les sondes per al Southern Blot. **B.** Comprovació per digestió amb enzims de restricció i electroforesi en gel d'agarosa del vector. A la dreta s'indiquen les bandes esperades a cada cas.

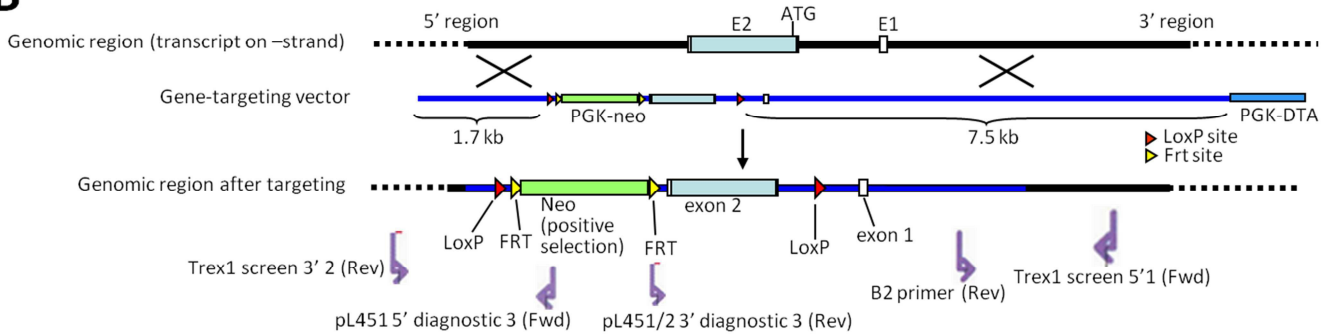
### A Ensemble transcript



### Transcript neighbourhood



### B

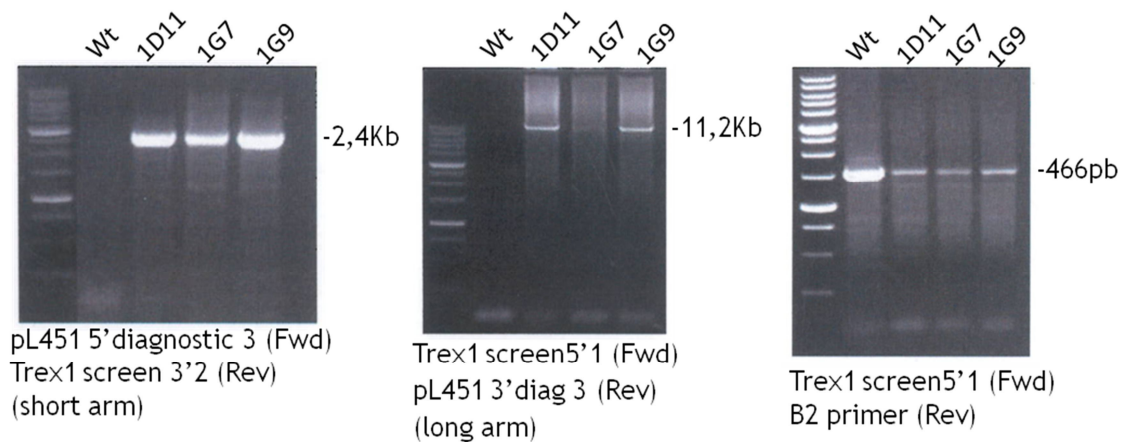


**Figura 52: Resum del procés de la recombinació homòloga.** **A.** El gen de *Trex1* comprèn dos exons, on només el segon conté una ORF, i està codificat a la cadena reversa. Els rectangles en blau amb els números a sobre, especifiquen la longitud de la seqüència que s'ha agafat de les regions confrontants per tal de permetre la recombinació homòloga. **B.** Les creus entre la regió genòmica (*Genomic region*) i el vector del gen diana (*Gene-targeting vector*), mostren els possibles llocs de recombinació homòloga. També es mostra la posició dels primers utilitzats per a l'anàlisi dels clons mitjançant PCR.

### Els clons positius van ser injectats a blastocists.

El vector es va electroporar en cèl·lules mare i aquestes es van deixar créixer en plaques de 96 pous, en una dilució al límit de manera que cada clon creixi a cada pou per separat. Un cop crescudes les cèl·lules, es va fer un primer cribratge mitjançant PCR (Figura 52B i 53). Es van analitzar prop de 400 clons, d'on en van sortir 8 clons positius. La recombinació homòloga es deixa totalment a l'atzar i en mans de la maquinària cel·lular, per aquest motiu és important comprovar si la incorporació de la modificació ha sigut en la posició correcta, així com també si se n'ha afegit una o més còpies. En cas que la incorporació de la modificació no hagi sigut correcta, les cèl·lules moriran perquè tindran l'expressió del gen de selecció negativa inclòs al *gene-targeting vector*. De la mateixa manera, les cèl·lules que no tinguin la incorporació de la

seqüència modificada, moriran perquè no seran capaces de sobreviure en un medi de cultiu suplementat amb neomicina.



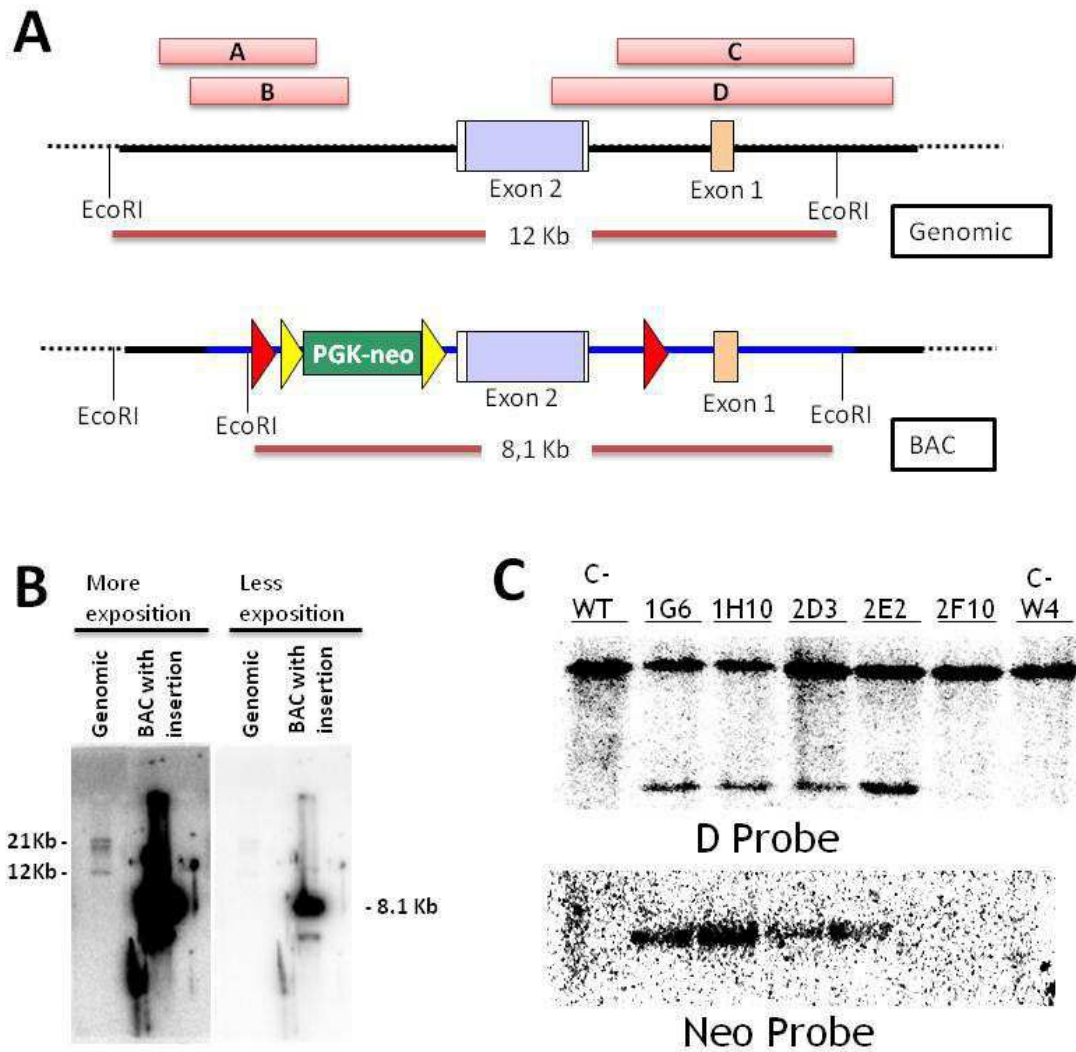
**Figura 53: Anàlisi per PCR dels clons crescuts prèviament sotmesos a electroporació, i determinació de la recombinació homòloga.** Anàlisi per PCR de les cèl·lules crescutes en un medi selectiu el qual conté neomicina. Les cèl·lules que no han fet una correcta recombinació homòloga moren per inclusió del gen de selecció negativa (PGK-DTA, figura 52B) o perquè no poden créixer en el medi selectiu amb neomicina.

Es deixen créixer els clons positius durant tres setmanes fins que arriben a una confluència suficient per extraure una bona quantitat de DNA genòmic. Per comprovar si la inserció es trobava en la posició correcta del genoma, així com també per saber si s'havia inserit més d'una còpia, es va realitzar un assaig de Southern Blot amb el DNA genòmic relatiu a cada clon que s'havia detectat positiu inicialment per PCR. Aquest DNA va ser sotmès a una digestió amb enzims de restricció i es va realitzar una transferència a membrana de niló (Southern Blot). Quatre dels clons van donar positiu per Southern mitjançant la detecció amb una sonda a l'extrem 3'(Figura 54A) i seguidament, el resultat va ser confirmat mitjançant la utilització d'una altra sonda basada en la regió del gen inserit de resistència a neomicina (Figura 54B). Dos d'aquests clons positius van ser injectats a blastocists, en l'etapa de desenvolupament de 16 cèl·lules.

Els blastocists codifiquen al seu genoma per a un pelatge blanc mentre que les cèl·lules que contenen el genoma modificat, tenen la informació genètica per a un pelatge negre. Abans d'injectar les cèl·lules mare, aquestes van ser exposades a la recombinasa FLP per tal d'eliminar el gen de selecció positiva de neomicina del genoma. Es van injectar doncs les cèl·lules positives per a la modificació genètica a un blastocist i, seguidament, els blastocists van ser implantats a mares de lloguer. Aquesta mare de lloguer donarà vida a cries quimèriques: animals els quals tenen un pelatge bicolor, blanc i negre. Com més percentatge de pelatge negre continguin, més

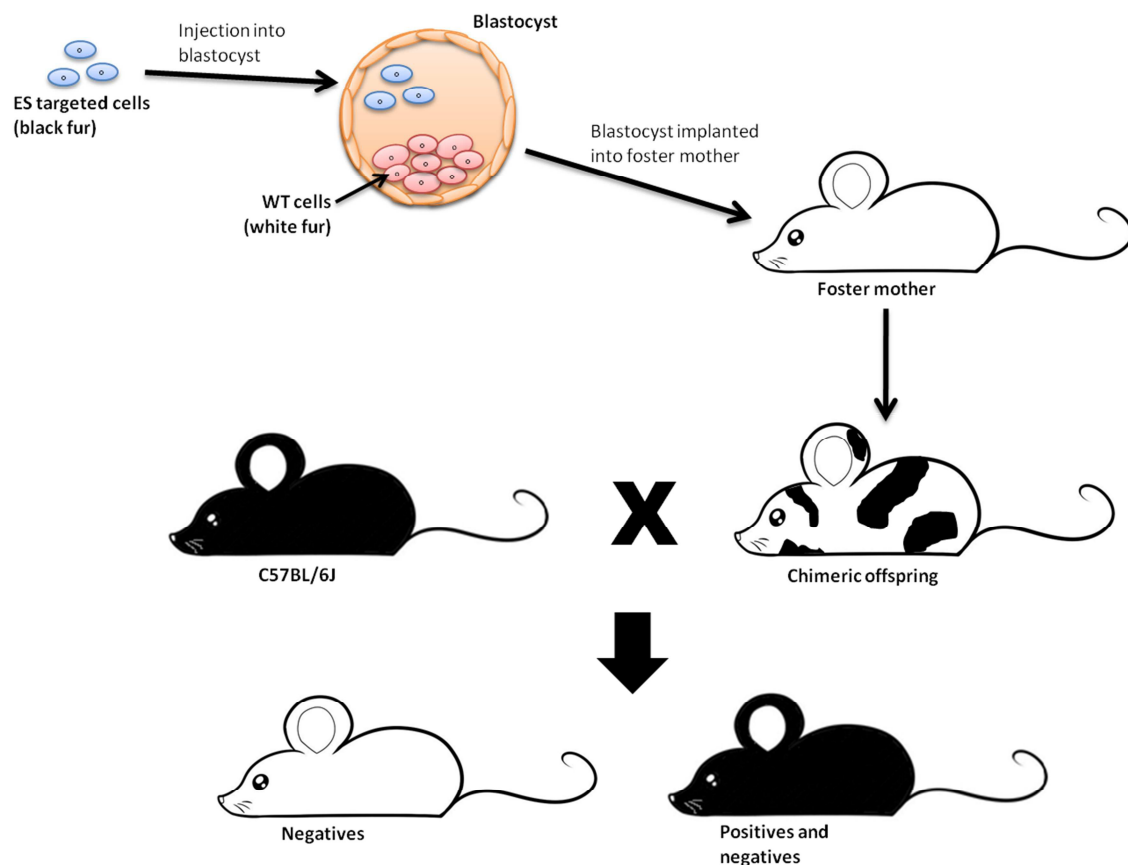


divisions han aconseguit les cèl·lules modificades dins del blastocist i, per tant, més altes són les probabilitats de tenir cèl·lules germinals amb el genoma modificat, cosa que dona més probabilitats de transmetre la modificació a la descendència (Figura 55).



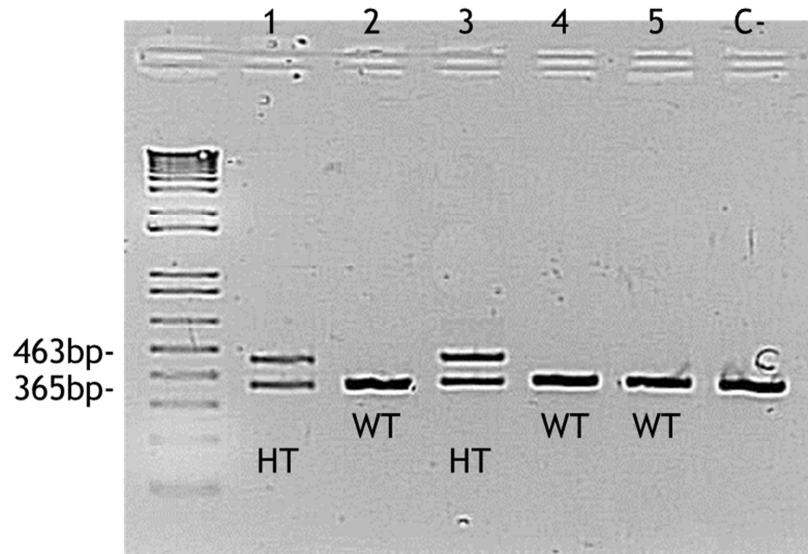
**Figura 54: Disseny de les sondes per a l'assaig de Southern Blot.** **A.** Les lletres A, B, C i D dins dels rectangles indiquen la posició de les sondes pel Southern Blot. Les sondes A i B es troben a l'extrem 5', mentre que les sondes C i D són a l'extrem 3'. Els valors 12Kb i 8,1Kb indiquen la mida de la regió després d'haver estat sotmès el genoma a digestió mitjançant l'enzim de restricció EcoRI, i on les sondes hibridaran. **B.** Southern Blot d'un control negatiu (DNA genòmic) i d'un control positiu (BAC amb la inserció). **C.** Cinc dels clons positius seleccionats per PCR van ser també analitzats per Southern Blot, en aquest cas utilitzant la sonda D. Quatre d'ells van resultar positius, confirmat mitjançant la realització d'un altre Southern utilitzat la sonda centrada en el cassette de neomicina. (Neo Probe). A l'experiment es van incloure dos controls negatius, "WT" i "W4". 1G6, 1H10, 2D3, 2E2 i 2F10, corresponen a la nomenclatura dels diferents clons analitzats.

Els animals quimèrics es van creuar amb ratolins comercials amb fons genètic pur C57BL/6J(WT). D'entre els descendents, es van seleccionar els animals amb pelatge negre i es va realitzar una PCR de genotipació per tal de comprovar si tenien la modificació del genoma. Els animals positius per a la modificació van ser llavors creuats fins a 10 vegades amb ratolins comercials amb fons genètic pur C57BL/6J, fins aconseguir animals amb fons genètic C57BL/6J. Cada descendència va ser genotipada mitjançant PCR i de cada naixement es van seleccionar els animals positius per a la modificació (Figura 55 i 56).



**Figura 55: Injecció de les cèl·lules embrionàries modificades (ES) i selecció dels animals positius.** Les cèl·lules modificades van ser injectades a un blastocist en etapa de 16 cèl·lules i aquest va ser injectat a mares de lloguer codificants per a un color de pelatge diferent. La primera descendència quimèrica es va creuar amb animals comercials de fenotip pur C57BL/6J. De cada descendència es van seleccionant cada cop els animals positius fins a la obtenció d'animals de fenotip pur C57BL/6J i que contenen la modificació al seu genoma.

En aquest punt, s'ha aconseguit el ratolí KO condicional per a TREX1 i està llest per al creuament del mateix amb soques de ratolins que expressin la recombinasa CRE. Cal mencionar que el ratolí KO condicional no presenta cap tipus d'afectació fenotípica, es reproduïx sense problemes i té un creixement normal, perfectament similar als ratolins WT comercials.

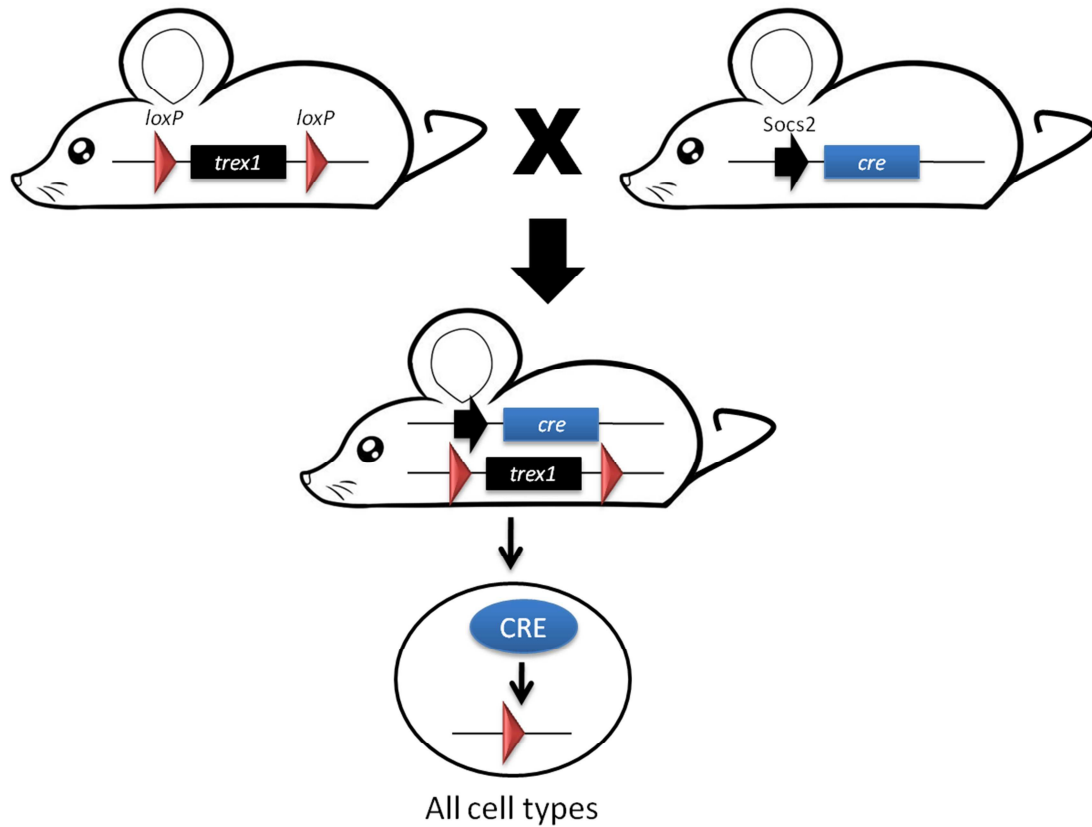


**Figura 56: Genotipat dels cinc primers animals de la colònia condicional de TREX1.** Dels 5 animals analitzats, dos d'ells van sortir heterozigots per a la modificació gènica.

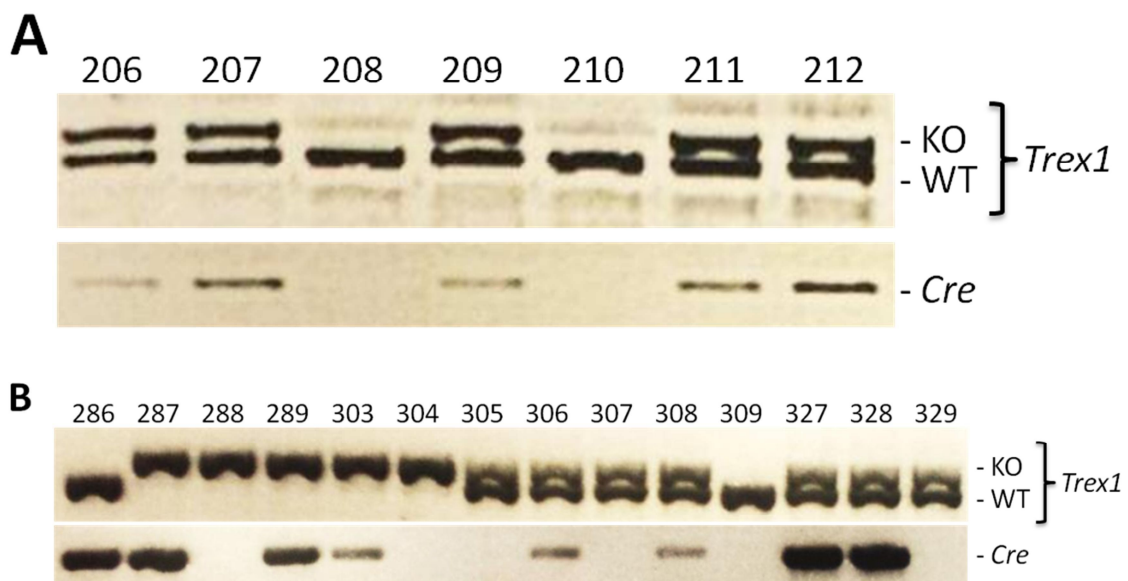
**El creuament del ratolí KO condicional de TREX1 amb una soca de ratolins que expressen CRE sota el promotor de Socs2 ( $CRE^{Socs2}$ ), mostra el mateix fenotip que el KO total de TREX1.**

En un primer experiment, es van creuar els ratolins KO condicional amb una soca de ratolins que expressen la proteïna CRE sota regulació del promotor Socs2 ( $CRE^{Socs2}$ ) (Figura 57). El promotor Socs2 es troba expressat en un estadi primerenc del desenvolupament, el que significa que tots els tipus cel·lulars estaran afectats per una pèrdua de TREX1 (Croker et al., 2008; Starr et al., 1997). Un primer genotipat dels animals va permetre seleccionar els animals heterozigots i positius per a *Cre* i es van encreuar entre si (Figura 58A).

Després del naixement es van seleccionar els animals positius per genotipació per a *Cre* com a KO, i els germans no codificants per *Cre* com a WT (Figura 58B). Ambdós tipus van ser analitzats. El primer que es va analitzar va ser la mida dels animals. Els KO són més petits i amb un pes menor, i moren a les poques setmanes en comparació als WT (Figura 59A i 59B). Aquest fenotip és el mateix que havia observat Morita et al. (2004) en el ratolí KO total de TREX1, així com també ho hem observat en el nostre laboratori (Pereira-Lopes et al., 2013) (Figura 60).



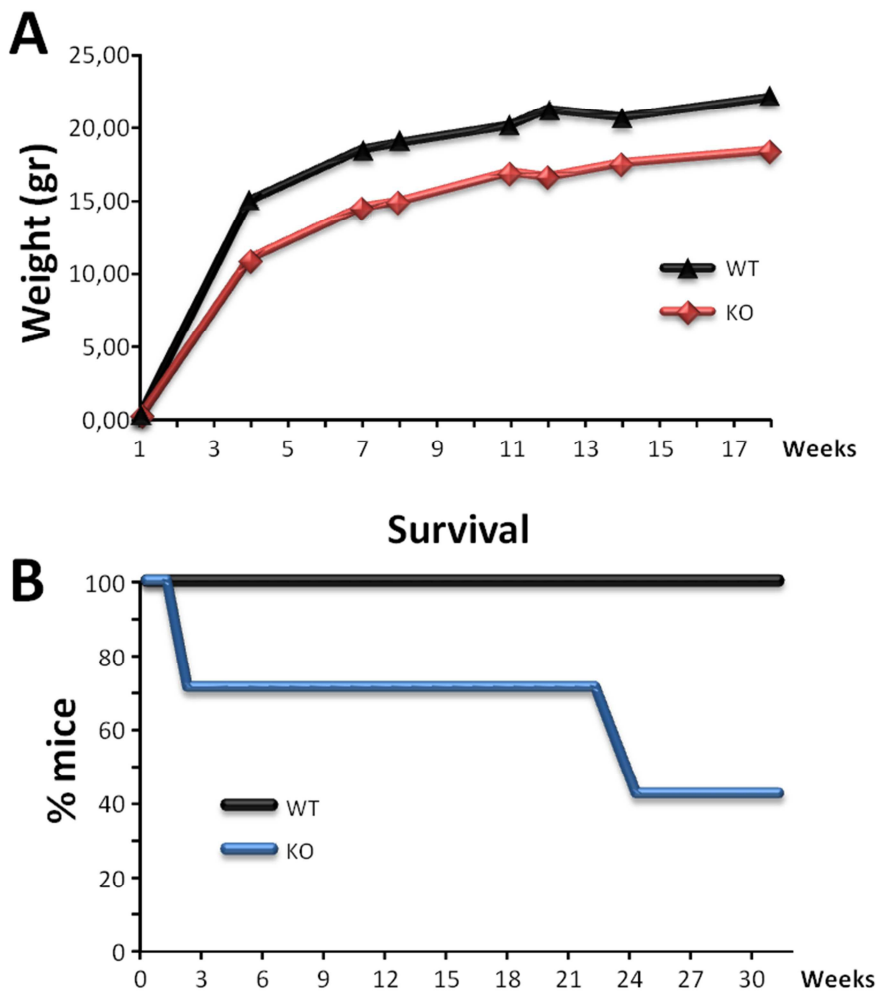
**Figura 57: Representació del creuament entre el KO condicional i la soca que expressa CRE sota el promotor de Socs2.** La descendència d'aquest creuament tindrà una deleció de TREX1 a tots els tipus cel·lulars, ja que a l'expressar-se la recombinasa des d'un estadi primerenc del desenvolupament, les cèl·lules es dividiran sense TREX1 i donaran lloc a animals sense TREX1.



**Figura 58: Genotipacions de la descendència entre els ratolins knockout condicional de TREX1 i CRE<sup>LysM</sup>.** A i B. Es va realitzar una PCR amb els encebadors específics per a la detecció de la modificació a la

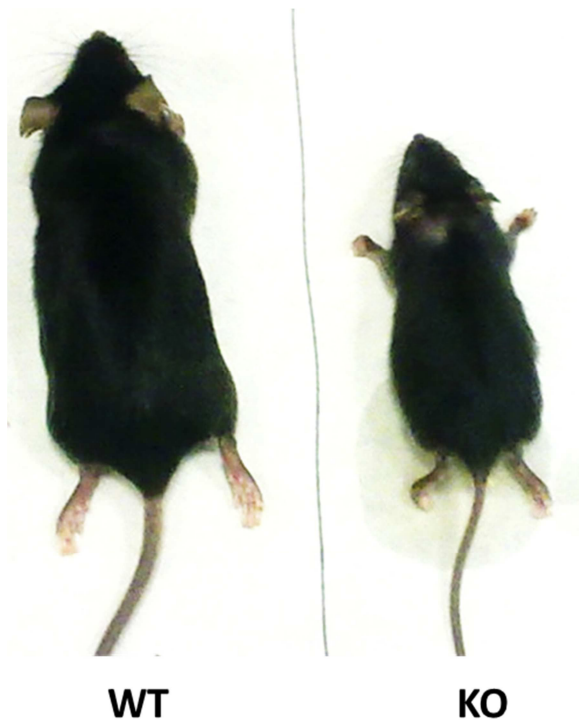
seqüència de *Trex1* i una altra amb els encebadors específics de *Cre*, i es va fer una electroforesi en gel d'agarosa del producte de la PCR.

Tot i això, alguns animals nascuts a la mateixa ventrada positius per a *Cre* i, com a conseqüència, deficients en l'expressió de TREX1, tenen el mateix pes i viuen més temps, de manera similar als WT (Figura 61A i 61B). Aquesta última observació, que alguns ratolins TREX1<sup>-/-</sup> tenen una major supervivència, té correspondència amb les observacions que s'han vist en experiments previs fets en altres grups amb els ratolins knockout totals de TREX1 (Morita et al., 2004; Stetson et al., 2008) (Figura 62). Aquests resultats indiquen que poden haver-hi implicats en aquest animals dos possibles mecanismes, ja que la corba de supervivència seguiria dues tendències.



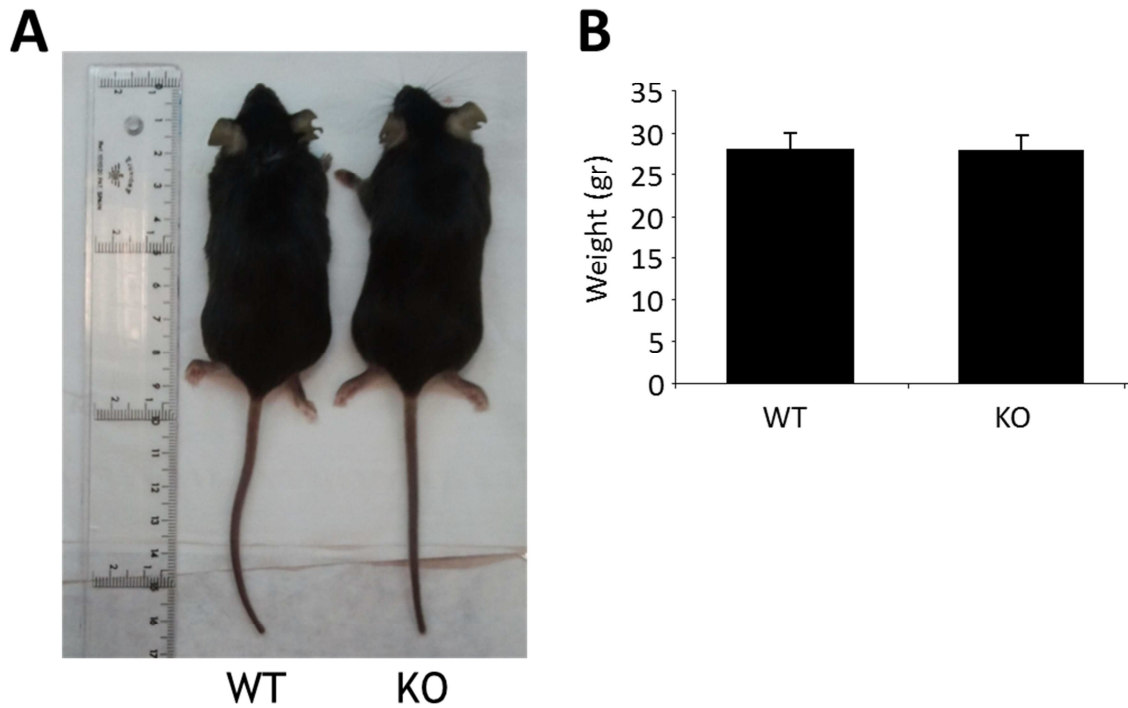
**Figura 59: Anàlisi d'una progènie de l'encreuament del ratolí KO condicional i un ratolí CRE<sup>Sox2</sup>. Corba de creixement (A) i corba de supervivència (B) dels animals KO en comparació amb els WT. Per a cada experiment es van mesurar els pesos i es va mirar la supervivència de 10 animals de cada grup.**

En aquests animals, similars als WT, també es van analitzar diferents òrgans els quals poden estar afectats a l'AGS. No es van veure diferències en morfologia ni en el pes dels diferents òrgans, el que indica que aquests animals no tenen un procés inflamatori tot i la deficiència en TREX1 com s'ha vist als animals KO de TREX1 que moren a una edat prematura (Figura 63A i 63B).

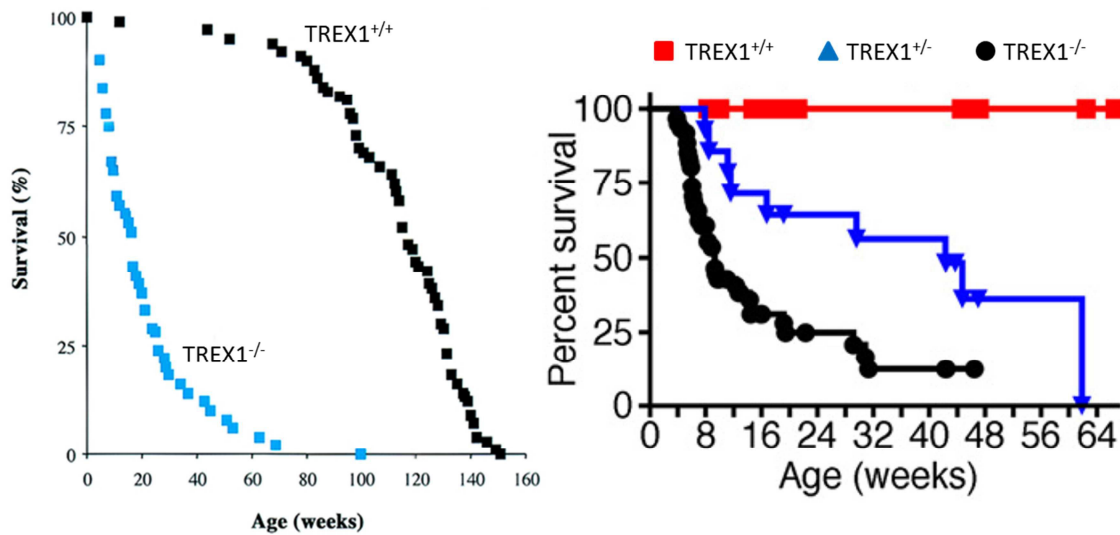


**Figura 60: Imatge d'un ratolí WT i un KO per TREX1.** A la imatge es veuen dos animals de la mateixa colònia i de la mateixa edat (8setmanes) però normal o deficient en TREX1, respectivament. Imatge cedida per Pereira et al.

Es va extraure llavors medul·la òssia dels animals WT i KO, i es va fer un cultiu amb M-CSF per a la obtenció de macròfags (BMDM). En primer lloc, es va analitzar l'expressió de marcadors de superfície de les cèl·lules provinents de ratolins WT i KO. Una vegada seleccionades les cèl·lules vives (Figura 64, gràfic superior esquerre) i seleccionades les cèl·lules no adherides unes amb altres (Figura 64, gràfic superior dret), es va veure que l'expressió de marcadors típics de macròfags, com són el F4/80 i la integrina alfa M (CD11b), és igual independentment de la procedència, ja sigui WT o KO (Figura 64, gràfics inferiors; es mostren dos resultats independents).



**Figura 61:** Anàlisi d'una progènie de l'encreuament del ratolí KO condicional i un ratolí CRE<sup>Socs2</sup>. Dintre de la mateixa ventrada, hi ha animals KO que són similars en mida (A) i pes (B) que els WT. Aquests animals tenen aproximadament 6 mesos d'edat. Anàlisi del pes de dos animals a cada grup.



**Figura 62:** Corbes de supervivència de ratolins TREX1. Adaptades de Morita et al. (2004) (esquerra) i Stetson et al. (2008) (dreta).

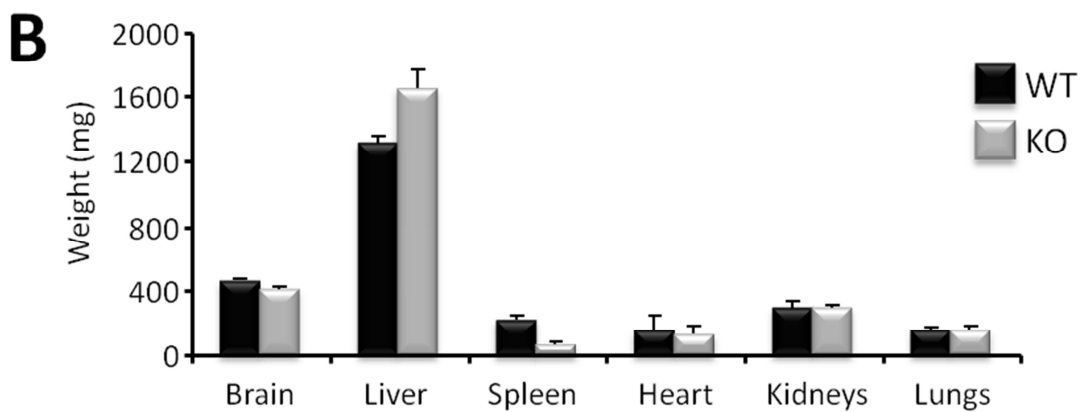
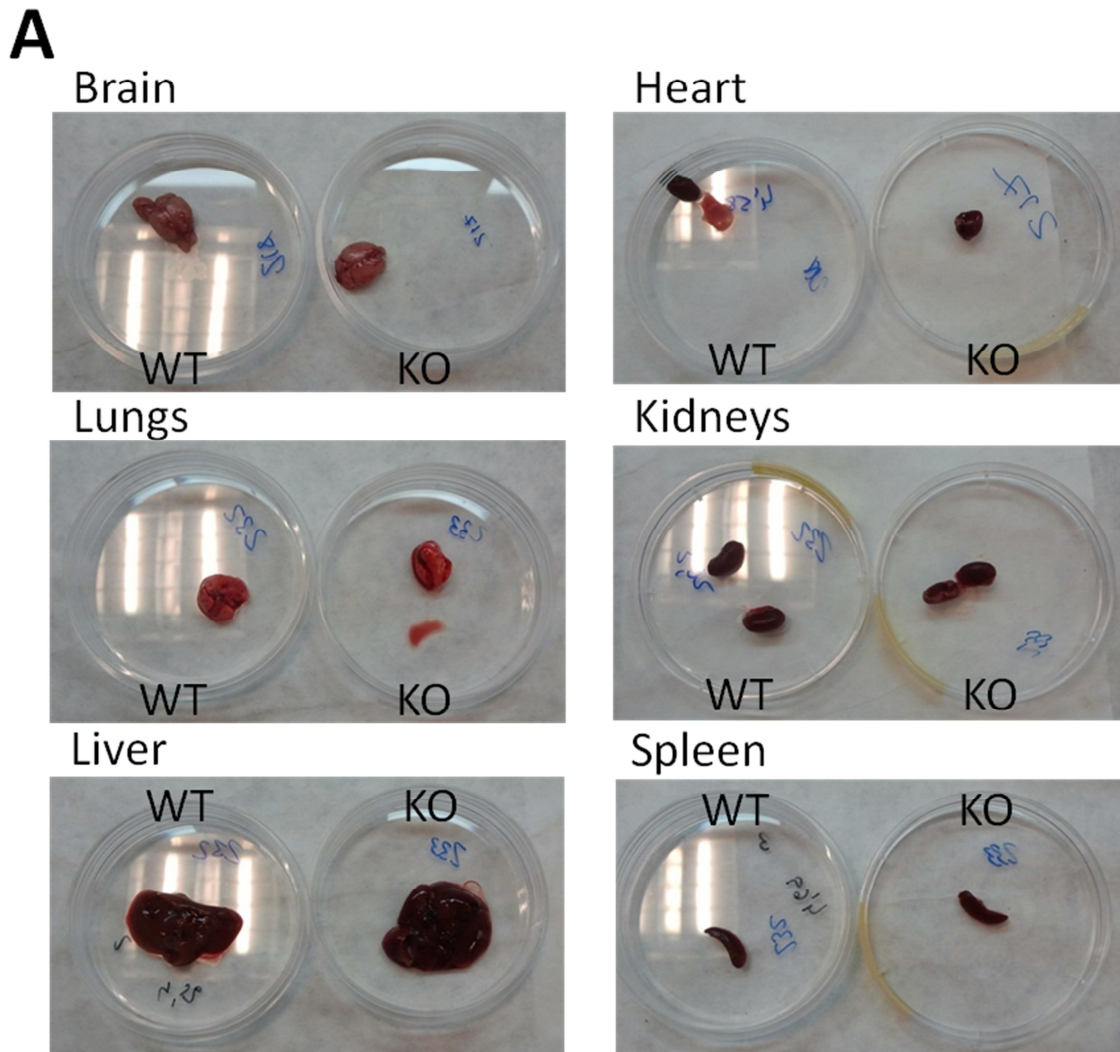
Es va analitzar també l'expressió d'altres molècules com Ly6C, marcador típic de monòcits, i CD11c, marcador típic de cèl·lules dendrítiques, i aquests es van confrontar amb els marcadors F4/80 i CD11b. Els BMDM de ratolins KO no tenen problemes de diferenciació, ja que

en cap cas no expressen el marcador Ly6C, ni tampoc marcadors d'altres tipus cel·lulars com el CD11c (Figura 65).

Es va analitzar l'expressió basal de *Trex1* a diferents teixits, i es va trobar que l'expressió és reduïda en el cas dels ratolins KO en comparació amb els WT (Figura 66A). També es va analitzar l'expressió a macròfags derivats de moll d'os. Els macròfags diferenciats obtinguts es van exposar durant 24 hores a un estímul d'IFN- $\gamma$ , ja que s'ha vist que *Trex1* és induït per aquesta citocina en macròfags murins (Serra et al., 2011), i seguidament es va fer l'extracció de l'RNA missatger total. Després de la transformació a cDNA, es va analitzar l'expressió de *Trex1* mitjançant PCR a temps real o quantitativa (qPCR). En el cas dels macròfags obtinguts a partir del moll de l'os dels ratolins KO, es veu una menor expressió de *Trex1* en comparació amb els macròfags de ratolins WT, però tot i així, els KO tenen un mínim d'expressió de *Trex1* i és induïble (Figura 66B).

Per tal de confirmar els resultats mostrats per la qPCR, es van fer extractes proteics totals de macròfags després de 7 dies de cultiu, i els sobrants es van replaquejar en absència del factor de creixement M-CSF durant 18 hores a temperatura i concentració de CO<sub>2</sub> normals. Mitjançant aquest medi condicionant s'aconsegueix que les cèl·lules quedin sincronitzades en l'etapa S del cicle cel·lular. Després de les 18 hores, es procedeix a l'estimulació (si pertoca) de les cèl·lules amb IFN- $\gamma$  per comprovar si hi ha una inducció de la traducció de TREX1. Després dels 7 dies de cultiu no es troba expressió de TREX1 en qualsevol dels casos, ni en els KO ni en els WT. Aquesta troballa té sentit ja que l'expressió de TREX1 és tòxica i està molt regulada en condicions basals, amb una vida mitja molt curta (Serra et al., 2011). Després de 24 hores en presència d'IFN- $\gamma$ , es veu un augment de TREX1 en els animals WT però no pas en els animals KO (Figura 67A). Aquest resultat va ser confirmat per una densitometria a partir del Western Blot (Figura 67B). En condicions control també es veu un augment de l'expressió de TREX1 (Figura 67A i 67B). Cal pensar que aquestes cèl·lules han estat durant 18 hores en condicions sense factor de creixement, el que pot haver causat un estrès cel·lular que estaria induint l'expressió del gen sense necessitat d'estar exposat a citocines proinflamatòries.





**Figura 63: Morfologia i pes d'òrgans de ratolins WT i KO.** A. Es van extraure òrgans de ratolins WT i KO de TREX1 provinents del creuament amb CRE<sup>Socs2</sup>. Es mostra una imatge representativa de duplicats d'animals que van ser analitzats. Posteriorment, es va fer un anàlisi dels pesos dels respectius òrgans i es va fer la mitjana i la desviació estàndard dels mateixos. El resultat es mostra a la figura B.

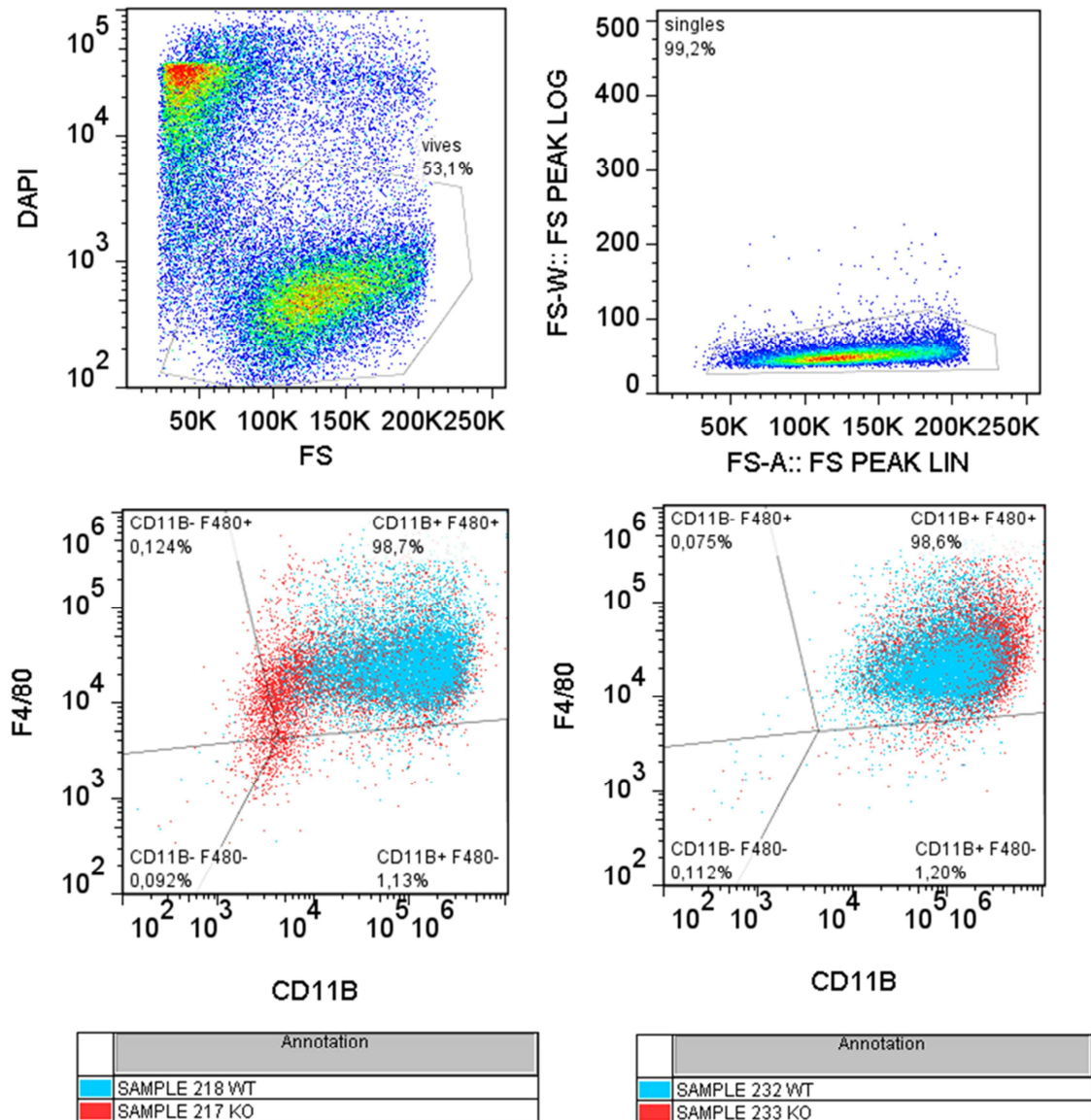
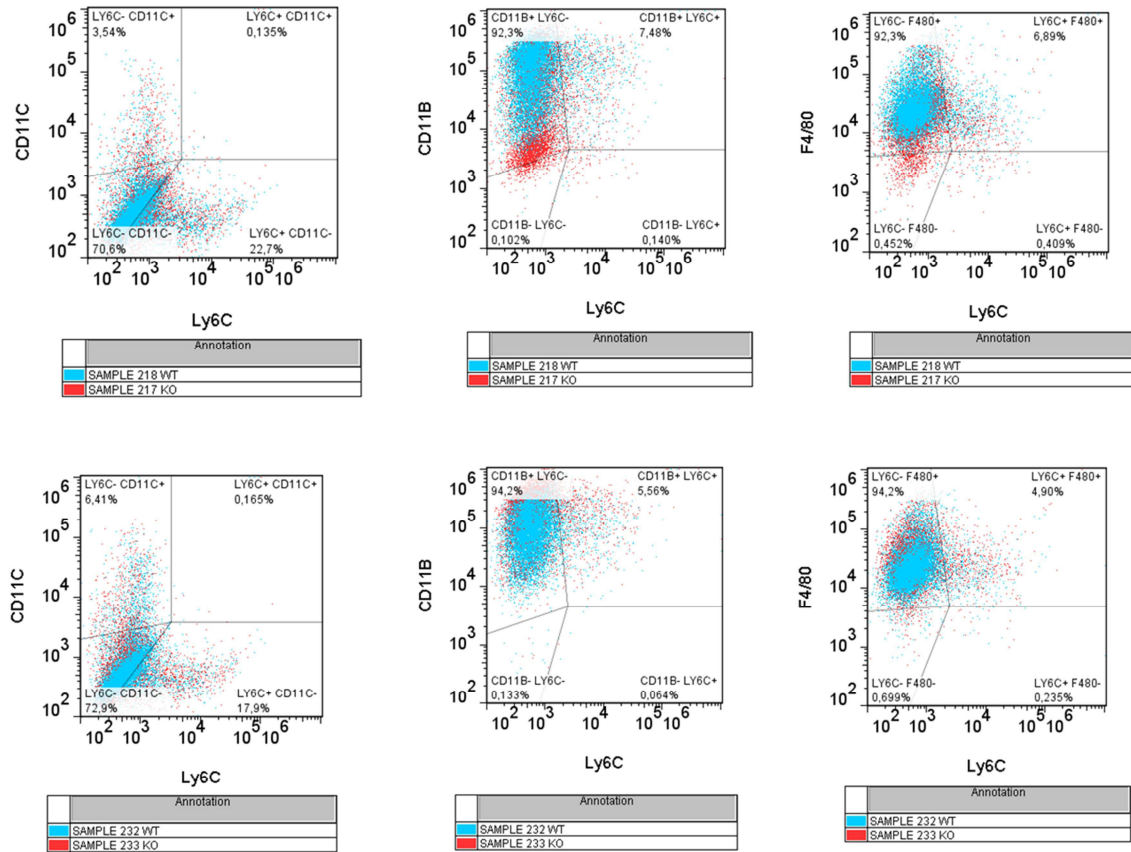
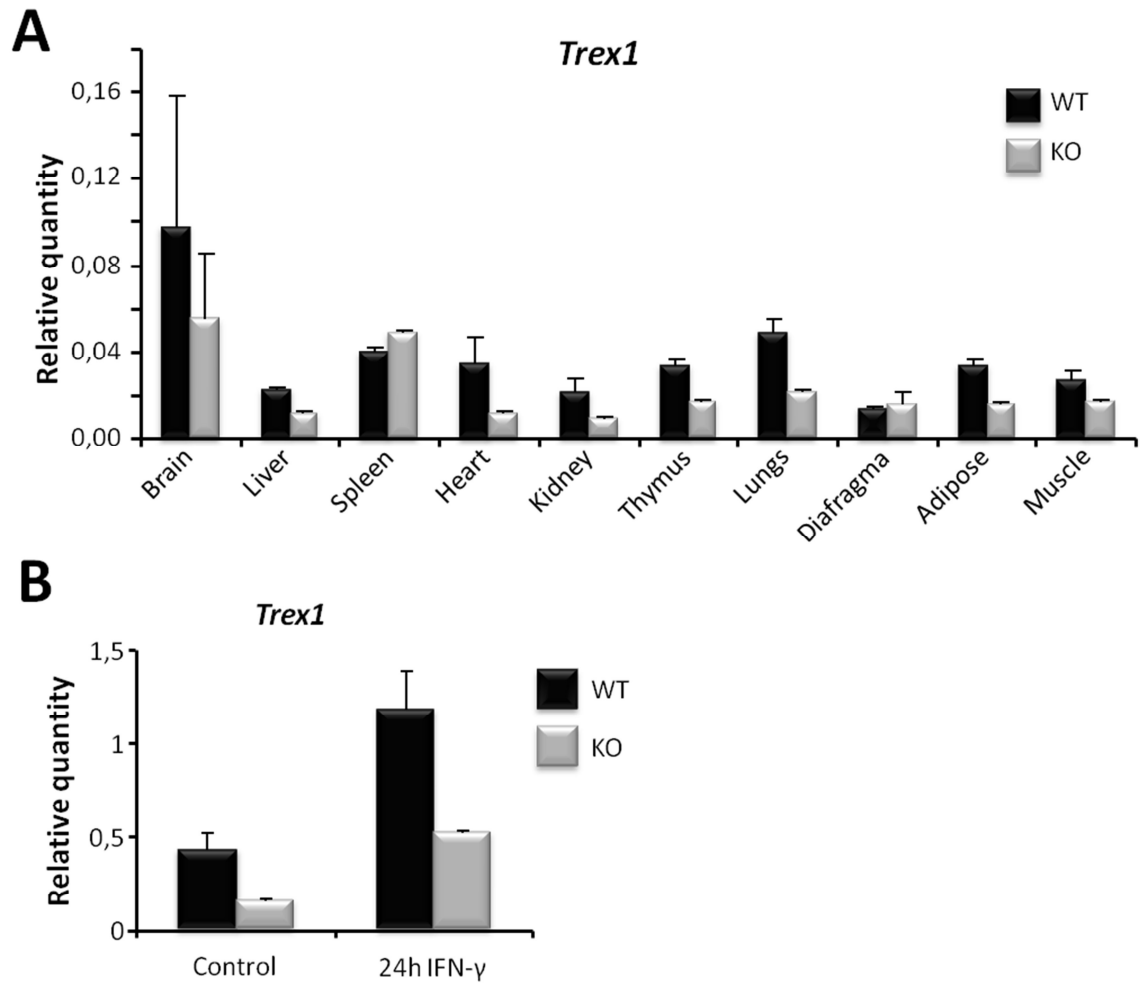


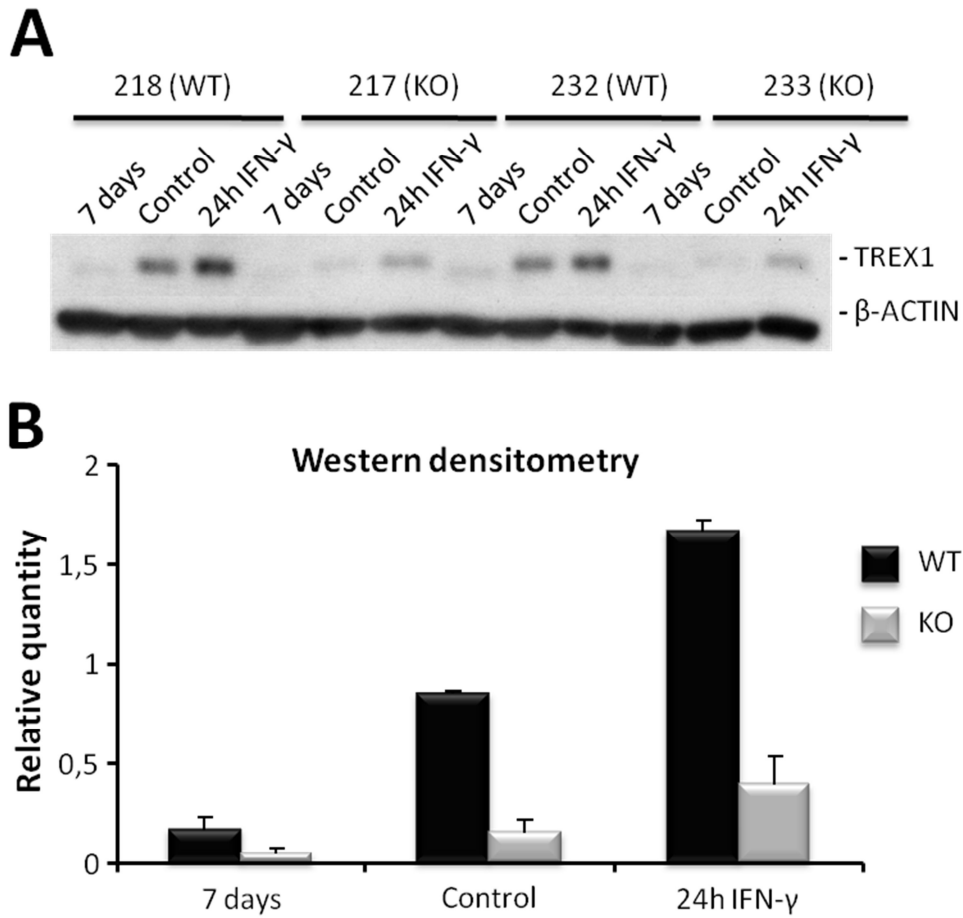
Figura 64: Anàlisi per FACS dels BMDM de ratolins negatius i positius per a CRE<sup>Socs2</sup>. Una vegada seleccionats els macròfags per mida, es va fer un primer anàlisi dels marcadors de superfície específics de macròfags. Es va fer el marcatge d'un milió de cèl·lules. Els dos gràfics inferiors són duplicats de l'experiment.



**Figura 65: Anàlisi per FACS dels BMDM de ratolins negatius i positius per a  $CRE^{Socs2}$ .** Una vegada seleccionats els macròfags per mida, es va fer l'anàlisi de marcadors de superfície específics d'altres línies de cèl·lules mieloides. Es va fer el marcatge d'un milió de cèl·lules. Els gràfics a la part inferior són duplicats d'una altra parella d'animals. En blau els ratolins negatius per a  $CRE^{Socs2}$  (WT) i en vermell els ratolins positius per a  $CRE^{Socs2}$  (KO).



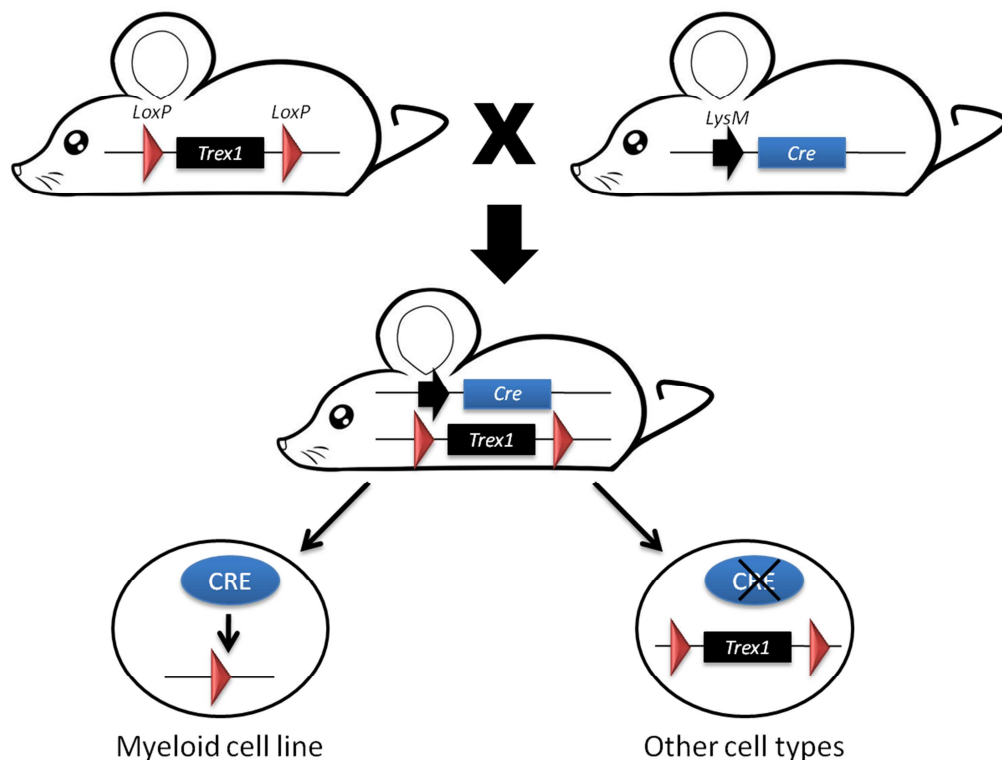
**Figura 66: Anàlisi d'una progènie de l'encreuament del ratolí KO condicional i un ratolí CRE<sup>Socs2</sup>. A.** Expressió basal de *Trex1* en diferents òrgans. **B.** Expressió de *Trex1a* BMDM en condicions basals (Control) i després de 24 hores en presència d'IFN- $\gamma$  (24h IFN- $\gamma$ ). En tots els casos es va extraure l'RNA dels diferents teixits indicats, o cultius cel·lulars, i es va fer una retrotranscripció amb 1 $\mu$ g d'aquest RNA. L'expressió de l'RNA es va analitzar mitjançant PCR quantitativa (qPCR) utilitzant els encebadors específics de *Trex1* i els resultats es mostren en relació a la quantitat d'*L14* detectada per qPCR a les mateixes mostres. A la figura es mostren les mitjanes i la desviació estàndard de dos experiments independents.



**Figura 67: Anàlisi d'una progènie de l'encreuament del ratolí KO condicional i un ratolí CRE<sup>Socs2</sup>. A.** Expressió proteica de TREX1 a BMDM després de 24 hores en presència d'IFN- $\gamma$  analitzada per Western Blot, i la densitometria corresponent (B). La determinació de la quantitat de proteïna es va realitzar mitjançant Western Blot utilitzant l'anticòs contra la proteïna murina de TREX1. Cada membrana també s'utilitza per al corresponent control de càrrega, mitjançant la utilització de l'anticòs contra la  $\beta$ -Actina ( $\beta$ -ACTIN). El Western mostra l'anàlisi per duplicat de ratolins WT i KO.

**Creuament del ratolí KO condicional de TREX1 amb una soca de ratolins que expressen CRE sota el promotor de la Lisozima M ( $CRE^{LysM}$ )**

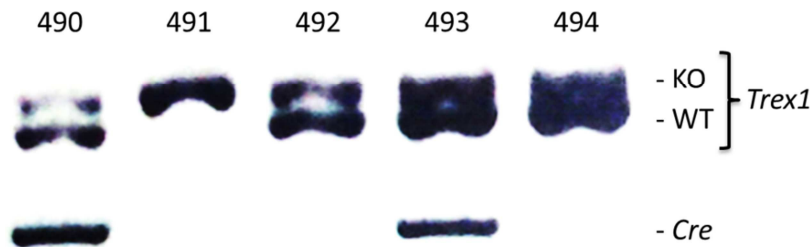
Es va fer llavors un creuament del ratolí KO condicional de TREX1 amb un ratolí que expressa la recombinasa CRE sota el promotor de la Lisozima M ( $CRE^{LysM}$ ). El promotor de la lisozima M s'expressa a la línia cel·lular mieloide: macròfags, cèl·lules dendrítiques, neutròfils i monòcits (Clausen et al., 1999). A la descendència provinent de l'encreuament entre el KO condicional i la soca  $CRE^{LysM}$ , aquestes cèl·lules no expressaran doncs TREX1 (Figura 68). Després del naixement, es van genotipar els animals mitjançant PCR. D'aquesta descendència es van seleccionar els animals positius per CRE com a KO, i els germans que no expressaven CRE com a WT. WT i KO van ser analitzats.



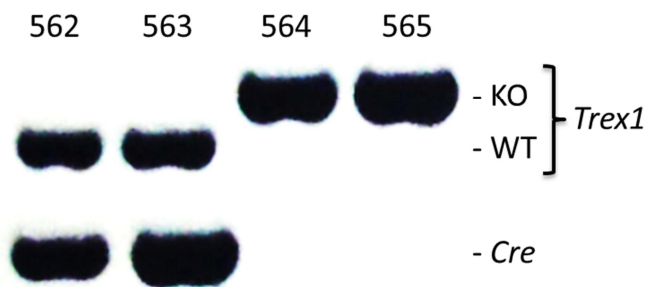
**Figura 68: Representació del creuament entre el KO condicional i la soca que expressa CRE de manera regulada pel promotor de la Lisozima M ( $CRE^{LysM}$ ).** A la descendència d'aquest creuament, CRE és expressat a les cèl·lules de la línia mieloide. Aquestes cèl·lules doncs no tindran expressió de TREX1. A qualsevol altre òrgan del ratolí, l'expressió de TREX1 és completament normal.

La penetrància de l'al·lel el qual conté *Cre* és molt baixa. Al primer creuament, es van obtenir animals heterozigots per a la modificació (animals WT i a l'altre al·lel expressen *LoxP*) dels quals uns pocs només expressaven CRE. Aquests animals que expressen CRE, van ser creuats entre sí a fi d'obtenir animals homozigots per a la modificació (*Trex1* flanquejat per *LoxP*)

i que expressin CRE. Aquest segon creuament va donar problemes. Es van obtenir animals positius per a CRE o animals homozigots, però en cap cas no es van obtenir els animals desitjats (Figura 69).



**Figura 69: Exemple de genotipat dels primers animals heterozigots per a la modificació de *Trex1* i que expressen CRE<sup>LysM</sup>.** Els animals heterozigots per a la modificació de *Trex1* i positius per a *Cre* es van creuar entre sí per a la obtenció de ratolins homozigots per a la modificació i que expressin *Cre*.



**Figura 70: Exemple de genotipat de les primeres descendències entre el ratolí condicional de TREX1 i el ratolí CRE<sup>LysM</sup>.** Dels animals heterozigots per a la modificació de *Trex1*, només els animals homozigots negatius per a la modificació expressen CRE, mentre que els animals homozigots positius no expressen CRE.

Pensem que el problema pot estar en el fet que en el model murí que vaig fer servir de recombinasa CRE, aquesta es troba fusionada al gen YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) i això podria estar interferint en la transferència del gen a la descendència quan s'està transferint conjuntament amb la modificació per a *Trex1*. Es va optar llavors per un canvi de progenitors que expressessin CRE, sense que aquesta estigui fusionat a res. Aquest cop s'ha obtingut una primera descendència amb un 100% d'animals heterozigots per a *Trex1* flanquejat per *LoxP* i dels quals un 80% expressen CRE (Figura 71). Aquests animals van ser creuats entre sí i, a dia d'avui, estem a l'espera de la següent generació per al seu genotipament. En cas que siguin els animals desitjats genèticament, es procedirà al seu anàlisi.



**Figura 71: Genotipació d'una ventrada obtinguda del creuament entre el KO condicional i la soca que expressa CRE regulada pel promotor de la Lisozima M ( $CRE^{LysM}$ ).** Els 8 animals nascuts d'un creuament entre un mascle donant de CRE i una femella KO condicional de *Trex1*, són tots heterozigots per a la modificació de la regió de *Trex1*, la qual conté el gen flanquejat per dues dianes de recombinació *LoxP*. D'aquests, 5 animals donen positiu per a l'expressió de CRE.





# Discussió

|

# Discussió

L'enteniment de la funció en concret de cada proteïna, és bàsic per a la comprensió de la patogènesi inicial de la síndrome d'Aicardi-Goutières. El dèficit per mutació de qualsevol de les proteïnes TREX1, RNASE H2 (H2A, H2B o H2C), SAMHD1 o ADAR1, provoca una acumulació a la cèl·lula d'algun tipus d'àcid nucleic o nucleòtids. Aquesta acumulació és detectada com a patogènica per receptors interns de la cèl·lula, activant el sistema immune cap un estat anti-víric. Els detectors del DNA acumulat al citosol són encara desconeguts, però STING (*Stimulator of interferon genes*) és el primer modulador de senyals reconegut en el cas d'una acumulació d'àcids nucleics per una falta de TREX1. Aquest és requerit per a la via que porta a l'activació de TBK1 i seguidament IRF3 i IRF7, els quals porten a la inducció de gens estimulats per IFN (ISG). Quan la malaltia AGS es dona per una mutació al gen *Trex1*, s'ha vist que és necessària una activació intrínseca cel·lular per a la propagació de la malaltia (Stetson et al., 2008). Recentment s'han trobat mutacions a la proteïna MDA5, encarregada de la detecció d'RNA víric al citoplasma. A diferència de les mutacions en les altres proteïnes, les quals provoquen una pèrdua de funció, les mutacions a MDA5 provoquen un guany de funció, provocant una activació contínua de la via MAVS i conduint així a una activació crònica del sistema immunitari innat que acabarà donant lloc a diferents malalties autoimmunitàries. El que és clar en qualsevol dels casos és que cap de les proteïnes associades a l'AGS, no tenen funcions redundants, ja que el funcionament deficient d'una de les mencionades proteïnes és suficient i necessari per al desenvolupament de la malaltia.

Es troben moltes similituds entre TREX1 i SAMHD1: en estructura i funció, les dues tenen una estructura terciària similar, amb la unió d'ions al centre actiu per al correcte funcionament de les proteïnes (magnesi a TREX1 i zinc en el cas de SAMHD1); ambdues proteïnes necessiten dimeritzar per al correcte funcionament; i les dues s'han vist relacionades amb el virus del SIDA, encara que de manera antagònica (Chahwan and Chahwan, 2012; Hasan and Yan, 2014; Luban, 2012; Xu et al., 2014). Donat que ambdues estan implicades en la mateixa malaltia autoimmunitària, es va voler aprofundir en la regulació dels mencionats gens i esbrinar si estan relacionats. Al nostre grup es va caracteritzar el promotor de *Trex1*. Es va veure que l'expressió de l'mRNA de *Trex1* està induïda en presència d'IFN- $\gamma$  així com també es troba induïda l'expressió de la proteïna (Serra et al., 2011). En aquesta tesi s'ha demostrat que *Samhd1* també està induït per estímuls proinflamatoris i que, a l'igual que *Trex1*, és dependent de la via d'STAT1 per a la seva inducció. Macròfags primaris provinents de ratolins deficientes en STAT1 i exposats a

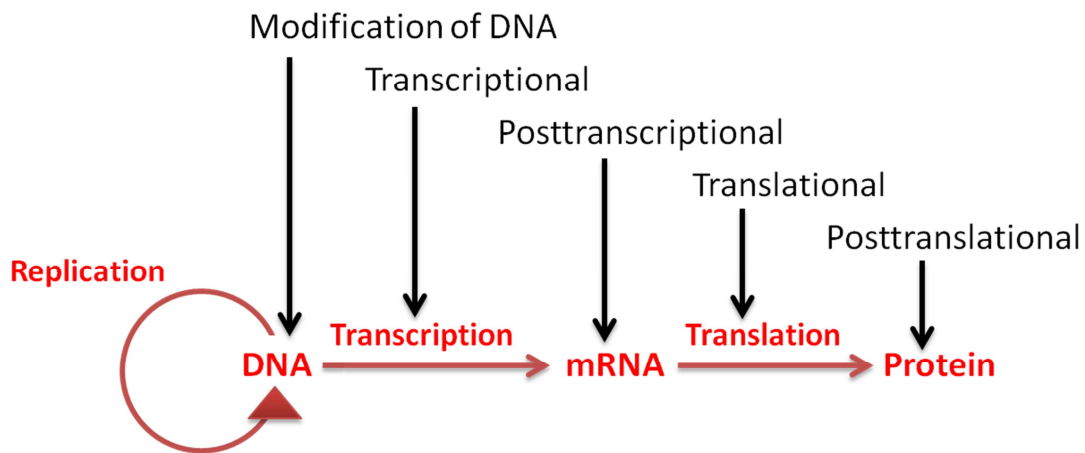
IFN- $\gamma$  tenen l'expressió de *Samhd1* completament inhibida. El fet que *Samhd1* estigui induït en presència d'estímuls proinflamatoris però no front estímuls antiinflamatoris, suggereix que SAMHD1 és important en el sistema immunitari innat. En suport a aquesta hipòtesi, se sap que SAMHD1 es troba actiu a cèl·lules diferenciades i estacionades al cycle cel·lular, com cèl·lules dendrítiques i macròfags, els quals tenen baixes concentracions intracel·lulars de dNTPs en comparació amb cèl·lules proliferatives, on SAMHD1 és ineficient (Hrecka et al., 2011; Laguette et al., 2011).

Una possible infecció en nens portadors de mutacions en algun dels gens AGS, provocaria l'activació del sistema immunitari. Segons s'han vist en els resultats d'aquesta tesi, els nens no estarien protegits front del dany al DNA, cosa que provocaria l'acumulació d'espècies d'àcids nucleics i la conseqüent activació de l'expressió d'IFN-I i això duria a l'activació del sistema immunitari. El dèficit de SAMHD1 provocat pel seu silenciament no provoca una inducció en cap dels gens analitzats, el que demostra que el SAMHD1 no té un efecte directe sobre la síndrome d'Aicardi-Goutières, sinó que l'acumulació de diferents espècies d'àcids nucleics seria el que estaria activant el sistema immunitari.

S'ha vist que TREX1 té una funció important en el funcionament dels punts de control del cycle cel·lular (Yang et al., 2007). En resposta al tractament amb agents genotòxics, TREX1 es mobilitza des del reticle endoplasmàtic cap al nucli cel·lular. Concretament, TREX1 forma focis nuclears en resposta als tractaments amb estímuls proinflamatoris. De la mateixa manera, hem demostrat que el dèficit a la cèl·lula de SAMHD1 provoca un augment del número de cadenes de DNA de cadena senzilla, detectats mitjançant la detecció per immunocitoquímica de la proteïna RPA i la quantificació dels focis nuclears amb un complex programa dissenyat específicament per a aquest motiu. També hem vist que SAMHD1 és necessari per a l'evolució cel·lular dins del cycle cel·lular. Al nostre laboratori hem vist que les cèl·lules deficientes en SAMHD1 no proliferen correctament, confirmant que SAMHD1 estaria implicat en la protecció del DNA en front de danys al DNA provocats per estímuls proinflamatoris.

També hem demostrat que l'augment de SAMHD1 a nivell d'mRNA és degut a un augment de la producció d'RNA, és a dir, l'augment de l'mRNA de *Samhd1* estaria degut a un augment de la transcripció i no pas degut a una estabilització de l'RNA, ja que la vida mitjana de *Samhd1* no varia en presència d'IFN- $\gamma$ . A més a més, podem concloure que la inducció de *Samhd1* a través dels estímuls mencionats no és només a nivell de l'RNA, ja que hem vist que l'augment de l'RNA no és degut a un increment de l'estabilitat de l'RNA, sinó que també hi ha un augment de la traducció.

A les cèl·lules es troben diferents mecanismes de regulació de l'expressió gènica: a nivell del DNA o la cromatina, regulació transcripcional, modificacions posttranscripcionals, regulació de la traducció, modificacions posttraduccional i, finalment, degradació proteica (Figura 1). En el cas de *Samhd1*, estaríem parlant de regulació a nivell de la transcripció, ja que hem vist que hi ha la unió d'una o més proteïnes que estarien bloquejant la seva síntesi. La regulació de la transcripció es pot donar mitjançant factors específics, unió de repressors, unió de factors de transcripció, i unió d'activadors, de potenciadors (o *enhancers*), o de silenciadors. Segons els resultats obtinguts, estaríem parlant d'una regulació de la transcripció mitjançant repressors o també de silenciadors, ja que hem vist que hi ha una unió proteica a una regió concreta del promotor de *Samhd1*, la qual desapareix en presència d'IFN- $\gamma$ .



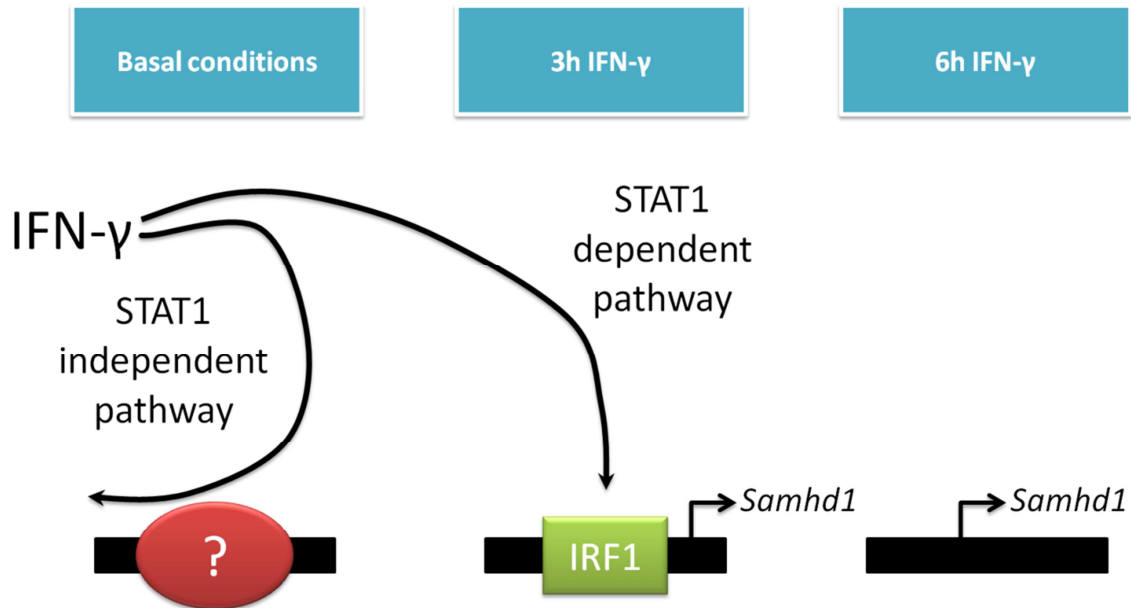
**Figura 72: Mecanismes de regulació de l'expressió gènica a eucariotes.** El diagrama mostra cinc tipus de mecanismes generals que poden ser presents.

El clonatge del promotor de *Samhd1* a un vector reporter per a la luciferasa va demostrar que 1500pb són suficients per a la inducció de *Samhd1*. La deleció de regions del promotor per l'extrem 5', van demostrar que 161 parells de bases són crítiques per a l'expressió de *Samhd1* en presència d'IFN- $\gamma$ . De manera més acurada, es va veure mitjançant experiments de retard en gel, que en una regió específica hi ha la unió d'una proteïna en condicions basals, unió que desapareix després de 6 hores en presència d' IFN- $\gamma$ . En aquest cas, estaríem parlant de que en condicions basals hi ha una repressió de l'expressió de *Samhd1*. Els resultats obtinguts indiquen que en condicions basals hi ha una proteïna que s'uneix al promotor de *Samhd1* i, davant d'un estímul d'IFN- $\gamma$ , aquesta es desuneix del promotor i entraria a unir-se una altra proteïna a una distància aproximada de 70 parells de bases, i d'aquesta manera s'activaria la transcripció del gen. La nostra teoria és que en condicions basals existeix un complex repressor ja unit a la regió concretada en aquesta tesi del promotor de *Samhd1*. En presència d'IFN- $\gamma$ ,

s'activarien dues vies de transducció de senyals: una via independent d'STAT1, la qual estaria fent que el complex repressor salti del promotor de *Samhd1*; i una via dependent d'STAT1, a partir de la qual se sintetitza IRF1 que s'uneix al promotor de *Samhd1* i n'activa l'expressió (Figura 2). El fet que amb el tractament amb cicloheximida hi hagi una major expressió de *Samhd1* ja a les tres hores, ens indica que el repressor que s'estaria unint a la regió del promotor té una vida mitja molt curta i necessita ser sintetitzat *de novo*. Els primers resultats indicaven que C/EBP $\beta$  podria ser la proteïna implicada en aquesta repressió, però els resultats de CHIP en presència de CHX demostren que no hi ha cap canvi en la unió de C/EBP $\beta$  a la regió promotora de *Samhd1*, el que estaria dient que una tercera estaria involucrada en el procés d'activació de la transcripció de *Samhd1*. Així és com es va arribar a veure que IRF1 és la proteïna implicada en el procés d'activació de la transcripció.

Tot i que els resultats d'aquesta tesi indiquen que IRF1 és la proteïna implicada en la inducció de la transcripció de *Samhd1*, s'hauria d'acabar de determinar què s'està unint al promotor en condicions basals. Per a tal efecte, es van extraure i purificar les bandes de retard obtingudes als assajos EMSA (veure apartat de Materials i Mètodes) i se'n van caracteritzar el seu contingut. Es van analitzar els pèptids en condicions basals així com també en presència de 6 hores amb IFN- $\gamma$ . Es va fer un primer cribratge seleccionant proteïnes que estiguessin en condicions basals però que no estiguessin quan hi ha un estímul amb IFN- $\gamma$ . Tot i que algunes de les proteïnes obtingudes semblaven interessants donades les seves funcions biològiques, cap no ha donat resultats significatius, ja que no s'ha trobat cap proteïna que estigui més abundant en condicions basals, donat que és quan pensem que hi ha el complex repressor unit al promotor de *Samhd1*.

El coneixement del promotor podrà ajudar a fer una sobreexpressió de la proteïna i, per tant, podria ajudar a regular la quantitat de dNTPs de les cèl·lules hoste. Donada la implicació de SAMHD1 com a un factor essencial en la inhibició del cicle biològic del virus del VIH (Laguette et al., 2011), la sobreexpressió de SAMHD1 es podria utilitzar, per exemple, com a mesura terapèutica per a la prevenció en front a una infecció vírica.



**Figura 73: Hipòtesi de la inducció de *Samhd1*.** L'IFN- $\gamma$  interactua amb el seu receptor provocant l'activació i la translocació d'STAT1 al nucli, activant gens estimulats per interferó (*Interferon Stimulated Gens*; ISG) entre els quals es troba IRF1, però a la vegada també estaria induint altres vies independents d'STAT1. La via independent d'STAT1 provocaria un primer efecte al promotor de *Samhd1*, fent que salti un complex repressor ja unit al promotor. L'IRF1 llavors aniria a unir-se al promotor de *Samhd1* i n'activaria la seva transcripció.

En estudis previs, es va realitzar la construcció d'un ratolí knock-out total per a TREX1 (Morita et al., 2004). A diferència del que era d'esperar en un ratolí deficient en un enzim de reparació, el KO de TREX1 no presenta una major incidència de mutacions espontànies així com tampoc de càncer. Els ratolins TREX1<sup>-/-</sup> són viables però tenen una esperança de vida molt reduïda, ja que desenvolupen una miocarditis d'origen inflamatori que culmina en una cardiopatia i un xoc circulatori. A la miocarditis que desenvolupen els ratolins TREX1<sup>-/-</sup>, no s'hi troba cap infecció vírica. Això es podria esperar ja que els ratolins nascuts per derivació d'embrions de mares criades en condicions lliures de patògens desenvolupen la mateixa anomalia. En canvi, el fenotip d'aquesta patologia sí que és compatible amb un origen autoimmunitari. Degut en gran part a les diferències de fenotip entre ratolins i humans, aquests estudis amb el model murí no van ser del tot funcionals. Mitjançant la construcció del knock-out condicional, es podrà investigar de manera més precisa la contribució de TREX1 a cada tipus cel·lular de manera particular. Serà interessant investigar particularment la contribució de la proteïna als macròfags, ja que creiem que aquest tipus cel·lular té una elevada importància a la patogènesi inicial de la malaltia. Donada la limitació biològica de que no hi ha cap promotor únic per a macròfags, l'aproximació més precisa que es podrà fer és mitjançant el creuament dels KO



condicionals amb animals que expressen la recombinasa CRE sota la regulació del promotor de la Lysozima M (LysM). El promotor de la lisozima M s'expressa a la línia cel·lular mieloide: macròfags, cèl·lules dendrítiques, neutròfils i monòcits (Clausen et al., 1999). A la descendència provinent de l'encreuament entre el KO condicional i la soca CRE<sup>LysM</sup>, aquestes cèl·lules no expressaran doncs TREX1. Degut a problemes amb la penetrabilitat d'aquest gen a la descendència, no ha sigut possible l'obtenció a temps d'animals pel seu estudi. A més a més, hem trobat que l'expressió de CRE juntament amb la YFP complica encara més la transmissió de la primera, donant com a resultat una impossible transmissió conjunta de CRE i de la modificació de la regió gènica de *Trex1* on s'hi ha incorporat les dues dianes *LoxP*. En aquest moment, ja s'han obtingut els primers animals heterozigots i positius per a l'al·lel de CRE<sup>LysM</sup>, i estem a l'espera de cries. Tenim esperança en aquest creuament perquè aquesta soca de CRE s'ha utilitzat prèviament al nostre laboratori amb resultats satisfactoris.

Amb estudis posteriors dels descendents del creuament del knock-out condicional amb ratolins CRE<sup>LysM</sup>, es podrà concretar la funció de TREX1 al sistema immunitari, més específicament a la línia mieloide. Quan estigui concretada la funció dels macròfags en un estadi basal, es podrà estudiar més específicament la funció d'aquestes cèl·lules al síndrome d'Aicardi-Goutières.

També serà interessant de creuar el ratolí KO condicional de TREX1 amb ratolins que expressen la recombinasa CRE al cervell, de manera que neurones, astròcits o micròglia no expressin TREX1. Per exemple, seria interessant el creuament amb ratolins que expressin CRE sota regulació del promotor CAMKII (Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II) (Mayford et al., 1997). Aquesta proteïna és una cinasa serina/treonina que es troba expressada de manera abundant a neurones, i té una funció clau en la diferenciació de les dendrites neuronals (Hudmon and Schulman, 2002). Donada l'afectació del cervell en l'AGS, seria d'important ajuda el conèixer els mecanismes pels quals s'inicien els processos de microcefàlia i poder així doncs establir una possible teràpia dirigida a un únic tipus cel·lular sense necessitat de patir efectes secundaris indesitjats.

Mitjançant aquest model, un altre possible estudi amb aquests seria la infecció per virus al cervell i mirar marcadors d'inflamació. En estudis recents s'ha vist que receptors del fetge X (LXR) tenen efectes globals en l'activació de macròfags com a resposta a IFN- $\gamma$  (Pascual-García et al., 2013). Els receptors LXR tenen funcions clau en la homeòstasi de lípids així com també en el control de la inflamació. Un pretractament amb agonistes d'aquests receptors, provoca una inhibició de la síntesi de citocines proinflamatories tot i la presència d'IFN- $\gamma$ . Així doncs, el

tractament de ratolins deficients de TREX1 amb agonistes de receptors LXR, podria donar més informació sobre la funció d'aquesta proteïna al model cel·lular escollit.



# Conclusions

|

# Conclusions

Les conclusions que es deriven d'aquesta tesi són:

- *Samhd1* té una funció important en la protecció del DNA front estímuls proinflamatoris.
- *Samhd1* és induït per estímuls proinflamatoris.
- L'Expressió de *Samhd1* és depenent de la via d'STAT1
- L'expressió de *Samhd1* es troba regulada negativament en condicions basals per la unió d'una proteïna a una regió distant del promotor.
- 161 parells de bases són crítics per a la inducció de *Samhd1*
- IRF1 és la proteïna encarregada de la inducció de la transcripció de *Samhd1*.
- Hem construït el ratolí knockout condicional de TREX1.
- El fenotip del ratolí knockout condicional és completament normal
- Els animals provinents del creuament entre un ratolí knockout condicional i un ratolí que expressa CRE sota el promotor *Socs2* donen una ventrada de ratolins fenotípicament similars als animals KO totals de TREX1.
-



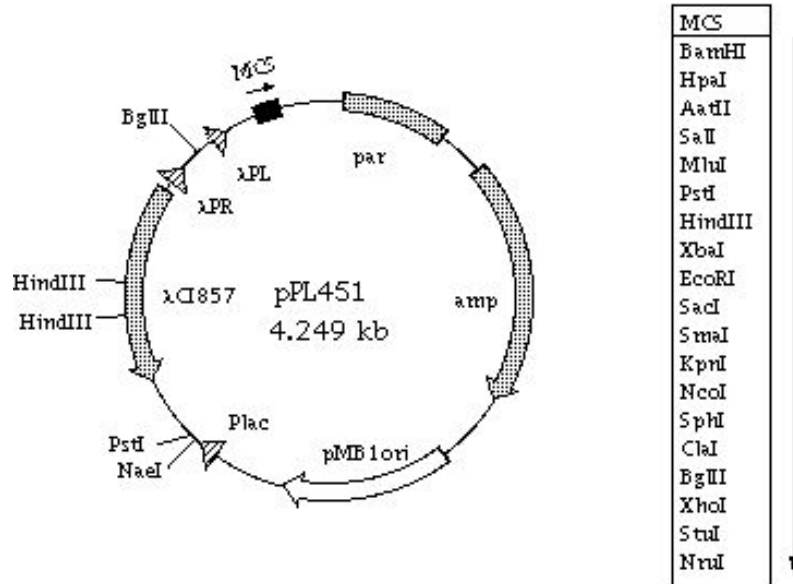
# **Annex**



|

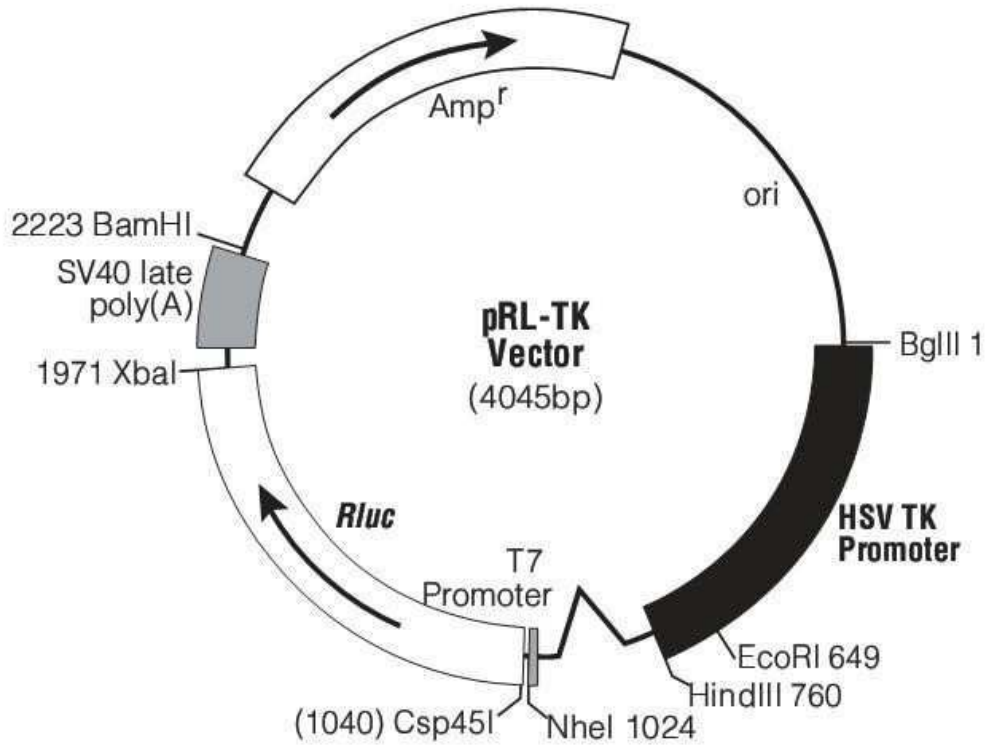
# Annex

## Vector BAC (Bacterial Artificial Chromosome)



### Vector pRL-TK

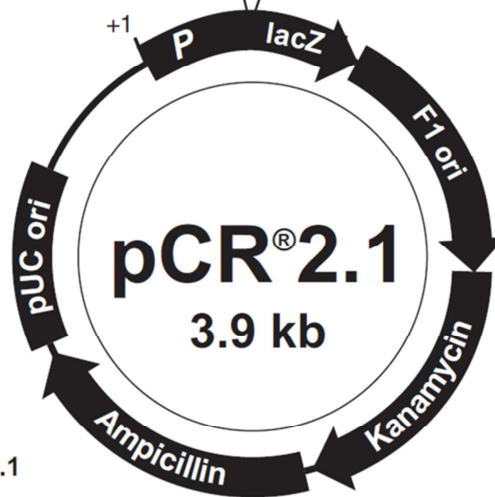
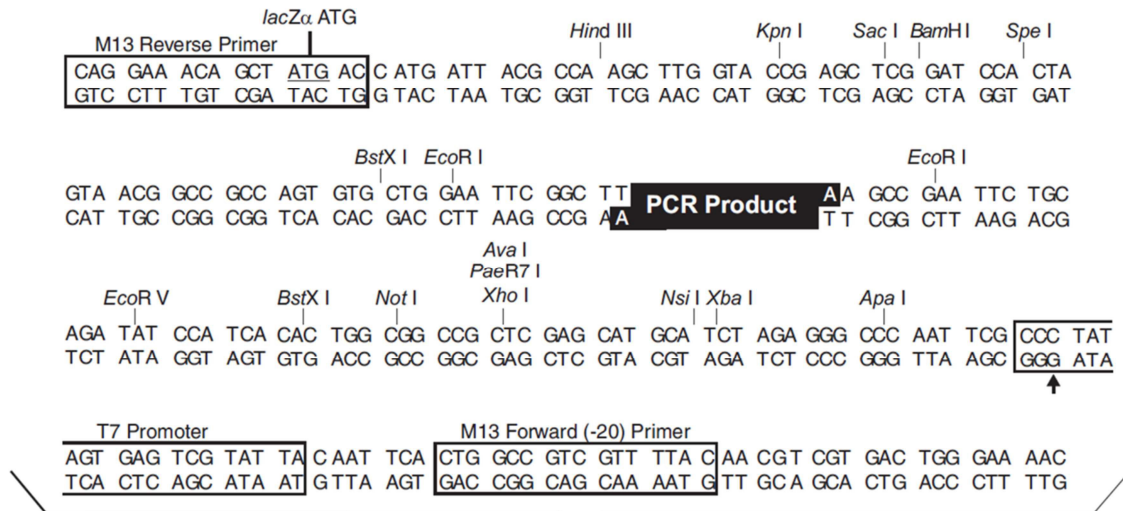
---



### Vector pCR2.1

---

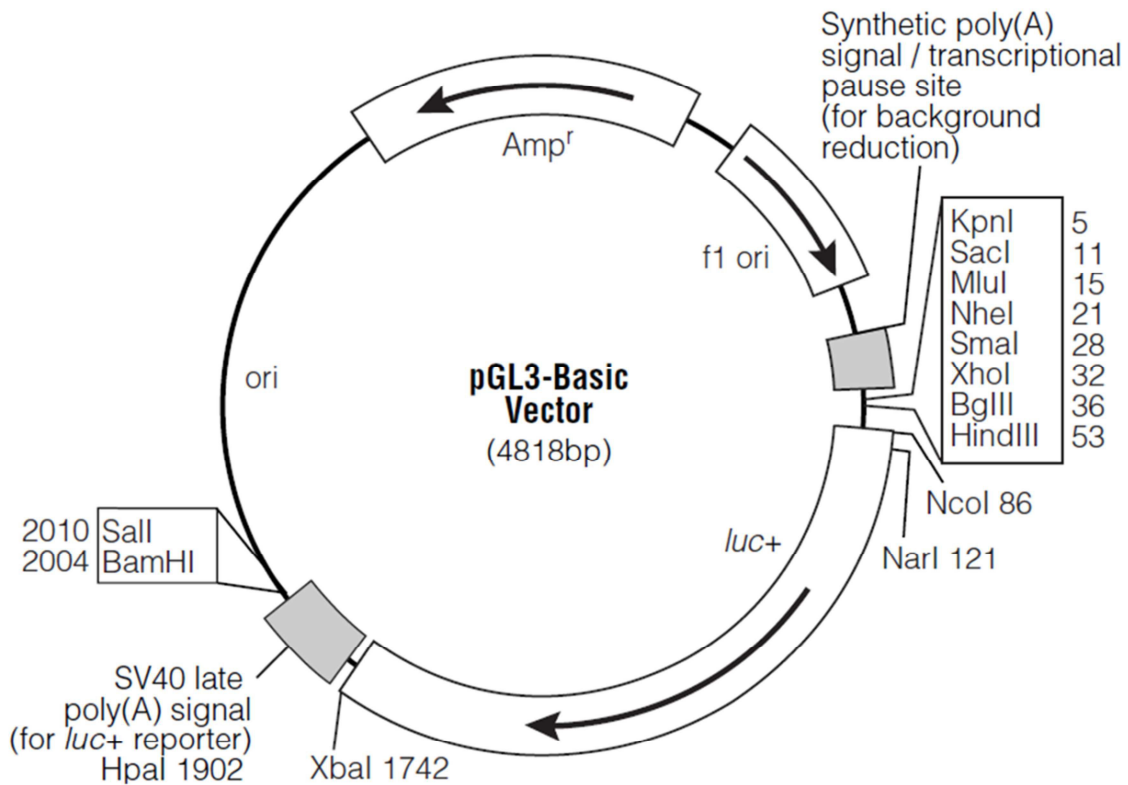
TREX1 and SAMHD1, and Aicardi-Goutières Syndrome



**Comments for pCR<sup>®</sup>2.1**  
**3929 nucleotides**

- LacZα gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
- pUC origin: bases 3134-3807

## Vector pGL3-Basic



### pGL3-Basic Vector Sequence Reference Points:

Promoter	(none)
Enhancer	(none)
Multiple cloning region	1–58
Luciferase gene ( <i>luc+</i> )	88–1740
GLprimer2 binding site	89–111
SV40 late poly(A) signal	1772–1993
RVprimer4 binding site	2080–2061
ColE1-derived plasmid replication origin	2318
$\beta$ -lactamase gene (Amp <sup>r</sup> )	3080–3940
f1 origin	4072–4527
upstream poly(A) signal	4658–4811
RVprimer3 binding site	4760–4779

# **Bibliografía**

|

# Bibliografía

- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, and Shiv Pillai Cellular And Molecular Immunology (Saunders (Elsevier)).
- Adams, D.O., and Hamilton, T.A. (1987). Molecular transductional mechanisms by which IFN gamma and other signals regulate macrophage development. *Immunol. Rev.* 97, 5–27.
- Ahn, J., Hao, C., Yan, J., DeLucia, M., Mehrens, J., Wang, C., Gronenborn, A.M., and Skowronski, J. (2012). HIV/Simian Immunodeficiency Virus (SIV) Accessory Virulence Factor Vpx Loads the Host Cell Restriction Factor SAMHD1 onto the E3 Ubiquitin Ligase Complex CRL4DCAF1. *J. Biol. Chem.* 287, 12550–12558.
- Aicardi, J. (2002). Aicardi-Goutières syndrome: special type early-onset encephalopathy. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* 6 *Suppl A*, A1–A7; discussion A23–A25, A77–A86.
- Aicardi, J., and Goutières, F. (1984). A progressive familial encephalopathy in infancy with calcifications of the basal ganglia and chronic cerebrospinal fluid lymphocytosis. *Ann. Neurol.* 15, 49–54.
- Albert, A., Yenush, L., Gil-Mascarell, M.R., Rodriguez, P.L., Patel, S., Martínez-Ripoll, M., Blundell, T.L., and Serrano, R. (2000). X-ray structure of yeast Hal2p, a major target of lithium and sodium toxicity, and identification of framework interactions determining cation sensitivity. *J. Mol. Biol.* 295, 927–938.
- Aoudjehane, L., Pissaia, A., Scatton, O., Podevin, P., Massault, P.-P., Chouzenoux, S., Soubrane, O., Calmus, Y., and Conti, F. (2008). Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 88, 973–985.
- Aravind, L., and Koonin, E.V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* 23, 469–472.
- Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T., and Shimotohno, K. (2007). Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7500–7505.
- Arpa, L., Valledor, A.F., Lloberas, J., and Celada, A. (2009). IL-4 blocks M-CSF-dependent macrophage proliferation by inducing p21Waf1 in a STAT6-dependent way. *Eur. J. Immunol.* 39, 514–526.
- Audoy-Rémus, J., Richard, J.-F., Soulet, D., Zhou, H., Kubes, P., and Vallières, L. (2008). Rod-Shaped monocytes patrol the brain vasculature and give rise to perivascular macrophages under the influence of proinflammatory cytokines and angiopoietin-2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10187–10199.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666–670.



- Aviv, T., Lin, Z., Lau, S., Rendl, L.M., Sicheri, F., and Smibert, C.A. (2003). The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *10*, 614–621.
- Bach, E.A., Aguet, M., and Schreiber, R.D. (1997). The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 563–591.
- Baldauf, H.-M., Pan, X., Erikson, E., Schmidt, S., Daddacha, W., Burggraf, M., Schenkova, K., Ambiel, I., Wabnitz, G., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. *Nat. Med.* *18*, 1682–1687.
- Barbalat, R., Lau, L., Locksley, R.M., and Barton, G.M. (2009). Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nat. Immunol.* *10*, 1200–1207.
- Barreda, D.R., Hanington, P.C., and Belosevic, M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp. Immunol.* *28*, 509–554.
- Beghé, B., Barton, S., Rorke, S., Peng, Q., Sayers, I., Gaunt, T., Keith, T.P., Clough, J.B., Holgate, S.T., and Holloway, J.W. (2003). Polymorphisms in the interleukin-4 and interleukin-4 receptor alpha chain genes confer susceptibility to asthma and atopy in a Caucasian population. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *33*, 1111–1117.
- Berke, I.C., and Modis, Y. (2012). MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA. *EMBO J.* *31*, 1714–1726.
- Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. *Cell* *145*, 435–446.
- Bigley, V., Haniffa, M., Doulatov, S., Wang, X.-N., Dickinson, R., McGovern, N., Jardine, L., Pagan, S., Dimmick, I., Chua, I., et al. (2011). The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J. Exp. Med.* *208*, 227–234.
- Blanchard, C., Mingler, M.K., Vicario, M., Abonia, J.P., Wu, Y.Y., Lu, T.X., Collins, M.H., Putnam, P.E., Wells, S.I., and Rothenberg, M.E. (2007). IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 1292–1300.
- Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., and Stark, G.R. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 975–990.
- Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J.C., White, T.E., Laguette, N., Benkirane, M., Brojatsch, J., and Diaz-Griffero, F. (2012). Role of SAMHD1 nuclear localization in restriction of HIV-1 and SIVmac. *Retrovirology* *9*, 49.
- Brucet, M., Marqués, L., Sebastián, C., Lloberas, J., and Celada, A. (2004). Regulation of murine Tap1 and Lmp2 genes in macrophages by interferon gamma is mediated by STAT1 and IRF-1. *Genes Immun.* *5*, 26–35.
- Brucet, M., Querol-Audí, J., Serra, M., Ramirez-Espain, X., Bertlik, K., Ruiz, L., Lloberas, J., Macias, M.J., Fita, I., and Celada, A. (2007). Structure of the dimeric exonuclease TREX1 in complex

- with DNA displays a proline-rich binding site for WW Domains. *J. Biol. Chem.* *282*, 14547–14557.
- Bruce, M., Querol-Audí, J., Bertlik, K., Lloberas, J., Fita, I., and Celada, A. (2008). Structural and biochemical studies of TREX1 inhibition by metals. Identification of a new active histidine conserved in DEDDh exonucleases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *17*, 2059–2069.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* *55*, 611–622.
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S.H., Beavis, A., Koezuka, Y., and Bendelac, A. (1999). Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 4647–4650.
- Casals-Casas, C., Álvarez, E., Serra, M., de la Torre, C., Farrera, C., Sánchez-Tilló, E., Caelles, C., Lloberas, J., and Celada, A. (2009). CREB and AP-1 activation regulates MKP-1 induction by LPS or M-CSF and their kinetics correlate with macrophage activation versus proliferation. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1902–1913.
- Celada, A., and Nathan, C. (1994). Macrophage activation revisited. *Immunol. Today* *15*, 100–102.
- Celada, A., Gray, P.W., Rinderknecht, E., and Schreiber, R.D. (1984a). Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J. Exp. Med.* *160*, 55–74.
- Celada, A., Gray, P.W., Rinderknecht, E., and Schreiber, R.D. (1984b). Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J. Exp. Med.* *160*, 55–74.
- Cenci, C., Barzotti, R., Galeano, F., Corbelli, S., Rota, R., Massimi, L., Di Rocco, C., O'Connell, M.A., and Gallo, A. (2008). Down-regulation of RNA editing in pediatric astrocytomas: ADAR2 editing activity inhibits cell migration and proliferation. *J. Biol. Chem.* *283*, 7251–7260.
- Chabosseau, P., Buhagiar-Labarchède, G., Onclercq-Delic, R., Lambert, S., Debatisse, M., Brison, O., and Amor-Guélet, M. (2011). Pyrimidine pool imbalance induced by BLM helicase deficiency contributes to genetic instability in Bloom syndrome. *Nat. Commun.* *2*, 368.
- Chahwan, C., and Chahwan, R. (2012). Aicardi-Goutieres syndrome: from patients to genes and beyond. *Clin. Genet.* *81*, 413–420.
- Chen, M.-J., Ma, S.-M., Dumitrache, L.C., and Hasty, P. (2007). Biochemical and cellular characteristics of the 3' → 5' exonuclease TREX2. *Nucleic Acids Res.* *35*, 2682–2694.
- Chiaromonte, M.G., Mentink-Kane, M., Jacobson, B.A., Cheever, A.W., Whitters, M.J., Goad, M.E.P., Wong, A., Collins, M., Donaldson, D.D., Grusby, M.J., et al. (2003). Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J. Exp. Med.* *197*, 687–701.
- Childs, K.S., Randall, R.E., and Goodbourn, S. (2013). LGP2 plays a critical role in sensitizing mda-5 to activation by double-stranded RNA. *PLoS One* *8*, e64202.

- Chilibeck, K.A., Wu, T., Liang, C., Schellenberg, M.J., Gesner, E.M., Lynch, J.M., and MacMillan, A.M. (2006). FRET analysis of in vivo dimerization by RNA-editing enzymes. *J. Biol. Chem.* *281*, 16530–16535.
- Cho, D.-S.C., Yang, W., Lee, J.T., Shiekhatar, R., Murray, J.M., and Nishikura, K. (2003). Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA. *J. Biol. Chem.* *278*, 17093–17102.
- Chon, H., Vassilev, A., DePamphilis, M.L., Zhao, Y., Zhang, J., Burgers, P.M., Crouch, R.J., and Cerritelli, S.M. (2009). Contributions of the two accessory subunits, RNASEH2B and RNASEH2C, to the activity and properties of the human RNase H2 complex. *Nucleic Acids Res.* *37*, 96–110.
- Chowdhury, D., Beresford, P.J., Zhu, P., Zhang, D., Sung, J.-S., Demple, B., Perrino, F.W., and Lieberman, J. (2006). The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol. Cell* *23*, 133–142.
- Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Förster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* *8*, 265–277.
- Clerzius, G., Gélinas, J.-F., Daher, A., Bonnet, M., Meurs, E.F., and Gatignol, A. (2009). ADAR1 interacts with PKR during human immunodeficiency virus infection of lymphocytes and contributes to viral replication. *J. Virol.* *83*, 10119–10128.
- Clifford, R., Louis, T., Robbe, P., Ackroyd, S., Burns, A., Timbs, A.T., Wright Colopy, G., Dreau, H., Sigaux, F., Judde, J.G., et al. (2014). SAMHD1 is mutated recurrently in chronic lymphocytic leukemia and is involved in response to DNA damage. *Blood* *123*, 1021–1031.
- Comalada, M., Xaus, J., Sánchez, E., Villedor, A.F., and Celada, A. (2004). Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21(Waf1) through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2257–2267.
- Comalada, M., Lloberas, J., and Celada, A. (2012). MKP-1: A critical phosphatase in the biology of macrophages controlling the switch between proliferation and activation. *Eur. J. Immunol.* *42*, 1938–1948.
- Corraliza, I. (2014). Recruiting specialized macrophages across the borders to restore brain functions. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 262.
- Couzin-Frankel, J. (2010). Inflammation Bares a Dark Side. *Science* *330*, 1621–1621.
- Cribier, A., Descours, B., Valadão, A.L.C., Laguette, N., and Benkirane, M. (2013). Phosphorylation of SAMHD1 by Cyclin A2/CDK1 Regulates Its Restriction Activity toward HIV-1. *Cell Rep.* *3*, 1036–1043.
- Crocker, B.A., Kiu, H., and Nicholson, S.E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* *19*, 414–422.

- Crow, Y.J. (1993). Aicardi-Goutières Syndrome. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.-T. Fong, R.J. Smith, and K. Stephens, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle),.
- Crow, Y.J., and Rehwinkel, J. (2009). Aicardi-Goutières syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity. *Hum. Mol. Genet.* *18*, R130–R136.
- Crow, Y.J., Hayward, B.E., Parmar, R., Robins, P., Leitch, A., Ali, M., Black, D.N., van Bokhoven, H., Brunner, H.G., Hamel, B.C., et al. (2006a). Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat. Genet.* *38*, 917–920.
- Crow, Y.J., Leitch, A., Hayward, B.E., Garner, A., Parmar, R., Griffith, E., Ali, M., Semple, C., Aicardi, J., Babul-Hirji, R., et al. (2006b). Mutations in genes encoding ribonuclease H2 subunits cause Aicardi-Goutières syndrome and mimic congenital viral brain infection. *Nat. Genet.* *38*, 910–916.
- Cullell-Young, M., Barrachina, M., López-López, C., Goñalons, E., Lloberas, J., Soler, C., and Celada, A. (2001). From transcription to cell surface expression, the induction of MHC class II I-A alpha by interferon-gamma in macrophages is regulated at different levels. *Immunogenetics* *53*, 136–144.
- Dai, X.-M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* *99*, 111–120.
- Dauphinee, S.M., and Karsan, A. (2005). Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab. Invest.* *86*, 9–22.
- Decker, T., and Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Publ. Online* 22 May 2000 Doi101038sjonc1203481 *19*.
- Donath, M.Y., and Shoelson, S.E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 98–107.
- Doria, M., Neri, F., Gallo, A., Farace, M.G., and Michienzi, A. (2009). Editing of HIV-1 RNA by the double-stranded RNA deaminase ADAR1 stimulates viral infection. *Nucleic Acids Res.* *37*, 5848–5858.
- Dragin, L., Nguyen, L.A., Lahouassa, H., Sourisce, A., Kim, B., Ramirez, B.C., and Margottin-Goguet, F. (2013). Interferon block to HIV-1 transduction in macrophages despite SAMHD1 degradation and high deoxynucleoside triphosphates supply. *Retrovirology* *10*, 30.
- Van Dyken, S.J., and Locksley, R.M. (2013). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 317–343.
- Eder, P.S., and Walder, J.A. (1991). Ribonuclease H from K562 human erythroleukemia cells. Purification, characterization, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* *266*, 6472–6479.

- Emile, J.F., Geissmann, F., Martin, O.C., Radford-Weiss, I., Lepelletier, Y., Heymer, B., Espanol, T., de Santes, K.B., Bertrand, Y., Brousse, N., et al. (2000). Langerhans cell deficiency in reticular dysgenesis. *Blood* *96*, 58–62.
- Fallon, P.G., Richardson, E.J., McKenzie, G.J., and McKenzie, A.N. (2000). Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 2585–2591.
- Fazzi, E., Cattalini, M., Orcesi, S., Tincani, A., Andreoli, L., Balottin, U., De Simone, M., Fredi, M., Facchetti, F., Galli, J., et al. (2013). Aicardi-Goutieres syndrome, a rare neurological disease in children: a new autoimmune disorder? *Autoimmun. Rev.* *12*, 506–509.
- Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R.K., and Kitani, A. (2006). IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat. Med.* *12*, 99–106.
- Fierro-Monti, I., and Mathews, M.B. (2000). Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 241–246.
- Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M., and Golenbock, D.T. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* *198*, 1043–1055.
- Fixe, P., and Praloran, V. (1997). Macrophage colony-stimulating-factor (M-CSF or CSF-1) and its receptor: structure-function relationships. *Eur. Cytokine Netw.* *8*, 125–136.
- Fleetwood, A.J., Lawrence, T., Hamilton, J.A., and Cook, A.D. (2007). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 5245–5252.
- Ford, A.Q., Heller, N.M., Stephenson, L., Boothby, M.R., and Keegan, A.D. (2009). An atopy-associated polymorphism in the ectodomain of the IL-4R(alpha) chain (V50) regulates the persistence of STAT6 phosphorylation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 1607–1616.
- Frank, P., Braunshofer-Reiter, C., Wintersberger, U., Grimm, R., and Büsen, W. (1998). Cloning of the cDNA encoding the large subunit of human RNase HI, a homologue of the prokaryotic RNase HII. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 12872–12877.
- Franzolin, E., Pontarin, G., Rampazzo, C., Miazzi, C., Ferraro, P., Palumbo, E., Reichard, P., and Bianchi, V. (2013). The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 14272–14277.
- Fulkerson, P.C., Fischetti, C.A., Hassman, L.M., Nikolaidis, N.M., and Rothenberg, M.E. (2006). Persistent effects induced by IL-13 in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *35*, 337–346.
- Van Furth, R., Diesselhoff-den Dulk, M.C., and Mattie, H. (1973). Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J. Exp. Med.* *138*, 1314–1330.
- Gallo, A., Keegan, L.P., Ring, G.M., and O’Connell, M.A. (2003). An ADAR that edits transcripts encoding ion channel subunits functions as a dimer. *EMBO J.* *22*, 3421–3430.

- Gateva, V., Sandling, J.K., Hom, G., Taylor, K.E., Chung, S.A., Sun, X., Ortmann, W., Kosoy, R., Ferreira, R.C., Nordmark, G., et al. (2009). A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* *41*, 1228–1233.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71–82.
- George, C.X., and Samuel, C.E. (1999a). Human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 transcripts possess alternative exon 1 structures that initiate from different promoters, one constitutively active and the other interferon inducible. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 4621–4626.
- George, C.X., and Samuel, C.E. (1999b). Characterization of the 5'-flanking region of the human RNA-specific adenosine deaminase ADAR1 gene and identification of an interferon-inducible ADAR1 promoter. *Gene* *229*, 203–213.
- George, C.X., Das, S., and Samuel, C.E. (2008). Organization of the mouse RNA-specific adenosine deaminase Adar1 gene 5'-region and demonstration of STAT1-independent, STAT2-dependent transcriptional activation by interferon. *Virology* *380*, 338–343.
- Goldstone, D.C., Ennis-Adeniran, V., Hedden, J.J., Groom, H.C.T., Rice, G.I., Christodoulou, E., Walker, P.A., Kelly, G., Haire, L.F., Yap, M.W., et al. (2011). HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* *480*, 379–382.
- Gommans, W.M., and Maas, S. (2008). Characterization of ADAR1-mediated modulation of gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *377*, 170–175.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 953–964.
- Hambleton, S., Salem, S., Bustamante, J., Bigley, V., Boisson-Dupuis, S., Azevedo, J., Fortin, A., Haniffa, M., Ceron-Gutierrez, L., Bacon, C.M., et al. (2011). IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* *365*, 127–138.
- Hamilton, J.A. (1997). CSF-I signal transduction: what is of functional significance? *Immunol. Today* *18*, 313–317.
- Hamilton, J.A. (2008). Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 533–544.
- Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M., Johnson, L.L., Swain, S.L., and Lund, F.E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* *1*, 475–482.
- Hartner, J.C., Schmittwolf, C., Kispert, A., Müller, A.M., Higuchi, M., and Seeburg, P.H. (2004). Liver disintegration in the mouse embryo caused by deficiency in the RNA-editing enzyme ADAR1. *J. Biol. Chem.* *279*, 4894–4902.
- Hartner, J.C., Walkley, C.R., Lu, J., and Orkin, S.H. (2009). ADAR1 is essential for the maintenance of hematopoiesis and suppression of interferon signaling. *Nat. Immunol.* *10*, 109–115.

- Hasan, M., and Yan, N. (2014). Safeguard against DNA sensing: the role of TREX1 in HIV-1 infection and autoimmune diseases. *Front. Microbiol.* 5.
- Herbert, A., and Rich, A. (2001). The role of binding domains for dsRNA and Z-DNA in the in vivo editing of minimal substrates by ADAR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12132–12137.
- Herbert, A., Alfken, J., Kim, Y.G., Mian, I.S., Nishikura, K., and Rich, A. (1997). A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8421–8426.
- Hiller, B., Achleitner, M., Glage, S., Naumann, R., Behrendt, R., and Roers, A. (2012). Mammalian RNase H2 removes ribonucleotides from DNA to maintain genome integrity. *J. Exp. Med.* 209, 1419–1426.
- Hoeck, J., and Woisetschläger, M. (2001a). Activation of eotaxin-3/CCL126 gene expression in human dermal fibroblasts is mediated by STAT6. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 3216–3222.
- Hoeck, J., and Woisetschläger, M. (2001b). STAT6 mediates eotaxin-1 expression in IL-4 or TNF-alpha-induced fibroblasts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 4507–4515.
- Hogrefe, H.H., Hogrefe, R.I., Walder, R.Y., and Walder, J.A. (1990). Kinetic analysis of Escherichia coli RNase H using DNA-RNA-DNA/DNA substrates. *J. Biol. Chem.* 265, 5561–5566.
- Höss, M., Robins, P., Naven, T.J., Pappin, D.J., Sgouros, J., and Lindahl, T. (1999). A human DNA editing enzyme homologous to the Escherichia coli DnaQ/MutD protein. *EMBO J.* 18, 3868–3875.
- Hrecka, K., Hao, C., Gierszewska, M., Swanson, S.K., Kesik-Brodacka, M., Srivastava, S., Florens, L., Washburn, M.P., and Skowronski, J. (2011). Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474, 658–661.
- Hudmon, A., and Schulman, H. (2002). Neuronal CA<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 473–510.
- Jiang, H., Harris, M.B., and Rothman, P. (2000). IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 1063–1070.
- Jin, Y., Zhang, W., and Li, Q. (2009). Origins and evolution of ADAR-mediated RNA editing. *IUBMB Life* 61, 572–578.
- Jin, Y., Birlea, S.A., Fain, P.R., Ferrara, T.M., Ben, S., Riccardi, S.L., Cole, J.B., Gowan, K., Holland, P.J., Bennett, D.C., et al. (2012). Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. *Nat. Genet.* 44, 676–680.
- Junttila, I.S., Mizukami, K., Dickensheets, H., Meier-Schellersheim, M., Yamane, H., Donnelly, R.P., and Paul, W.E. (2008). Tuning sensitivity to IL-4 and IL-13: differential expression of IL-4Ralpha, IL-13Ralpha1, and gamma c regulates relative cytokine sensitivity. *J. Exp. Med.* 205, 2595–2608.

- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* *441*, 101–105.
- Kaviratne, M., Hesse, M., Leusink, M., Cheever, A.W., Davies, S.J., McKerrow, J.H., Wakefield, L.M., Letterio, J.J., and Wynn, T.A. (2004). IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 4020–4029.
- Kawakubo, K., and Samuel, C.E. (2000). Human RNA-specific adenosine deaminase (ADAR1) gene specifies transcripts that initiate from a constitutively active alternative promoter. *Gene* *258*, 165–172.
- Kearney, S., Delgado, C., and Lenz, L.L. (2013). Differential effects of type I and II interferons on myeloid cells and resistance to intracellular bacterial infections. *Immunol. Res.* *55*, 187–200.
- Kelly-Welch, A.E., Hanson, E.M., Boothby, M.R., and Keegan, A.D. (2003). Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* *300*, 1527–1528.
- Kim, C.A., and Bowie, J.U. (2003). SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 625–628.
- Kim, U., Wang, Y., Sanford, T., Zeng, Y., and Nishikura, K. (1994). Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11457–11461.
- Lee-Kirsch, M.A., Gong, M., Schulz, H., Rüschenhoff, F., Stein, A., Pfeiffer, C., Ballarini, A., Gahr, M., Hubner, N., and Linné, M. (2006). Familial chilblain lupus, a monogenic form of cutaneous lupus erythematosus, maps to chromosome 3p. *Am. J. Hum. Genet.* *79*, 731–737.
- Lee-Kirsch, M.A., Chowdhury, D., Harvey, S., Gong, M., Senenko, L., Engel, K., Pfeiffer, C., Hollis, T., Gahr, M., Perrino, F.W., et al. (2007). A mutation in TREX1 that impairs susceptibility to granzyme A-mediated cell death underlies familial chilblain lupus. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *85*, 531–537.
- Kruse, S., Braun, S., and Deichmann, K.A. (2002). Distinct signal transduction processes by IL-4 and IL-13 and influences from the Q551R variant of the human IL-4 receptor alpha chain. *Respir. Res.* *3*, 24.
- Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R., and Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* *358*, 417–421.
- De Laet, C., Goyens, P., Christophe, C., Ferster, A., Mascart, F., and Dan, B. (2005). Phenotypic overlap between infantile systemic lupus erythematosus and Aicardi-Goutières syndrome. *Neuropediatrics* *36*, 399–402.
- Laguet, N., Sobhian, B., Casartelli, N., Ringeard, M., Chable-Bessia, C., Ségéral, E., Yatim, A., Emiliani, S., Schwartz, O., and Benkirane, M. (2011). SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* *474*, 654–657.
- Lahouassa, H., Daddacha, W., Hofmann, H., Ayinde, D., Logue, E.C., Dragin, L., Bloch, N., Maudet, C., Bertrand, M., Gramberg, T., et al. (2012). SAMHD1 restricts the replication of human



- immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat. Immunol.* *13*, 223–228.
- Lai, F., Drakas, R., and Nishikura, K. (1995). Mutagenic analysis of double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for RNA editing of glutamate-gated ion channel transcripts. *J. Biol. Chem.* *270*, 17098–17105.
- Landau, D.A., Carter, S.L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M.S., Sougnez, C., Stewart, C., Sivachenko, A., Wang, L., et al. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* *152*, 714–726.
- Laskin, D.L., Sunil, V.R., Gardner, C.R., and Laskin, J.D. (2011). Macrophages and Tissue Injury: Agents of Defense or Destruction? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *51*, 267–288.
- Lawrence, T., Willoughby, D.A., and Gilroy, D.W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 787–795.
- Lebon, P., Badoual, J., Ponsot, G., Goutières, F., Hémeury-Cukier, F., and Aicardi, J. (1988). Intrathecal synthesis of interferon-alpha in infants with progressive familial encephalopathy. *J. Neurol. Sci.* *84*, 201–208.
- Lehtinen, D.A., Harvey, S., Mulcahy, M.J., Hollis, T., and Perrino, F.W. (2008). The TREX1 double-stranded DNA degradation activity is defective in dominant mutations associated with autoimmune disease. *J. Biol. Chem.* *283*, 31649–31656.
- Li, M., Yang, L., Li, C., Jin, C., Lai, M., Zhang, G., Hu, Y., Ji, J., and Yao, Z. (2010). Mutational spectrum of the ADAR1 gene in dyschromatosis symmetrica hereditaria. *Arch. Dermatol. Res.* *302*, 469–476.
- Li, N., Zhang, W., and Cao, X. (2000). Identification of human homologue of mouse IFN-gamma induced protein from human dendritic cells. *Immunol. Lett.* *74*, 221–224.
- Li, X.-D., Sun, L., Seth, R.B., Pineda, G., and Chen, Z.J. (2005). Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17717–17722.
- Liao, W., Bao, Z., Cheng, C., Mok, Y.-K., and Wong, W.S.F. (2008). Dendritic cell-derived interferon- $\gamma$ -induced protein mediates tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation of human lung fibroblasts. *PROTEOMICS* *8*, 2640–2650.
- Lindahl, T., Gally, J.A., and Edelman, G.M. (1969). Properties of deoxyribonuclease 3 from mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* *244*, 5014–5019.
- Liu, Y., and Samuel, C.E. (1996). Mechanism of interferon action: functionally distinct RNA-binding and catalytic domains in the interferon-inducible, double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *J. Virol.* *70*, 1961–1968.
- Liu, Y., Meyer, C., Müller, A., Herweck, F., Li, Q., Müllenbach, R., Mertens, P.R., Dooley, S., and Weng, H.-L. (2011). IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF- $\beta$ -independent Smad signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 2814–2823.
- Luban, J. (2012). Innate immune sensing of HIV-1 by dendritic cells. *Cell Host Microbe* *12*, 408–418.

- Lupardus, P.J., Birnbaum, M.E., and Garcia, K.C. (2010). Molecular basis for shared cytokine recognition revealed in the structure of an unusually high affinity complex between IL-13 and IL-13Ralpha2. *Struct. Lond. Engl.* 1993 18, 332–342.
- Mackanness, G.B. (1962). Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116, 381–406.
- Majka, J., and Burgers, P.M.J. (2004). The PCNA–RFC Families of DNA Clamps and Clamp Loaders. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, (Academic Press), pp. 227–260.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6.
- Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483.
- Mayford, M., Mansuy, I.M., Muller, R.U., and Kandel, E.R. (1997). Memory and behavior: a second generation of genetically modified mice. *Curr. Biol.* 7, R580–R589.
- Mazur, D.J., and Perrino, F.W. (2001). Structure and expression of the TREX1 and TREX2 3' → 5' exonuclease genes. *J. Biol. Chem.* 276, 14718–14727.
- McCormack, S.J., Thomis, D.C., and Samuel, C.E. (1992). Mechanism of interferon action: identification of a RNA binding domain within the N-terminal region of the human RNA-dependent P1/eIF-2 alpha protein kinase. *Virology* 188, 47–56.
- McCormack, S.J., Ortega, L.G., Doohan, J.P., and Samuel, C.E. (1994). Mechanism of interferon action motif I of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase (PKR) is sufficient to mediate RNA-binding activity. *Virology* 198, 92–99.
- McKenzie, G.J., Bancroft, A., Grecis, R.K., and McKenzie, A.N. (1998). A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. *Curr. Biol.* CB 8, 339–342.
- Meyer, O. (2009). Interferons and autoimmune disorders. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 76, 464–473.
- Miller, S.I., Ernst, R.K., and Bader, M.W. (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 36–46.
- Miyamura, Y., Suzuki, T., Kono, M., Inagaki, K., Ito, S., Suzuki, N., and Tomita, Y. (2003). Mutations of the RNA-specific adenosine deaminase gene (DSRAD) are involved in dyschromatosis symmetrica hereditaria. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 693–699.
- Morita, M., Stamp, G., Robins, P., Dulic, A., Rosewell, I., Hrivnak, G., Daly, G., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2004). Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3' → 5' DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6719–6727.
- Moriya, C., Jinnin, M., Yamane, K., Maruo, K., Muchemwa, F.C., Igata, T., Makino, T., Fukushima, S., and Ihn, H. (2011). Expression of matrix metalloproteinase-13 is controlled by IL-13 via

- PI3K/Akt3 and PKC- $\delta$  in normal human dermal fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* *131*, 655–661.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 958–969.
- Namiki, Y., and Zou, L. (2006). ATRIP associates with replication protein A-coated ssDNA through multiple interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 580–585.
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., and Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* *158*, 670–689.
- Ng, S.-L., Friedman, B.A., Schmid, S., Gertz, J., Myers, R.M., Tenover, B.R., and Maniatis, T. (2011). I $\kappa$ B kinase epsilon (IKK(epsilon)) regulates the balance between type I and type II interferon responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 21170–21175.
- Nowotny, M., and Yang, W. (2006). Stepwise analyses of metal ions in RNase H catalysis from substrate destabilization to product release. *EMBO J.* *25*, 1924–1933.
- Nowotny, M., Gaidamakov, S.A., Crouch, R.J., and Yang, W. (2005). Crystal Structures of RNase H Bound to an RNA/DNA Hybrid: Substrate Specificity and Metal-Dependent Catalysis. *Cell* *121*, 1005–1016.
- O’Connell, M.A., Krause, S., Higuchi, M., Hsuan, J.J., Totty, N.F., Jenny, A., and Keller, W. (1995). Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1389–1397.
- Oda, H., Nakagawa, K., Abe, J., Awaya, T., Funabiki, M., Hijikata, A., Nishikomori, R., Funatsuka, M., Ohshima, Y., Sugawara, Y., et al. (2014). Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am. J. Hum. Genet.* *95*, 121–125.
- O’Driscoll, M. (2008). TREX1 DNA exonuclease deficiency, accumulation of single stranded DNA and complex human genetic disorders. *DNA Repair* *7*, 997–1003.
- Ohtani, N., Haruki, M., Morikawa, M., Crouch, R.J., Itaya, M., and Kanaya, S. (1999). Identification of the Genes Encoding Mn<sup>2+</sup>-Dependent RNase HII and Mg<sup>2+</sup>-Dependent RNase HIII from *Bacillus subtilis*: Classification of RNases H into Three Families†. *Biochemistry (Mosc.)* *38*, 605–618.
- Ovchinnikov, D.A., van Zuylen, W.J.M., DeBats, C.E.E., Alexander, K.A., Kellie, S., and Hume, D.A. (2008). Expression of Gal4-dependent transgenes in cells of the mononuclear phagocyte system labeled with enhanced cyan fluorescent protein using Csf1r-Gal4VP16/UAS-ECFP double-transgenic mice. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 430–433.
- Pace, J.L., Russell, S.W., Schreiber, R.D., Altman, A., and Katz, D.H. (1983). Macrophage activation: priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 3782–3786.
- Palframan, R.T., Jung, S., Cheng, G., Weninger, W., Luo, Y., Dorf, M., Littman, D.R., Rollins, B.J., Zweerink, H., Rot, A., et al. (2001). Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J. Exp. Med.* *194*, 1361–1373.

- Pascual-García, M., Rué, L., León, T., Julve, J., Carbó, J.M., Matalonga, J., Auer, H., Celada, A., Escolà-Gil, J.C., Steffensen, K.R., et al. (2013). Reciprocal Negative Cross-Talk between Liver X Receptors (LXRs) and STAT1: Effects on IFN- $\gamma$ -Induced Inflammatory Responses and LXR-Dependent Gene Expression. *J. Immunol.* *190*, 6520–6532.
- Patel, S., Martínez-Ripoll, M., Blundell, T.L., and Albert, A. (2002). Structural enzymology of Li(+)-sensitive/Mg(2+)-dependent phosphatases. *J. Mol. Biol.* *320*, 1087–1094.
- Patterson, J.B., and Samuel, C.E. (1995). Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 5376–5388.
- Peisley, A., Jo, M.H., Lin, C., Wu, B., Orme-Johnson, M., Walz, T., Hohng, S., and Hur, S. (2012). Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E3340–E3349.
- Pereira-Lopes, S., Celhar, T., Sans-Fons, G., Serra, M., Fairhurst, A.-M., Lloberas, J., and Celada, A. (2013). The Exonuclease Trex1 Restrains Macrophage Proinflammatory Activation. *J. Immunol.* *191*, 6128–6135.
- Perrino, F.W., Harvey, S., Shaban, N.M., and Hollis, T. (2009). RNaseH2 mutants that cause Aicardi-Goutieres syndrome are active nucleases. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *87*, 25–30.
- Perwitasari, O., Cho, H., Diamond, M.S., and Gale, M. (2011). Inhibitor of  $\kappa$ B kinase epsilon (IKK(epsilon)), STAT1, and IFIT2 proteins define novel innate immune effector pathway against West Nile virus infection. *J. Biol. Chem.* *286*, 44412–44423.
- Pfaller, C.K., Li, Z., George, C.X., and Samuel, C.E. (2011). Protein kinase PKR and RNA adenosine deaminase ADAR1: new roles for old players as modulators of the interferon response. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 573–582.
- Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J., and Sambhara, S. (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* *3*, 161–167.
- Pollard, J.W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 259–270.
- Postlethwaite, A.E., Holness, M.A., Katai, H., and Raghow, R. (1992). Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J. Clin. Invest.* *90*, 1479–1485.
- Powell, R.D., Holland, P.J., Hollis, T., and Perrino, F.W. (2011). Aicardi-Goutières Syndrome Gene and HIV-1 Restriction Factor SAMHD1 Is a dGTP-regulated Deoxynucleotide Triphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* *286*, 43596–43600.
- Qiao, F., and Bowie, J.U. (2005). The Many Faces of SAM. *Sci. Signal.* *2005*, re7–re7.
- Qu, C., Edwards, E.W., Tacke, F., Angeli, V., Llodrá, J., Sanchez-Schmitz, G., Garin, A., Haque, N.S., Peters, W., van Rooijen, N., et al. (2004). Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J. Exp. Med.* *200*, 1231–1241.

- Reijns, M.A.M., Rabe, B., Rigby, R.E., Mill, P., Astell, K.R., Lettice, L.A., Boyle, S., Leitch, A., Keighren, M., Kilanowski, F., et al. (2012). Enzymatic Removal of Ribonucleotides from DNA Is Essential for Mammalian Genome Integrity and Development. *Cell* *149*, 1008–1022.
- Reikine, S., Nguyen, J.B., and Modis, Y. (2014). Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front. Immunol.* *5*, 342.
- Rice, G., Patrick, T., Parmar, R., Taylor, C.F., Aeby, A., Aicardi, J., Artuch, R., Montalto, S.A., Bacino, C.A., Barroso, B., et al. (2007a). Clinical and molecular phenotype of Aicardi-Goutieres syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 713–725.
- Rice, G., Newman, W.G., Dean, J., Patrick, T., Parmar, R., Flintoff, K., Robins, P., Harvey, S., Hollis, T., O'Hara, A., et al. (2007b). Heterozygous mutations in TREX1 cause familial chilblain lupus and dominant Aicardi-Goutieres syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *80*, 811–815.
- Rice, G.I., Bond, J., Asipu, A., Brunette, R.L., Manfield, I.W., Carr, I.M., Fuller, J.C., Jackson, R.M., Lamb, T., Briggs, T.A., et al. (2009). Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response. *Nat. Genet.* *41*, 829–832.
- Rice, G.I., Kasher, P.R., Forte, G.M.A., Mannion, N.M., Greenwood, S.M., Szykiewicz, M., Dickerson, J.E., Bhaskar, S.S., Zampini, M., Briggs, T.A., et al. (2012). Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. *Nat. Genet.* *44*, 1243–1248.
- Rice, G.I., del Toro Duany, Y., Jenkinson, E.M., Forte, G.M.A., Anderson, B.H., Ariando, G., Bader-Meunier, B., Baildam, E.M., Battini, R., Beresford, M.W., et al. (2014). Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat. Genet.* *46*, 503–509.
- Richards, A., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Jen, J.C., Kavanagh, D., Bertram, P., Spitzer, D., Liszewski, M.K., Barilla-Labarca, M.-L., Terwindt, G.M., Kasai, Y., et al. (2007). C-terminal truncations in human 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause autosomal dominant retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy. *Nat. Genet.* *39*, 1068–1070.
- Rigby, R.E., Leitch, A., and Jackson, A.P. (2008). Nucleic acid-mediated inflammatory diseases. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *30*, 833–842.
- Rohman, M.S., Koga, Y., Takano, K., Chon, H., Crouch, R.J., and Kanaya, S. (2008). Effect of the disease-causing mutations identified in human ribonuclease (RNase) H2 on the activities and stabilities of yeast RNase H2 and archaeal RNase HII. *FEBS J.* *275*, 4836–4849.
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B.G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S., and Fitzgerald, K.A. (2005). The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 5260–5268.
- Sasmono, R.T., Oceandy, D., Pollard, J.W., Tong, W., Pavli, P., Wainwright, B.J., Ostrowski, M.C., Himes, S.R., and Hume, D.A. (2003). A macrophage colony-stimulating factor receptor-green fluorescent protein transgene is expressed throughout the mononuclear phagocyte system of the mouse. *Blood* *101*, 1155–1163.

- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 163–189.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 421–452.
- Serra, M., Forcales, S.-V., Pereira-Lopes, S., Lloberas, J., and Celada, A. (2011). Characterization of Trex1 induction by IFN- $\gamma$  in murine macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 2299–2308.
- Shaban, N.M., Harvey, S., Perrino, F.W., and Hollis, T. (2010). The Structure of the Mammalian RNase H2 Complex Provides Insight into RNA-DNA Hybrid Processing to Prevent Immune Dysfunction. *J. Biol. Chem.* *285*, 3617–3624.
- Shevelev, I.V., Ramadan, K., and Hubscher, U. (2002). The TREX2 Exonuclease Physically Interacts with DNA Polymerase I and Increases Its Accuracy. *Sci. World J.* *2*, 275–281.
- Si, Y., Tsou, C.-L., Croft, K., and Charo, I.F. (2010). CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 1192–1203.
- Sieweke, M.H., and Allen, J.E. (2013). Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* *342*, 1242974.
- Silva, S. de, Hoy, H., Hake, T.S., Wong, H.K., Porcu, P., and Wu, L. (2013). Promoter Methylation Regulates SAMHD1 Gene Expression in Human CD4<sup>+</sup> T Cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 9284–9292.
- Smyth, D.J., Cooper, J.D., Bailey, R., Field, S., Burren, O., Smink, L.J., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Widmer, B., Dunger, D.B., et al. (2006). A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat. Genet.* *38*, 617–619.
- Stanley, E.R., Berg, K.L., Einstein, D.B., Lee, P.S., and Yeung, Y.G. (1994). The biology and action of colony stimulating factor-1. *Stem Cells Dayt. Ohio* *12 Suppl 1*, 15–24; discussion 25.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 227–264.
- Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., et al. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* *387*, 917–921.
- Stetson, D.B., Ko, J.S., Heidmann, T., and Medzhitov, R. (2008). Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell* *134*, 587–598.
- St Gelais, C., de Silva, S., Amie, S.M., Coleman, C.M., Hoy, H., Hollenbaugh, J.A., Kim, B., and Wu, L. (2012). SAMHD1 restricts HIV-1 infection in dendritic cells (DCs) by dNTP depletion, but its expression in DCs and primary CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes cannot be upregulated by interferons. *Retrovirology* *9*, 105.
- Tacke, F., Ginhoux, F., Jakubzick, C., van Rooijen, N., Merad, M., and Randolph, G.J. (2006). Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J. Exp. Med.* *203*, 583–597.

- Tenoever, B.R., Ng, S.-L., Chua, M.A., McWhirter, S.M., García-Sastre, A., and Maniatis, T. (2007). Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity. *Science* 315, 1274–1278.
- Toth, A.M., Zhang, P., Das, S., George, C.X., and Samuel, C.E. (2006). Interferon action and the double-stranded RNA-dependent enzymes ADAR1 adenosine deaminase and PKR protein kinase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 81, 369–434.
- Uzé, G., and Monneron, D. (2007). IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. *Biochimie* 89, 729–734.
- Valente, L., and Nishikura, K. (2007). RNA binding-independent dimerization of adenosine deaminases acting on RNA and dominant negative effects of nonfunctional subunits on dimer functions. *J. Biol. Chem.* 282, 16054–16061.
- Valledor, A.F., Borràs, F.E., Cullèll-Young, M., and Celada, A. (1998). Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 63, 405–417.
- Valledor, A.F., Xaus, J., Marquès, L., and Celada, A. (1999). Macrophage colony-stimulating factor induces the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 through a protein kinase C-dependent pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 163, 2452–2462.
- Valledor, A.F., Comalada, M., Xaus, J., and Celada, A. (2000). The Differential Time-course of Extracellular-regulated Kinase Activity Correlates with the Macrophage Response toward Proliferation or Activation. *J. Biol. Chem.* 275, 7403–7409.
- Valledor, A.F., Arpa, L., Sánchez-Tilló, E., Comalada, M., Casals, C., Xaus, J., Caelles, C., Lloberas, J., and Celada, A. (2008). IFN- $\gamma$ -mediated inhibition of MAPK phosphatase expression results in prolonged MAPK activity in response to M-CSF and inhibition of proliferation. *Blood* 112, 3274–3282.
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., and Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4560–4565.
- Vinh, D.C., Patel, S.Y., Uzel, G., Anderson, V.L., Freeman, A.F., Olivier, K.N., Spalding, C., Hughes, S., Pittaluga, S., Raffeld, M., et al. (2010). Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* 115, 1519–1529.
- Wang, Y., and Samuel, C.E. (2009). Adenosine deaminase ADAR1 increases gene expression at the translational level by decreasing protein kinase PKR-dependent eIF-2alpha phosphorylation. *J. Mol. Biol.* 393, 777–787.
- Wang, Q., Khillan, J., Gadue, P., and Nishikura, K. (2000). Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science* 290, 1765–1768.
- Wang, Q., Miyakoda, M., Yang, W., Khillan, J., Stachura, D.L., Weiss, M.J., and Nishikura, K. (2004). Stress-induced apoptosis associated with null mutation of ADAR1 RNA editing deaminase gene. *J. Biol. Chem.* 279, 4952–4961.

- Welbourn, S., Dutta, S.M., Semmes, O.J., and Strebel, K. (2013). Restriction of Virus Infection but Not Catalytic dNTPase Activity Is Regulated by Phosphorylation of SAMHD1. *J. Virol.* *87*, 11516–11524.
- White, T.E., Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L., Kim, B., Brojatsch, J., and Diaz-Griffero, F. (2013a). Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1. *Virology* *436*, 81–90.
- White, T.E., Brandariz-Nuñez, A., Valle-Casuso, J.C., Amie, S., Nguyen, L.A., Kim, B., Tuzova, M., and Diaz-Griffero, F. (2013b). The Retroviral Restriction Ability of SAMHD1, but Not Its Deoxynucleotide Triphosphohydrolase Activity, Is Regulated by Phosphorylation. *Cell Host Microbe* *13*, 441–451.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Bartocci, A., Ferrante, A.W., Ahmed-Ansari, A., Sell, K.W., Pollard, J.W., and Stanley, E.R. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4828–4832.
- Wiktor-Jedrzejczak, W., Urbanowska, E., and Szperl, M. (1994). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor corrects macrophage deficiencies, but not osteopetrosis, in the colony-stimulating factor-1-deficient op/op mouse. *Endocrinology* *134*, 1932–1935.
- Wöhrl, B.M., and Moelling, K. (1990). Interaction of HIV-1 ribonuclease H with polypurine tract containing RNA-DNA hybrids. *Biochemistry (Mosc.)* *29*, 10141–10147.
- Wynes, M.W., and Riches, D.W.H. (2003). Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 3550–3559.
- Wynes, M.W., Frankel, S.K., and Riches, D.W.H. (2004). IL-4-induced macrophage-derived IGF-I protects myofibroblasts from apoptosis following growth factor withdrawal. *J. Leukoc. Biol.* *76*, 1019–1027.
- Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* *214*, 199–210.
- Xaus, J., Cardó, M., Valledor, A.F., Soler, C., Lloberas, J., and Celada, A. (1999a). Interferon gamma induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. *Immunity* *11*, 103–113.
- Xaus, J., Mirabet, M., Lloberas, J., Soler, C., Lluís, C., Franco, R., and Celada, A. (1999b). IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 3607–3614.
- Xaus, J., Comalada, M., Cardó, M., Valledor, A.F., and Celada, A. (2001a). Decorin inhibits macrophage colony-stimulating factor proliferation of macrophages and enhances cell survival through induction of p27(Kip1) and p21(Waf1). *Blood* *98*, 2124–2133.
- Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A.F., Cardó, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J., and Celada, A. (2001b). Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology* *204*, 543–550.
- Xu, J., Zoltick, P.W., Gamero, A.M., and Gallucci, S. (2014). TLR ligands up-regulate Trex1 expression in murine conventional dendritic cells through type I Interferon and NF-κB-dependent signaling pathways. *J. Leukoc. Biol.* *96*, 93–103.



- Yan, J., Kaur, S., DeLucia, M., Hao, C., Mehrens, J., Wang, C., Golczak, M., Palczewski, K., Gronenborn, A.M., Ahn, J., et al. (2013). Tetramerization of SAMHD1 Is Required for Biological Activity and Inhibition of HIV Infection. *J. Biol. Chem.* *288*, 10406–10417.
- Yang, W., Lee, J.Y., and Nowotny, M. (2006). Making and Breaking Nucleic Acids: Two-Mg<sup>2+</sup>-Ion Catalysis and Substrate Specificity. *Mol. Cell* *22*, 5–13.
- Yang, Y.-G., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2007). Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease. *Cell* *131*, 873–886.
- Ben-Yehoyada, M., Gautier, J., and Dupré, A. (2007). The DNA damage response during an unperturbed S-phase. *DNA Repair* *6*, 914–922.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* *38*, 79–91.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., et al. (2005). Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *175*, 2851–2858.
- Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D., and Nishikawa, S. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* *345*, 442–444.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* *300*, 1542–1548.
- Zuo, L., Fulkerson, P.C., Finkelman, F.D., Mingler, M., Fischetti, C.A., Blanchard, C., and Rothenberg, M.E. (2010). IL-13 induces esophageal remodeling and gene expression by an eosinophil-independent, IL-13R alpha 2-inhibited pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *185*, 660–669.