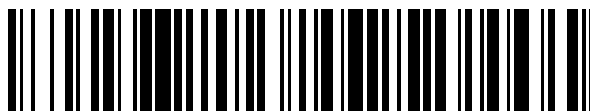


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 194**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2013 PCT/US2013/075509**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14099824**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2013 E 13863990 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2934598**

54 Título: **Determinación farmacéutica de una vía de señalización de dinucleótido cíclico de mamífero**

30 Prioridad:

19.12.2012 US 201261739072 P

31.05.2013 US 201361829251 P

28.08.2013 US 201361871277 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.08.2018

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, ZHIJIAN;
SUN, LIJUN;
WU, JIAXI;
SHI, HEPING y
CHEN, CHUO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 678 194 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Determinación farmacéutica de una vía de señalización de dinucleótido cíclico de mamífero

5 **Introducción**

El ADN citosólico induce interferones de tipo I y otras citocinas que son importantes para la defensa antimicrobiana, pero también puede dar como resultado la autoinmunidad. Esta vía de señalización de ADN requiere la proteína adaptadora STING y el factor de transcripción IRF3, pero el mecanismo de detección del ADN no está claro. En este caso los investigadores indican que los extractos citosólicos de mamíferos sintetizaron GMP-AMP cíclico (GAMPC) *in vitro* a partir de ATP y GTP en presencia de ADN pero no de ARN. La transfección del ADN o la infección por el virus de ADN de células de mamíferos también desencadenó la producción de GAMPC. GAMPC unido a STING, que conduce a la activación de IRF3 y la inducción de interferón- β (IFN β). Por tanto, GAMPC representa el primer dinucleótido cíclico en los metazoos y funciona como un segundo mensajero endógeno que desencadena la producción de interferón en respuesta al ADN citosólico. El documento US 2008/286296 se refiere a nuevos adyuvantes y a los usos en composiciones farmacéuticas, como en vacunas, adyuvantes y/o inmunomoduladores para la vacunación profiláctica y/o terapéutica en el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, tumores, alergias, así como para el control de la fertilidad en poblaciones humanas o animales.

El documento US 2006/040887 divulga que di-GMP cíclico, o un análogo de dinucleótido cíclico del mismo que tiene el mismo efecto que di-GMP cíclico, estimula o potencia la respuesta inmunológica o inflamatoria en un paciente o potencia la respuesta inmunológica a una vacuna al servir como un adyuvante.

El documento WO 2013/185052 proporciona una terapia de combinación que se basa en un estimulador inmunológico de molécula pequeña dinucleótido cíclico (CDN) - que activa las células dendríticas (DC) a través de un receptor citoplásmico recientemente descubierto conocido como STING (estimulador de genes de interferón) formulado con líneas celulares alogénicas de tumor humano obtenidas por ingeniería para secretar grandes cantidades de GM-CSF. Kranzusch *et al.*, 2013, 30; 3 (5): 1362-8 divulga que el reconocimiento inmunológico innato de ácidos nucleicos extraños induce respuestas de interferón protectoras, y que la detección de ADN citosólico desencadena la señalización inmunológica aguas abajo a través de la activación de la GMP-AMP sintasa cíclica (GASc). Los autores también indicaron la estructura cristalina de GASc humano.

El documento WO 2014/179335 se refiere a composiciones, métodos, kits y ensayos relacionados con el uso y/o la explotación de isómeros de GAMPC, así como la estructura de la enzima GASc.

A través del fraccionamiento bioquímico y la espectrometría de masas cuantitativa, los investigadores también identificaron una GAMPC sintasa (GASc), que pertenece a la familia nucleotidiltransferasa. La sobreexpresión de GASc activó el factor de transcripción IRF3 e indujo IFN β de una manera dependiente de STING. La caída de GASc inhibió la activación de IRF3 y la inducción de IFN β por transfección de ADN o infección por virus de ADN. GASc unido al ADN en el citoplasma y la síntesis catalizada de GAMPC. Estos resultados indican que GASc es un sensor de ADN citosólico que induce interferones al producir el segundo mensajero GAMPC.

La divulgación aplica estos hallazgos a novedosos métodos y composiciones relacionadas con la GMP-AMP sintasa cíclica (GASc) y la GMP-AMP cíclica (GAMPC), incluido su uso en formulaciones (que incluyen adyuvantes de vacunas), filtros de fármacos, terapias y diagnósticos.

45 **Sumario de la invención**

La divulgación proporciona exploraciones de fármacos basadas en células que incluyen métodos para inhibir GASc, que comprenden poner en contacto una célula o un extracto de célula con una cantidad eficaz de un inhibidor de GASc exógeno, y detectar una inhibición resultante de la sintasa. La inhibición resultante puede detectarse inferencialmente por activación de IRF3 inducida por GMP-AMP cíclico (dimerización o translocación nuclear), producción de interferón o activación de NF- κ B.

La divulgación proporciona terapias que incluyen métodos para inhibir GASc, que comprenden poner en contacto una célula que se determina que lo necesita con una cantidad eficaz de un inhibidor de GASc exógeno. El método comprende administrar el inhibidor a un mamífero que se determina que lo necesita y que comprende la célula, y/o el inhibidor puede ser un inhibidor de ciclase de molécula pequeña o puede ser un ARNsh o ARNip específico de GASc.

La divulgación proporciona exploraciones de fármacos *in vitro* que incluyen métodos para inhibir GASc, que comprenden poner en contacto una mezcla que comprende la sintasa, ATP, GTP y un inhibidor, en condiciones en las que el inhibidor inhibe la conversión catalítica por la sintasa del ATP y GTP a GMP-AMP cíclico y pirofosfato inorgánico, y detectar una inhibición resultante de la sintasa. La mezcla comprende adicionalmente ADN y la conversión puede ser dependiente de ADN. Además, el GASc puede ser constitutivamente activo.

La divulgación proporciona ensayos de unión a fármacos *in vitro* que incluyen métodos para inhibir la unión de GASc a un sustrato o cofactor, que comprende poner en contacto una mezcla que comprende la sintasa y un sustrato ATP

o GTP o un cofactor de ADN y un inhibidor, en condiciones en las que el inhibidor inhibe la unión de la sintasa al sustrato o al cofactor, y detectar una inhibición resultante de la unión.

5 La divulgación proporciona métodos para preparar GAMPC que comprende formar una mezcla que comprende GASc, ATP y GTP, en condiciones en las que la sintasa catalítica convierte el ATP y el GTP en GAMPC, en el que la sintasa, el ATP y el GTP están en cantidades predefinidas o el método comprende además la etapa de aislar o detectar el GAMPC resultante. En particular, la mezcla comprende adicionalmente ADN y la conversión puede ser dependiente de ADN. En un primer aspecto, la invención proporciona un método para preparar 2'3'-GMP-AMP cíclico (2'3'-GAMPC), que comprende formar una mezcla que comprende la sintasa GMP-AMP cíclica (GASc) de mamífero, ATP y GTP, en condiciones en las que la sintasa convierte catalíticamente el ATP y el GTP en 2'3'-GAMPC, en el que la sintasa, el ATP y el GTP están en cantidades predefinidas, comprendiendo el método además la etapa de aislar o detectar el 2'3'-GAMPC resultante, en el que la mezcla comprende adicionalmente ADN y la conversión es dependiente de ADN.

10 En un segundo aspecto, la invención proporciona un 2'3'-GAMPC aislado obtenido a partir del método del primer aspecto de la invención.

15 En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad predeterminada del 2'3'-GMP-AMP cíclico (2'3'-GAMPC) como se define en el segundo aspecto de la invención.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad predeterminada de 2'3'-GAMPC.

20 En un quinto aspecto, la invención proporciona un adyuvante que comprende la composición de acuerdo con el tercer o el cuarto aspecto de la invención.

En un sexto aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende un inmunógeno predeterminado y la composición de acuerdo con el tercer o el cuarto aspecto de la invención.

25 En un séptimo aspecto, la invención proporciona una composición de acuerdo con el tercer o el cuarto aspecto de la invención para uso en un método para inducir o promover una respuesta inmune, comprendiendo el método administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de la composición.

30 La divulgación proporciona métodos para detectar niveles de GAMPC, niveles de GASc o mutaciones de GASc que comprenden la etapa de: detectar en una muestra de una persona los niveles de GAMPC, niveles de GASc o mutaciones de GASc y asignar a la persona una métrica de enfermedad autoinmunitarias basada en los niveles de GAMPC, niveles de GASc o mutaciones de GASc; y opcionalmente administrar a la persona una terapia para la enfermedad autoinmunitaria.

35 La divulgación proporciona composiciones que comprenden una cantidad predeterminada de GAMPC, tal como una vacuna que comprende además un inmunógeno para un patógeno objetivo, en la que el GAMPC proporciona un adyuvante. En particular, la composición puede estar libre de otros di-nucleótidos cíclicos, y/o ser adecuada de otra manera como adyuvante o vacuna, *p. ej.*, estériles farmacéuticamente aceptables, en cantidades, relaciones *etc.*, predeterminadas definidas, y las composiciones pueden estar a granel o en dosificaciones unitarias, cuantificadas para uso individual. La divulgación también proporciona métodos para inducir o promover una respuesta inmunitaria que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de dichas composiciones. En particular, la administración puede ser mucosal (sublingual o intranasal), intramuscular o subcutánea.

La invención incluye todas las combinaciones de las realizaciones particulares enumeradas.

45 **Descripción de las realizaciones particulares de la invención**

La divulgación proporciona métodos y composiciones relacionados con GASc y GAMPC, incluido su uso en formulaciones (que incluyen adyuvantes de vacunas), filtros de fármacos, terapias y diagnósticos.

50 Aspectos destacados: 2'3'-GAMPC es un segundo mensajero endógeno producido por células de mamífero; 2'3'-GAMPC es un ligando de alta afinidad para STING; 2'3'-GAMPC es un potente inductor de interferones de tipo I; La unión de 2'3'-GAMPC induce cambios conformacionales de STING.

55 La divulgación proporciona exploraciones de fármacos basadas en células que incluyen métodos para inhibir GASc, que comprenden poner en contacto una célula o un extracto de célula con una cantidad eficaz de un inhibidor de GASc exógeno, y detectar una inhibición resultante de la sintasa. La sintasa puede ser normalmente GASc humano o murino, y puede truncarse, recombinarse en proteína de fusión, o modificarse de otra manera para adaptarse al ensayo. Normalmente, el método puede practicarse como un ensayo de selección en el que el inhibidor puede ser un inhibidor candidato para el análisis, que puede ser de una biblioteca, optimización de avance, *etc.* La inhibición puede detectarse directa o inferencialmente, tal como mediante activación de IRF3 inducida por GAMPC. (dimerización o translocación nuclear), producción de interferón o activación de NF-κB, detección directa de GAMPC y otros productos mediante, por ejemplo, espectrometría de masas, ensayos basados en anticuerpos (*p. ej.*, ELISA, ALPHA, polarización fluorescente, *etc.*). Por ejemplo, el ARN de IFN se puede medir mediante RT-PCR y la dimerización de IRF3 mediante electroforesis nativa en gel. Las lecturas adecuadas adicionales incluyen mediciones de ATP, GTP y pirofosfato (PPi).

La divulgación proporciona terapias que incluyen métodos para inhibir GASc, que comprenden poner en contacto una célula que se determina que lo necesita con una cantidad eficaz de un inhibidor de GASc exógeno. En particular, el método comprende administrar el inhibidor a un mamífero que se determina que lo necesita y que comprende la célula, y/o el inhibidor puede ser un inhibidor de ciclasa de molécula pequeña, o puede ser un ARNhc o ARNip específico de GASc, u otro ARNi o inhibidor específico de ARNGASc antisentido.

Los datos de los investigadores indican que GASc y la vía GASc-GAMPc son importantes para desencadenar respuestas inflamatorias al ADN propio y extraño, y por lo tanto, los inhibidores de GASc pueden usarse para reducir la actividad GASc patógena de enfermedades autoinmunitarias asociadas. De forma similar, los datos de los investigadores indican que GASc también es importante para la transformación de células normales a cancerosas y también para la supervivencia y metástasis de células cancerosas, y por lo tanto, los inhibidores de GASc pueden usarse para reducir la actividad GASc patógena de enfermedades neoplásicas asociadas.

La terapia actual para el lupus y otras enfermedades autoinmunitarias implica dosis masivas de agentes inmunosupresores, que tienen efectos secundarios graves. Aunque un nuevo anticuerpo BAFF (Benlysta) ha sido aprobado para el tratamiento del lupus, solo tiene una efectividad marginal. Dirigir GASc con inhibidores de molécula pequeña, particularmente los disponibles por vía oral, proporciona ventajas significativas sobre las terapias existentes. Los inhibidores de GASc se dirigen a la causa raíz del lupus y otras enfermedades autoinmunitarias y proporcionan beneficios terapéuticos a los pacientes. Además, la vía de inmunidad innata del ADN citosólico se activa de manera aberrante en condiciones autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (SLE), el síndrome de Sjögren y el síndrome de Aicardi-Goutières, y la inhibición de GASc proporciona un tratamiento racional de estas y otras enfermedades autoinmunitarias.

La divulgación proporciona exploraciones de fármacos *in vitro* que incluyen métodos para inhibir GASc, que comprenden poner en contacto una mezcla que comprende la sintasa, ATP, GTP y un inhibidor, en condiciones en las que el inhibidor inhibe la conversión catalítica por la sintasa del ATP y GTP a GAMPc y pirofosfato inorgánico, y detectar una inhibición resultante de la sintasa. En particular, la mezcla comprende adicionalmente ADN y la conversión puede ser dependiente de ADN. Además, el GASc puede ser constitutivamente activo. Normalmente, el método puede practicarse como un ensayo de selección en el que el inhibidor puede ser un inhibidor candidato para el análisis, que puede ser de una biblioteca, optimización de avance, etc. La mezcla puede estar contenida en una célula o un extracto de célula, o puede ser acelular.

La divulgación proporciona ensayos de unión a fármacos *in vitro* que incluyen métodos para inhibir la unión de GASc a un sustrato o cofactor, que comprende poner en contacto una mezcla que comprende la sintasa y un sustrato ATP o GTP o un cofactor de ADN y un inhibidor, en condiciones en las que el inhibidor inhibe la unión de la sintasa al sustrato o al cofactor, y detectar una inhibición resultante de la unión. Normalmente, el método se puede practicar como un ensayo de selección en el que el inhibidor puede ser un inhibidor candidato para el análisis, y se puede implementar en diversos formatos adecuados que incluyen ensayos inmunológicos en fase sólida, ensayos de polarización fluorescente, etc.

La divulgación proporciona métodos para preparar GAMPc que comprende formar una mezcla que comprende GASc, ATP y GTP, en condiciones en las que la sintasa catalítica convierte el ATP y el GTP en GAMPc, en el que la sintasa, el ATP y el GTP pueden estar en cantidades predefinidas, o el método comprende además la etapa de aislar o detectar el GAMPc resultante. En particular, la mezcla comprende adicionalmente ADN y la conversión puede ser dependiente de ADN.

La expresión patógena de la actividad de GASc, particularmente como resultado de la sobreexpresión o la mutación, está asociada con enfermedades autoinmunitarias humanas; por lo tanto, la divulgación también proporciona métodos y ensayos para detectar niveles o mutaciones de GASc, particularmente como una herramienta de diagnóstico para enfermedades autoinmunitarias humanas. Por consiguiente, la divulgación proporciona métodos para detectar niveles de GAMPc, niveles de GASc o mutaciones de GASc que comprenden la etapa de: detectar en una muestra de una persona los niveles de GAMPc, niveles de GASc o mutaciones de GASc y asignar a la persona una métrica de enfermedad autoinmunitarias basada en los niveles de GAMPc, niveles de GASc o mutaciones GASc; y opcionalmente administrar a la persona una terapia para la enfermedad autoinmune.

La divulgación proporciona composiciones que comprenden una cantidad predeterminada de GAMPc, tal como una vacuna que comprende además un inmunógeno para un patógeno objetivo, en la que el GAMPc proporciona un adyuvante. En particular, la composición puede estar sustancialmente o esencialmente libre de otros di-nucleótidos cíclicos. La divulgación también proporciona métodos para inducir o promover una respuesta inmunitaria que comprende administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de dichas composiciones. En particular, la administración puede ser mucosal (sublingual o intranasal), intramuscular o subcutánea.

Como un potente inductor de interferones de tipo I, GAMPc proporciona un adyuvante inmunitario racional. GAMPc se puede usar como adyuvantes de vacuna, particularmente con vacunas de mucosa, y se puede formular con inmunógenos y entregar como son di-GMP cíclico y di-AMPc como adyuvantes de vacuna; véase, *p. ej.*, Pedersen, y *col.*, PLoS ONE, noviembre de 2011, 6, 11, e26973; Ebensen y *col.*, Vaccine 29, 2011, 5210-5220; Chen y *col.*,

Vaccine 28, 2010, 3080-3085. De hecho, el adyuvante GAMPc a menudo es más eficaz porque GAMPc es más potente que di-GMPc para inducir interferones.

Ejemplos

5 **Ejemplo 1. El GMP-AMP cíclico es un segundo mensajero endógeno en la señalización inmunitaria innata mediante ADN citosólico**

10 La defensa del huésped contra elementos genéticos extraños es una de las funciones más fundamentales de un organismo vivo. La presencia de ADN propio o extraño en el citoplasma es detectado por las células eucariotas como una señal de peligro o un signo de invasión extraña (1). El ADN se puede introducir en el citoplasma mediante infección bacteriana o viral, transfección o "fuga" del núcleo o mitocondrias en algunas condiciones patológicas que causan enfermedades autoinmunitarias como el lupus. En las células de mamíferos, el ADN citosólico desencadena la producción de interferones de tipo I (IFN) y otras citocinas a través de la proteína STING del retículo endoplásmico (también conocida como MITA, MPYS o ERIS) (2). STING recluta y activa las cinasas citosólicas IKK y TBK1, que activan los factores de transcripción NF- κ B e IRF3, respectivamente. NF- κ B e IRF3 luego ingresan al núcleo y funcionan juntos para inducir IFN y otras citocinas. Se ha demostrado que la ARN polimerasa III dependiente de ADN es un sensor que detecta y transcribe ADN rico en AT tal como poli[dA:dT] en un ligando de ARN capaz de estimular la vía de RIG-I para inducir IFN(3, 4). Sin embargo, la mayoría de las secuencias de ADN no activan la vía de la ARN polimerasa III-RIG-I. En cambio, el ADN citosólico activa la vía dependiente de STING de una manera independiente de la secuencia. Cómo el ADN citosólico activa la vía STING sigue siendo elusivo.

25 La hipótesis de los investigadores es que el ADN se une y activa un supuesto sensor de ADN citosólico, que luego directa o indirectamente activa STING, lo que conduce a la activación de IRF3 y NF- κ B. Para probar este modelo, los investigadores desarrollaron un ensayo de complementación *in vitro* usando la línea celular de fibrosarcoma murino L929, que se sabe que induce interferón- β (IFN β) de una manera dependiente de STING (5). Los investigadores usaron una línea celular L929 que expresaba de forma estable un ARN(hc) horquillado corto contra STING de modo que la transfección de ADN activaría solamente factores aguas arriba de STING, incluido el sensor de ADN supuesto. Las células L929-STINGhc se transfectaron con diferentes tipos de ADN y luego los extractos citoplasmáticos de estas células se mezclaron con la línea celular monocítica humana THP1 o la línea celular de macrófagos murinos Raw264.7, que se permeabilizó con perfringolisina O (PFO). El tratamiento PFO atraviesa agujeros en la membrana plasmática (6), permitiendo que el citoplasma se difunda dentro y fuera de las células, mientras conserva orgánulos, incluido el retículo endoplásmico (que contiene STING) y el aparato de Golgi dentro de las células (7). Si se genera un activador aguas arriba de STING en las células transfectadas con ADN, se espera que el citoplasma que contiene dicho activador active STING en las células permeabilizadas con PFO, conduciendo a la fosforilación y dimerización de IRF3.

40 Los extractos citoplásmicos de células L929-STINGhc transfectadas con una secuencia de ADN conocida como ADN estimulante del interferón (ISD), poli[dA:dT], un ADNdc de 50 pares de bases rico en GC (G:C50), poli[dI:dC] o el ADN de testículo de arenque (ADN-TA) activó IRF3 en células THP1 permeabilizadas, lo que indica que esta actividad era independiente de la secuencia de ADN.

45 Para determinar si el activador de STING es una proteína, los investigadores incubaron los extractos citoplasmáticos a 95 °C para desnaturalizar la mayoría de las proteínas y luego incubaron el "sobrenadante de calor" con células THP1 permeabilizadas. Sorprendentemente, el sobrenadante de calor de las células transfectadas con ISD o ADN-TA causó la dimerización de IRF3. Esta actividad era resistente al tratamiento con Benzonase, que degrada el ADN y el ARN, o la proteinasa K. Por tanto, el activador de STING probablemente no sea una proteína, ADN o ARN.

50 Para probar si el ADN podría estimular la generación del activador de STING resistente al calor *in vitro*, los investigadores incubaron el ADN-TA con extractos citoplasmáticos L929-STINGhc (S100) en presencia de ATP. La mezcla de reacción se calentó a 95 °C para desnaturalizar las proteínas. De manera destacable, la incubación del sobrenadante con células Raw264.7 permeabilizadas condujo a la dimerización de IRF3. Esta actividad dependió de la adición de ADN a los extractos citoplásmicos. Otro ADN, incluyendo poli[dA:dT], poli [dG:dC] e ISD, también estimuló la generación del activador de STING en extractos citoplasmáticos L929-STINGhc, mientras que el poli[I:C] y el ARN monocatenario no tuvieron actividad. Se obtuvieron resultados similares con células THP1 permeabilizadas. La caída de STING en las células THP1 permeabilizadas suprimió la activación de IRF3 por el factor resistente al calor generado por ADN transfectado en células L929 o ADN añadido a extractos citosólicos de L929. Los experimentos de control mostraron que la caída de STING inhibió la activación de IRF3 y la inducción de IFN β y TNF α en células THP1 mediante transfección de DNA-TA, pero la activación de IRF3 mediante transfección poli[I:C] o infección por el virus Sendai, que se sabe que activa la vía de RIG-I, no se vio afectada por la caída de STING. Los investigadores también probaron extractos citoplásmicos de varias líneas celulares por su capacidad para producir el activador de STING resistente al calor. La incubación de DNA-TA con extractos de células MEF primarias, macrófagos procedentes de médula ósea de ratón (BMDM) y células L929 condujo a la generación del factor resistente al calor que activó el IRF3. Los extractos de células humanas de THP1, pero no HEK293T, también fueron capaces de producir este activador STING. Estos resultados están de acuerdo con el hallazgo anterior de los investigadores de que las células MEF, BMDM, L929 y THP1, pero no de células HEK293T, poseían la vía

dependiente de STING, dependiente de la ARN polimerasa III, para inducir interferones tipo I (3).

A continuación los investigadores purificaron el activador de STING resistente al calor a partir de extractos de células L929 usando varias etapas cromatográficas que incluyen una etapa de purificación por afinidad STING-Flag. Las investigaciones anteriores han demostrado que las moléculas bacterianas di-AMP cíclicas y di-GMP cíclicas se unen a STING e inducen interferones de tipo I (8, 9). Sin embargo, usando espectrometría de masa de cromatografía nanolíquida (nano-LC-MS), los investigadores no detectaron espectros MS o MS/MS consistentes con los esperados de di-GMPc ($[M+H]^+=691$) o di-AMPc ($[M+H]^+=659$). Curiosamente, el examen en profundidad del espectro MS reveló dos iones con relaciones de masa a carga (m/z) de 675,1 ($z=1^+$) y 338,1 ($z=2^+$), que estaban presentes en las fracciones activas pero ausentes en los espectros de fondo. Estos valores m/z , a pesar de la baja precisión de masa del espectrómetro de masas (LTQ), fueron equivalentes a los valores m/z medios calculados de di-GMPc y di-AMPc ($675 = [691 + 659]/2$). Esta observación indicó que el ión detectado era un híbrido de di-GMPc y di-AMPc, es decir, GMP-AMP cíclico ($m/z = 675,107$, $z=1^+$; $m/z 338,057$, $z=2^+$). La fragmentación de disociación inducida por colisión (CID) de este ión ($m/z = 338,1$, $z=2^+$) reveló varios iones prominentes con valores m/z esperados de los iones producto de GMP-AMPc (GAMPc). Curiosamente, la espectrometría de masas cuantitativa que usa el monitoreo de reacción selectiva (SRM) mostró que la abundancia de los iones que representan GAMPc en las fracciones de una columna C18 se correlaciona muy bien con sus actividades estimulantes de IRF3. Recientemente se ha identificado GAMPc en la bacteria *Vibrio cholera* y se ha demostrado que desempeña un papel en la quimiotaxis bacteriana y la colonización (10). Sin embargo, no se ha indicado que GAMPc exista o funcione en células eucarióticas.

Para verificar la identidad del activador de STING resistente al calor, los investigadores usaron un espectrómetro de masas de alta precisión de alta resolución (Q Exactivo, Thermo) para realizar análisis de nano-LC-MS. El activador de STING procedente de células tenía m/z de 675,107 ($z=1^+$) y 338,057 ($z=2^+$), que coincidía exactamente con los valores teóricos de GAMPc. Para caracterizar aún más la estructura y función de GAMPc, los investigadores desarrollaron un protocolo de un solo matraz de diez etapas para sintetizar químicamente GAMPc. Los espectros MS/MS del activador de STING procedente de células fueron idénticos a los del GAMPc químicamente sintetizado. Estos resultados demuestran que las células L929 produjeron GAMPc.

Los ensayos cuantitativos de RT-PCR y ELISA mostraron que el GAMPc químicamente sintetizado indujo ARN y proteína de IFN β en células L929 después de la introducción en las células. Los experimentos de titulación mostraron que GAMPc indujo ARN de IFN β de manera robusta incluso a concentraciones tan bajas como 10 nM. De hecho, GAMPc fue mucho más potente que di-GMPc para inducir IFN β basándose en ensayos ELISA. GAMPc también fue más potente que di-GMPc y di-AMPc en la activación de IRF3. Para determinar si los extractos de L929 contenían enzimas que podían sintetizar otros tipos de di-nucleótidos u oligonucleótidos capaces de activar IRF3, los investigadores probaron los cuatro ribonucleótidos en diversas combinaciones. El ATP y el GTP eran necesarios y suficientes para apoyar la síntesis de un activador de IRF3, lo que apoya aún más que L929 contenía una enzima que sintetiza GAMPc a partir de ATP y GTP.

Para determinar si la infección por el virus del ADN conduce a la producción de GAMPc en las células, los investigadores infectaron las células L929 con HSV-1 que carece de ICP34.5, una proteína viral que se sabe que antagoniza la producción de interferón en las células infectadas (11). Al igual que la transfección de ADN, la infección por HSV-1 Δ ICP34.5 condujo a la activación de IRF3 en células L929. Los extractos celulares de las células transfectadas con ADN o infectadas con virus contenían un factor resistente al calor que podía activar IRF3 en células Raw264.7 permeabilizadas. Como control, los investigadores infectaron células L929 con una cepa del virus de la estomatitis vesicular, VSV- Δ M51-GFP, un virus de ARN que desencadena una fuerte producción de interferón a través de la vía RIG-I (12, 13). A diferencia de HSV-1, las células infectadas con VSV no contenían el activador de IRF3 resistente al calor en el mismo ensayo *in vitro*, aunque la infección por VSV indujo la activación de IRF3 en células L929. El factor resistente al calor en células infectadas con HSV-1 se enriqueció mediante HPLC de fase inversa y se cuantificó mediante nano-LC-MS usando SRM. Las células transfectadas con ADN o infectadas con HSV-1, pero no las células tratadas de manera simulada o infectadas con VSV, produjeron niveles elevados de GAMPc. Los experimentos cinéticos mostraron que, después de transfectar el ADN en células L929, se producía GAMPc antes de la dimerización de IRF3 y se podía detectar la inducción de IFN β . Para probar si los virus de ADN podían inducir la producción de GAMPc en células humanas, los investigadores infectaron las células THP1 con virus HSV1 o Vaccinia (VACV). Ambos virus indujeron la dimerización de IRF3 en las células. Curiosamente, ambos virus también desencadenaron la producción de GAMPc que activó IRF3. En conjunto, estos resultados indicaron que la transfección de ADN y las infecciones con virus de ADN en células humanas y de ratón producían GAMPc, que condujo a la activación de IRF3.

Para determinar si GAMPc activa IRF3 a través de STING, los investigadores llevaron a cabo tres conjuntos de experimentos. En primer lugar, los investigadores establecieron una línea celular HEK293T que expresa de forma estable STING, estimularon estas células con GAMPc y luego midieron la inducción de IFN β mediante RT-PCR cuantitativa. Las células HEK293T no respondieron a GAMPc, probablemente debido a la falta o al nivel muy bajo de expresión de STING en estas células. La expresión de STING en células HEK293T presentó un alto nivel de inducción de IFN β por GAMPc. Sin embargo, el ADN no estimula las células HEK293T/STING para inducir IFN β , lo que concuerda con un defecto de las células HEK293T en la producción de GAMPc en respuesta a la estimulación del ADN. A diferencia, las células L929 indujeron IFN β en respuesta a estimulación por GAMPc o ADN. La infección

por HSV-1 indujo la dimerización de IRF3 en L929, pero no en las células HEK293T o HEK29T STING, lo que indica que la producción de GAMPc es importante para que HSV-1 active IRF3 en las células. De hecho, los extractos de L929 infectadas con HSV1, pero no de las células HEK293T o HEK293T/STING, contenían la actividad de GAMPc que conducía a la dimerización de IRF3 en las células Raw264.7 permeabilizadas. Estos resultados indican que la expresión de STING en células HEK293T instaló la capacidad de las células para activar IRF3 e inducir IFN β en respuesta a GAMPc, pero fue insuficiente para instalar la respuesta al ADN o virus de ADN debido a un defecto de células HEK293T en la síntesis de GAMPc.

En segundo lugar, los investigadores probaron la respuesta de las células L929 y L929-STINGhc a GAMPc. Análogo a ISD y di-GMPc, la dimerización de IRF3 inducida por GAMPc dependía de STING. A diferencia, poli[I:C] aún inducía la dimerización de IRF3 en ausencia de STING. Estos resultados demuestran que STING es necesario para que GAMPc active IRF3.

Finalmente, los investigadores examinaron si STING se une directamente a GAMPc. La proteína STING recombinante que contienen restos 139-379, que se ha demostrado que se unen a di-GMPc (14), se expresó y se purificó a partir de *E. coli* y luego se incubó con ³²P-GAMPc seguido de reticulación inducida por UV. Se detectó una banda radiomarcada correspondiente al complejo STING-GAMPc reticulado cuando STING y ³²P-GAMPc estaban presentes. Las altas concentraciones de ATP o GTP no competían con la formación del complejo STING-GAMPc. Por el contrario, la intensidad de esta banda disminuyó a medida que aumentaban las concentraciones de GAMPc fría competidora, di-GMPc o di-AMPc, lo que indica que los sitios de unión de GAMPc en STING se solapan con aquellos que interactúan con di-GMPc y di-AMPc. De hecho, las mutaciones de varios restos que recientemente se ha demostrado que participan en la unión de STING a di-GMPc (14), que incluyen S161Y, Y240S y N242A, también alteraron la unión de STING a GAMPc. En conjunto, estos resultados demuestran que GAMPc es un ligando que se une y activa STING.

Se ha demostrado que los di-nucleótidos cíclicos funcionan como segundos mensajeros bacterianos que regulan diversos procesos fisiológicos, incluida la motilidad bacteriana y la formación de biopelículas (15). Un informe reciente mostró que di-GMPc se produce en el protozoo *Dictyostelium* y funciona como un morfógeno para inducir la diferenciación de células del tallo (16). En este ejemplo, los investigadores identificaron GAMPc como el primer di-nucleótido cíclico en metazoos. Además, los investigadores demostraron que GAMPc es un potente inductor de interferones tipo I. El papel de GAMPc es análogo al de AMPc, el segundo mensajero mejor estudiado (17). Al igual que el AMPc, que se sintetiza mediante la adenilato ciclasa tras su activación por ligandos aguas arriba, GAMPc se sintetiza mediante una ciclasa en respuesta a la estimulación por un ligando de ADN (18). El AMPc se une y activa la proteína quinasa A y otras moléculas efectoras. De forma similar, GAMPc se une y activa STING para desencadenar las cascadas de señalización aguas abajo. Como molécula endógena en células de mamífero, GAMPc puede usarse en terapia inmunológica o como un adyuvante de vacunas.

Referencias y notas

1. R. Barbalat, SE Ewald, ML Mouchess, GM Barton, Reconocimiento de Ácido Nucleico por el Sistema Inmunitario Innato. *Annu Rev Immunol*, (5 de abril).
2. GN Barber, vías inmunitarias innatas del ADN citoplásmico. *Immunological reviews* 243, 99 (septiembre de 2011).
3. YH Chiu, JB Macmillan, ZJ Chen, La ARN polimerasa III detecta ADN citosólico e induce interferones tipo I a través de la vía RIG-I. *Cell* 138, 576 (7 de agosto de 2009).
4. A. Ablasser y col., Detección dependiente de RIG-I de poli(dA:dT) a través de la inducción de un intermedio de ARN transcrito con ARN polimerasa III. *Nat Immunol*, (16 de julio de 2009).
5. Y. Tanaka, ZJ Chen, STING especifica la fosforilación de IRF3 por TBK1 en la vía de señalización de ADN citosólico. *Sci Signal* 5, ra20 (2012).
6. J. Rossjohn y col., Estructuras del perfringolisina O sugieren una vía para la activación de las citolisinas dependientes del colesterol. *Journal of molecular biology* 367, 1227 (13 de abril de 2007).
7. T. Saitoh y col., Atg9a controla la translocación dinámica conducida por ADNdc de STING y la respuesta inmunológica innata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 20842 (8 de diciembre de 2009).
8. JJ Woodward, AT Iavarone, DA Portnoy, di-AMPc secretada por *Listeria monocytogenes* intracelular activa una respuesta de interferón tipo I del huésped. *Science* 328, 1703 (25 de junio de 2010).
9. DL Burdette y col., STING es un sensor inmunitario innato directo de di-GMP cíclico. *Nature* 478, 515 (27 de octubre de 2011).
10. BW Davies, RW Bogard, TS Young, JJ Mekalanos, La regulación coordinada de los elementos genéticos accesorios produce di nucleótidos cíclicos para la virulencia de *V. cholerae*. *Cell* 149, 358 (13 de abril de 2012).
11. KL Mossman, JR Smiley, Virus del herpes simple ICP0 e ICP34.5 contrarrestan distintas barreras inducidas por el interferón para la replicación del virus. *Journal of virology* 76, 1995 (febrero de 2002).
12. DF Stojdl y col., Las cepas de VSV con defectos en su capacidad para detener la inmunidad innata son potentes agentes sistémicos antitumorales. *Cancer Cell* 4, 263 (octubre de 2003).
13. Q. Sun y col., El papel específico y esencial de MAVS en respuestas inmunológicas innatas antivirales. *Immunity* 24, 633 (mayo de 2006).

14. Q. Yin *et al.*, Detección di-GMP cíclica a través de la proteína de señalización inmunológica innata STING. *Molecular Cell* 46, 735 (29 de junio de 2012).
15. C. Pesavento, R. Hengge, Segundos mensajeros a base de nucleótidos bacterianos. *Curr Opin Microbiol* 12, 170 (abril de 2009).
- 5 16. ZH Chen, P. Schaap, El mensajero procarionta di-GMPc desencadena la diferenciación de células de tallo en *Dictyostelium*. *Nature* 488, 680 (30 de agosto de 2012).
17. SA Blumenthal, Earl Sutherland (1915-1975) y el descubrimiento del AMP cíclico. *Perspect Biol Med* 55, 236 (2012).
- 10 18. L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, ZJ Chen, La GMP-AMP sintasa cíclica es un sensor de ADN citosólico que activa la vía del interferón de tipo I. *Science*, (2012).

Ejemplo 2. La GMP-AMP sintasa cíclica es un sensor de ADN citosólico que activa la vía del interferón de tipo I

15 Se sabía que el ADN estimulaba la respuesta inmunológica mucho antes de que se demostrara que era un material genético, pero el mecanismo por el cual el ADN funciona como un inmunoestimulante sigue siendo poco entendido (1). Aunque el ADN puede estimular la producción de interferones tipo I en células dendríticas mediante la unión al receptor tipo Toll 9 (TLR9) en el endosoma, todavía no está claro cómo el ADN en el citosol induce el IFN. En particular, el sensor que detecta el ADN citosólico en la vía del interferón sigue siendo elusivo (2). Aunque se ha sugerido que varias proteínas, incluyendo DAI, ARN polimerasa III, IFI16, DDX41 y varias otras ADN helicasas, funcionan como los potenciales sensores de ADN que inducen IFN, ninguna se ha encontrado con aceptación universal (3).

25 **Purificación e identificación de GMP-AMP sintasa cíclica (GASc).** Los investigadores mostraron que la entrega de ADN a células de mamífero o extractos citosólicos desencadenó la producción de GMP-AMP cíclico (GAMPc), que se unió a STING y lo activó, lo que condujo a la activación de IRF3 y a la inducción de IFN β (4). Para identificar la GAMPc sintasa (GASc), los investigadores fraccionaron extractos citosólicos (S100) de la línea celular de fibrosarcoma murino L929, que contiene la actividad de síntesis de GAMPc. Esta actividad se ensayó incubando las fracciones de columna con ATP y GTP en presencia de ADN de testículo de arenque (ADN-TA). Después de digerir el ADN con Benzonase y calentar a 95 °C para desnaturalizar proteínas, los sobrenadantes resistentes al calor que contenían GAMPc se incubaron con células Raw264.7 permeabilizadas con Perfringolisina O (PFO) (macrófagos de ratón transformados). La dimerización de IRF3 inducida por GAMPc en estas células se analizó mediante electroforesis nativa en gel (4). Usando este ensayo, los investigadores llevaron a cabo tres vías de purificación independientes, consistiendo cada una en cuatro etapas de cromatografía, pero que diferían en las columnas o en el orden de las columnas que se usaron. En particular, la tercera vía incluía una etapa de purificación por afinidad usando un oligo de ADN biotinilado (un ADN de 45 pb conocido como ADN estimulante inmunológico o ISD). Los investigadores estimaron que alcanzaron un intervalo de 8000-15.000 veces de purificación y 2-5 % de recuperación de la actividad de estas vías de fraccionamiento. Sin embargo, en la última etapa de cada una de estas vías de purificación, la tinción con plata de las fracciones no reveló bandas de proteínas transparentes que se purificaron conjuntamente con la actividad GASc, lo que sugiere que la abundancia de la proteína GASc supuesta podría ser muy baja en extractos citosólicos L929.

Los investigadores desarrollaron una estrategia de espectrometría de masas cuantitativa para identificar una lista de proteínas que se purificaron conjuntamente con la actividad de GASc en la última etapa de cada vía de purificación.

45 Los investigadores razonaron que la supuesta proteína GASc debe purificarse conjuntamente con su actividad en las tres vías de purificación, mientras que la mayoría de las proteínas "contaminantes" no lo harían. Por tanto, desde la última etapa de cada vía de purificación, los investigadores eligen las fracciones que contenían la mayor parte de la actividad de GASc (fracciones máximas) y las fracciones adyacentes que contenían muy poca actividad o ninguna. Las proteínas en cada fracción se separaron mediante SDS-PAGE y se identificaron mediante espectrometría de masas por cromatografía nano líquida (nano-LC-MS). Los datos se analizaron mediante cuantificación sin etiquetas usando el software MaxQuant (5). De manera destacable, aunque muchas proteínas se purificaron conjuntamente con la actividad de GASc en una o dos vías de purificación, solo tres proteínas se purificaron conjuntamente en las tres vías. Las tres fueron supuestas proteínas no caracterizadas: E330016A19 (nº de acceso: NP_775562), Arf-GAP con proteína 2 que contiene un dominio de PH doble (NP_742145) y una proteína de 9 kDa de partículas de reconocimiento de señal (NP_036188). Entre estas, se identificaron más de 24 péptidos exclusivos en E330016A19, que representan un 41 % de cobertura en esta proteína de 507 aminoácidos.

El análisis bioinformático llamó la atención de los investigadores sobre E330016A19, que mostró homología estructural y de secuencia con el dominio catalítico de la oligoadenilato sintasa (OAS1). En particular, E330016A19 contiene un motivo G[G/S]_{x₉₋₁₃}[E/D]h[E/D]h conservado, en el que x₉₋₁₃ indica 9-13 restos flanqueantes que consisten en cualquier aminoácido y h indica un aminoácido hidrofóbico. Este motivo se encuentra en la familia nucleotidiltransferasa (NTasa) (6). Además de OAS1, esta familia incluye adenilato ciclasa, poli[A] polimerasa y ADN polimerasas. El extremo C de E330016A19 contenía un dominio 21 anormal masculino (Mab21), que se identificó por primera vez en la proteína C. *elegans* Mab21 (7). La alineación de secuencias reveló que los dominios C-terminal NTasa y Mab21 están altamente conservados desde el pez cebra hasta el ser humano, mientras que las secuencias N-terminal están mucho menos conservadas (8). Curiosamente, el homólogo humano de E330016A19,

C6orf150 (también conocido como MB21D1) fue identificado recientemente como uno de varios éxitos positivos en una pantalla para genes estimulados con interferón (ISG) cuya sobreexpresión inhibió la replicación viral (9). Para mayor claridad y sobre la base de la prueba presentada en este documento, los investigadores proponen nombrar la proteína de ratón E330016A19 como GAScr y el homólogo humano C6orf150 como GASch. La RT-PCR cuantitativa
 5 mostró que la expresión de GAScr era baja en células MEF inmortalizadas pero alta en L929, Raw264.7 y macrófagos procedentes de médula ósea (BMDM). De forma similar, la expresión del ARN GASch fue muy baja en células HEK293T pero alta en la línea celular monocítica humana THP1. La inmunotransferencia confirmó además que la proteína GASch se expresó en células THP1 pero no en células HEK293T. Por tanto, los niveles de expresión de GAScr y GASch en diferentes líneas celulares se correlacionan con la capacidad de estas células para producir
 10 GAMPc e inducir IFN β en respuesta al ADN citosólico (4, 10).

La catálisis por GASc desencadena la producción de interferón de tipo I. La sobreexpresión de GAScr en HEK293T, que carece de expresión de STING, no indujo IFN β , mientras que la expresión estable de STING en células HEK293T produjo que estas células fueran altamente competentes en la inducción de IFN β por GAScr.
 15 Curiosamente, las mutaciones puntuales de los restos catalíticos supuestos G198 y S199 a alanina suprimieron la capacidad de GAScr para inducir IFN β . Estas mutaciones, así como las mutaciones de los otros supuestos restos catalíticos E211 y D213 a alanina, también anularon la capacidad de GAScr para inducir la dimerización de IRF3 en células HEK293T-STING. La magnitud de la inducción de IFN β por GASc fue comparable a la inducida por MAVS (una proteína adaptadora que funciona aguas abajo del sensor de ARN RIG-I) y fue varias órdenes más altas que las inducidas por otros sensores de ADN supuestos, incluyendo DAI, IFI16 y DDX41. Para determinar si la sobreexpresión de GASc y otros supuestos sensores de ADN conducían a la producción de GAMPc en las células, los sobrenadantes de los extractos celulares tratados térmicamente se incubaron con células Raw264.7 permeabilizadas con PFO, seguido de la medición de la dimerización de IRF3. Entre todas las proteínas expresadas en células HEK293T-STING, solo el GASc fue capaz de producir la actividad de GAMPc en las células.
 20

Para probar si GASc podía sintetizar GAMPc *in vitro*, los investigadores purificaron las proteínas Flag-GASc de tipo silvestre (WT) y mutantes de células HEK293T transfectadas. GAScr WT y GASch, pero no los mutantes catalíticamente inactivos de GASc, fueron capaces de producir la actividad de GAMPc, que estimuló la dimerización de IRF3 en células Raw264.7 permeabilizadas. Curiosamente, las actividades *in vitro* de GAScr y GASch dependían de la presencia de ADN-TA. Para probar si el ADN potencia la inducción de IFN β por GASc en células, se transfectaron diferentes cantidades de plásmido de expresión de GASc con o sin ADN TA en células HEK293T-STING. ADN-TA potenció significativamente la inducción de IFN β mediante dosis bajas (10 y 50 ng) pero no altas (200 ng) de plásmido GASc. A diferencia de GASc, IFI16 y DDX41 no indujeron IFN β incluso cuando ADN-TA se transfectó conjuntamente.
 25

Se requiere GASc para la inducción de IFN β por transfección de ADN e infección por el virus de ADN. Los investigadores usaron dos pares diferentes de ARNip para destruir GAScr en células L929, y descubrieron que los dos ARNip oligos inhibían significativamente la inducción de IFN β por ADN-TA, y que el grado de inhibición se correlacionaba con la eficiencia para destruir GAScr ARN. Los investigadores también establecieron dos líneas celulares L929 que expresan de forma estable secuencias de ARNhc dirigidas a distintas regiones de GAScr. La capacidad de estas células para inducir IFN β en respuesta a ADN-TA se vio gravemente comprometida en comparación con otra línea celular que expresa un ARNhc de control (GFP). Curiosamente, la expresión de GASc en las células L929-GASchc restauró la inducción de IFN β . La expresión de STING o MAVS en células L929-GASchc o la entrega de GAMPc a estas células también indujo IFN β . A diferencia, la expresión de GASc o la entrega de GAMPc no indujo IFN β en células L929-STINGhc, mientras que la expresión de STING o MAVS restableció la inducción de IFN β en estas células. Los análisis cuantitativos de RT-PCR confirmaron la especificidad y la eficiencia de destruir GASc y STING en las líneas celulares L929 que expresan de forma estable los ARNhc correspondientes. Estos resultados indican que GASc funciona aguas arriba de STING y se requiere para la inducción de IFN β por ADN citosólico.
 30

El virus del herpes simple 1 (HSV-1) es un virus de ADN que se sabe que induce IFN a través de la activación de STING e IRF3 (3). Curiosamente, el RNAhc contra GAScr, pero no GFP, en células L929 inhibió fuertemente la dimerización de IRF3 inducida por la infección por HSV-1. A diferencia, la eliminación de GASc no afectó la activación de IRF3 por el virus *Sendai*, un virus ARN. Para determinar si se requiere GASc para la generación de GAMPc en células, los investigadores transfectaron ADN-TA en L929-GFPhc y L929-GAShcc o infectaron estas células con HSV-1, luego prepararon fracciones resistentes al calor que contenían GAMPc, que fue posteriormente entregado a las células Raw264.7 permeabilizadas para medir la activación de IRF3. La caída de GASc suprimió en gran parte la actividad de GAMPc generada por transfección de ADN o infección por HSV-1. La espectrometría de masas cuantitativa usando monitorización de reacción selectiva (SRM) mostró que la abundancia de GAMPc inducida por transfección de ADN o infección por HSV-1 se reducía notablemente en células L929 agotadas de GASc. En conjunto, estos resultados demuestran que GASc es esencial en la producción de GAMPc y la activación de IRF3 en respuesta a la transfección de ADN o infección por HSV-1.
 35

Para determinar si GASc es importante en la vía de detección de ADN en células humanas, los investigadores establecieron una línea celular THP1 que expresa de forma estable un ARNhc dirigido a GASch. La caída de GASch inhibió fuertemente la inducción de IFN β por transfección de ADN-TA o infección por virus *vaccinia*, otro virus de
 40

DNA, pero no virus *Sendai*. La caída de GASch también inhibió la dimerización de IRF3 inducida por la infección por HSV-1 en células THP1. Este resultado se confirmó adicionalmente en otra línea celular THP1 que expresa un ARNhc dirigido a una región diferente de GASch. Los efectos fuertes y específicos de múltiples secuencias de ARNhc de GASc en la inhibición de la activación de IRF3 inducida por ADN y la inducción de IFN β en líneas celulares de ratón y humanas demuestran un papel clave de GASc en la vía de detección de ADN dependiente de STING.

La proteína GASc recombinante cataliza la síntesis de GAMPC a partir de ATP y GTP de una manera dependiente del ADN.

Para probar si GASc es suficiente para catalizar la síntesis de GAMPC, los investigadores expresaron GASch etiquetada con FLAG en células HEK293T y la purificaron a homogeneidad aparente. En presencia de ADN-TA, la proteína GASc purificada catalizó la producción de actividad de GAMPC, que estimuló la dimerización de IRF3 en células Raw264.7 permeabilizadas. El tratamiento con DNasa-I suprimió esta actividad. La actividad de GASc también fue estimulada por otro ADN, incluyendo poli(dA:dT), poli(dG:dC) e ISD, pero no el ARN poli(l:C). La síntesis de GAMPC por GASc requería ATP y GTP, pero no CTP o UTP. Estos resultados indican que la actividad ciclase de la proteína GASc purificada fue estimulada por ADN pero no por ARN.

Los investigadores también expresaron GAScr en *E. coli* como una proteína de fusión SUMO. Después de la purificación, la Sumo-GAScr generó la actividad de GAMPC de una manera dependiente de ADN. Sin embargo, después de que la etiqueta SUMO fue eliminada por una proteasa de Sumo, la proteína GAScr catalizó la síntesis de GAMPC de una manera independiente del ADN. La razón de esta pérdida de dependencia del ADN no está clara, pero podría deberse a algunos cambios conformacionales después de la eliminación de sumo. Los experimentos de valoración mostraron que menos de 1 nM de la proteína GASc recombinante condujo a la dimerización de IRF3 detectable, mientras que el mutante catalíticamente inactivo de GASc no logró activar IRF3 incluso a altas concentraciones. Para probar formalmente que el GASc cataliza la síntesis de GAMPC, los productos de reacción se analizaron mediante nano-LC-MS usando SRM. Se detectó GAMPC en una reacción de 60 minutos que contenía GASs, ATP y GTP purificados. La identidad de GAMPC se confirmó adicionalmente mediante fragmentación iónica usando disociación inducida por colisión (CID). El patrón de fragmentación de GAMPC sintetizado por GASc purificado reveló iones de producto cuyos valores m/z coincidían con los de GAMPC químicamente sintetizado. En conjunto, estos resultados demuestran que el GASc purificado cataliza la síntesis de GAMPC a partir de ATP y GTP.

GASc se une al ADN. La estimulación de la actividad de GASc por ADN indica que GASc es un sensor de ADN. De hecho, GST-GAScr y GST-GASch, pero no GST-extremo N de RIG-I [RIG-I(N)], se precipitaron mediante ISD biotinilado. A diferencia, el ARN biotinilado no se unió a GASc. Los análisis de delección mostraron que el fragmento GASch N-terminal que contiene los restos 1-212, pero no el fragmento C-terminal 213-522, se unió a ISD. Un fragmento C-terminal más largo que contiene los restos 161-522 se unió a ISD, lo que indica que la secuencia 161-212 puede ser importante para la unión al ADN. Sin embargo, la delección de los restos 161-212 de GASch no alteró significativamente la unión a ISD, lo que indica que GASc contiene otro dominio de unión a ADN en el extremo N. De hecho, el fragmento N-terminal que contiene los restos 1-160 también se une a ISD. Por tanto, GASc puede contener dos dominios de unión al ADN separados en el extremo N. No obstante, está claro que el extremo N de GASch que contiene los restos 1-212 es necesario y suficiente para unirse al ADN.

Diferentes mutantes de delección de GASch se sobreexpresaron en células HEK293T-STING para determinar su capacidad para activar IRF3 e inducir IFN β y el factor de necrosis tumoral citoquina α (TNF α). El fragmento de proteína 1-382, que carece de los 140 restos C-terminales que incluyen gran parte del dominio Mab21, no indujo IFN β o TNF α o activó IRF3, lo que indica que un dominio Mab21 intacto es importante para la función de GASc. Tal como se esperaba, la delección de los 212 restos N-terminales (fragmento 213-522), que incluyen parte del dominio NTasa, suprimió la actividad de GASc. Una delección interna de solo cuatro aminoácidos (KLKL, Δ 171-174) dentro de la primera hélice del pliegue de NTasa que precede a los restos catalíticos también destruyó la actividad de GASc. Curiosamente, la delección de los 160 restos N-terminales no afectó la activación de IRF3 o la inducción de citoquinas por GASc. El ensayo *In vitro* mostró que este fragmento de proteína (161-522) todavía activaba la vía de IRF3 de una manera dependiente de ADN. Por tanto, los 160 aminoácidos N-terminales de GASch, cuya secuencia primaria no está altamente conservada evolutivamente, parece ser en gran medida prescindible para la unión al ADN y la catálisis por GASc. A diferencia, los dominios NTasa y Mab21 son importantes para la actividad de GASc.

El GASc se localiza predominantemente en el citosol. Para determinar si GASc es un sensor de ADN citosólico, los investigadores prepararon extractos citosólicos y nucleares de células THP1 y analizaron la localización de GASch endógeno mediante inmunotransferencia. Se detectó GASch en los extractos citosólicos, pero apenas detectable en los extractos nucleares. Los extractos de THP1 se sometieron adicionalmente a centrifugación diferencial para separar los orgánulos subcelulares entre sí y del citosol. Se detectaron cantidades similares de GASch en S100 y P100 (sedimento después de una centrifugación de 100.000 xg), lo que indica que esta proteína es soluble en el citoplasma, pero una fracción significativa de la proteína está asociada con vesículas u orgánulos ligeros. La proteína GASc no se detectó en P5, que contenía mitocondrias y ER como se prueba por la presencia de VDAC y STING, respectivamente. GASc tampoco fue detectable en P20, que contenía predominantemente ER y vesículas pesadas.

Los investigadores también examinaron la localización de GASc mediante microscopía de inmunofluorescencia

confocal usando células L929 que expresan de forma estable Flag-GASc. La proteína GASc se distribuyó por todo el citoplasma, pero también se pudo observar en la región nuclear o peri-nuclear. Curiosamente, después de que las células se transfectaron con ISD etiquetado con Cy3 durante 2 o 4 horas, se observaron formas punteadas de GASc y se solaparon con la fluorescencia del ADN. Dicha co-localización y aparente agregación de GASc y Cy3-ISD se observó en más del 50 % de las células bajo observación. Estos resultados, junto con la prueba bioquímica de unión directa de GASc con ADN, indican que GASc se une al ADN en el citoplasma.

Análisis. En este ejemplo, los investigadores desarrollaron una estrategia que combinaba la espectrometría de masas cuantitativa con la purificación de proteínas convencional para identificar proteínas biológicamente activas que se purificaron parcialmente a partir de extractos de células brutas. Esta estrategia es generalmente aplicable a proteínas que son difíciles de purificar a homogeneidad debido a muy poca abundancia, actividad lábil o materiales de partida escasos. Como prueba de principio, los investigadores usaron esta estrategia para identificar la proteína E330016A19 de ratón como la enzima que sintetiza GAMPc. Este descubrimiento condujo a la identificación de una gran familia de GASc que se conserva de peces a humanos, lo que demuestra formalmente que los animales vertebrados contienen enzimas evolutivamente conservadas que sintetizan dinucleótidos cíclicos, que se encontraban previamente solo en bacterias, arqueas y protozoos (11-13). *Vibrio cholera* puede sintetizar GAMPc a través de su ciclasa DncV (VC0179), que contiene un dominio de NTasa, pero carece de una homología de secuencia primaria significativa con el GASc de mamífero (12).

Los resultados de los investigadores no solo demuestran que el GASc es un sensor de ADN citosólico que desencadena la vía del interferón tipo I, sino que también revela un novedoso mecanismo de señalización inmunitaria en el que el GASc genera el segundo mensajero GAMPc, que se une y activa STING (4), desencadenando así la producción de interferón tipo I. El despliegue de GASc como un sensor de ADN citosólico amplía enormemente el repertorio de microorganismos detectados por el sistema inmunitario del huésped. En principio, todos los microorganismos que pueden transportar ADN al citoplasma del huésped, como virus ADN, bacterias, parásitos (*p. ej.*, malaria) y retrovirus (*p. ej.*, VIH), podrían desencadenar la vía GASc-STING (14, 15). La síntesis enzimática de GAMPc por GASc proporciona un mecanismo de amplificación de señal para una respuesta inmunológica robusta y sensible. Sin embargo, la detección de ADN propio en el citoplasma del huésped por GASc también puede conducir a enfermedades autoinmunitarias, como el lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjögren y el síndrome de Aicardi-Goutières (16-18).

Se ha indicado que varios sensores más de ADN, como DAI, IFI16 y DDX41, inducen interferones de tipo I (19-21). La sobreexpresión de DAI, IFI16 o DDX41 no condujo a la producción de GAMPc. Los investigadores también encontraron que la caída de DDX41 y p204 (un homólogo de ratón de IFI16) por ARNip no inhibía la generación de actividad de GAMPc en células L929 transfectadas con ADN-TA. A diferencia de otros sensores de ADN supuestos y la mayoría de los receptores de reconocimiento de patrones (*p. ej.*, TLR), GASc es una ciclasa que es responsable de la inhibición por compuestos de moléculas pequeñas, que proporcionan agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias humanas.

40 Referencias y notas

1. LA O'Neill, el ADN hace que el ARN produzca inmunidad innata. *Cell* 138, 428 (7 de agosto de 2009).
2. GN Barber, vías inmunitarias innatas del ADN citoplásmico. *Immunological reviews* 243, 99 (septiembre de 2011).
3. SE Keating, M. Baran, AG Bowie, Sensores de ADN citosólico que regulan la inducción de interferón tipo I. *Trends in immunology* 32, 574 (diciembre de 2011).
4. J. Wu y col., GMP-AMP cíclico es un segundo mensajero endógeno en la señalización inmunológica innata por ADN citosólico. *Science*, (2012).
5. J. Cox, M. Mann, MaxQuant permite altas velocidades de identificación de péptidos, precisiones de masa de intervalo ppb individualizado y cuantificación proteica de proteínas de amplio proteoma. *Nat Biotechnol* (26) 1367 (diciembre de 2008).
6. K. Kuchta, L. Knizewski, LS Wyrwicz, L. Rychlewski, K. Ginalski, Clasificación global de las proteínas plegadas de nucleotidiltransferasa: identificación de familias novedosas y sus representantes en seres humanos. *Nucleic Acids Res* 37, 7701 (diciembre de 2009).
7. KL Chow, DH Hall, SW Emmons, El gen mab-21 de *Caenorhabditis elegans* codifica una novedosa proteína requerida para la elección de destinos celulares alternativos. *Development* 121, 3615 (noviembre de 1995).
8. J. Pei, BH Kim, NV Grishin, PROMALS3D: una herramienta para múltiples secuencias de proteínas y alineamientos de estructura. *Nucleic Acids Res* 36, 2295 (abril de 2008).
9. JW Schoggins y col., Una gama diversa de productos génicos son efectores de la respuesta antiviral de interferón tipo I. *Nature* 472, 481 (28 de abril de 2011).
10. YH Chiu, JB Macmillan, ZJ Chen, La ARN polimerasa III detecta ADN citosólico e induce interferones tipo I a través de la vía RIG-I. *Cell* 138, 576 (7 de agosto de 2009).
11. C. Pesavento, R. Hengge, Segundos mensajeros a base de nucleótidos bacterianos. *Curr Opin Microbiol* 12, 170 (abril de 2009).
12. BW Davies, RW Bogard, TS Young, JJ Mekalanos, La regulación coordinada de los elementos genéticos accesorios produce di nucleótidos cíclicos para la virulencia de *V. cholerae*. *Cell* 149, 358 (13 de abril de 2012).

13. ZH Chen, P. Schaap, El mensajero procariota di-GMPc desencadena la diferenciación de células de tallo en *Dictyostelium*. *Nature* 488, 680 (30 de agosto de 2012).
14. S. Sharma y col., Reconocimiento inmunológico innato de un motivo de ADN de bucle de tallo rico en AT en el genoma de *Plasmodium falciparum*. *Immunity* 35, 194 (26 de agosto de 2011).
- 5 15. N. Yan, ZJ Chen, Inmunidad antiviral intrínseca. *Nat Immunol* 13, 214 (2012).
16. V. Pascual, L. Farkas, J. Banchereau, Lupus eritematoso sistémico: todos los caminos conducen a interferones tipo I. *Current opinion in immunology* 18, 676 (diciembre de 2006).
17. Y. Yao, Z. Liu, B. Jallal, N. Shen, L. Ronnblom, Interferones Tipo I en el Síndrome de Sjögren. *Autoimmunity reviews*, (29 de noviembre de 2012).
- 10 18. RE Rigby, A. Leitch, AP Jackson, Enfermedades inflamatorias mediadas por ácidos nucleicos. *Bioessays* 30, 833 (septiembre de 2008).
19. A. Takaoka y col., DAI (DLM-1 / ZBP1) es un sensor de ADN citosólico y un activador de la respuesta inmunológica innata. *Nature* 448, 501 (26 de julio de 2007).
- 15 20. L. Unterholzner y col., IFI16 es un sensor inmunológico innato para el ADN intracelular. *Nature immunology* 11, 997 (noviembre de 2010).
21. Z. Zhang y col., La helicasa DDX41 detecta el ADN intracelular mediado por el adaptador STING en células dendríticas. *Nature immunology* 12, 959 (octubre de 2011).
22. Los números de acceso de GenBank para secuencias GASc humanas y de ratón son KC294566 y KC294567.

Ejemplo 3. GMP-AMP cíclico que contiene enlaces mixtos de fosfodiéster es un ligando endógeno de afinidad alta para STING

La detección inmunológica innata de infecciones microbianas está mediada por receptores de reconocimiento de patrones codificados en línea germinal que incluyen proteínas de membrana tales como receptores de tipo Toll (TLR) y proteínas citosólicas tales como receptores tipo NOD (NLR) y receptores tipo RIG-I (RLR) (Iwasaki y Medzhitov, 2010; Ronald y Beutler, 2010; Takeuchi y Akira, 2010). Como prácticamente todos los microorganismos infecciosos contienen y necesitan ácidos nucleicos en sus ciclos de vida, el sistema inmunitario innato ha evolucionado para reconocer el ADN y el ARN microbianos como una estrategia central de defensa del huésped. Específicamente, varios TLR están localizados en la membrana endosomal para detectar ARN o ADN en el lumen de los endosomas, mientras que los RLR son responsables de detectar el ARN viral y bacteriano en el citoplasma.

Se sabe que el ADN es una molécula inmunoestimuladora durante más de un siglo, pero hasta hace poco no se había investigado exhaustivamente cómo el ADN activa el sistema inmunitario del huésped (O'Neill, 2013). El ADN en el endosoma es detectado por TLR9, que luego desencadena la producción de interferones de tipo I y citoquinas inflamatorias. Cuando el ADN microbiano o del huésped se entrega al citoplasma, también puede inducir interferones de tipo I a través de la proteína de membrana STING del retículo endoplásmico (también conocida como MITA, ERIS o MPYS) (Barber, 2011). STING funciona como una proteína adaptadora que recluta y activa las proteínas quinasas IKK y TBK1, que a su vez activan los factores de transcripción NF- κ B e IRF3 para inducir interferones y otras citoquinas.

Recientemente los investigadores identificaron la GMP-AMP sintasa cíclica (GASs) como un sensor de ADN que activa STING (Sun y col., 2013; Wu y col., 2013). Específicamente, los investigadores encontraron que el GASs cataliza la síntesis de GMP-AMP cíclico (GAMPc) a partir de ATP y GTP en presencia de ADN. GAMPc luego funciona como un segundo mensajero que se une y activa STING. Si bien estos estudios demuestran claramente que GAMPc es un segundo mensajero endógeno producido por GASc en células de mamíferos, la naturaleza exacta de los enlaces fosfodiéster internos entre GMP y AMP en GAMPc no se determinó en parte porque la espectrometría de masas sola no podía distinguir inequívocamente estos enlaces sin la disponibilidad de todos los isómeros de GAMPc como referencia convencional. Aunque el GAMPc químicamente sintetizado que contiene enlaces 3'-5' homogéneos es capaz de inducir IFN β , sigue siendo posible que GAMPc que contiene otros enlaces fosfodiéster también pueda activar la vía de STING.

En este estudio, los investigadores investigaron aún más la estructura de GAMPc a través de una combinación de técnicas químicas y biofísicas. Los investigadores encontraron que GAMPc producido por GASc contiene un enlace fosfodiéster entre 2'-OH de GMP y 5'-fosfato de AMP y otro entre 3'-OH de AMP y 5'-fosfato de GMP. Además, los investigadores demostraron que esta molécula, denominada en el presente documento 2'3'-GAMPc, se produjo en células de mamífero en respuesta a ADN en el citoplasma. Además, los investigadores demostraron que 2'3'-GAMPc se une a STING con una alta afinidad y es un potente inductor de interferón- β (IFN β). Los investigadores también resolvieron la estructura cristalina de STING unido al producto GASc y observaron interacciones extensas entre 2'3'-GAMPc y STING, que proporcionan la base estructural para su unión específica y de alta afinidad. Curiosamente, la estructura del complejo STING-GAMPc reveló que este ligando natural induce reordenamientos conformacionales en STING subyacentes a su activación.

El producto de GASc es GMP-AMP cíclico que contiene enlaces fosfodiéster mezclados

Se sabe que los enlaces 2'-5' y 3'-5' fosfodiéster entre los nucleótidos existen en la naturaleza, mientras que el

enlace 2'-5' es menos común. Los enlaces fosfodiéster interno del GAMPc natural producido por GASc aún no se han determinado. Por lo tanto, los investigadores sintetizaron químicamente moléculas de GAMPc que contienen los cuatro posibles enlaces fosfodiéster (Tabla S1). La síntesis química de las isoformas de GAMPc se realizó usando procedimientos modificados a partir de los métodos publicados (Gaffney y col., *et al.*, 2010; Zhang y col., 2006). Por simplicidad, denominaron a estas moléculas de GAMPc de acuerdo con la posición OH de GMP seguida de la posición OH de AMP que forman los enlaces fosfodiéster; por ejemplo, 2'3'-GAMPc contiene un enlace fosfodiéster entre 2'-OH de GMP y 5'-fosfato de AMP y otro entre 3'-OH de AMP y 5'-fosfato de GMP. También usaron la proteína GASc purificada para sintetizar enzimáticamente el GAMPc natural a partir de ATP y GTP en presencia de ADN (Sun y col., 2013). El producto de GAPc purificado y los isómeros de GAMPc sintéticos se analizaron por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR). Sorprendentemente, el espectro de NMR ^1H del producto GASc fue idéntico al del 2'3'-GAMPc sintético, pero distinto de los de otros isómeros de GAMPc. En particular, el protón anomérico (H1') era un singlete con un 3'-fosfato y un doblete con 2'-fosfato. Sistemáticamente, solo los fosfatos de 2',3'-GAMPc tenían los mismos cambios químicos de RMN ^{31}P que los de GAMPc natural. Los investigadores también realizaron análisis de espectrometría de masas del GAMPc natural y sintético usando Q-Exact, un instrumento con alta resolución y precisión de masa. La masa total de cada una de estas moléculas cargadas individualmente ($[\text{M}+\text{H}]^+$) fue de 675,107, que coincidía exactamente con la masa teórica de GAMPc. Los espectros de masa en tándem (MS/MS) del producto GASc, que se fragmentó usando una disociación por colisión de energía más alta (HCD), fueron idénticos a los del 2'3'-GAMPc sintético, y similares pero no idénticos a los de 2'2'-GAMPc y 3'3'-GAMPc. Los espectros de MS/MS de 3'2'-GAMPc parecían ser más distintos de los de 2'3'-GAMPc y el producto GASc. El análisis de HPLC de fase inversa mostró que GAMPc natural eluyó conjuntamente con 2'3'-GAMPc, pero no con otras moléculas de GAMPc. Los investigadores también determinaron la configuración del producto GASc por dicroísmo circular (CD), lo que confirma que procede de D-ribosa. El espectro CD del GAMPc natural se superpone bien con el de 2'3'-GAMPc. Los espectros de CD cerca de UV indican que los cuatro GAMPc adoptan conformaciones significativamente diferentes, con 2'3' y 2'2'-GAMPc formando un patrón de banda de CD distinto de los de 3'2'- y 3'3'-GAMPc. En conjunto, estos resultados proporcionan la prueba definitiva de que GASc sintetiza 2'3'-GAMPc *in vitro*.

El GAMPc endógeno producido en células transfectadas con ADN contiene enlaces fosfodiéster mezclados

Para probar si las células de mamíferos podían producir GAMPc endógeno que contiene los enlaces fosfodiéster mezclados, los investigadores transfectaron la línea celular de ratón L929 y monocitos humanos THP1 con ADN de testículo de arenque (ADN-TA), luego los lisados celulares se calentaron a 95 °C para desnaturalizar proteínas y los sobrenadantes se prepararon para el análisis de GAMPc endógeno por espectrometría de masas (Wu y col., 2013). Los espectros MS/MS de la molécula endógena de ambas líneas celulares fueron idénticos a los del producto GASc y 2'3'-GAMPc, lo que indica que el segundo mensajero endógeno es 2'3'-GAMPc.

2'3'-GAMPc es un ligando de alta afinidad para STING

Los investigadores realizaron experimentos de calorimetría de titulación isotérmica para medir la afinidad (K_d) de la unión de STING a GAMPc sintético. Un dominio C terminal (CTD) que abarca los restos 139-379 de STING humano, que se mostró previamente que actúa como mediador en la unión al di-GMP cíclico del segundo mensajero bacteriano (Burdette y col., 2011; Huang y col., 2012; Ouyang y col., 2012; Shang y col., 2012; Shu y col., 2012; Yin y col., 2012), se expresó en *E. coli* y se purificó a homogeneidad aparente para el experimento ITC. Consecuente con informes previos, los investigadores encontraron que di-GMPc se unía a STING con una K_d de 1,21 μM . Curiosamente, el GAMPc natural y el 2'3'-GAMPc sintético se unieron a STING con una afinidad tan alta que el ajuste de la curva fue difícil. Además, a diferencia de la unión de di-GMPc, que es un proceso exotérmico, la unión de 2'3'-GAMPc natural a STING fue endotérmica, lo que sugiere que la energía puede usarse para el cambio conformacional de STING (véase más adelante). Para obtener la K_d de 2'3'-GAMPc natural y sintético para STING, los investigadores titularon diferentes cantidades de estos compuestos como competidores en el complejo STING-di-GMPc. Estas mediciones produjeron una K_d de 4,59 nM para el producto GASc y 3,79 nM para 2'3'-GAMPc. El experimento de competición también se realizó para 3'2'-GAMPc, debido a que su unión a STING generó poco cambio de calor. Este compuesto se une a STING con una K_d de 1,61 μM . 2'2' y 3'3'-GAMPc se titularon directamente a STING y los valores de K_d que se calcularon fueron de 287 nM y 1,04 μM , respectivamente. Por tanto, la K_d de 2'3'-GAMPc fue ~300 veces menor que las de di-GMPc, 3'2'-GAMPc y 3'3'-GAMPc, y ~75 veces menor que la de 2'2'-GAMPc.

Los GAMPc son potente inductores de interferones de tipo I

Los investigadores entregaron diferentes cantidades de los isómeros de GAMPc, así como di-GMPc en células L929 y midieron la inducción de IFN β por RT-PCR. Las moléculas GAMPc indujeron IFN β con una EC_{50} que oscilaba entre 15 nM y 42 nM, mientras que di-GMPc tenía una EC_{50} de más de 500 nM. Por tanto, parecía que la afinidad de unión de diferentes dinucleótidos cíclicos no se correlacionaba bien con su EC_{50} en los ensayos basados en células. La razón de esto no está clara, pero es posible que diferentes compuestos tengan una estabilidad o distribución diferente en las células. No obstante, estos experimentos proporcionan la prueba directa de que el producto GASc, 2'3'-GAMPc, es un ligando de alta afinidad para STING (K_d : ~4 nM) y un potente inductor de IFN β en células (EC_{50} : ~20 nM).

La estructura cristalina del complejo STING-GAMPC revela reordenamientos conformacionales inducidos por ligando de STING

Los investigadores cristalizaron conjuntamente el dominio STING C-terminal (CTD) (restos 139-379) con el producto GASc purificado en el grupo espacial C2. La estructura del complejo se resolvió mediante reemplazo molecular usando una estructura apo-STING (código PDB: 4F9E) como modelo de búsqueda y se refinó a una resolución de 1,88 Å (Tabla M1). Hay un protómero STING en la unidad asimétrica cristalográfica, que forma un dímero en forma de mariposa con otro protómero que se relaciona mediante la simetría cristalográfica doble. La molécula de GAMPC unida se encuentra en el eje doble (véase los detalles a continuación). La región ordenada de STING (de Asn152 a Glu336) adopta una estructura global similar a la apo-STING, caracterizada por una lámina β trenzada central rodeada por cuatro hélices α . Sin embargo, STING en el complejo con GAMPC muestra varias diferencias sorprendentes de apo-STING tanto en la estructura del monómero como en la disposición del dímero. En comparación con el apo-dímero, los dos protómeros en el dímero de la estructura compleja experimentan rotaciones sustanciales hacia adentro en relación con el sitio de unión a GAMPC. Esta disposición más cerrada crea un bolsillo más profundo entre los dos protómeros para abarcar GAMPC. Además, el sitio de unión a GAMPC está cubierto por una tapa de lámina β antiparalela de cuatro cadenas y los bucles de conexión formados por los restos 219-249 de cada uno de los dos protómeros. A diferencia, este segmento en la estructura apo está en gran parte desordenado (Ouyang y col., 2012; Yin y col., 2012). La formación de la lámina β no se debe a un empaquetamiento cristalográfico. Las interacciones entre dominios dentro de la tapa involucran varios pares de contactos polares, entre el grupo lateral de Tyr245 y el átomo de oxígeno del carbonilo de la cadena principal de Gly234, el grupo lateral de Ser243 y el átomo de nitrógeno de la amida de la cadena principal de Lys236, así como los grupos laterales de Asp237 y Lys224.

Las interacciones extensas entre 2'3'-GAMPC y STING subyacen en su unión específica y de alta afinidad

Dado que el eje doble cristalográfico pasa a través de la molécula asimétrica 2'3'-GAMPC, GAMPC debe adoptar dos orientaciones relacionadas por la simetría doble. Esto es consecuente con el hecho de que se espera que los dos protómeros en el dímero STING tengan las mismas probabilidades de interactuar con la guanidina o el resto adenosina. Por lo tanto los investigadores asignaron dos conformaciones alternativas con la ocupación de 0,5 para GAMPC y varios restos de aminoácidos circundantes. El mapa omit de recocido simulado de la estructura refinada muestra una densidad decente para GAMPC. 2'3'-GAMPC, pero no otras isoformas, y se ajusta bien al mapa de densidad electrónica. En comparación con di-GMPc unido a STING, GAMPC se encuentra ~2,5 Å más profundo en la grieta entre la interfaz dimerica STING. Además, las dos alas de la mariposa están ~20 Å más cerca la una de la otra en el STING: estructura GAMPC debido a la disposición más cerrada de los dos protómeros STING. Los análisis adicionales del bolsillo de unión a GAMPC muestran que GAMPC está bien coordinado por interacciones extensas polares e hidrofóbicas. Los anillos de grupos de base de purina GAMPC se apilan contra cuatro restos aromáticos de alrededor, Tyr 240 y Tyr167 de cada uno de los dos protómeros. De forma destacable, los dos grupos α -fosfato de GAMPC ponen en contacto Arg238 de los dos protómeros y Arg232 de un protómero. El 3'-OH libre de GMP apunta a dos restos de Ser162 de la parte inferior del bolsillo. La base de guanina interactúa directamente con los grupos laterales de Glu260 y Thr263, así como también con el oxígeno del carbonilo de la cadena principal de Val239. Estos contactos polares particulares explican por qué 2'3'-GAMPC es un ligando específico y de alta afinidad para STING. Además, es probable que los restos de la lámina β (Arg232, Arg238, Val239)m que están involucrados en la unión a GAMPC, controlen la formación de la tapa y la activación dimerica de STING.

La arginina 232 de STING es importante para la vía de señalización de ADN citosólico

Tres informes previos de las estructuras cristalinas de STING unidas a di-GMP cíclico usaron una variante humana rara que sustituye Arg232 por una histidina (Ouyang y col., 2012; Shu y col., 2012; Yin y col., 2012). La secuenciación extensa de ADN de poblaciones humanas ha demostrado que el alelo Arg232 es prevalente y, por tanto, debe considerarse STING de tipo salvaje (Jin y col., 2011). El uso de la variante H232 de STING puede explicar por qué di-GMPc no indujo un cambio conformacional significativo de STING en estos estudios (Ouyang y col., 2012; Shu y col., 2012; Yin y col., 2012). Un informe anterior mostró que una mutación de Arg231 de STING de ratón (equivalente a Arg232 en STING humano) a alanina suprimió la inducción de IFN β por di-GMP cíclica, pero no del ADN (Burdette y col., 2011). Sin embargo, basándose en la estructura cristalina del complejo STING-GAMPC de los investigadores, se espera que una mutación de Arg232 a histidina debilite significativamente la unión de GAMPC y la señalización aguas abajo por STING, y una mutación de Arg232 a alanina debería ser aún más perjudicial. Por lo tanto, los investigadores investigaron la función de Arg232 de STING en dos grupos de experimentos. En primer lugar, los investigadores destruyeron STING endógeno por RNAi en células L929 y lo reemplazaron por WT, R232A o R232H de STING humano. Estas líneas celulares estables se transfectaron con ADN-TA o se trataron con 2'3'-GAMPC, seguido de la medición de IFN β por RT-PCRc. Las células que expresaban STING WT fueron capaces de inducir IFN β en respuesta a la estimulación de ADN o GAMPC, mientras que las que expresaban R232A o R232H eran defectuosas. Como control, el análogo de ARN bicatenario poli[I:C] estimuló la expresión de IFN β en todas estas líneas celulares. En segundo lugar, los investigadores expresaron de forma estable STING WT o mutante en células HEK293T, que tienen expresión indetectable de STING endógeno y GASc (Sun y col., 2013). Las células se transfectaron luego con el plásmido de expresión de GASc humano seguido de medición de ARN de IFN β . STING WT, pero no el mutante R232A, pudo soportar la inducción de IFN β por GASc. El mutante R232H fue parcialmente

defectuoso, posiblemente porque la histidina cargada positivamente puede sustituir débilmente algunas de las funciones de Arg232. MAVS, una proteína adaptadora esencial de la vía RIG-I (Seth y col., 2005), fue capaz de inducir IFN β en todas estas líneas celulares. En conjunto, los datos estructurales y funcionales de los investigadores indican fuertemente un papel importante de Arg232 en las funciones de STING y subrayan aún más el papel del GASc como un sensor de ADN citosólico indispensable.

ANÁLISIS

Los estudios previos de los investigadores identificaron GASc como un sensor de ADN citosólico y una ciclasa que sintetiza GAMPc usando ATP y GTP como sustratos (Sun y col., 2013; Wu y col., 2013). GAMPc luego funciona como un segundo mensajero que se une y activa STING. En este caso los investigadores emplean la síntesis química y varios enfoques biofísicos para caracterizar aún más los enlaces fosfodiéster internos del producto GASc y determinaron que es 2'3'-GAMPc. Posteriormente, Gao y col indicaron las estructuras de GASc en sus formas apo-y unidas al ADN, lo que confirmó que el GASc es en efecto una sintasa cíclica-GMP-AMP activada por ADN que cataliza la síntesis de GAMPc a partir de ATP y GTP (Gao y col., 2013). Este elegante estudio también dilucidó el mecanismo estructural mediante el cual la unión al ADN conduce a la activación de GASc. Usando un enfoque diferente, Gao y col., también encontraron que la proteína GASc truncada sintetiza 2'3'-GAMPc *in vitro*. Sin embargo, no probaron si 2'3'-GAMPc tiene alguna actividad biológica o bioquímica, ni tampoco demostraron si se produce 2'3'-GAMPc endógeno en células de mamífero. En este informe, los investigadores mostraron que la estimulación de células de ratón y humanas con ADN conduce a la producción de 2'3'-GAMPc endógeno. Además, los investigadores demostraron que 2'3'-GAMPc se une a STING con una afinidad mucho mayor que otros isómeros de GAMPc y di-GMPc. Además, los investigadores mostraron que 2'3'-GAMPc y otros isómeros de GAMPc son mucho más potentes que di-GMPc para inducir IFN β en las células.

Se obtienen nuevos conocimientos sobre la estructura y la función de 2'3'-GAMPc a partir de la estructura cristalina del STING CTD unido a este ligando endógeno. Esta estructura cristalina tiene una resolución de 1,88Å, lo que permite una vista detallada de la estructura del ligando, que incluye los enlaces 2'-5' y 3'-5' fosfodiéster. La estructura revela restos específicos en STING que actúan como mediadores de la unión de 2'3'-GAMPc. Además, una comparación de esta estructura con las estructuras STING CTD publicadas previamente en su forma apo revela extensos reordenamientos conformacionales inducidos por el ligando natural. Específicamente, los dos brazos del dímero STING en forma de V se mueven más cerca de aproximadamente 20 Å y una nueva lámina de cuatro cadenas β forma una tapa por encima del sitio de unión de GAMPc en la estructura de STING unida a ligando. Estas características están ausentes en las estructuras STING: di-GMPc previamente determinadas, que usaban una variante STING que contenía la mutación R232H. En estas estructuras, la unión de di-GMPc no induce ningún reordenamiento conformacional obvio en STING (Ouyang y col., 2012; Shu y col., 2012; Yin y col., 2012). Sin embargo, en otras dos estructuras que contienen el STING WT (Arg232) y di-GMPc, uno muestra cambios conformacionales similares a los observados en el complejo STING-GAMPc (Huang y col., 2012), y el otro muestra un cambio conformacional distinto en el que Arg232 está orientado de forma diferente (Shang y col., 2012). La conformación "cerrada" observada por Huang y col., puede haber capturado el estado activo de STING inducido por di-GMPc, que es capaz de activar STING, aunque de forma más débil que GAMPc.

Las interacciones extensas entre STING y 2'3'-GAMPc proporcionan la base estructural para su unión de alta afinidad. En particular, Glu260, Thr263 y Val1239 interactúan con la base de guanina de GMP y Ser162 interactúa con el grupo 3'-OH libre de GMP, lo que explica por qué GAMPc que contiene un enlace fosfodiéster entre 2'-OH de GMP y 5'-fosfato de AMP es un ligando de alta afinidad. Además, los dos grupos α -fosfato interactúan con Arg232 de un protómero y Arg238 de ambos protómeros. Este análisis estructural explica que las mutaciones R232A o R232H alteran fuertemente la función de STING en respuesta a ADN o GAMPc. Los datos de los investigadores destacan la importancia de usar STING de tipo salvaje (Arg232) en estudios estructurales y funcionales.

Aunque 2'3'-GAMPc se une a STING con una afinidad mucho más alta que los isómeros GAMPc que contienen otros enlaces fosfodiéster, los cuatro isómeros GAMPc indujeron IFN β con similares valores de EC₅₀, que eran mucho más bajos que los de di-GMPc. Por tanto, todas las isoformas de GAMPc son potentes inductores de IFN β .

En resumen, los resultados de los investigadores demuestran que 1) el segundo mensajero endógeno producido en células de mamífero en respuesta a la estimulación del ADN citosólico es 2'3'-GAMPc; 2) 2'3'-GAMPc es un ligando de alta afinidad para STING; 3) 2'3'-GAMPc es un potente inductor de IFN β en células de mamífero; 4) 2'3'-GAMPc induce reordenamientos conformacionales en STING que pueden ser la base de su activación; y 5) las interacciones extensas entre 2'3'-GAMPc y STING observadas en la estructura cristalina del complejo explican su unión específica y de alta afinidad.

Los investigadores concluyen: 2'3'-GAMPc es un segundo mensajero endógeno producido por células de mamífero; 2'3'-GAMPc es un ligando de alta afinidad para STING; 2'3'-GAMPc es un potente inductor de interferones de tipo I; y la unión de 2'3'-GAMPc induce cambios conformacionales de STING.

NÚMERO DE ACCESO

Las coordenadas de la estructura STINGCTD humana unida a 2'3'-GAMPC se han depositado en el banco de datos de proteína RCSB (PDB: 4KSY).

5

REFERENCIAS

- GUSSEI. en la World Wide Web <http://biophysicsswmededu/MBR/softwarehtml>.
- Adams, PD, Afonine, PV, Bunkoczi, G., Chen, VB, Davis, IW, Echols, N., Headd, JJ, Hung, LW, Kapral, GJ, Grosse-Kunstleve, RW, y col., (2010). PHENIX: un sistema global basado en Python para la solución de estructura macromolecular. *Acta crystallographica* 66, 213-221.
- Barber, GN (2011). vías inmunitarias innatas del ADN citoplásmico. *Immunological reviews* 243, 99-108.
- Burdette, DL, Monroe, KM, Sotelo-Troha, K., Iwig, JS, Eckert, B., Hyodo, M., Hayakawa, Y., y Vance, RE (2011). STING es un sensor inmunitario innato directo de di-GMP cíclico. *Nature* 478, 515-518.
- DeLano, WL (2002). El sistema de gráficos moleculares PyMOL. en la World Wide Web <http://www.pymol.org>.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, WG y Cowtan, K. (2010). Características y desarrollo de Coot. *Acta crystallographica* 66, 486-501.
- Gaffney, BL, Veliath, E., Zhao, J. y Jones, RA (2010). Síntesis de un matraz de di-GMPc y los análogos de [Rp, Rp] y [Rp, Sp] tiosfato. *Org Lett* 12, 3269-3271.
- Gao, P., Ascano, M., Wu, Y., Barchet, W., Gaffney, BL, Zillinger, T., Serganov, AA, Liu, Y., Jones, RA, Hartmann, G., y col., (2013). [G(2',5')pA(3',5')p] cíclico es el segundo mensajero metazoico producido por la sintasa GMP-AMP cíclica activada por ADN. *Cell*.
- Houtman, JC, Brown, PH, Bowden, B., Yamaguchi, H., Appella, E., Samelson, LE, y Schuck, P. (2007). Estudio de las interacciones multisitio binarias y ternarias de la proteína mediante el análisis global de los datos de calorimetría de titulación isotérmica en SEDPHAT: aplicación a los complejos proteicos del adaptador en la señalización celular. *Protein Sci* 16, 30-42.
- Huang, YH, Liu, Liu, XY, Du, XX, Jiang, ZF y Su, XD (2012). La base estructural para la detección y unión de di-GMP cíclico por STING. *Naturaleza estructural y biología molecular* 19, 728-730.
- Iwasaki, A., y Medzhitov, R. (2010). Regulación de la inmunidad adaptativa por el sistema inmune innato. *Science* 327, 291-295.
- Jin, L., Xu, LG, Yang, IV, Davidson, EJ, Schwartz, DA, Wurfel, MM y Cambier, JC (2011). Identificación y caracterización de una variante MPYS humana con pérdida de función. *Genes and immunity* 12, 263-269.
- Keller, S., Vargas, C., Zhao, H., Piszczek, G., Brautigam, CA, y Schuck, P. (2012). Calorimetría de titulación isotérmica de alta precisión con análisis automático en forma de pico. *Analytical chemistry* 84, 5066-5073.
- Minor, W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., y Chruszcz, M. (2006). HKL-3000: la integración de la reducción de datos y la solución de la estructura, desde imágenes de difracción hasta un modelo inicial en minutos. *Acta crystallographica* 62, 859-866.
- O'Neill, LA (2013). Inmunología. La detección del lado oscuro del ADN. *Science* 339, 763-764.
- Ouyang, S., Song, X., Wang, Y., Ru, H., Shaw, N., Jiang, Y., Niu, F., Zhu, Y., Qiu, W., Parvatiyar, K., y col., (2012). El análisis estructural de la proteína adaptadora STING revela una interfaz de dímero hidrófobo y un modo de unión di-GMP cíclico. *Immunity* 36, 1073-1086.
- Ronald, PC y Beutler, B. (2010). Sensores vegetales y animales de firmas microbianas conservadas. *Science* 330, 1061-1064.
- Seth, RB, Sun, L., Ea, CK y Chen, ZJ (2005). Identificación y caracterización de MAVS, una proteína de señalización antiviral mitocondrial que activa NF-kappaB e IRF 3. *Cell* 122, 669-682.
- Shang, G., Zhu, D., Fi, N., Zhang, J., Zhu, C., Lu, D., Liu, C., Yu, Q., Zhao, Y., Xu, S., y col., (2012). Las estructuras cristalinas de la proteína STING revelan una base para el reconocimiento de di-GMP cíclico. *Nature structural & molecular biology* 19, 725-727.
- Shu, C., Yi, G., Watts, T., Kao, CC y Li, P. (2012). La estructura de STING unido a di-GMP cíclico revela el mecanismo del reconocimiento de dinucleótidos cíclicos por el sistema inmunológico. *Nature structural & molecular biology* 19, 722-724.
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X. y Chen, ZJ (2013). La GMP-AMP sintasa cíclica es un sensor de ADN citosólico que activa la vía del interferón de tipo I. *Science* 339, 786-791.
- Takeuchi, O., y Akira, S. (2010). Receptores de reconocimiento de patrones e inflamación. *Cell* 140, 805-820.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C. y Chen, ZJ (2013). GMP-AMP cíclico es un segundo mensajero endógeno en la señalización inmunológica innata por ADN citosólico. *Science* 339, 826-830.
- Yin Q., Tian, Y., Kabaleeswaran, V., Jiang, X., Tu, D., Eck, MJ, Chen, ZJ y Wu, H. (2012). Detección di-GMP cíclica a través de la proteína de señalización inmunológica innata STING. *Molecular cell* 46, 735-745.
- Zhang, Z., Kim, S., Gaffney, BL y Jones, RA (2006). Polimorfismo de la molécula de señalización di-GMPc *J Am Chem Soc* 128, 7015-7024.

Tabla M1. Estadísticas de recopilación de datos y refinamiento de GAMPc unido a STING

Datos	GAMPc unido a STING
Grupo espacial	C2
Celda unidad (Å, °)	89,525 77,927 35,974 90 96,98 90
Número de moléculas en ASU	1
Longitud de onda (Å)	0,97918
Resolución (Å)	50-1,88 (1,91-1,88)
R _{fusión} (%)	7,8 (65,0)
I/σ	17,82 (2,20)
Completitud (%)	99,4 (98,6)
Número de reflexiones medidas	99.635
Número de reflexiones particulares	19.800
Redundancia	5,0 (4,8)
Factor B de Wilson (Å ²)	30,80
Factor R (%)	16,07 (23,09)
R _{libre} (%)	18,15 (30,83)
Número de átomos	
Macromoléculas	1483
Ligando	45
Agua	72
Todos los átomos	1600
Valor B medio (Å ²)	
Macromoléculas	46,20
Ligando	23,10
disolvente	50,00
Todos los átomos	45,70
Desviaciones de Rms de los valores ideales	
Enlaces (Å)	0,007
Ángulo (°)	1,213
Estadísticas del diagrama de Ramachandran (%)	
Favorecido	97,22
Permitido	2,78
Valores atípicos	0

5 Los valores entre paréntesis son para pantalla de alta definición. $R = \frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum F_{obs}}$, en la que F_{calc} es el factor de estructura de proteína calculado a partir del modelo atómico (R_{libre} se calculó con el 10 % de las reflexiones seleccionadas).

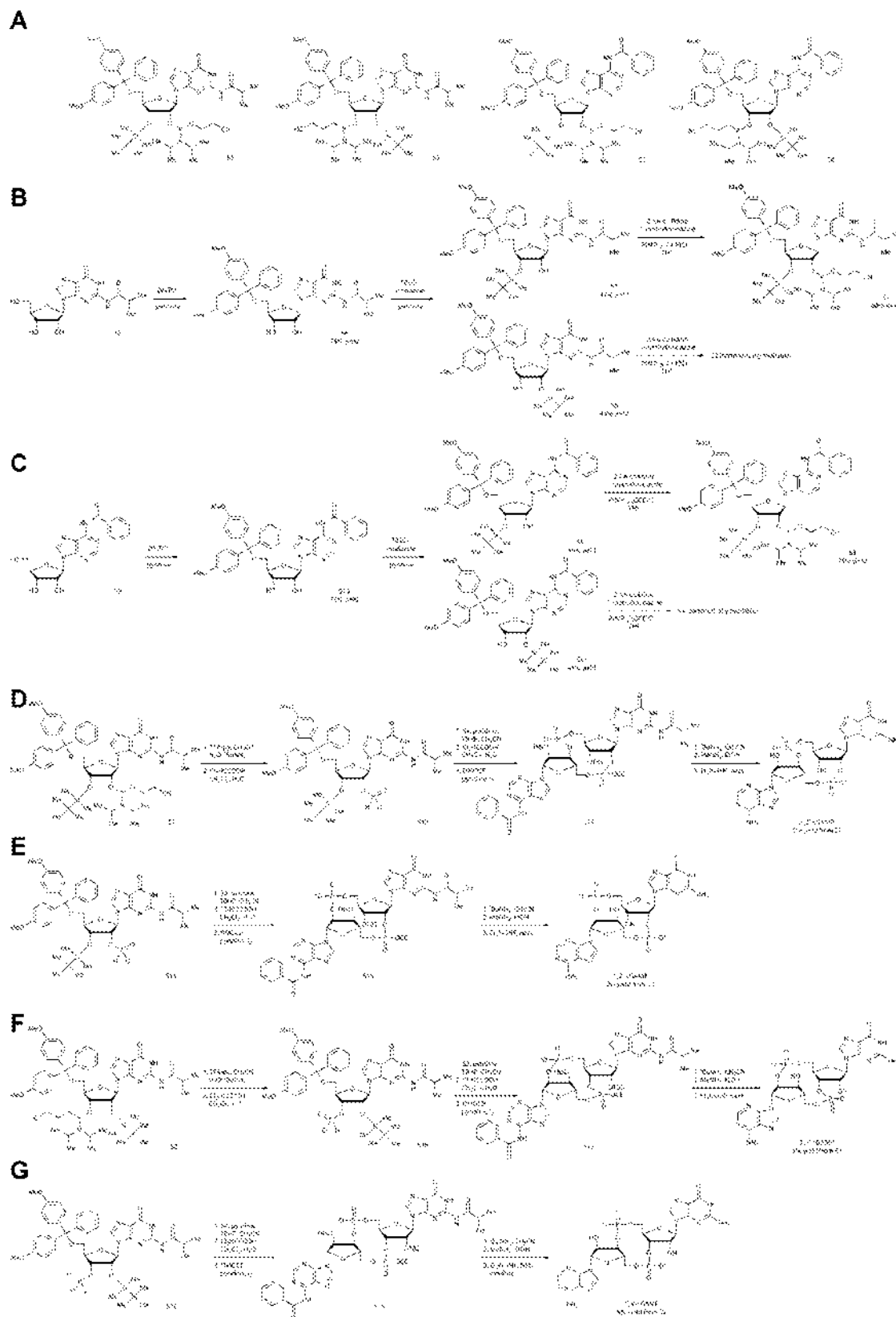


Tabla S1. Síntesis química de los GAMPc. (A) Estructura de los bloques de construcción **S1-S4**. **(B)** Síntesis del bloque de construcción **S1**. **(C)** Síntesis del bloque de construcción **S3**. **(C)** Síntesis de 2'3'-GAMPc. **(E)** Síntesis de 2'2'-GAMPc. **(F)** Síntesis de 3'2'-GAMPc. **(G)** Síntesis de 3'3'-GAMPc.

5

Ejemplo 4. La GMP-AMP sintetasa cíclica es un sensor inmunológico innato del VIH y otros retrovirus

Los retrovirus, incluido el VIH, pueden activar respuestas inmunológicas innatas, pero los sensores del huésped para los retrovirus son en gran parte desconocidos. En este caso los investigadores muestran que la infección por VIH activa la sintasa GMP-AMP cíclica (GAMPc) (GASc) para producir GAMPc, que se une y activa la proteína adaptadora STING para inducir interferones tipo I y otras citoquinas. Los inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH, pero no de la integrasa, anularon la inducción de interferón- β por el virus, lo que indica que el ADN del VIH transcrito de forma inversa desencadena la respuesta inmunológica innata. La desactivación o caída de GASc en líneas celulares de ratón o humanas bloquearon la inducción de citoquina por VIH, el virus de la leucemia murina (MLV) y el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV). Estos resultados indican que el GASc detecta el ADN retroviral y que el GASc es un sensor inmunológico innato del VIH y otros retrovirus.

Aunque se han logrado avances enormes en la comprensión del reconocimiento inmunológico innato de muchos patógenos microbianos (1-3), se sabe relativamente poco sobre las respuestas inmunológicas innatas contra las infecciones retrovirales (4). Se pensaba que los retrovirus desencadenaban respuesta inmunológicas innatas débiles o inexistentes, que normalmente se medían a través de la producción de citoquinas inflamatorias e interferones de tipo I. Sin embargo, las investigaciones recientes han demostrado que los retrovirus como el VIH pueden desencadenar respuestas inmunológicas innatas, que normalmente están enmascaradas por factores virales o del huésped (5-8). Por ejemplo, TREX1 es una exonucleasa citosólica que degrada el ADN procedente del VIH o retroelementos endógenos, evitando así la acumulación de ADN citosólico que de otro modo desencadenaría la inmunidad innata (9, 10). La pérdida de mutaciones funcionales de TREX1 en seres humanos se ha relacionado estrechamente con el síndrome de Aicardi Goutières (SAG), una enfermedad similar al lupus caracterizada por la expresión elevada de citoquinas inflamatorias y genes estimulados por interferón (11).

Recientemente los investigadores han identificado la enzima GMP-AMP cíclica (GAMPc) sintasa (GASc) como un sensor de ADN citosólico que desencadena la producción de interferones tipo I y otras citoquinas (12, 13). El ADN se une y activa el GASc, que cataliza la síntesis de un isómero particular de GAMPc de ATP y GTP. Este isómero de GAMPc, denominado 2'3'-GAMPc, que contiene enlaces fosfodiéster 2'-5' y 3'-5', funciona como un segundo mensajero que se une y activa la proteína STING del retículo endoplásmico (14-17). STING luego activa las proteínas quinasas IKK y TBK1, que a su vez activan los factores de transcripción NF- κ B e IRF3 para inducir interferones y otras citoquinas (18). La caída de GASc inhibe la inducción de IFN β por virus de ADN tales como el virus de herpes simple-1 (VHS-1) y virus vaccinia (13). Debido a que los retrovirus generan ADN complementario a partir del ARN viral mediante transcripción inversa, los investigadores hipotizaron que el GASc podría detectar el ADN retroviral y desencadenar respuestas inmunológicas innatas.

Los investigadores usaron un virus VIH-1 de una sola ronda en el cual su proteína de envoltura fue reemplazada por la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VEV-G), lo que le permite infectar una gran diversidad de tipos de células humanas y de ratón (9). Este virus también expresa GFP, que se puede usar para controlar la infección viral. La infección de la línea celular monocítica humana THP1 con VIH-GFP condujo a la dimerización de IRF3, una evidencia de su activación. La fosforilación de STAT1 en Tyr-701 también se detectó después de la infección por VIH, lo que indica que la vía de señalización del interferón se activó en las células infectadas por el virus (19). La infección por VIH condujo a la inducción de IFN β y la quimiocina CXCL10, conjunta con la generación del ADN episomal de VIH Gag. Los niveles de producción de IFN β fueron proporcionales a la multiplicidad de infección por VIH. El tratamiento del virus VIH-GFP con DNasa I no alteró su capacidad de inducir IFN β , mientras que el tratamiento del ADN de testículo de arenque (ADN-TA) con DNasa I inhibió la inducción de IFN β , lo que indica que la inducción de IFN β por VIH-GFP no se debió a ningún ADN contaminante. La diferenciación de THP1 de monocitos a macrófagos mediante el tratamiento de células con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) inhibió la infección o replicación de VIH-GFP e inhibió fuertemente la inducción de IFN β . Por tanto, a menos que se indique lo contrario, las células THP1 usadas en el estudio de los investigadores no fueron tratadas con PMA antes de la infección por VIH.

Para probar si se requiere la transcripción inversa para que el VIH active la respuesta inmunológica innata, los investigadores trataron las células THP1 con los inhibidores de la transcriptasa inversa del VIH, la azidotimidina (AZT) y la nevirapina (NVP). Ambos inhibidores bloquearon la activación de IRF3 y la inducción de IFN β por VIH. A diferencia, el inhibidor de la integrasa del VIH raltegravir (RAL) no afectó la activación de esta vía. AZT y NVP, incluso en altas concentraciones, no inhibieron la inducción de IFN β por ADN TA, lo que indica que los efectos inhibidores de AZT y NVP se debieron a su inhibición específica de la transcripción inversa de VIH. Estos resultados indican que el ADN del VIH transcrito inverso es el desencadenante de la activación de IRF3 y la producción de IFN β .

Sorprendentemente, la caída mediada por ARNhc de GASc o STING en células THP1 inhibió fuertemente la inducción de IFN β y CXCL10 y la activación de IRF3 por VIH-GFP. Los experimentos de control mostraron que el ARNhc contra la luciferasa no inhibía la activación de la vía, y que los vectores ARNhc destruían específicamente a los objetivos pretendidos. En particular, el ARNhc GASc destruyó GASc pero no STING, y la inducción de IFN β en estas células se rescató entregando GAMPc en las células, lo que indica que el ARNhc GASc no tenía efectos fuera de objetivo en la vía STING.

Los estudios previos han demostrado que VSV-G pseudotipado VIH-1 induce fuertemente IFN β en fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en TREX1 (MEF), pero no en el tipo salvaje (WT) FER (9). Los investigadores generaron líneas celulares *Trex1*^{-/-} MEF que expresan de forma estable ARNhc contra GASc, STING o luciferasa (como control). La infección por VIH indujo ARN de IFN β y CXCL10 en las células de control (luciferasahc) pero no en células agotadas con GASc o STING. A diferencia, la caída de GASc o STING no afectó la inducción de IFN β o CXCL10 por el análogo de ARN bicatenario poli[λ :C].

Para obtener la prueba definitiva del papel de GASc en la detección innata de ADN citosólico y retrovirus, los investigadores emplearon la tecnología TALEN para alterar el gen que codifica GASc (*Mb21d1*), específicamente la región que codifica el dominio catalítico, en células L929 (20). Aunque las células L929 contienen tres copias del cromosoma 9 que alberga el gen GASc, la secuenciación del ADN de las células que expresan TALEN identificó múltiples clones que tenían deleciones en los tres cromosomas; tres de estos clones fueron elegidos para estudios posteriores. Los tres clones contenían deleciones en el locus GASc que generaron mutaciones de cambio de marco (21).

Las tres líneas celulares mutantes de GASc no pudieron activar IRF3 en respuesta a la transfección de ADN-TA o la infección por virus de herpes simple (HSV-1: un virus de ADN bicatenario). Como controles, estas células activaron IRF3 normalmente en respuesta a la transfección con poli[λ :C] o la infección con el virus *Sendai*, un virus ARN. Las células mutantes de GASc también eran defectuosas para inducir CXCL10 en respuesta a ADN-TA, pero este defecto se rescató transfecando las células con el plásmido de expresión de GASc de ratón.

Los investigadores eligieron el clon mutante GASc n.º 18 y las células parentales L929 para investigar el papel de GASc en el reconocimiento inmunológico innato de la infección por VIH. En células L929 que expresan de forma estable un ARNhc contra TREX1, pero no la luciferasa de control, la infección por VIH-GFP indujo la dimerización de IRF3 y la producción de IFN β y CXCL10. A diferencia, las células mutantes de L929 GASc no pudieron establecer ninguna respuesta inmunológica detectable a la infección por VIH, incluso cuando TREX1 se agotó, lo que demuestra el papel esencial de GASc en las respuestas inmunológicas contra el VIH. El agotamiento de GASc no afectó la inducción de IFN β o CXCL10 por el virus *Sendai*.

Los investigadores han demostrado previamente que las células HEK293T no expresan niveles detectables de GASc y STING y por tanto no pueden activar IRF3 en respuesta a la transfección del ADN o la infección por el virus de ADN (13). Consecuente con un papel importante de GASc y STING en la detección de retrovirus, la infección por VIH-GFP activó IRF3 y STAT1 en células THP1 pero no en HEK293T. A diferencia, el virus *Sendai* activó IRF3 y STAT1 en ambas líneas celulares. Para determinar si la infección por VIH conduce a la producción de GAMPc endógeno en células humanas, los investigadores prepararon lisados de células infectadas con VIH THP1 y HEK293T, calentaron los lisados a 95 °C para desnaturalizar la mayoría de las proteínas, que se eliminaron por centrifugación (12). El sobrenadante que potencialmente contenía GAMPc se entregó a células THP1 que se habían permeabilizado con la toxina bacteriana perfringolisina-O (PFO), y luego se ensayó la dimerización de IRF3 mediante electroforesis nativa en gel. El sobrenadante resistente al calor de THP1 infectado con VIH, pero no de células HEK293T, contenía la actividad de GAMPc que estimulaba la activación de IRF3 en las células receptoras. Además, la inhibición de la transcripción inversa del VIH por AZT, DDI (didanosina) o NVP bloqueó la generación de la actividad de GAMPc, mientras que el inhibidor de la integrasa del VIH RAL no tuvo efecto. La infección por VIH-GFP en células L929Trex1hc también condujo a la generación de la actividad de GAMPc, que dependía de GASc. En conjunto, estos resultados indican que la infección por VIH induce la producción de GAMPc endógeno de una forma que depende de GASc y la transcripción inversa de ARN de VIH a ADNc.

Para probar si la infección por VIH produce ADNc retroviral en el citoplasma para activar GASc, los investigadores infectaron células HEK293T con VIH-GFP y prepararon extractos citosólicos que luego se incubaron con proteína GASc purificada en presencia de ATP y GTP. Los extractos citosólicos de células infectadas con VIH, pero no de células no infectadas, fueron capaces de estimular GASc para producir la actividad GAMPc que activaba IRF3 en células THP1 permeabilizadas. El tratamiento de las células HEK293T con AZT inhibió la generación de la actividad estimulante de GASc. Los análisis adicionales mostraron que el citoplasma de las células infectadas con VIH contenía el ADN Gag del VIH y la proteína GFP, ambos inhibidos por el AZT.

La medición cuantitativa de la abundancia de GAMPc por espectrometría de masas usando monitorización de reacción selectiva (SRM) proporcionó la prueba directa de que GAMP se produjo en células THP1 infectadas con VIH pero no tratadas de manera simulada. La espectrometría de masas en tándem del GAMPc endógeno de células THP1 infectadas con VIH reveló que era idéntico al producto GASc, 2'3'-GAMPc (15).

Para probar si la infección por VIH en células inmunológicas humanas primarias conduce a la producción de GAMPc, los investigadores infectaron macrófagos procedentes de monocitos (MDM) y células dendríticas procedentes de monocitos (MDDC) con el aislado VIH-1 clínico VIH-BaL y VIH-GFP, respectivamente. Las investigaciones previas han demostrado que los macrófagos humanos y las células dendríticas expresan SAMHD1, una nucleasa que hidroliza el NTPd, inhibiendo así la transcripción inversa del VIH. El VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) contienen la proteína Vpx, que se dirige a SAMHD1 para la degradación proteasomal mediada por ubiquitina, eliminando por tanto este factor de restricción del huésped. Para facilitar las infecciones por VIH en MDM y MDDC

humanos, los investigadores entregaron VIS Vpx en estas células usando una partícula tipo virus (VLP) antes de la infección por VIH. En presencia de Vpx, la infección de MDM y MDCC con VIH-BaL y VIH-GFP, respectivamente, condujo a la generación de actividad GAMPc. El análisis de espectrometría de masas cuantitativa confirmó además la producción de 2'3'-GAMPc en MDCC infectados por VIH que expresaban Vpx. La actividad de GAMPc se observó sistemáticamente en MDCC y MDM de donantes humanos adicionales, y esta actividad fue mayor en las células infectadas con VIH que las tratadas con Vpx solo. Estos resultados demuestran que la infección por VIH en macrófagos humanos y células dendríticas conduce a la generación de GAMPc en condiciones que son permisivas para la replicación viral.

Finalmente, los investigadores probaron si se requiere GASc para las respuestas inmunológicas innatas contra otros retrovirus infectando las líneas celulares L929 y L929-GASc KO con el virus de la leucemia murina (MLV) y SIV. Análogo al VIH, MLV y SIV indujeron ARN de IFN β y CXCL10 en células L929 agotadas de TREX1 endógeno, pero dicha inducción fue completamente suprimida en las células GASc KO. En apoyo adicional de un papel esencial de la vía GASc-STING en la detección inmunológica innata de retrovirus, la caída de GASc o STING en células *Trex1*^{-/-} MEF inhibió fuertemente la inducción de IFN β por VLM y VIS.

En el presente documento los investigadores demostraron que GASc es esencial para la respuesta inmunológica innata contra VIH, SIV y MLV, lo que indica que GASc es un sensor inmunológico innato general del ADN retroviral. Aunque el VIH infecta principalmente las células T CD4 humanas, también puede entrar en los macrófagos y las células dendríticas, normalmente sin desencadenar una respuesta inmunológica innata manifiesta al ocultar los ácidos nucleicos virales dentro de la cápside y al limitar la acumulación de ADN viral mediante la cooptación de factores del huésped tales como TREX1 y SAMHD1(S). Se cree que la ausencia de una respuesta inmunológica innata rigurosa al VIH en las células dendríticas es un factor importante que dificulta las respuestas productivas de las células T y el desarrollo de vacunas (7). El descubrimiento de los investigadores de que el VIH y otros retrovirus pueden inducir la producción de GAMPc a través de GASc en condiciones permisivas indica que el GAMPc puede usarse para evitar el bloqueo de las respuestas inmunológicas innatas contra el VIH. Como tal, GAMPc proporciona un adyuvante de vacuna útil para el VIH y otros patógenos que son expertos en subvertir el sistema inmunológico innato del huésped.

Referencias y notas

1. A. Iwasaki, R. Medzhitov, Regulación de la inmunidad adaptativa por el sistema inmune innato. *Science* 327, 291 (15 de enero de 2010).
2. O. Takeuchi, S. Akira, Receptores de reconocimiento de patrones e inflamación. *Cell* 140, 805, (19 de marzo de 2010).
3. PC Ronald, B. Beutler, Sensores vegetales y animales de firmas microbianas conservadas. *Science* 330, 1061 (19 de noviembre de 2010).
4. R. Medzhitov, D. Littman, La inmunología del VIH necesita una nueva dirección. *Nature* 455, 591 (2 de octubre de 2008).
5. N. Manel, DR Littman, Escondiéndose al descubierto: cómo el VIH elude las respuestas inmunológicas innatas. *Cell* 147, 271 (14 de octubre de 2011).
6. N. Manel y col., Un sensor críptico para VIH-1 activa la inmunidad innata antiviral en células dendríticas. *Nature* 467, 214 (9 de septiembre de 2010).
7. J. Luban, Detección inmunológica innata de VIH-1 por las células dendríticas. *Cell host & microbe* 12, 408 (18 de octubre de 2012).
8. N. Yan, ZJ Chen, Inmunidad antiviral intrínseca. *Nat Immunol* 13, 214 (2012).
9. N. Yan, AD Regalado-Magdos, B. Stiggelbout, MA Lee-Kirsch, J. Lieberman, La exonucleasa citosólica TREX1 inhibe la respuesta inmunológica innata al virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. *Nature immunology* 11, 1005 (noviembre de 2010).
10. DB Stetson, JS Ko, T. Heidmann, R. Medzhitov, Trex1 evita el inicio intrínseco celular de la autoinmunidad. *Cell* 134, 587 (22 de agosto de 2008).
11. YJ Crow y col., Mutaciones en el gen que codifica la 3'-5' ADN exonucleasa 'TREX1 causan el síndrome de Aicardi-Goutières en el locus AGS1. *Nature genetics* 38, 917 (agosto de 2006).
12. J. Wu y col., GMP-AMP cíclico es un segundo mensajero endógeno en la señalización inmunológica innata por ADN citosólico. *Science* 339, 826 (15 de febrero de 2013).
13. L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, ZJ Chen, La GMP-AMP sintasa cíclica es un sensor de ADN citosólico que activa la vía del interferón de tipo I. *Science* 339, 786 (15 de febrero de 2013).
14. P. Gao y col., [G(2',5')pA(3',5')p] cíclico es el segundo mensajero metazoico producido por la sintasa GMP-AMP cíclica activada por ADN. *Cell* 153, 1094 (23 de mayo de 2013).
15. X. Zhang y col., GMP-AMP cíclico que contiene enlaces mixtos de fosfodiéster es un ligando de afinidad alta endógeno para STING. *Molecular Cell*, (3 de junio de 2013).
16. EJ Diner y col., El sensor de ADN inmunológico innato GASc produce un dinucleótido cíclico no canónico que activa la STING humana. *Cell Rep* 3, 1355 (30 de mayo de 2013).
17. A. Ablasser y col., GASc produce un segundo mensajero de dinucleótido cíclico enlazado en 2'-5' que activa STING. *Nature* 498, 380 (20 de junio de 2013).
18. GN Barber, vías inmunitarias innatas del ADN citoplásmico. *Immunological reviews* 243, 99 (septiembre de

2011).

19. DE Levy, JE Darnell, Jr., Estadísticas: control transcripcional e impacto biológico. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3, 651 (septiembre de 2002).

20. T. Cermak y col., Diseño y ensamblaje eficientes de construcciones TALEN personalizadas y otras construcciones basadas en efectores para la dirección de ADN. *Nucleic Acids Res* 39, e82 (julio de 2011).

21. El clon n.º 18 tiene mutaciones de cambio de marco en los tres cromosomas. Además de los cambios de marco, el clon n.º 36 albergaba una delección de 9 pb en un cromosoma que eliminaba 3 aminoácidos (215-217) en el dominio catalítico, mientras que el clon n.º 94 tenía una delección de 12 pb en un cromosoma y una delección de 18 pb en otro que eliminó 4 (214-217) y 6 (212-217) aminoácidos en el dominio catalítico, respectivamente.

Ejemplo 5. Papeles pivotantes de la señalización de GASc-GAMPc en la defensa antiviral y los efectos adyuvantes inmunológicos

La invasión de ADN microbiano en el citoplasma de las células animales desencadena una cascada de reacciones inmunológicas del huésped que ayudan a eliminar la infección; sin embargo, el propio ADN en el citoplasma puede causar enfermedades autoinmunitarias. Los enfoques bioquímicos condujeron a la identificación de GMP-AMP (GAMPc) sintasa cíclica (GASc) como un sensor de ADN citosólico que desencadena respuestas inmunológicas innatas. En este caso los investigadores muestran que las células de ratones deficientes en GASc (*cGas*^{-/-}), incluyendo fibroblastos, macrófagos y células dendríticas, no pudieron producir interferones de tipo I y otras citoquinas en respuesta a la transfección de ADN o la infección por el virus de ADN. Los ratones *cGas*^{-/-} fueron más susceptibles a la infección letal con el virus del herpes simple-1 (HSV1) que los ratones de tipo salvaje. Los investigadores también demostraron que GAMPc es un adyuvante que potencia la activación de las células T específicas de antígeno y la producción de anticuerpos.

La detección de invasión de ADN extraño es un mecanismo fundamental de defensa del huésped. En las células de mamíferos, la presencia de ADN extraño o propio en el citoplasma es una señal de peligro que desencadena la respuesta inmunológica innata del huésped (1). A través de estudios bioquímicos, los investigadores han identificado recientemente GMP-AMP cíclico (GAMPc) sintasa (GASc) como un sensor inmunológico innato de ADN citosólico que desencadena la producción de interferones tipo I y otras citoquinas inflamatorias (2,3). GASc se une al ADN independientemente de su secuencia; esta unión activa GASc para catalizar la síntesis de un isómero GAMPc particular, que contiene enlaces fosfodiéster 2'-5' y 3'-5' (4-7). Esta molécula, denominada 2'3'GAMPc, funciona como un segundo mensajero que se une y activa la proteína adaptadora STING (3,7). STING luego activa las proteínas quinasas IKK y TBK1, que a su vez activan los factores de transcripción NF-κB e IRF3 para inducir interferones y otras citoquinas (8).

Para investigar la función de GASc *in vivo*, los investigadores generaron una cepa de ratón *Gasc* inactivado, en la que el primer exón se empalma en un casete LacZ, anulando así la expresión del locus endógeno (9). Los ratones *Gas*^{-/-} nacieron en la relación mendeliana, y no mostraron ninguna anomalía de desarrollo manifiesta. Los análisis cuantitativos de PCR de transcripción inversa (RT-PCR) de ARN de fibroblastos pulmonares y macrófagos procedentes de médula ósea (BMDM) confirmaron que las células *Gas*^{-/-} eran defectuosas para producir ARN de *Gasc*, mientras que las células *Gas*^{+/-} producían niveles intermedios de ARN de *Gasc*.

Los investigadores obtuvieron fibroblastos pulmonares de ratones WT, *Gas*^{+/-} y *GAS*^{-/-}, así como el ratón goldenticket (*gt/gt*), que tiene una mutación puntual que da como resultado la pérdida de la expresión de STING (10). La transfección de diferentes tipos de ADN, incluyendo ADN de testículo de arenque (ADN-TA), ADN de *E. coli* y ADN estimulante de interferón (ISD, ADN bicatenario de 45 pb) (11), en los fibroblastos pulmonares de ratones WT y *Gas*^{+/-} condujeron a la producción robusta de proteína IFNβ, medida por ELISA. A diferencia, las células *Gas*^{-/-} y *Sting*^{gt/gt} no produjeron ningún nivel detectable de IFNβ. Poli[I:C], un análogo de ARN bicatenario conocido por inducir IFNβ a través de la vía del receptor tipo RIG-I (RTR) (12), indujo IFNβ normalmente en ausencia de *Gasc* o *Sting*. Curiosamente, poli[dA:dT], que previamente se demostró que induce interferones de tipo I a través de la vía de ARN polimerasa III-RIG-I-MAVS (13, 14), indujo IFNβ normalmente en las células *Gas*^{-/-} y *Sting*^{gt/gt}. Los análisis RT-PCR confirmaron además que el GASc es esencial para la inducción de ARN de IFNβ por diferentes tipos de ADN sintético o bacteriano, excepto poli[dA:dT]. Los experimentos de curso de tiempo muestran que la inducción de IFNβ por ISD fue completamente suprimida en los fibroblastos pulmonares de *Gas*^{-/-} incluso en puntos de tiempo tempranos (2-8 h) después de la transfección de ADN, lo que indica que GASc es indispensable para la inducción de IFNβ por ADN citosólico.

Para medir la producción de GAMPc en células WT y *Gas*^{-/-}, los investigadores realizaron un bioensayo que mide la actividad de GAMPc en extractos citoplásmicos de células transfectadas con ISD. Los extractos se calentaron a 95 °C para desnaturalizar la mayoría de las proteínas, que se eliminaron por centrifugación. Los sobrenadantes que podrían contener GAMPc se entregaron a la línea celular monocítica humana THP1, que se había permeabilizado con la toxina bacteriana perfringolisina-O (PFO). La dimerización de IRF3, una evidencia de su activación, luego se midió mediante electroforesis nativa en gel. Este ensayo mostró que los extractos de fibroblastos pulmonares transfectados con ISD de ratones WT pero no de *Gas*^{-/-} contenían la actividad de GAMPc, lo que demuestra que GASc tiene un papel no redundante para catalizar la síntesis de GAMPc en estas células en respuesta al ADN

citosólico.

A continuación, los investigadores infectaron los fibroblastos pulmonares con los virus de ADN virus del herpes simple-1 (HSV1), virus vaccinia (VACV) y una cepa mutante de HSV1 llamada d109, que tiene una delección de proteínas virales como ICP0 que se sabe que antagoniza respuestas inmunológicas (15). La inducción de IFN β por cada uno de estos virus fue suprimida en gran parte en células *Gas*^{-/-} y *Sting*^{gt/gt}, y se inhibió parcialmente en células *Gas*^{+/-}. A diferencia, la inducción de IFN β por el virus *Sendai*, un virus ARN conocido por activar la vía RIG-I, no se vio afectado por la deficiencia en *Gasc* o *Sting*. La administración de GAMPc en el citoplasma rescató la inducción de IFN β en células *Gas*^{-/-} pero no en células *Sting*^{gt/gt}. De forma similar, la inducción de la quimioquina CXCL10 por los virus de ADN dependía de *Gasc* y *Sting*. La medición de la dimerización de IRF3 mostró que las células *Gas*^{-/-} no activaron IRF3 en respuesta a la transfección de ADN-TA o la infección por HSV-1 WT o la cepa HSV1 7134, que también carece del interferón antagonista ICP0 (16). La deficiencia de *Gasc* no alteró la activación de IRF3 por el virus *Sendai*. Por tanto, se requiere *GASc* para la activación de IRF3 y la inducción de citocinas por virus de ADN pero no virus de ARN en fibroblastos pulmonares de ratón.

BMDM de ratones *Gas*^{-/-} y *Sting*^{gt/gt} fueron defectuosos para producir IFN β en respuesta a la transfección con ADN-TA o ISD. De forma similar, la inducción de IFN β por VACV y las cepas HSV1 d109 y 7134 fue suprimida en gran parte en *Gas*^{-/-} y *Sting*^{gt/gt} BMDM. Sin embargo, la inducción de IFN β por WT HSV1 se bloqueó grave pero no completamente bien en *Gas*^{-/-} o en *Sting*^{gt/gt} BMDM, lo que indica que estas células poseen otra vía que podía compensar parcialmente la pérdida de la vía *GASc*-*STING* para detectar la infección por HSV1 WT. La pérdida de *GASc* o *STING* en BMDM no afectó la inducción de IFN β por el virus *Sendai*. Los experimentos cinéticos muestran que la inducción de IFN β por ISD y HSV1-d109 fue suprimida en *Gas*^{-/-} BMDM a lo largo del curso temporal de la estimulación. De forma análoga a IFN β , la inducción de TNF α por ADN-TA o ISD fue suprimida en *Gas*^{-/-} o *Sting*^{gt/gt} BMDM. Los análisis de RT-PCR mostraron que la inducción de IFN β , interleucina-6 (IL6) y ARN de CXCL10 por transfección de ADN-TA o ISD o infección con HSV1-d109 era completamente dependiente de *Gasc* y *Sting*. A diferencia, los niveles de ARN de estas citocinas inducidas por poli[I:C] o el virus *Sendai* no se vieron afectados por la deficiencia en *Gasc* o *Sting*.

Los investigadores obtuvieron células dendríticas convencionales (DCc) y DC plasmocitoides (DCp) cultivando médulas óseas en medios condicionados que contienen GM-CSF y ligando de Flt3 (Flt3L), respectivamente. Los DC GM-CSF, que contienen en gran parte DCc, de ratones *Gas*^{-/-} y *Sting*^{gt/gt} no indujeron IFN α o IFN β en respuesta a la transfección de ADN-TA o ISD. La pérdida de *GASc* o *STING* en DC de GM-CSF suprimió la inducción de IFN β por HSV1-d109 y VACV, e inhibió parcialmente la inducción de IFN β por HSV1 WT. A diferencia, la deficiencia en *GASc* o *STING* no alteró la inducción de IFN α o IFN β por el virus *Sendai*. Los experimentos de RT-PCR confirmaron además que *GASc* y *STING* eran esenciales para la inducción de ARN de IFN β , IL6 y CXCL10 por transfección con ADN-TA o ISD o infección con HSV1-d109, mientras que la inducción de estas citoquinas por poli[I:C] o el virus *Sendai* era independiente de *GASc* o *STING*.

Se sabe que los DCp expresan TLR9 que es responsable de la inducción de los interferones de tipo I por los enlaces de CpG sintético que contienen fosforotioato (17). Cuando el ADN de CpG se usó para estimular las DC de Flt3L, que contiene en gran parte DCp, en presencia o ausencia de liposoma (lipofectamina 2000), indujo la producción robusta de IFN α e IFN β incluso en las células *Gas*^{-/-} y *Sting*^{gt/gt}. A diferencia, otras formas de ADN, incluido ISD, poli[dA:dT] y ADN genómico de *E. coli* y *Vibrio cholerae*, indujeron IFN α en Flt3L-DC solo en presencia de liposomas, y esta inducción por cada ADN fue suprimida en ausencia de *GASc* o *STING*. La fuerte dependencia de la inducción de IFN α por poli[dA:dT] en *GASc* y *STING* en DCp indica que la vía *GASc*-*STING*, pero no la vía Pol-III-RIG-I, juega un papel importante en la detección del ADN en estas células. El Flt3L-DC de ratones *Gas*^{-/-} y *Sting*^{gt/gt} indujeron IFN α e IFN β en respuesta a la infección por el virus *Sendai*, pero no HSV1. En conjunto, estos resultados demuestran que *GASc* es responsable de detectar ADN natural (p. ej., ADN bacteriano) e infecciones por virus ADN en células dendríticas.

Para determinar el papel de *GASc* en la defensa inmunológica contra virus ADN *in vivo*, los investigadores infectaron ratones WT y *Gas*^{-/-} con HSV1 por vía intravenosa (vi). El análisis de ELISA mostró que los sueros de ratones WT contenían niveles elevados de IFN α e IFN β , que alcanzó su punto máximo a las 8 y 4 horas, respectivamente, después de la infección por HSV1 (1x10⁷ upf/ratón). Los niveles de IFN α e IFN β se atenuaron intensamente en los ratones *Gas*^{-/-} infectados con la misma dosis infecciosa de HSV1. En un experimento independiente en el que los ratones fueron controlados para su supervivencia después de la infección con HSV1 a la dosis infecciosa de 1x10⁶ upf/ratón, cuatro de los cinco ratones *Gas*^{-/-} desarrollaron ataxia y parálisis en 3 días después de la infección del virus y murieron unas horas después de que aparecieron estos síntomas. El quinto ratón *Gas*^{-/-} murió el día 4 después de la infección. Tres de los cinco ratones WT desarrollaron estos síntomas el día 6 y murieron poco después. Cuando se extrajeron los cerebros de los ratones WT y *Gas*^{-/-} para medir los títulos virales el día 3 después de la infección, se detectaron altos niveles de HSV1 en los cinco ratones *Gas*^{-/-}, mientras que ninguno de los ratones WT tenía niveles detectables de HSV1 en los cerebros. Se observaron las curvas de supervivencia similares y se detectaron títulos virales similares en los cerebros en experimentos independientes en los que la dosis infecciosa de HSV1 se aumentó a 1 x 10⁷ upf por ratón. La susceptibilidad de los ratones *Gas*^{-/-} a la infección por HSV1 fue similar a la de los ratones *Sting*^{gt/gt}, que también tenían una notable reducción de IFN α e IFN β en los sueros, y murieron dentro de los 3-4 días después de la infección por HSV1 (18).

Los resultados de los investigadores de que el GASc es esencial para la inducción de interferones de tipo I por ADN citosólico en múltiples tipos de células, incluidas las células que presentan antígenos, indican que el producto GASc, 2'3'GAMPc, se puede usar para sustituir el efecto inmunoestimulador de ADN, incluido el efecto adyuvante de las vacunas de ADN (19). Para determinar el efecto adyuvante de 2'3'GAMPc, los investigadores inyectaron el modelo de antígeno de proteína ovoalbúmina (OVA) en ausencia o presencia de 2'3'GAMPc en ratones WT o *Sting^{gt/gt}* por vía intramuscular. Los ratones se reforzaron una vez en el día 10 con la misma formulación de antígeno. Los análisis ELISA mostraron que 2'3'GAMPc potenciaba fuertemente la producción de anticuerpos específicos de OVA el día 17 en los ratones WT, pero no en *Sting^{gt/gt}*. Este efecto adyuvante de 2'3'GAMPc tampoco se observó en ratones deficientes de receptores de interferón tipo I (*Ifnar^{-/-}*). Para investigar el efecto de 2'3'GAMPc en la activación de células T, los leucocitos esplénicos aislados de los ratones WT, que se habían inmunizado con OVA u OVA + 2'3'GAMPc durante 7 días, se cultivaron con un péptido OVA conocido para estimular células T CD4 a través de la molécula MHC de clase II I-A^b u otro péptido OVA que estimula las células T CD8 a través de la molécula MHC de clase I H-2K^b. Tanto las células T CD4 como CD8 de los ratones inmunizados con OVA + 2'3'GAMPc, pero no con OVA solo, produjeron niveles elevados de IFN γ e IL-2 después de la estimulación con los péptidos afines. El análisis de citometría de flujo usando un tetrámero compuesto por un péptido OVA en el complejo con H-2K^b mostró un notable aumento en el porcentaje de las células T CD8 tetrámero-positivas en los ratones inmunizados con OVA + 2'3'GAMPc, lo que indica que 2'3'GAMPc estimuló la expansión de las células T CD8 que portan el receptor de células T específico de OVA. En conjunto, estos resultados indican que 2'3'GAMPc funciona como un adyuvante inmunológico para estimular respuestas de células T y células B específicas de antígeno.

En el presente documento los investigadores proporcionan la prueba de que GASc es esencial para la inducción de interferones de tipo I y otras citoquinas inflamatorias por transfección de ADN e infección por virus de ADN. Con la excepción de poli[dA:dT] y ADN CpG, la mayoría de moléculas de ADN, especialmente las que se encuentran en la naturaleza (*p. ej.* ADN bacteriano y viral), estimulan los interferones tipo I exclusivamente a través de la vía GASc-GAMPc-STING. En múltiples tipos de células, incluyendo fibroblastos, macrófagos y células dendríticas, la inducción de interferones de tipo I por virus vaccinia y varias cepas de HSV1 es completamente dependiente de GASc y STING. De forma destacable, sin embargo, la inducción de IFN β por HSV1 de tipo salvaje se suprime de forma grave pero no completamente en las DC de BMDM y GM-CSF de ratones *Cas^{-/-}* o *Sting^{gt/gt}*. Otros supuestos sensores de ADN, tales como IFI16 o DDX41, también pueden estar involucrados en esta inducción residual de IFN β por HSV1 WT(20, 21). En el caso de GASc, los fenotipos de *Cas^{-/-}* son sorprendentemente similares a los de ratones *Sting^{-/-}* (este estudio y ref. 18). Estos resultados, junto con los datos bioquímicos de los investigadores que muestran que GASc es una enzima citosólica activada por su unión al ADN genérico (2,3), demuestran formalmente que el GASc es un sensor de ADN citosólico no redundante y general que activa STING.

Los investigadores mostraron que 2'3'GAMPc es un adyuvante eficaz que refuerza la producción de anticuerpos específicos de antígeno y las respuestas de células T. Aunque los segundos mensajeros bacterianos di-GMP cíclico y di-AMP cíclico se están desarrollando como posibles coadyuvantes de vacunas (22), 2'3'GAMPc es un ligando mucho más potente de STING que cualquiera de los dinucleótidos cíclicos bacterianos (7). Por tanto, 2'3'GAMPc proporciona un adyuvante útil para las vacunas de la próxima generación para evitar o tratar enfermedades humanas, incluidas las enfermedades infecciosas y el cáncer.

Referencias y notas

1. LA O'Neill, Inmunología. La detección del lado oscuro del ADN. *Science* 339, 763 (15 de febrero de 2013).
2. L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, ZJ Chen, La GMP-AMP sintasa cíclica es un sensor de ADN citosólico que activa la vía del interferón de tipo I. *Science* 339, 786 (15 de febrero de 2013).
3. J. Wu y col., GMP-AMP cíclico es un segundo mensajero endógeno en la señalización inmunológica innata por ADN citosólico. *Science* 339, 826 (15 de febrero de 2013).
4. A. Ablasser y col., GASc produce un segundo mensajero de dinucleótido cíclico enlazado en 2'-5' que activa STING. *Nature* 498, 380 (20 de junio de 2013).
5. EJ Diner y col., El sensor de ADN inmunológico innato GASc produce un dinucleótido cíclico no canónico que activa la STING humana. *Cell Rep* 3, 1355 (30 de mayo de 2013).
6. P. Gao y col., [G(2',5')pA(3',5')p] cíclico es el segundo mensajero metazoico producido por la sintasa GMP-AMP cíclica activada por ADN. *Cell* 153, 1094 (23 de mayo de 2013).
7. X. Zhang y col., GMP-AMP cíclico que contiene enlaces mixtos de fosfodiéster es un ligando de afinidad alta endógeno para STING. *Molecular Cell*, (3 de junio de 2013).
8. H. Ishikawa, GN Barber, La vía STING y la regulación de la señalización inmunológica innata en respuesta a los patógenos del ADN. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 68, 1157 (abril de 2011).
9. Se generaron ratones *Gas^{-/-}* mediante fertilización *in vitro* usando espermatozoides que albergaban una inserción dirigida en el locus *Gasc/Mb21d1*.
10. JD Sauer y col., El mutante de ratón Goldenticket inducido por N-etil-N-nitrosourea revela una función esencial de Sting en la respuesta de interferón *in vivo* a *Listeria monocytogenes* y dinucleótidos cíclicos. *Infect Immun* 79, 688 (febrero de 2011).
11. DB Stetson, R. Medzhitov, El reconocimiento de ADN citosólico activa una respuesta inmunológica innata dependiente de IRF3. *Immunity* 24, 93 (enero de 2006).
12. M. Yoneyama y col., El ARN helicasa RIG-I tiene una función esencial en las respuestas antivirales innatas

- inducidas por ARN bicatenario. *Nat Immunol* 5, 730 (julio de 2004).
13. A. Ablasser y *col.*, La detección dependiente de RIG-I de poli(dA:dT) a través de la inducción de un ARN intermedio transcrito con ARN polimerasa III. *Nat Immunol*, (16 de julio de 2009).
- 5 14. YH Chiu, JB Macmillan, ZJ Chen, La ARN polimerasa III detecta ADN citosólico e induce interferones tipo I a través de la vía RIG-I. *Cell* 138, 576 (7 de agosto de 2009).
15. LA Samaniego, L. Neiderhiser, NA DeLuca, La persistencia y expresión del genoma del virus del herpes simple en ausencia de proteínas inmediatas/tempranas. *Journal of virology* 72, 3307 (abril de 1998).
16. GT Melroe, NA DeLuca, DM Knipe, El virus del herpes simple 1 tiene múltiples mecanismos para bloquear la producción de interferón inducida por virus. *Journal of virology* 78, 8411 (agosto de 2004).
- 10 17. O. Takeuchi, S. Akira, Los receptores de reconocimiento de patrones e inflamación. *Cell* 140, 805, (19 de marzo de 2010).
18. H. Ishikawa, Z. Ma, GN Barber, STING regula la inmunidad innata dependiente de interferón tipo I mediada por ADN intracelular. *Nature* 461, 788 (8 de octubre de 2009).
- 15 19. CJ Desmet, KJ Ishii, La detección de ácidos nucleicos en la interfaz entre inmunidad innata y adaptativa en la vacunación. *Nature reviews. Immunology* 12, 479 (julio de 2012).
20. Z. Zhang y *col.*, La helicasa DDX41 detecta el ADN intracelular mediado por el adaptador STING en células dendríticas. *Nature immunology* 12, 959 (octubre de 2011).
21. L. Unterholzner y *col.*, IFI16 es un sensor inmunológico innato para el ADN intracelular. *Nature immunology* 11, 997 (noviembre de 2010).
- 20 22. W. Chen, R. Kuolee, H. Yan, El potencial de 3',5'-ácido diguanílico cíclico (di-GMPc) como un adyuvante de vacuna eficaz. *Vaccine* 28, 3080 (19 de abril de 2010).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para preparar 2'3'-GMP-AMP cíclico (2'3'-GAMPc), que comprende formar una mezcla que comprende la sintasa GMP-AMP cíclica de mamífero (GASc), ATP y GTP, en condiciones en las que la sintasa convierte catalíticamente el ATP y el GTP en 2'3'-GAMPc, en donde la sintasa, el ATP y el GTP están en cantidades predefinidas, comprendiendo el método además la etapa de aislar o detectar el 2'3'- GAMPc resultante, en donde la mezcla comprende además ADN y la conversión es dependiente de ADN.
- 10 2. Un 2'3'-GAMPc aislado obtenido a partir del método de la reivindicación 1.
3. Una composición que comprende una cantidad predeterminada del 2'3'- GMP-AMP cíclico (2'3'-GAMPc) como se define en la reivindicación 2.
- 15 4. Una composición que comprende una cantidad predeterminada de 2'3'-GAMPc.
5. La composición de las reivindicaciones 3 o 4 esencialmente libre de otros di-nucleótidos cíclicos.
6. Un adyuvante que comprende la composición de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4.
- 20 7. Una vacuna que comprende un inmunógeno predeterminado y la composición de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4.
8. La vacuna de la reivindicación 7, en la que el inmunógeno es selectivo para un patógeno objetivo.
- 25 9. La composición de las reivindicaciones 3 o 4 para su uso en un método para inducir o promover una respuesta inmunológica, comprendiendo el método administrar a un mamífero que lo necesita una cantidad eficaz de la composición.
- 30 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición se administra por vía mucosal (sublingual o intranasal), intramuscular o subcutánea.