



---

# **Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE MEDICINA  
Dpto. de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y  
FISIOLOGÍA  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL:

## **REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 POR LIPINA-2 EN MACRÓFAGOS**

Presentada por Gema Lordén Losada para optar al  
grado de Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:  
Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Balboa García  
Dr. Jesús Balsinde Rodríguez

Valladolid, 2016



## ***ÍNDICES***

---





# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>ÍNDICES</b> .....	<b>III</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>XXI</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>1 RECONOCIMIENTO POR EL SISTEMA INMUNE INNATO</b> .....	<b>37</b>
1.1 RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs).....	38
1.1.1 <i>Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)</i> .....	40
1.1.2 <i>La familia de proteínas NF-κB</i> .....	41
1.2 RECEPTORES TIPO NOD (NLRs).....	43
<b>2 EL INFLAMASOMA</b> .....	<b>44</b>
2.1 EL INFLAMASOMA NLRP3.....	45
2.1.1 <i>Modelos de activación del inflamasoma NLRP3</i> .....	46
2.1.2 <i>El ATP como activador del inflamasoma NLRP3 a través del receptor P2X7</i> .....	51
2.1.3 <i>El inflamasoma NLRP3 y la diabetes tipo II. Activación por ácido palmítico</i> .....	53
2.2 OTROS INFLAMAMASOMAS CANÓNICOS: NLRP1, NLRC4 y AIM2.....	54
2.3 PIROPTOSIS: MUERTE CELULAR PROINFLAMATORIA.....	56
<b>3 ENFERMEDADES AUTOINFLAMATORIAS</b> .....	<b>57</b>
<b>4 LA FAMILIA DE LAS LIPINAS</b> .....	<b>59</b>
4.1 DESCUBRIMIENTO DE LAS LIPINAS.....	59
4.2 FUNCIONES MOLECULARES DE LA FAMILIA DE LAS LIPINAS.....	60
4.2.1 <i>Las lipinas codifican para enzimas responsables de la actividad PAP</i> .....	61
4.2.2 <i>Las lipinas actúan como reguladores transcripcionales</i> .....	64
4.3 EL PAPEL DE LAS LIPINAS EN EL SISTEMA INMUNE.....	64
4.4 LA LIPINA-2.....	65
4.4.1 <i>El síndrome de Majeed</i> .....	68
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>71</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>75</b>
<b>1 MATERIALES Y REACTIVOS</b> .....	<b>77</b>
1.1 ESTÍMULOS CELULARES E INHIBIDORES.....	79
1.2 TAMPONES Y SOLUCIONES.....	80
<b>2 MÉTODOS EXPERIMENTALES</b> .....	<b>82</b>

2.1	MEDIOS DE CULTIVO CELULARES .....	82
2.2	CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES .....	83
2.3	ANIMALES .....	83
2.4	OBTENCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN. ....	85
2.5	OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN .....	87
2.6	INDUCCIÓN DE SHOCK SÉPTICO EN RATÓN .....	87
2.7	OBTENCIÓN DE MONOCITOS Y MACRÓFAGOS HUMANOS.....	88
2.8	SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNA.....	89
2.9	TRANSFECCIÓN DE FLAGELINA PARA ACTIVAR INFLAMASOMA NLRC4 .....	90
2.10	MARCAJES INMUNOFUORESCENTES .....	91
2.11	OBTENCIÓN DE HOMOGENEIZADOS PROTEICOS E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	92
2.11.1	<i>Obtención de homogeneizados celulares.....</i>	<i>92</i>
2.11.2	<i>Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares .....</i>	<i>92</i>
2.11.3	<i>Obtención de sobrenadantes para la detección de citoquinas mediante ELISA y para la concentración de proteínas que se encuentran en ellos. ....</i>	<i>92</i>
2.11.4	<i>Obtención de oligómeros de ASC .....</i>	<i>93</i>
2.11.5	<i>Valoración de la concentración de proteína .....</i>	<i>93</i>
2.11.6	<i>Electroforesis desnaturizante y electrotransferencia de proteínas.....</i>	<i>94</i>
2.11.7	<i>Inmunodetección de proteínas (immunoblot).....</i>	<i>95</i>
2.12	MEDICIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE ELISA (ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS).....	97
2.13	TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ARNm .....	97
2.13.1	<i>Extracción de ARN.....</i>	<i>97</i>
2.13.2	<i>PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) .....</i>	<i>98</i>
2.13.3	<i>PCR cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR).....</i>	<i>98</i>
2.14	ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ROS POR CITOMETRÍA DE FLUJO .....	101
2.15	ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-1 .....	101
2.16	ANÁLISIS DE LA APARICIÓN DE PIROPTOSIS .....	102
2.16.1	<i>Análisis de la permeabilización de membrana mediante yoduro de propidio (IP).....</i>	<i>102</i>
2.16.2	<i>Análisis de la permeabilización de membrana mediante anexina V.....</i>	<i>102</i>
2.16.3	<i>Análisis de la permeabilización de membrana mediante bromuro de etidio.....</i>	<i>103</i>
2.16.4	<i>Análisis de citotoxicidad mediante ensayo de LDH.....</i>	<i>103</i>
2.17	MEDIDA DE LOS NIVELES DE POTASIO EN UNA POBLACIÓN CELULAR .....	104
2.18	PREPARACIÓN DE ÁCIDO PALMÍTICO.....	104
2.19	MEDIDAS ELECTROFISIOLÓGICAS .....	105
2.19.1	<i>Fundamento.....</i>	<i>105</i>
2.19.2	<i>Procedimiento.....</i>	<i>105</i>
2.19.3	<i>Protocolo experimental de estimulación eléctrica .....</i>	<i>106</i>
2.20	ÁNÁLISIS DE LOS NIVELES CELULARES DE COLESTEROL.....	108

2.21	ANÁLISIS DE ÉSTERES DE COLESTEROL .....	109
2.21.1	<i>Extracción de lípidos y separación por TLC.....</i>	109
2.21.2	<i>Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).....</i>	109
2.22	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	111
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>113</b>
<b>1</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA SEÑAL 1 DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 DESCRIBIENDO SUS EFECTOS SOBRE LA SEÑALIZACIÓN POR TLR4 EN MACRÓFAGOS.....</b>	<b>115</b>
1.1	LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS .....	115
1.1.1	<i>La falta de lipina-2 aumenta la producción de IL-1<math>\beta</math> .....</i>	115
1.1.2	<i>La falta de lipina-2 aumenta la producción de TNF-<math>\alpha</math> en macrófagos.....</i>	119
1.2	LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA SEÑAL INFLAMATORIA A TRAVÉS DE TLR4 .....	120
1.2.1	<i>La falta de lipina-2 incrementa la producción de pro-IL-1<math>\beta</math>.....</i>	120
1.2.2	<i>La falta de lipina-2 aumenta la expresión génica de IL-1<math>\beta</math> y de otros genes proinflamatorios ....</i>	122
1.2.3	<i>La falta de lipina-2 incrementa la translocación de NF-<math>\kappa</math>B al núcleo tras la activación de TLR4. .</i>	126
1.2.4	<i>La falta de lipina-2 aumenta la activación de las MAPK tras la activación de TLR4.....</i>	128
1.3	LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3.....	131
1.3.1	<i>La falta de lipina-2 aumenta la expresión de genes implicados en la formación del inflammasoma ...</i> .....	131
1.3.2	<i>La falta de lipina-2 induce la expresión de IL-1R en macrófagos humanos.....</i>	133
<b>2</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE LA LIPINA-2 EN LA SEGUNDA SEÑAL DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 POR ATP, DEFINIENDO SU PAPEL EN LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR P2X7, LOS FLUJOS DE K<sup>+</sup>, LA OLIGOMERIZACIÓN DE ASC, LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-1 Y LOS PROCESOS DE MUERTE CELULAR ASOCIADOS A DICHA ACTIVACIÓN.....</b>	<b>134</b>
2.1	LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE IL-18 EN MACRÓFAGOS .....	134
2.2	LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 POR ATP A TRAVÉS DEL RECEPTOR P2X7 EN MACRÓFAGOS .....	135
2.2.1	<i>La falta de lipina-2 incrementa la expresión de algunas variantes del receptor P2X7.....</i>	135
2.2.2	<i>La falta de lipina-2 incrementa las corrientes de iones por ATP a través del canal P2X7.....</i>	136
2.2.3	<i>La falta de lipina-2 aumenta la salida de K<sup>+</sup> tras la activación del inflammasoma con LPS/ATP ....</i>	139
2.2.4	<i>Efecto de la concentración extracelular de K<sup>+</sup> sobre la producción de IL-1<math>\beta</math> en células sin lipina-2 ...</i> .....	140
2.3	LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA OLIGOMERIZACIÓN DE ASC MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA CON LPS/ATP .....	141
2.4	LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-1 TRAS LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA CON LPS/ATP. ....	144

2.5	EL AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\beta$ EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2 ESTÁ MODULADO A TRAVÉS DEL INFLASOMA NLRP3-ASC-CASPASA-1.....	147
2.6	LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANA.....	149
2.7	LA PRODUCCIÓN DE ROS NO INTERVIENE EN LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\beta$ MEDIADA POR LIPINA-2 ....	154
<b>3</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL COLESTEROL EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 DESENCADENADA POR LA FALTA DE LIPINA-2, Y MÁS CONCRETAMENTE, EN LA AMPLIFICACIÓN DE LA SEGUNDA SEÑAL .....</b>	<b>155</b>
3.1	LA FALTA DE LIPINA-2 DISMINUYE LOS NIVELES DE COLESTEROL DE LA CÉLULA EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN CLÁSICA DEL INFLAMASOMA NLRP3. ....	155
3.2	FALTA DE LIPINA-2 DISMINUYE LOS NIVELES DE ESTERES DE COLESTEROL DE LA CÉLULA. ....	156
3.3	EL TRATAMIENTO CON COLESTEROL DISMINUYE LAS CORRIENTES DE K <sup>+</sup> EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2 .....	159
3.4	EL TRATAMIENTO CON COLESTEROL DISMINUYE LA FORMACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ASC POR LPS/ATP EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2.....	162
3.5	EL TRATAMIENTO CON COLESTEROL DISMINUYE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-1 EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2.....	163
3.6	EL TRATAMIENTO CON COLESTEROL DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\beta$ EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2 .....	164
<b>4</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL INFLAMASOMA DURANTE EL DESARROLLO DE INFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS EN UN MODELO MURINO .....</b>	<b>165</b>
4.1	PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS TRAS EL TRATAMIENTO DE RATONES CON LPS....	165
4.2	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES PROINFLAMATORIOS EN HÍGADO Y BAZO DE RATONES <i>Lpin2</i> <sup>-/-</sup> TRAS TRATAMIENTO CON LPS. ....	166
<b>5</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA EN MACRÓFAGOS A TRAVÉS DE UN ESTÍMULO METABÓLICO COMO ES EL ÁCIDO PALMÍTICO .....</b>	<b>169</b>
5.1	LA LIPINA-2 MODULA LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA A TRAVÉS DEL ÁCIDO PALMÍTICO.....	169
5.1.1	<i>La falta de lipina-2 aumenta la activación de NF-<math>\kappa</math>B por ácido palmítico .....</i>	<i>169</i>
5.1.2	<i>La falta de lipina-2 aumenta la expresión del ARNm de IL-1<math>\beta</math> por ácido palmítico.....</i>	<i>171</i>
5.1.3	<i>La falta de lipina-2 aumenta la producción de IL-1<math>\beta</math> por ácido palmítico en células preactivadas con LPS .....</i>	<i>174</i>
<b>6</b>	<b>LA LIPINA-2 TAMBIÉN MODULA LA PRODUCCIÓN DE IL-1<math>\beta</math> A TRAVÉS DEL INFLAMASOMA NLRC4. ....</b>	<b>179</b>
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>181</b>
<b>1</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA PRIMERA SEÑAL DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 DESCRIBIENDO SUS EFECTOS SOBRE LOS PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN POR TLR4 EN MACRÓFAGOS.....</b>	<b>184</b>

---

1.1	ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN POR LPS.	184
1.2	ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA INDUCCIÓN DE GENES QUE COMPONEN EL INFLAMASOMA.	187
<b>2</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA SEGUNDA SEÑAL DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 MEDIADA POR ATP.</b>	<b>187</b>
<b>3</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL COLESTEROL EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 DESENCADENADA POR LA FALTA DE LIPINA-2, Y MÁS CONCRETAMENTE, EN LA AMPLIFICACIÓN DE LA SEGUNDA SEÑAL POR ATP.</b>	<b>191</b>
<b>4</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL INFLAMASOMA DURANTE EL DESARROLLO DE INFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS EN UN MODELO MURINO.</b>	<b>194</b>
4.1	FACTORES DIFERENCIALES ENTRE RATONES Y HUMANOS QUE PODRÍAN SER LOS CAUSANTES DE PROMOVER LA APARICIÓN DEL SÍNDROME DE MAJEED.	195
<b>5</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA POR ÁCIDO PALMÍTICO.</b>	<b>197</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONS.</b>	<b>203</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>207</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rutas de señalización de los PRRs.....	40
<b>Figura 2.</b> Rutas de activación de las MAPK.....	41
<b>Figura 3.</b> Estructura de los componentes de NF-kB.....	42
<b>Figura 4.</b> Dominios estructurales de los receptores tipo NOD y HIN200.....	44
<b>Figura 5.</b> Ensamblaje de los inflamasomas.....	45
<b>Figura 6.</b> Modelo de activación del inflamasoma NLRP3.....	47
<b>Figura 7.</b> Activadores del inflamasoma NLRP3.....	48
<b>Figura 8.</b> Modelo de activación del inflamasoma NLRP3.....	50
<b>Figura 9.</b> Mecanismos de activación del inflamasoma por alteraciones metabólicas y en T2D en células mieloides.....	54
<b>Figura 10.</b> Los inflamasomas y sus activadores.....	55
<b>Figura 11.</b> Fenotipo de los ratones fld.....	59
<b>Figura 12.</b> Estructura de los alelos mutantes fld.....	60
<b>Figura 13.</b> Motivos estructurales y funcionales de las proteínas de la familia lipina.....	61
<b>Figura 14.</b> Ruta del glicerol fosfato para la síntesis de novo de triacilglicerol (TAG) y glicerofosfolípidos. L.....	62
<b>Figura 15.</b> Actividad enzimática de las lipinas en mamíferos.....	63
<b>Figura 16.</b> Patrón de expresión de las lipinas murinas en tejidos.....	66
<b>Figura 17.</b> Diagrama de las mutaciones de la proteína lipina-2 en humanos.....	68
<b>Figura 18.</b> Protocolo experimental de estimulación eléctrica empleado para medir las corrientes eléctricas producidas por ATP.....	107
<b>Figura 19.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$ en distintos tipos de macrófagos.....	116
<b>Figura 20.</b> Efectos de la falta de lipina-2 en la activación de la IL-1 $\beta$ en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> .....	117
<b>Figura 21.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$ en macrófagos tras estimulación con diferentes activadores del inflamasoma NLRP3.....	118
<b>Figura 22.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de TNF- $\alpha$ en distintos tipos de macrófagos.....	119
<b>Figura 23.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de pro-IL-1 $\beta$ durante la activación mediada por LPS en células RAW 264.7.....	120
<b>Figura 24.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de pro-IL-1 $\beta$ durante la activación mediada por LPS en BMDM.....	121
<b>Figura 25.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de pro-IL-1 $\beta$ durante la activación mediada por LPS en macrófagos humanos.....	122
<b>Figura 26.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$ en distintos tipos de macrófagos..	123
<b>Figura 27.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de ARNm de IL18 en distintos tipos de macrófagos...	124
<b>Figura 28.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de genes proinflamatorios en los distintos tipos de macrófagos.....	125

<b>Figura 29.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de NF- $\kappa$ B durante la activación mediada por LPS en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> .....	127
<b>Figura 30.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de NF- $\kappa$ B durante la activación mediada por LPS en macrófagos humanos.....	128
<b>Figura 31.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de las MAPK durante la activación mediada por LPS en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> .....	129
<b>Figura 32.</b> Papel de las MAPK en la producción de IL-1 $\beta$ en BMDM.....	130
<b>Figura 33.</b> Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión de los genes que codifican para proteínas que componen el inflammasoma.....	132
<b>Figura 34.</b> Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión del gen que codifican para IL1R.....	133
<b>Figura 35.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-18 en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> .....	134
<b>Figura 36.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión génica de las distintas variantes de los receptores P2X7 en distintos tipos de macrófagos murinos en reposo.....	136
<b>Figura 37.</b> Registros de corrientes de iones producidas por ATP en macrófagos peritoneales.....	137
<b>Figura 38.</b> Densidad media de corriente en macrófagos murinos de distinta procedencia.....	138
<b>Figura 39.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en el análisis de los niveles de K <sup>+</sup> intracelulares en células RAW 264.7 tras la activación con ATP.....	139
<b>Figura 40.</b> Efecto de los niveles extracelulares de K <sup>+</sup> sobre la producción de IL-1 $\beta$ en células RAW 264.7.....	140
<b>Figura 41.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la formación de oligómeros de ASC por LPS/ATP en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> .....	142
<b>Figura 42.</b> Efecto de la falta de lipina-2 sobre la formación de specks en BMDM.....	143
<b>Figura 43.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de la caspasa-1 y de la IL-1 $\beta$ en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> .....	144
<b>Figura 44.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de la caspasa-1 por LPS/ATP en células RAW 264.7.....	145
<b>Figura 45.</b> Efecto de los inhibidores de caspasa en la producción de IL-1 $\beta$ en BMDM de animales wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> .....	146
<b>Figura 46.</b> Producción de TNF- $\alpha$ en macrófagos murinos derivados de médula ósea de animales wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> .....	146
<b>Figura 47.</b> Efecto de la inhibición de caspasas en la producción de IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$ en macrófagos humanos.....	147
<b>Figura 48.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$ en BMDM procedentes de ratones wt, Nalp3 <sup>-/-</sup> , Asc <sup>-/-</sup> y Casp1 <sup>-/-</sup> .....	148
<b>Figura 49.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la unión de anexina V durante la activación del inflammasoma.....	150
<b>Figura 50.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la entrada de IP en la célula tras la activación del inflammasoma.....	151
<b>Figura 51.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la permeabilización de la membrana por ATP en BMDM.....	152
<b>Figura 52.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la citotoxicidad tras tratamiento celular con LPS/ATP.....	153
<b>Figura 53.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de ROS en la activación del inflamasona en células RAW 264.7.....	154

<b>Figura 54.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en los niveles de colesterol en macrófagos tras la activación clásica del inflammasoma. ....	156
<b>Figura 55.</b> Efecto de la ausencia de la lipina-2 en la composición en ácidos grasos y en el contenido total de los ésteres de colesterol de macrófagos humanos. ....	157
<b>Figura 56.</b> Medida de los niveles celulares de colesterol tras el tratamiento con colesterol-MCD en células deficientes en lipina-2 tras la activación clásica del inflammasoma. ....	158
<b>Figura 57.</b> Efecto del colesterol en los registros de corrientes de iones producidas por ATP en macrófagos peritoneales carentes de lipina-2 .....	159
<b>Figura 58.</b> Efecto del colesterol en las corrientes iónicas generadas por el receptor P2X7 tras tratamiento con ATP. ....	160
<b>Figura 59.</b> Efecto del colesterol en en el curso temporal de apertura y cierre del receptor P2X7 tras tratamiento con ATP. ....	161
<b>Figura 60.</b> Papel del colesterol en la formación de oligómeros de ASC por LPS/ATP en BMDM carentes de lipina-2. ....	162
<b>Figura 61.</b> Efecto del colesterol exógeno en la activación de caspasa-1. ....	163
<b>Figura 62.</b> Efecto del colesterol exógeno en la producción de IL-1 $\beta$ . ....	164
<b>Figura 63.</b> Producción de IL-1 $\beta$ , IL-18 y TNF- $\alpha$ en suero de ratones carentes de lipina-2. ....	165
<b>Figura 64.</b> Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias y proteínas del inflammasoma en hígado de ratones tras el tratamiento LPS. ....	166
<b>Figura 65.</b> Tamaño de los bazo tras el tratamiento de ratones wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> con LPS. ....	167
<b>Figura 66.</b> Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias y proteínas del inflammasoma en bazo de ratones tras el tratamiento LPS. ....	168
<b>Figura 67.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de NF- $\kappa$ B en células RAW 264.7 tras la activación con ácido palmítico. ....	169
<b>Figura 68.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de NF- $\kappa$ B en células RAW 264.7 tras la activación con ácido palmítico. ....	170
<b>Figura 69.</b> Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión de IL-1 $\beta$ . ....	171
<b>Figura 70.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de la caspasa-1 por ácido palmítico en células RAW 264.7. ....	172
<b>Figura 71.</b> Efecto de la falta de lipina-2 sobre la producción de IL-1 $\beta$ por ácido palmítico en macrófagos. ....	173
<b>Figura 72.</b> Efecto de la falta de lipina-2 sobre la producción de IL-1 $\beta$ por ácido palmítico en células RAW 264.7 primadas con distintas dosis de LPS. ....	174
<b>Figura 73.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$ por ácido palmítico en macrófagos primados con LPS. ....	175
<b>Figura 74.</b> Papel de las MAPK en la producción de IL-1 $\beta$ en células RAW 264.7 que tienen la expresión de lipina-2 disminuida. ....	176
<b>Figura 75.</b> Papel de los ROS en la producción de IL-1 $\beta$ en células RAW 264.7 por ácido palmítico. ....	177
<b>Figura 76.</b> Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de la caspasa-1 por ácido palmítico en células RAW 264.7. ....	178



<b>Figura 77.</b> Producción de IL-1 $\beta$ en células RAW 264.7 a través del inflamasoma NLRC4.....	179
<b>Figura 78.</b> Posible papel de la lipina-2 en la actividad de los receptores P2X7.....	194
<b>Figura 79.</b> Posible modelo de activación del inflamasoma NLRP3 por LPS y ATP en macrófagos carentes de lipina-2.....	200
<b>Figura 80.</b> Posible modelo de activación del inflamasoma NLRP3 por LPS y ácido palmítico en macrófagos humanos carentes de lipina-2.....	201

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> TLRs y sus ligandos correspondientes.....	39
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de las enfermedades autoinflamatorias monogénicas atendiendo a las características clínicas.....	58
<b>Tabla 3.</b> Composición de los medios con distintas concentraciones de K <sup>+</sup> .....	80
<b>Tabla 4.</b> Reacción de PCR convencional para el genotipado de ratones.....	84
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos usados en PCR convencional para el genotipado de ratones wt y Lpin2 <sup>-/-</sup> .....	85
<b>Tabla 6.</b> Listado de anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.....	91
<b>Tabla 7.</b> Listado de anticuerpos utilizados en Western Blot.....	96
<b>Tabla 8.</b> Reacción para hacer RT-q-PCR.....	99
<b>Tabla 9.</b> Oligonucleótidos de genes de ratón usados para RT-q-PCR.....	100
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos de genes de humano usados para RT-q-PCR.....	101



## ***ABREVIATURAS***

---



**Abreviaturas y acrónimos más utilizados**

**7-AAD:** 7-aminoactinomicina D

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**AIM2:** Proteína ausente en melanoma 2 (del inglés, *absent in melanoma 2*)

**AMP:** Adenosina 5'-monofosfato

**AMPK:** Proteína quinasa activada por AMP (del inglés, *AMP-activated protein kinase*)

**AP-1:** Proteína activadora-1 (del inglés *activator protein-1*)

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNdc:** ARN de doble cadena

**ARNcs:** ARN de cadena sencilla

**ARNm:** ARN mensajero

**ASC:** Proteína adaptadora tipo *speck* asociada a apoptosis con dominio CARD (del inglés, *apoptosis-associated speck-like protein with a CARD domain*)

**ATCC:** Colección americana de cultivos tipo (del inglés, *american type culture collection*)

**ATP:** Adenosina 5'-trifosfato

**BSA:** Albumina sérica bovina (del inglés, *bovine serum albumin*)

**BMDM:** Macrófagos murinos derivados de médula ósea (del inglés, *bone marrow derived macrophages*)

**BrEt:** Bromuro de etidio

**CAPS:** Síndromes periódicos asociados a criopirina (del inglés, *cryopyrin associated periodic syndromes*)

**CHAPS:** 3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano sulfonato

**CE:** Éster de colesterol (del inglés, *cholesteryl ester*)

**COX:** Ciclooxygenasa

**C/EBP $\beta$ :** Proteína beta de unión a CCAAT (del inglés, *CCAAT/enhancer-binding protein beta*)

**CARD:** Dominio de reclutamiento de caspasa (del inglés, *caspase recruitment domain*)

**DAG:** Diacilglicerol

**DAMPs:** Patrones moleculares asociados a daño (del inglés, *danger-associated molecular patterns*)

**DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol

**DAPK:** Proteína quinasa asociada a muerte (del inglés, *death associated protein kinase*)

**DCFHDA:** 2',7-diclorofluoresceína diacetato

**Dir:** Directo

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**dNTP:** Desoxinucleótido trifosfato

**DSS:** Suberato de disuccinimidilo

**DTT:** Ditiotreitolo

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetraacético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *epidermal growth factor*)

**EGTA:** Ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*)

**ERK:** Quinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés, *extracellular-signal-regulated kinases*)

**FFAs:** Ácidos grasos libres (del inglés, *free fatty acids*)

**FBS:** Suero fetal bovino (del inglés, *fetal bovine serum*)

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (del inglés, *fluorescein isothiocyanate*)

**FLICA:** Fluorocromo inhibidor de caspasa

**fld:** Distrofia de hígado graso (del inglés, *fatty liver dystrophy*)

**GAPDH:** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GC/MS:** Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (del inglés, *gas chromatography/mass spectrometry*)

**HEPES:** Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico

**HMGCR:** 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa

**HFD:** Dieta alta en grasa (del inglés, *high-fat diet*)

**Ig:** Inmunoglobulina

**IκB:** Proteína inhibidora de la cadena ligera kappa de las células B activadas (del inglés, *inhibitor protein of kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

**IKK:** Inhibidor de la quinasa de NF-κB (del inglés, *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*)

**IL:** Interleuquina

**IL-1R:** Receptor de la Interleuquina-1 (del inglés, *interleukin-1 receptor*)

**IP:** Ioduro de propidio

**IRS-1:** Sustrato del receptor de insulina-1 (del inglés, *insulin receptor substrate-1*)

**JNK:** Quinasa c-Jun N-terminal (del inglés, *c-Jun N-terminal kinase*)

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad (del inglés, *low-density lipoprotein*)

**LPS:** Lipopolisacárido

**LRR:** Dominio rico en leucinas (LRR, del inglés *leucine-rich repeat domain*)

**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*)

**MAPKK≡ MEK≡ MAP2K≡ MKK:** Proteína quinasa activada por MAPK (del inglés, *MAPK-activated protein kinase*)

**MAPKKK≡ MEKK≡ MAP3K:** Proteína quinasa quinasa activada por MAPK (del inglés, *MAPK-activated protein kinase kinase*)

**MCD:** Metil-β-ciclodextrina

**MCD-CHL:** Colesterol unido a MCD, soluble en agua

**MSU:** Urato monosódico (del inglés, *monosodium urate*)

**mtROS:** ROS mitocondriales

**NAC:** N-acetil-L-cisteína

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NBD:** Dominio de unión a nucleótidos (del inglés *nucleotide-binding domain*)

- NF- $\kappa$ B**: Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de las células B activadas (del inglés, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- NOD**: Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (del inglés *nucleotide-binding oligomerization domain*)
- NLR**: Receptores tipo NOD (del inglés *NOD-like receptors*)
- NLRC4**: Proteína 4 que contiene dominio CARD de la familia de NLR (del inglés *NLR family CARD domain-containing protein 4*)
- NLRP3**: Proteína 3 de la familia de NLR (del inglés *NLR family protein 3*)
- NMDG**: N-metil-D-glucamida
- P2X7**: Purinoceptor tipo 2X subunidad 7 (del inglés, *purinoceptor 2X type 7 subunit*)
- PA**: Ácido fosfatídico (del inglés, *phosphatidic acid*)
- PAP**: Fosfohidrolasa de ácido fosfatídico (del inglés, *PA phosphohydrolase*)
- PAMPs**: Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*)
- PAGE**: Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés, *polyacrylamide gel electrophoresis*)
- PALM**: Ácido palmítico
- PBS**: Tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)
- PC**: Fosfatidilcolina (del inglés, *phosphatidylcholine*)
- PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)
- PE**: Fosfatidiletanolamina (del inglés, *phosphatidylethanolamine*)
- PG**: Fosfatidilglicerol (del inglés, *phosphatidylglycerol*)
- PI3K**: Fosfatidilinositol-3-quinasa (del inglés, *phosphoinositide-3-kinase*)
- PI**: Fosfatidilinositol (del inglés, *phosphatidylinositol*)
- PIC**: Mezcla de inhibidores de proteasas (del inglés, *protease inhibitor cocktail*)
- PKA**: Proteína quinasa A
- PKC**: Proteína quinasa C
- PKR**: Proteína quinasa activada por ARN de doble cadena
- PMSF**: Fluoruro de fenilmetilsulfonylo (del inglés, *phenylmethylsulfonyl fluoride*)
- PRRs**: Receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, *pattern-recognition receptors*)
- PS**: Fosfatidilserina (del inglés, *phosphatidylserine*)
- PYD**: Dominio de pirina (del inglés, *pyrin domain*)
- RD-NES**: Solución extracelular normal divalente reducida (del inglés, *reduced divalent normal extracellular solution*)
- RE**: Retículo endoplásmático
- Rev**: Reverso
- ROS**: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, *reactive oxygen species*)
- RT-PCR**: PCR con transcriptasa inversa (del inglés, *reverse transcription PCR*)
- RT-q-PCR**: PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés, *real time quantitative PCR*)
- SAPK**: Proteína quinasa activada por estrés (del inglés, *stress-activated protein kinase*)
- SDS**: Dodecilsulfato sódico (del inglés, *sodium dodecyl sulfate*)
- SFAs**: Ácidos grasos saturados (del inglés, *saturated fatty acids*)

**siRNA:** ARN pequeño de interferencia (del inglés, *small interfering RNA*)

**SREBP:** Proteína de unión al elemento regulador de esteroides (del inglés, *sterol-regulatory-element-binding protein*)

**T2D:** Diabetes tipo II (del inglés, *type II diabetes*)

**TAE:** Tris-acetato-EDTA

**TAG:** Triacilglicerol o triglicérido

**TLC:** Cromatografía en capa fina (del inglés, *thin-layer chromatography*)

**TLR:** Receptor tipo toll (del inglés, *toll-like receptor*)

**TNF:** Factor de necrosis tumoral (del inglés, *tumor necrosis factor*)

**TNFR:** Receptor del factor de necrosis tumoral (del inglés, *tumor necrosis factor receptor*)

**wt:** Genotipo silvestre (del inglés, *wild-type*)



## ***SUMMARY***

---



## **INTRODUCTION**

The innate immune system constitutes the first line of defense against invading microbial pathogens, as it can discriminate self from non-self. It can also sense endogenous danger signals that are released from disrupted host tissue or stressed cells. Macrophages, cells of the innate immune system, are able to recognize PAMPs and DAMPs by different receptors that modulate inflammation through transcriptional (TLRs) and post-transcriptional (NLRs) mechanisms. Key players in those pathways are large intracellular multiprotein complexes called inflammasomes. After exposure to pathogens and danger signals, inflammasomes orchestrate innate immune responses through activation of caspase-1 leading to the maturation of pro-inflammatory cytokines pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 and an inflammatory form of death known as pyroptosis. NLRP3 inflammasome is the best characterized to date. It is composed of an NLR receptor, the adaptor protein ASC and pro-caspase-1. In macrophages, its activation and assembly need two signals. The first signal, also known as priming, leads to transcription of genes encoding pro-IL-1 $\beta$  and NLRP3 and it is mediated by activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B through various receptors, such as TLRs, IL1R or TNFR. The second signal, provided by DAMPs, activates the inflammasome assembly, resulting in the catalytic processing of pro-caspase-1 into its enzymatically active form. NLRP3 inflammasome is activated by a wide range of stimuli, such as bacterial and viral pathogens, pore-forming toxins, lipids, crystals, vaccine adjuvants and stress cellular signals such as ATP. It is broadly agreed that detection of such a diverse variety of agents cannot bind to NLRP3 directly. Instead, it is thought that NLRP3 monitors a common host-derived factor triggered by all these agents. Several hypotheses on molecular mechanisms leading to NLRP3 activation have been formulated. Three models that may not be exclusive are the most widely accepted. The first model suggests that a decrease in intracellular potassium concentration causes inflammasome activation, the second model points at mitochondrial damage and ROS production, and the third model claims that lysosomal destabilization is the mechanism triggering caspase-1 activation.

Extracellular ATP has been widely used as an inflammasome inducer and exerts its biological action through purinergic P2 receptors such as P2X7R. P2X7R are non-selective cationic channels, abundantly expressed in macrophages, whose activation mediates an influx of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> into the cytosol and the concomitant efflux of K<sup>+</sup>. ATP binding to P2X7R promotes a decrease in intracellular K<sup>+</sup> levels triggering inflammasome assembly, but high concentrations of ATP (in the mM range) are required to elicit NLRP3 activation in a P2X7R dependent manner. P2X7R are located in lipid rafts, membrane microdomains rich in cholesterol and sphingolipids, and their function is tightly regulated. Cholesterol acts as a negative regulator of their activity, and protects cells from P2X7-dependent death.

FFA triggered inflammation has been proposed to be involved in the development of metabolic diseases such as obesity and T2D. Elevated FFA levels in circulation may contribute to these disorders by activating the NLRP3-ASC inflammasome, triggering caspase-1, IL-1 $\beta$  and IL-18 production. The underlying mechanism may be the following: FFAs induce pro-IL-1 $\beta$  production through TLRs and at the same time promote caspase-1 by increasing mtROS through intracellular AMPK inhibition.

Dysregulation of the NLRP3 inflammasome is associated with a wide spectrum of autoinflammatory diseases. These diseases are characterized by recurrent fevers and unprovoked episodes of inflammation, in which the monocyte-macrophage is the dysfunctional cell and auto-reactive T-cells or auto-antibodies are absent. Furthermore, autoinflammatory disorders are driven by IL-1 oversecretion as IL-1, in particular IL-1 $\beta$  blockade improves clinical symptoms in patients. However, TNF- $\alpha$  neutralization, a highly effective therapy for autoimmune diseases, poorly controls autoinflammatory disorders.

Of all autoinflammatory diseases characterized to date, it is important to highlight the Majeed syndrome, whose molecular mechanism does not lie in mutations of inflammasome proteins or IL-1 biology, but in mutations of lipin-2, a key enzyme in lipid metabolism.

Lipin-2 is a member of a family of proteins, the lipins, which catalyze the enzymatic conversion of phosphatidic acid to diacylglycerol, a direct precursor of triacylglycerol and some phospholipids. There are three members in this family (lipin-1, lipin-2 and lipin-3) and all of them exhibit Mg<sup>2+</sup>-dependent PAP activity. Lipins are cytosolic enzymes that translocate onto the endoplasmic reticulum to participate in the glycerolipid biosynthesis pathway or onto the nucleus, to act as transcriptional coactivators. Structurally, these proteins possess two highly conserved domains, N-LIP and C-LIP. The C-LIP domain contains the PAP enzyme active site motif (DXDXT) as well as the LXXIL motif, which has been shown to mediate interaction of lipin with transcriptional activators and coactivators. Members of the lipin family exhibit different tissue expression patterns; lipin-1 is mainly expressed in adipose tissue and skeletal muscle, whereas lipin-2 is mainly expressed in the liver. Lipins have also been found in macrophages, where lipin-1 and lipin-2 play opposite roles in the inflammatory response. It has been described that lipin-1 mediates pro-inflammatory responses through the overactivation of downstream pathways during TLR4 activation. However, lipin-2 has a protective role in macrophages, which depends on the overstimulation of the JNK pathway by saturated fatty acids.

Mutations found in the human LPIN2 gene have been linked to inflammatory based disorders. In particular, four independent LPIN2 mutations are known to cause Majeed syndrome, an autosomal recessive disease first described in 2001 that falls into the category

of autoinflammatory disorders. Majeed syndrome starts during infancy and its phenotype includes chronic recurrent multifocal osteomyelitis, congenital dyserythropoietic anaemia, recurrent fevers and inflammation of the bone and skin. Majeed syndrome patients are weakly responsive to treatment with corticosteroids and TNF- $\alpha$  inhibitors but IL-1 $\beta$  blockade is accompanied by symptomatic improvement on clinical and biological parameters. These data revealed that IL-1 $\beta$  plays a key role in the development of the disease.

Studies in humans to elucidate the underlying mechanisms by which mutations in lipin-2 cause this syndrome are limited. Since IL-1 $\beta$  seems to be involved in this process, it was hypothesized that lipin-2 could modulate its production and thereby be involved in the regulation of inflammasome activity.

## **OBJECTIVES**

Taking into consideration all of these previous results, the principal objective in this thesis was to assess the role of lipin-2 in the inflammasome activation *in vitro* and *in vivo*.

This principal objective can be divided into several specific objectives:

- To study the involvement of lipin-2 in inflammasome priming (first signal) defining its effects on cell signaling, in mouse and human macrophages.
- To study the involvement of lipin-2 in inflammasome activation (second signal), defining its effect on P2X7 receptor activity, potassium efflux, ASC oligomerization, caspase-1 activation and pyroptosis.
- To analyze the effect of cholesterol on inflammasome overactivation of macrophages lacking lipin-2.
- To analyze the role of lipin-2 during *in vivo* treatment with LPS.
- To study the involvement of lipin-2 in a metabolic inflammasome activation with palmitic acid, in mouse and human macrophages.

## **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

Cells: The following cell types were used: Murine RAW 264.7 macrophage-like cells, bone marrow derived macrophages (BMDM) from *wt*, *Lpin2*<sup>-/-</sup>, *Nalp3*<sup>-/-</sup>, *Pycard*<sup>-/-</sup> and *Casp1*<sup>-/-</sup> mice, peritoneal macrophages from *wt* and *Lpin2*<sup>-/-</sup> and human blood monocyte-derived macrophages obtained from *buffy coats* of healthy volunteer donors from the Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (Valladolid, Spain).

Reagents: LPS, ATP, nigericin, MSU, alumin, caspase-1 inhibitor IV (Ac-YVAD-AOM), pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK), NAC, palmitic acid complexed to bovine serum albumin (BSA) (3,4:1 molar ratio) and flagellin.

ELISA: Following manufacturer's instructions, specific ELISA kits were used to quantify IL-1 $\beta$ , IL-18 and TNF- $\alpha$  from mouse serum and supernatants after cellular activation.

Immunoblot: After cellular stimulation, cells were lysed and protein quantified by the Bradford protein assay kit. 50  $\mu$ g of protein were analyzed by immunoblot using specific antibodies and were visualized by chemiluminiscence.

RT-q-PCR: Total RNA from cells and mouse tissues was extracted and cDNA was synthesized. Quantitative real time PCR was performed in a LightCycler 480 and the relative mRNA expression was obtained using the  $\Delta\Delta$ Ct method.

Transfection: Human macrophages were transiently transfected with siRNA (20 nM) by Nucleofection™ following the corresponding Amaxa™ optimized protocol. RAW 264.7 cells and BMDM were transfected with siRNA (20 nM) using Lipofectamine™ RNAiMAX. Flagellin was transfected into cells using the *jetPRIME*® reagent.

Flow cytometry: It was used to quantified ROS production (Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, DCFHDA), caspase-1 activity (FAM-FLICA® *in vitro* Caspase-1 Detection kit) and membrane permeabilization (Propidium iodide, IP). Fluorescence was analyzed by flow cytometry in a FACS Gallios (Beckman Coulter), using the FL1 (for DCFHDA and FAM-FLICA®) and the FL3 detector (IP). Data analyses were performed using Kaluza software.

Confocal microscopy: It was used to measure membrane permeabilization (Ethidium bromide and annexin V) as well as to perform immunofluorescence assays. Fluorescence was detected in a Leica confocal microscope TCS SP5X using a White Light Laser. DAPI was detected using the 405 nm laser line (blue), Alexa-Fluor 488 was detected using the 485 nm laser line (green) and ethidium bromide and annexin V were detected using the 588 nm laser line (red).

Inductively Coupled Plasma and Optical Emission Spectrometry: Intracellular K<sup>+</sup> measurements were performed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) with a Varian 725-ES spectrometer.

Cytotoxicity assay: Extracellular LDH was measured to determine the percentage of cell death using a Cytotoxicity Detection kit.

Electrophysiology: Ionic currents through P2X7R were recorded at room temperature (20-25° C) using the whole-cell configuration of the *patch-clamp* technique. Whole-cell currents were recorded using an Axopatch 200A *patch-clamp* amplifier (Axon Instruments). Electrical stimulation protocols were edited with the Clampex® subroutine of the pCLAMP® 10.2 software (Axon Instruments) and recordings were digitized using Clampfit® subroutine of the pCLAMP® software (Axon Instruments).

Lipid measurement: A cell extract corresponding to 1 mg protein was used and total lipids were extracted. Analysis of the fatty acids of CE was performed by gas chromatography/mass spectrometry. It was carried out in an Agilent 7890A gas chromatography coupled to an Agilent 5975C mass-selective detector operated in electron impact mode (70 eV). Total cholesterol levels were measured by spectrophotometry as its reaction with FeCl<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> produces a red colour that can be quantified at 560 nm.

Statistical analysis: Data are expressed as mean ± standard deviation of the mean. Statistical comparisons between groups of data were carried out with the two-tailed Student's t test. p values of less than 0.05 were considered significant.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The purpose of the present study was to explore the role of lipin-2 on inflammasome activation. To accomplish this objective, a classic model of NLRP3 inflammasome activation was used. Priming of macrophages and inflammasome assembly were achieved by LPS and exogenous ATP-induced activation of the P2X7R, respectively.

### **1. Involvement of lipin-2 in inflammasome priming (first signal) defining its effects on cell signaling, in mouse and human macrophages**

Inflammasome activation and subsequent IL-1 $\beta$  production has two important checkpoints, priming (signal 1) and assembly (signal 2), but the mechanistic details of those events still remain poorly characterized.

After testing the production of IL-1 $\beta$  in macrophages deficient in lipin-2 treated with LPS (200 ng/ml, 4 h) and ATP (2 mM, 40 min), it was observed that IL-1 $\beta$  release was augmented when lipin-2 was reduced or absent. These data suggest that lipin-2 modulates NLRP3 inflammasome activation, and an important next step would be to determine at which checkpoint lipin-2 was involved in IL-1 $\beta$  production.

To further explore the role of lipin-2 in IL-1 $\beta$  production, experiments were performed to look at whether lipin-2 could be involved in TLR4 signaling pathways during the priming step.

The first goal was to determine whether lipins could be implicated in the up-regulation of pro-IL-1 $\beta$  by LPS. It is well established that the transcription of pro-IL-1 $\beta$  is induced by the activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B. To assess whether NF- $\kappa$ B activity was altered when lipin-2 was absent, nuclear expression of this transcription factor was analyzed, and it was found that 30 minutes after LPS stimulation, the induction of nuclear translocation of NF- $\kappa$ B was more marked in cells lacking lipin-2. To determine whether a higher activation of NF- $\kappa$ B in these cells was parallel to a larger induction of pro-IL-1 $\beta$ , protein and mRNA levels were quantified by western blot and RT-q-PCR respectively. As expected, the analysis showed a pronounced increase in pro-IL-1 $\beta$  expression that was higher in the absence of lipin-2. In addition, RT-q-PCR analysis also revealed that the mRNA expression of NLRP3 was increased in cells without lipin-2.

In line with the previous results, the role of lipin-2 in LPS activation was further confirmed by quantitative analysis of proinflammatory cytokines. It was observed that the inhibition of lipin-2 expression led to a significant induction of *Tnfa* and *Il6* gene expression, and ELISA measurements verified that *Tnfa* increased mRNA expression by LPS in cells lacking lipin-2 resulted in an increased production of its protein levels. Taking these data into consideration, TNF- $\alpha$  overproduction seen in cells without lipin-2 could act as a priming step through TNFR1 and TNFR2, and participate in the higher IL-1 $\beta$  generation reported in the absence of lipin-2.

Collectively, these data suggest that lipin-2 depletion increases pro-IL-1 $\beta$  and NLRP3 production, possibly through the overactivation of NF- $\kappa$ B as well as modulates proinflammatory cytokine levels. However, the fact that lipin-2 plays an important role in transcriptional regulation of NLRP3, does not discard its involvement in NLRP3 deubiquitination, a very important process for inflammasome activation.

MAPKs are also activated through TLR4 receptors and they also seem to play a role in inflammasome activation. For this reason, the effect of lipin-2 depletion on the level of phosphorylation of members of the MAPK pathway was studied by western blot. It was found that treatment of macrophages lacking lipin-2 with LPS significantly increased the phosphorylation of JNK, ERK and p38 compared to *wt*, suggesting that lipin-2 may negatively regulate MAPK activation by LPS. The fact that the absence of lipin-2 increases MAPK activation may be related to an enhanced inflammasome activation in those cells, probably due to an increase in speck formation through ASC phosphorylation by JNK.



---

## **2. Involvement of lipin-2 in inflammasome activation (second signal), defining its effect on P2X7 receptor activity, potassium efflux, ASC oligomerization, caspase-1 activation and pyroptosis**

Once it was determined that lipin-2 has a key role during the first step, experiments were performed to look at its involvement in the second signal. Analysis of IL-18 production, a constitutively expressed cytokine and whose maturation depends on inflammasome activation, showed an important increase in LPS primed cells lacking lipin-2 after stimulation with ATP, which suggested that lipin-2 could be implicated in caspase-1 activation (second signal).

Macrophage treatment with ATP causes activation of purinergic receptor P2X7. To determine whether lipin-2 interferes with that process, *patch-clamp* whole-cell configuration studies were carried out. Application of ATP dramatically enhanced the amplitude of the inward and outward currents through P2X7R in cells lacking lipin-2. These data suggest that ATP promotes the P2X7R opening to a pore dilated state that is larger when lipin-2 is absent. In addition, these data were confirmed by the use of NMDG<sup>+</sup> as the extracellular charge-carrying ion.

As cellular ion gradients control inflammasome activation, intracellular K<sup>+</sup> concentration was measured. Application of ATP led to an important drop in the intracellular content of K<sup>+</sup>, which was found to be more marked when lipin-2 was absent. Moreover, the significant decrease in the intracellular amounts of this ion elicited by ATP were analyzed at different time points and remained lower overtime if lipin-2 was not present. These data show that lower intracellular concentration of K<sup>+</sup> may be responsible for the enhanced NLRP3 inflammasome activation and concomitant IL-1 $\beta$  overproduction observed in primed macrophages lacking lipin-2 after ATP treatment. Moreover, other cellular events triggered during the second step of inflammasome activation were investigated and higher ASC oligomerization, greater activation of caspase-1 and enhanced membrane permeabilization, a process that precedes pyroptosis, were detected in lipin-2 deficient macrophages. Collectively, these data suggest that absence of lipin-2 leads to overstimulation of the NLRP3 pathway, triggering IL-1 $\beta$  and IL-18 production in an ASC and caspase-1 dependent manner, effects that may be due to the fact that absence of lipin-2 leads to an increase of ATP receptor activity, triggering a higher K<sup>+</sup> efflux from the cell and in turn, increasing the assembly of the inflammasome and its activity.

### **3. Effect of cholesterol on inflammasome overactivation in lipin-2 deficient macrophages**

Lipin-2 deficient cells were found to have lower cholesterol levels than control cells. In order to determine whether these decreased levels were related to the finding that absence of lipin-2 triggers NLRP3 inflammasome hyperactivation, cellular cholesterol levels were increased by preincubating cells with 100 µg/ml cholesterol (complexed with MCD to make it water-soluble). Once it was determined that cholesterol levels were similar in cells with and without lipin-2, different events triggered by inflammasome activation were studied: K<sup>+</sup> efflux, ASC oligomerization, caspase-1 activity and IL-1β production. Responses mediated by P2X7 receptors after ATP application, such as ionic currents, were diminished by cholesterol loading. Furthermore, it was also observed that ATP treatment of LPS primed macrophages after incubation with cholesterol-loaded MCD produced a profound inhibition of ASC oligomerization, caspase-1 activity and IL-1β production. Taken together these results suggest that restored cholesterol levels in cells lacking lipin-2 is essential to reduce inflammatory responses associated to NLRP3, as decreased levels of this lipid seem to play a key role during the activation of P2X7R by ATP, participating in NLRP3 inflammasome activation.

In this scenario it is likely that lipin-2 is necessary for maintaining cholesterol homeostasis. Lipin-2 may modulate cholesterol levels through HMGCR, the key enzyme in cholesterol synthesis or through cholesterol efflux by regulating ABCA1 and ABCG1. However, since lipin-2 is a lipid metabolic enzyme, it can also be speculated that lipin-2 deficiency leads to perturbations in the bilayer structure in the immediate lipid environment of the P2X7 receptor, enhancing its activity through modifications in its gating properties. Lipin-2 absence could alter ceramide and lysolipid levels and thereby alter membrane structure and fluidity. In the same line of thinking, modification in DAG and PA levels, phospholipids precursors which are control by lipins, might also contribute to stabilize the dilated state of P2X7R pore.

In recent years, the lipid environment has been considered to be crucial for the maintenance of the structure and function of membrane proteins, a fact that has led to the development of new methods to understand lipid interactions. Among these methods, high resolution mass spectrometry stands out, which is emerging with the full potential to monitor different modes of lipid binding to membrane proteins. Studying the interaction between P2X7R and surrounding lipids in the presence and absence of lipin-2 could reveal new data about how this enzyme regulates cholesterol homeostasis and the inflammatory response.

#### 4. Role of lipin-2 during *in vivo* treatment with LPS

One of the differences between humans and mice with mutations in lipin-2 is that mice do not develop the Majeed Syndrome. Although lipin-2 knock-out mice did exhibit features of the disease such as anemia, they failed to show evidences of osteomyelitis. These data suggest that other components in addition to lipin-2 deficiency may contribute to the appearance of the Majeed syndrome.

Majeed syndrome patients have elevated pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  in serum inferring that inflammasome activity may be altered. As intraperitoneal injection of LPS triggers IL-1 $\beta$  production in a NLRP3 inflammasome dependent manner, a model of septic shock induced by LPS was used to determine whether infection, as an additional factor in mice may contribute to develop this autoinflammatory condition. Mice were injected intraperitoneally with LPS (10 mg/kg) and after 3 hours they were euthanized, and blood was collected to analyze cytokine production in serum. It was observed that mice lacking lipin-2 showed an increased production of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-18 and TNF- $\alpha$  when compared to *wt* mice. These data suggest that lipin-2 absence promotes inflammasome overactivation *in vivo* in a mice model of septic shock. Moreover, the mRNA expression of pro-inflammatory genes in livers and spleens from mice treated with LPS was also analyzed. In lipin-2 deficient livers, LPS promotes a significant increase of pro-inflammatory genes such as *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Il12b* and *Nos2* in comparison with *wt* livers. Additionally, genes encoding inflammasome proteins and IL-1 receptor were also evaluated, and *Nalp3* and *Il1r* gene expression were found to be up-regulated when lipin-2 was absent. In the same way, to test whether lipin-2 contributed to a marked inflammation in spleens following LPS injection, RT-q-PCR analyses were performed, and it was found that *Il1b*, *Tnfa* and *Nalp3* gene expression was up-regulated in inflamed spleens from *Lpin2*<sup>-/-</sup> mice. Moreover, LPS treatment showed that spleens from mice lacking lipin-2 were bigger in size, which could be due to a higher oxidative response in those animals.

Since LPS treatment promotes an enhanced pro-inflammatory status in lipin-2 deficient mice, it may also be speculated that infectious agents, such as bacteria or viruses, may constitute an additional environmental factor triggering the Majeed syndrome. This hypothesis was formulated because children are highly exposed to these agents during the first year of life, and if they have mutations in lipin-2, they might develop worse episodes of inflammation leading to the medical profile observed in Majeed syndrome patients. In the same way, the vaccination schedule for infants could also contribute to Majeed syndrome development, as alum salts, one of the main components in vaccines is able to increase IL-1 $\beta$  production and neutrophil recruitment to peritoneal cavity in mice. It would be of great interest to subject mice to the same vaccine schedule as children to evaluate whether vaccines triggers the disease

or not. Moreover, children but not mice may also be exposed to UV and other skin irritants, another two NLRP3 inducers that trigger IL-1 $\beta$  production in a NLRP3 dependent manner and could also participate in the development of the clinical symptoms observed in Majeed syndrome patients.

In summary, the activators to which children but not mice are exposed that could be involved in the development of Majeed syndrome should be outlined. Moreover, it will also be useful to elucidate whether NLRP3 alone or in combination with other inflammasomes is responsible for IL-1 $\beta$  overproduction when lipin-2 is absent. Understanding the actual mechanisms involved in the development of this autoinflammatory syndrome could bring new insights into the pathophysiology of the disease and provide highly effective therapies for these patients.

### **5. Involvement of lipin-2 in metabolic inflammasome activation with palmitic acid in mouse and human macrophages**

It is important to highlight that palmitic acid has also been described as an NLRP3 inflammasome inducer but differs from other inflammasome activators because it can act as signal 1 and signal 2. Since lipin-2 attenuates the pro-inflammatory response in human macrophages and RAW cells activated by palmitic acid, it was analyzed whether lipin-2 was involved in IL-1 $\beta$  production by this fatty acid. First of all, NF- $\kappa$ B activation was studied by western blot and it was shown that inhibition of lipin-2 expression led to an overactivation of p65 and p50 subunits of NF- $\kappa$ B. In addition, it is worth noting that NF- $\kappa$ B overactivation was accompanied by an increase in *Il1b* mRNA expression by palmitic acid. Thus, it can also be concluded that macrophage stimulation by palmitic acid promotes IL-1 $\beta$  maturation in a caspase-1 dependent manner, and inhibition of lipin-2 exacerbates such production.

Activation of LPS primed macrophages with palmitic acid led to stronger caspase-1 activation, and IL-1 $\beta$  generation was markedly augmented when lipin-2 was absent. To elucidate the cellular mechanism by which palmitic acid triggers the NLRP3 inflammasome, IL-1 $\beta$  production was assessed after MAPK inhibition. Palmitic acid enhanced IL-1 $\beta$  secretion in lipin-2 deficient macrophages was effectively blocked after MAPK inhibition, suggesting that MAPK might be key players in inflammasome overactivation caused by lipin-2 depletion.

Surprisingly, lipin-2 seemed to play a different role in BMDM during palmitic acid induced inflammasome activation. IL-1 $\beta$  production remained largely unaffected under palmitic acid treatment in lipin-2 deficient BMDM when compared to *wt* macrophages and was even diminished when LPS primed BMDM were stimulated with palmitic acid. The pathophysiological relevance of these findings may reside in the differential behavior of mouse

and human lipin-2 deficient macrophages after palmitic acid treatment, what led to the hypothesis of breastfeeding as a trigger for Majeed syndrome, due to breastmilk is rich in this fatty acid. Taken together, the differences found between human macrophages and BMDMs in IL-1 $\beta$  production in a metabolic context might explain why mice lacking lipin-2 do not develop the Majeed syndrome and humans do.

To further understand the IL-1 $\beta$  generation in mouse and human macrophages by palmitic acid, it would be of great interest to explore non-canonical inflammasome activation by intracellular fatty acids. Non-canonical inflammasome also appears to require two signals: a priming signal that increases the expression of inflammasome components, such as pro-IL-1 $\beta$  and caspase-11 and a second signal to trigger caspase activation. The data obtained in the present work could be explained if palmitic acid fails to produce non-canonical inflammasome activity in LPS primed lipin-2 deficient macrophages but not in *wt* macrophages or if pro-caspase-11 induction is lower in primed macrophages lacking lipin-2. If that hypothesis were to be confirmed, non-canonical inflammasome could be considered as the underlying mechanism by which palmitic acid exhibits distinct properties in the presence or absence of lipin-2.

To conclude, the results obtained in this work show that lipin-2 is a key regulator during classic activation (LPS and ATP) and metabolic activation (LPS and palmitic acid) of the NLRP3 inflammasome in macrophages. These findings could open new avenues for developing new drugs for the treatment of pathological conditions associated with processes in which IL-1 $\beta$  production is altered.



## ***I. INTRODUCCIÓN***

---





## 1 RECONOCIMIENTO POR EL SISTEMA INMUNE INNATO

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo, y está caracterizada por su habilidad para reconocer un amplio rango de patógenos tales como virus, bacterias y hongos, a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *pattern-recognition receptors*) (1, 2). Los PRRs se expresan en muchos tipos celulares incluyendo macrófagos, monocitos, células dendríticas, neutrófilos y células epiteliales, permitiendo una detección temprana de patógenos directamente en el sitio de infección. Los PRRs reconocen motivos microbianos conservados llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*) (3). Los PAMPs pueden ser de diversos orígenes: glucídicos ( $\beta$ -glucano), proteicos (flagelina) o componentes de la pared celular bacteriana tales como el peptidoglicano y el lipopolisacárico (LPS), y todos ellos son reconocidos por el sistema inmune innato. Para explicar cómo el sistema inmune es capaz de distinguir bacterias comensales no patogénicas de microorganismos patogénicos, Matzinger (4, 5) sugirió que la activación del sistema inmune no se basa solamente en el reconocimiento de PAMPs, sino también en la presencia de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, del inglés *danger-associated molecular patterns*), tales como cristales de ácido úrico, ATP (Adenosina trifosfato), HMGB1 (del inglés, *high mobility group box 1*) o proteínas de choque térmico hsp70 y hsp90, que son liberados por células dañadas. Durante las infecciones, el organismo sufre daño tisular y lisis celular que desencadenan la liberación de moléculas del propio organismo o DAMPs, y el reconocimiento de estos DAMPs por el sistema inmune va a permitir, además de detectar la infección y reclutar más células inmunes, iniciar la reparación del tejido dañado (6). Por lo tanto, el sistema inmune innato no solo inspecciona el ambiente celular en busca de patógenos invasores, sino que también es capaz de reconocer los daños que éstos causan, debido a que la aparición de estrés tisular en situaciones con heridas estériles libera DAMPs que serán capaces de activar las células del sistema inmune innato. En este caso, en lugar de dirigir la eliminación de los patógenos, la respuesta inflamatoria estéril será crucial para la reparación tisular y para la iniciación de la respuesta adaptativa (7).

### RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES (PRRs)

Los PAMPs son reconocidos por los PRRs, y pueden dividirse en dos grupos según su localización. En el primer grupo se encuentran los receptores tipo *Toll* (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*) y los receptores de lectina tipo-C (CLRs, del inglés *C-type lectin receptors*), los cuales son proteínas transmembrana encontradas en la membrana plasmática y los endosomas. En el segundo grupo se encuentran los receptores tipo RIG-I (RLRs, del inglés

*RIG-I-like receptors*), los receptores tipo AIM2 (ALRs, del inglés *AIM2-like receptors*) y los receptores tipo NOD (NLRs, del inglés *NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors*), que son proteínas solubles que patrullan el citoplasma buscando signos que adviertan de la presencia de invasores intracelulares (8-10).

Los PRRs más estudiados son los receptores tipo *Toll*. El estudio aquí presentado se centrará tanto en los receptores tipo *Toll* como en los receptores tipo NOD, particularmente en el receptor TLR4 y en el NLRP3 respectivamente.

## 1.1 RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs)

Los receptores tipo *Toll* fueron los primeros PRRs identificados y se describieron en *Drosophila melanogaster* como moduladores del desarrollo embrionario y como factores implicados en la defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas (11). Posteriormente se describieron los receptores homólogos en mamíferos, denominándolos tipo *Toll*. Esta familia de receptores se expresa en diversos tipos celulares, incluyendo células mononucleares, endoteliales y epiteliales. Desde el punto de vista de su estructura, los TLRs son glicoproteínas transmembrana de tipo I que se localizan en la superficie celular (TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11) o en los endosomas (TLRs 3, 7, 8 y 9). En humanos se expresan los TLRs 1-10 mientras que en ratón se expresan los TLRs 1-9 y 11-13, siendo el TLR10 murino un pseudogen (12).

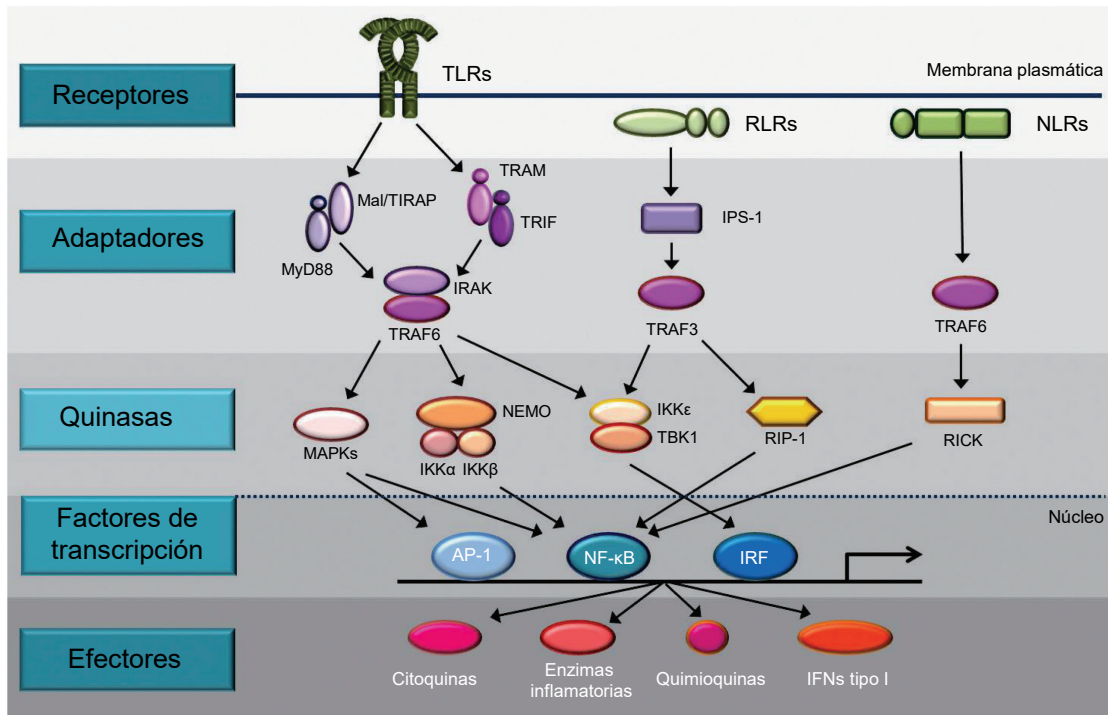
Los TLRs están compuestos por un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. El dominio extracelular posee un dominio rico en leucinas (LRR, del inglés *leucine-rich repeat domain*) que interviene en el reconocimiento de ligandos, y que induce la dimerización del dominio intracelular y la activación de las cascadas de señalización. El dominio intracelular se denomina dominio TIR (del inglés *Toll/IL-1 resistance*), por ser homólogo al receptor de la IL-1 (IL-1R), y es necesario para la activación de las cascadas de señalización (12). Los ligandos de TLRs incluyen lipoproteínas, lipopéptidos y mananos (TLR2), ARN de doble cadena (ARNdc) (TLR3), LPS (TLR4), ácidos grasos (TLR2 y TLR4), flagelina (TLR5), ARN de cadena sencilla (ARNcs) (TLR7) y ADN rico en CpG (TLR9) (13, 14). En la Tabla 1 se muestran resumidos los ligandos más importantes para los distintos TLRs en humanos.

**Tabla 1.** TLRs y sus ligandos correspondientes. Tabla modificada de Jimenez-Dalmaroni et al. (14).

TIPO DE TLR	LIGANDO MICROBIANO (PAMPs)
TLR2 (En asociación con TLR1 o TLR6)	Lipomananos ( <i>Mycobacterium</i> ), ácido lipoteicoico (bacterias Gram-positiva), lipopéptidos bacterianos
TLR4	LPS (bacterias Gram-negativa)
TLR5	Flagelina (bacterias Gram-negativa)
TLR3	ARNdc (virus)
TLR7	ARNcs (virus)
TLR8	ARNcs (virus)
TLR9	Motivos CpG (bacterias, virus)

Después de la unión al ligando, los receptores forman homo- o heterodímeros y reclutan moléculas adaptadoras como MyD88 (del inglés, *myeloid differentiation primary response gene 88*), utilizada por todos los TLRs excepto TLR3, TRIF (del inglés, *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon  $\beta$* ), utilizada sólo por TLR3 y TLR4, MAL/TIRAP (del inglés, *MyD88-adaptor-like protein/TIR domain-containing adapter protein*), esencial para la señalización de TLR2 y TLR4 que funciona como nexo entre MyD88 y el TLR, o TRAM (del inglés, *TRIF-related adaptor molecule*), que actúa como conector entre TLR y TRIF. Estas moléculas adaptadoras producirán en último lugar la activación de quinasas (complejo IKK, MAPKs, RIP-1) y factores de transcripción como factor nuclear-kB (NF-kB, del inglés nuclear factor-kB), la proteína activadora-1 (AP-1, del inglés *activator protein-1*) y factores reguladores de interferon (IRFs, del inglés *interferon regulatory factors*) (Figura 1) (8, 15, 16).

La activación de los TLRs resultará en la producción de péptidos antimicrobianos, genes proinflamatorios entre los que destacan los que codifican para citoquinas inflamatorias e interleuquinas (IL), como por ejemplo IL-6, IL-1 $\beta$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o MCP-1, quimioquinas, moléculas de adhesión y coestimuladoras, así como también un aumento de expresión de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHCs, del inglés *major histocompatibility complex*).



**Figura 1. Rutas de señalización de los PRRs.** Los TLRs se localizan principalmente en la membrana plasmática, mientras que los RLRs y los NLRs en el citosol. Los TLRs señalizan a través de Mal/TIRAP y MyD88 o TRAM/TRIF para activar posteriormente las diferentes quinasas. Los RLRs usan IPS-1 y TRAF3 como moléculas adaptadoras y los NLRs activan las vías de TRAF6. Las señales de activación de los PRRs producen la activación de quinasas como MAPKs, IKKs, TBK1, RIP-1 y RICK, que dan lugar a la activación de factores de transcripción como AP-1, NF- $\kappa$ B e IRF. Estos factores de transcripción se unen a secuencias específicas de ADN e inducen la expresión de genes que codifican para citoquinas, enzimas inflamatorias, quimioquinas e interferones tipo I (IFNs). Figura modificada de Jeong y Lee (15).

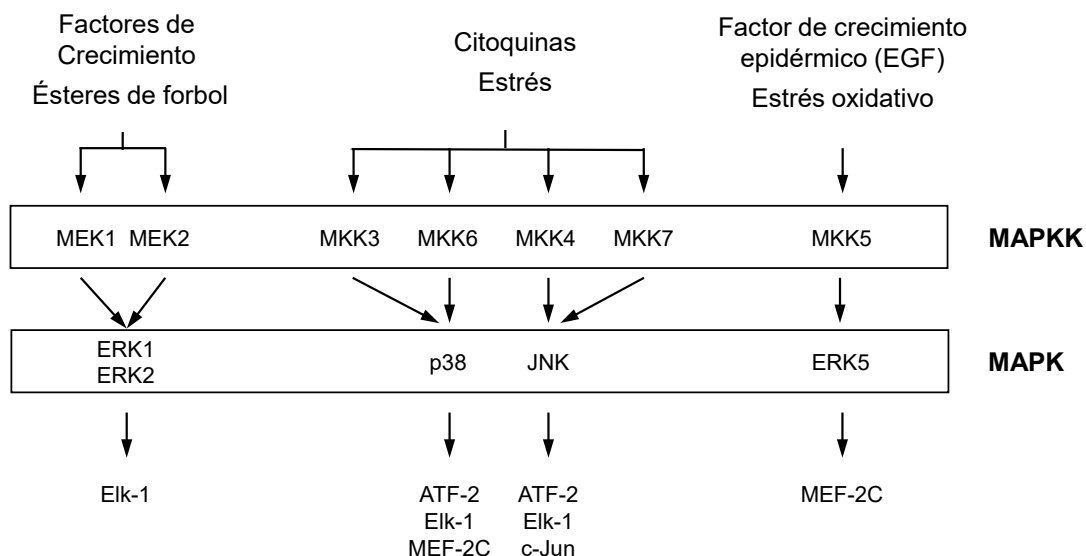
### 1.1.1 Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés mitogen-activated protein kinase)

La cascada de señalización de las MAPK es una de las vías de señalización más antigua y conservada en eucariotas a lo largo de la evolución. Esta vía está implicada en numerosos procesos de la respuesta inmune y otros procesos fisiológicos tales como proliferación, estrés celular y apoptosis (17).

Existen tres subfamilias bien definidas de MAPK: las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK, del inglés *extracellular signal-regulated kinase*, p44 y p42), las proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK, del inglés *stress-activated protein kinase*) y quinasas del extremo amino terminal de c-Jun (JNK, del inglés *c-Jun N-terminal kinase*), también conocidas como SAPK/JNK (p46 y p54) y por último, las quinasas p38 (18). La activación de estas proteínas se lleva a cabo mediante una doble fosforilación en un motivo formado por tres aminoácidos cuya secuencia es diferente para cada grupo; Thr-Glu-Tyr en ERK, Thr-Pro-Tyr en JNK y Thr-Gly-Tyr en p38.

El proceso de activación de las MAPK tiene lugar a través de fosforilaciones en cascada que comienzan con la activación de las MAPK quinasas quinasas (MAPKKK), que fosforilan a las MAPK quinasas (MAPKK) que finalmente fosforilan a las MAPK. Una vez que son activadas, las MAPK son capaces de fosforilar un amplio rango de proteínas implicadas en numerosas vías de señalización intracelular (Figura 2), y también pueden translocarse al núcleo y fosforilar ahí proteínas que estabilizan la cromatina, o bien factores de transcripción como AP-1 (18).

Entre sus funciones cabe destacar el papel que las MAPK desempeñan en inmunidad innata, regulando la producción de citoquinas proinflamatorias debidas a la activación de los receptores TLR (19). En modelos de ratón, la deficiencia de proteínas clave en la señalización a través de TLRs, como MyD88 o TRAF6, impide la activación de las MAPK en respuesta a endotoxina (20) o IL-1 (21). Además, las MAPK también son capaces de activar factores de transcripción como AP-1. JNK es capaz de unirse al dominio de activación amino terminal de c-Jun (22) y fosforilarlo en los residuos Ser-63 y Ser-73 (23). Una vez fosforilado, c-Jun forma homodímeros o heterodímeros con proteínas como c-Fos, que en combinación forman AP-1, regulando así la expresión de genes proinflamatorios.

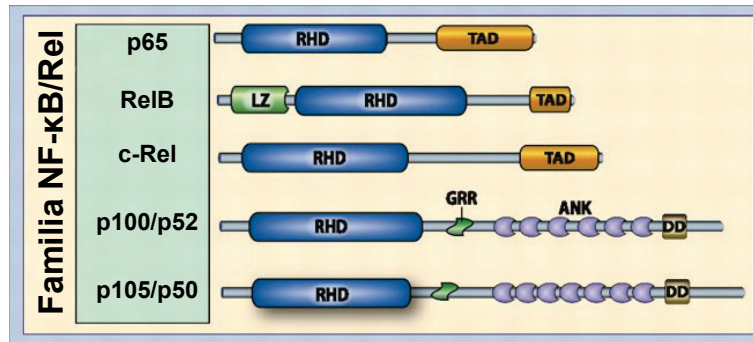


**Figura 2. Rutas de activación de las MAPK.** Figura modificada de Dong et al. (19)

### 1.1.2 La familia de proteínas NF- $\kappa$ B

En mamíferos, la familia de proteínas NF- $\kappa$ B comprende cinco proteínas: p65 (RelA), RelB, c-Rel (Rel) y las proteínas precursoras NF- $\kappa$ B1 (p105) y NF- $\kappa$ B2 (p100), las cuales se procesan para producir p50 y p52 respectivamente (Figura 3) (24). Estos factores de transcripción pueden asociarse entre sí formando homodímeros y heterodímeros que se unen

a los sitios  $\kappa$ B de promotores de una gran variedad de genes, para inducir o reprimir la transcripción (25). Estructuralmente, todas las proteínas de NF- $\kappa$ B presentan un dominio muy conservado de 300 aminoácidos en el extremo amino terminal, conocido como dominio de homología Rel (RHD, del inglés *Rel homology domain*) (24). El dominio RHD es necesario para la dimerización de NF- $\kappa$ B, para su unión al ADN y también para la interacción con sus inhibidores- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (24, 26).



**Figura 3. Estructura de los componentes de NF- $\kappa$ B.** La familia de proteínas NF- $\kappa$ B/Rel consta de cinco miembros: p65 (RelA), RelB, c-Rel (Rel), y las proteínas precursoras p100 (NF- $\kappa$ B2) y p105 (NF- $\kappa$ B1), que se procesan dando lugar a p52 y p50 respectivamente. Los dominios relevantes que componen cada proteína aparecen indicados. RHD: dominio de homología Rel; TAD: dominio de transactivación; LZ: dominio cremallera de leucina; GRR: región rica en glicina; ANK: dominio repetido de anquirina; DD: dominio de muerte. Figura modificada de Hayden y Ghosh (26).

El rango de estímulos capaz de inducir la activación de NF- $\kappa$ B incluye infecciones víricas y bacterianas, citoquinas proinflamatorias, activadores de PRRs y estrés oxidativo (26) Aunque la actividad NF- $\kappa$ B es inducible en la mayoría de las células, puede estar activa de forma constitutiva en determinados tipos celulares, tales como células B maduras y neuronas, y también puede encontrarse en gran número de tumores.

La activación de NF- $\kappa$ B puede ocurrir a través de dos rutas: la ruta clásica o canónica y la ruta alternativa o no canónica.

La ruta clásica o canónica es inducida por la mayoría de los estímulos fisiológicos, como señales que se unen a receptores de citoquinas y PRRs (familias de receptores de TNF- $\alpha$ , superfamilia de IL-1R, TLRs). En la mayoría de células en reposo, los dímeros de NF- $\kappa$ B permanecen de forma inactiva en el citosol debido a la interacción con las proteínas inhibitoras I $\kappa$ B. Cuando se estimulan las células, se induce la degradación de estos inhibidores a través de su fosforilación por el complejo de las quinasas de I $\kappa$ B (IKK), que incluye IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , y la subunidad reguladora IKK $\gamma$  (NEMO). Por tanto, es una ruta dependiente de IKKs y NEMO. Las proteínas I $\kappa$ B fosforiladas, principalmente I $\kappa$ B $\alpha$ , son ubiquitinadas para su posterior degradación en el proteasoma 26S, liberando así los dímeros de NF- $\kappa$ B (mayoritariamente heterodímeros p50-p65), que se translocan al núcleo, donde

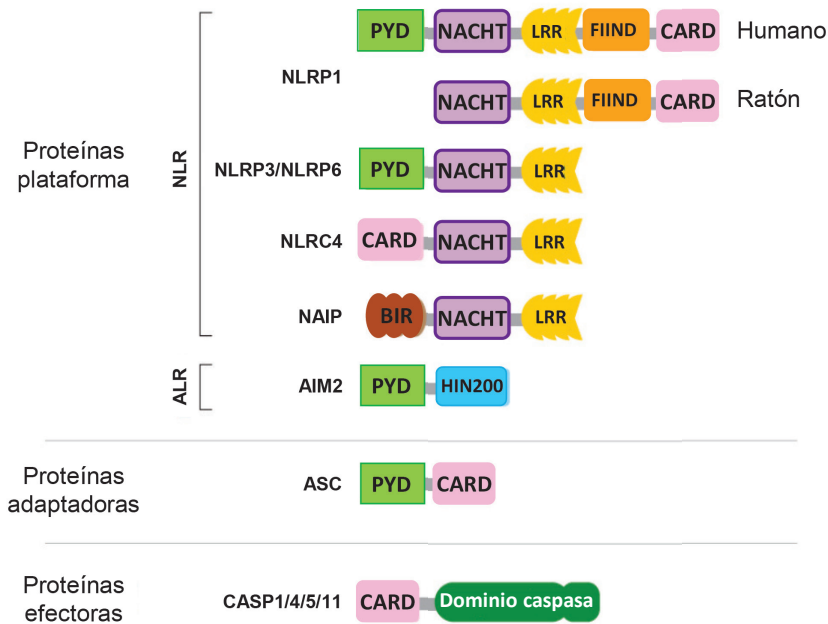
activan la transcripción de sus genes diana (Figura 1). La subunidad p50 se genera por el procesamiento de la proteína p105, que actúa tanto como subunidad precursora de NF- $\kappa$ B como proteína inhibidora I $\kappa$ B (15, 27).

La ruta alternativa o no canónica, más recientemente descrita, depende de IKK $\alpha$ , pero no de IKK $\beta$  ni de NEMO (28-31). La quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK) fosforila la quinasa IKK $\alpha$ , que a su vez fosforila la proteína NF- $\kappa$ B2/p100 (probablemente unida a RelB) que es poliubiquitinada y, por tanto, degradada. La proteólisis de p100 genera p52, y da lugar al dímero p52-RelB. La translocación nuclear de este heterodímero da lugar a la activación génica (30).

## 1.2 RECEPTORES TIPO NOD (NLRs)

La familia de los NLRs ha sido descrita recientemente como un grupo de proteínas del sistema inmune innato que, siendo solubles en el citoplasma, son capaces de detectar y responder a patógenos exógenos y a señales de peligro endógenas (32, 33). La familia de los NLRs consta de 23 miembros en humanos y 34 miembros en ratones (34). Estos receptores están altamente conservados a lo largo de la evolución, y estructuralmente están formados por tres dominios: un dominio central de unión a nucleótidos llamado NACHT (acrónimo de NAIP (del inglés, *neuronal apoptosis inhibitor protein*), C2TA (del inglés, *MHC class 2 transcription activator*), HET-E (del inglés, *incompatibility locus protein from *Podospora anserina**) y TP1 (del inglés, *telomerase-associated protein*)) que es también conocido como dominio NOD o NBD, un dominio efector N-terminal y un dominio LRR en la región C-terminal (34, 35) (Figura 4). El dominio LRR es el responsable de detectar los ligandos y autoregular los NLRs, pero el mecanismo a través del cual realiza esta función aún es desconocido. El extremo N-terminal de la mayoría de los NLRs alberga los motivos de unión a proteínas, como el dominio de reclutamiento de caspasa (CARD, del inglés *caspase recruitment domain*), un dominio pirina (PYD, del inglés *pyrin domain*) o un dominio repetido IAP de baculovirus (BIR, del inglés *baculovirus IAP repeat domain*) (Figura 4). Existen diferentes NLRs implicados en la inflamación dependiente de caspasa-1: son los NOD1, NOD2, NLRP1 (también conocido como NALP1 o DEFCAP), NLRP2, NLRP3 (NALP3, CIAS1 o criopirina), NLRC4 (IPAF o CARD12), NLRP6, NLRP7 y NLRP12 (36, 37). De los NLRs anteriormente mencionados, el NLRP1, el NLRP3, el NLRC4, el NLRP6 y el NLRP7 son capaces de ensamblarse con otras proteínas y formar inflamasomas, desempeñando un papel fisiológico *in vivo* muy importante (38-41). Recientemente, también se ha descrito que la proteína ausente en melanoma 2 (AIM2, del inglés *absent in melanoma 2*, o PYHIN4) de la familia PYHIN200, puede dar lugar a la formación de un inflamasoma (42-44).





**Figura 4. Dominios estructurales de los receptores tipo NOD y HIN200.** Los receptores tipo NOD están compuestos por diferentes dominios, cada uno de los cuales posee una función distinta que contribuye a la función biológica del receptor. Los miembros de la familia NLR poseen un dominio NACHT seguido por varias LRRs, y según el receptor NLR pueden llevar un dominio PYD de unión a ASC (NLRP3 y NLRP6), un dominio CARD de unión a caspasa (NLRC4) o ambos dominios (NLRP1 humana ya que el NLRP1 murino carece del dominio PYD). La proteína AIM2 contiene un dominio PYD seguido de un dominio de unión a ADN, HIN200. Los dominios PYD de AIM2, NLRP1, NLRP3 y NLRP6 reclutan a la proteína adaptadora ASC, mientras que NLRP1 y NLRC4 pueden interactuar directamente con la caspasa-1 a través del dominio CARD o indirectamente a través de ASC. El NLR humano NAIP contiene un dominio BIR. El dominio FIIND encontrado en NLRP1 tiene una función única de activación autoproteolítica del inflamasoma. Figura modificada de Lamkanfi y Dixit (45).

## 2 EL INFLAMASOMA

Los inflamasomas son complejos multiproteicos citosólicos que desencadenan la activación de las caspasas inflamatorias 1 (inflamasoma canónico) y 11 (inflamasoma no canónico) (40, 46). La conversión de las pro-caspasas en proteasas enzimáticamente activas, dará lugar a la producción de las citoquinas proinflamatorias activas IL-1 $\beta$  e IL-18, así como también conducirá a la muerte celular.

Los inflamasomas canónicos están formados por un receptor citosólico PRR (bien NLR o ALR), una molécula adaptadora ASC (del inglés *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (caspase recruitment domain) domain*) que también se conoce como Pycard y una proteasa de cisteína llamada caspasa-1. La secuencia de eventos que lleva al ensamblaje del inflamasoma aún no está totalmente dilucidada en cada uno de los inflamasomas que pueden originarse. Hasta la fecha ha sido descrito que, tras la estimulación que lleva a la formación del inflamasoma, se produce una oligomerización de la molécula sensora, que recluta la pro-caspasa-1 directamente a través de una interacción homotípica por los dominios CARD (inflamasomas NLRP1 y NLRC4), o bien primero recluta la proteína



ASC a través de una interacción homotípica de los dominios PYD, y posteriormente es ASC la que recluta la pro-caspasa-1 a través del dominio CARD (inflammasomas NLRP3 y AIM2) (Figura 5) (47). El hecho de que para el ensamblaje del inflammasoma haya una interacción directa entre la molécula sensora y la pro-caspasa-1 o esa unión esté mediada por ASC, va a depender de la estructura bioquímica de la molécula sensora.

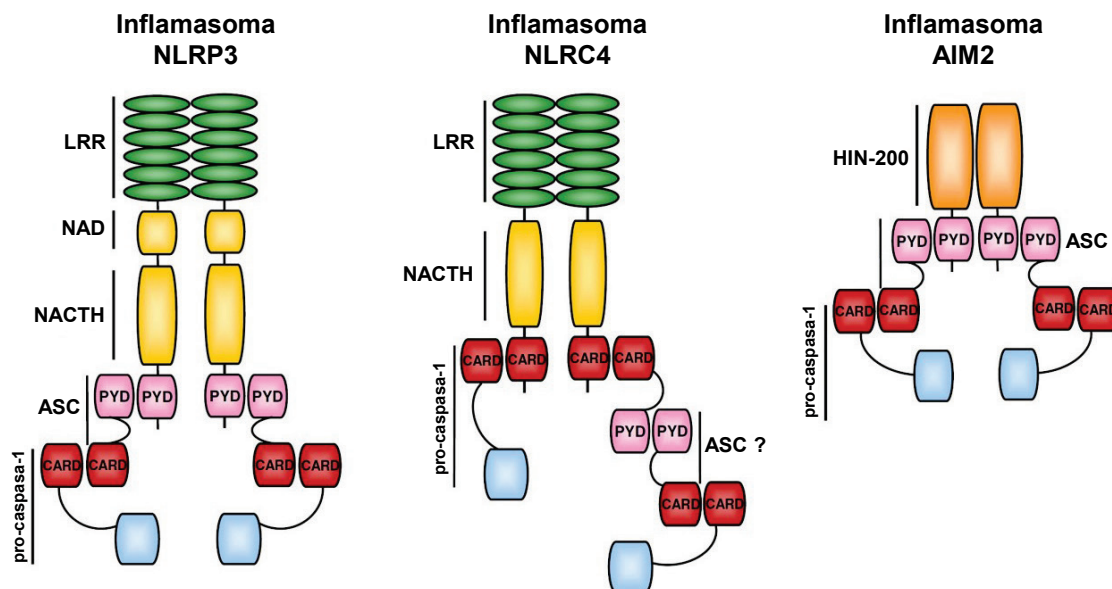


Figura 5. **Ensamblaje de los inflammasomas.** Las proteínas NLRP3 y NLRC4, así como la proteína AIM2, son capaces de ensamblar inflammasomas. Lo hacen reclutando y activando la pro-caspasa-1 directamente a través de los dominios CARD (rosa) o indirectamente a través de la proteína ASC. Figura modificada de Eitel et al. (48).

## 2.1 EL INFLAMASOMA NLRP3

El inflammasoma NLRP3 (también llamado NALP3, PYPAF1 o criopirina), es el inflammasoma mejor caracterizado hasta la fecha y en el que se centrará este estudio.

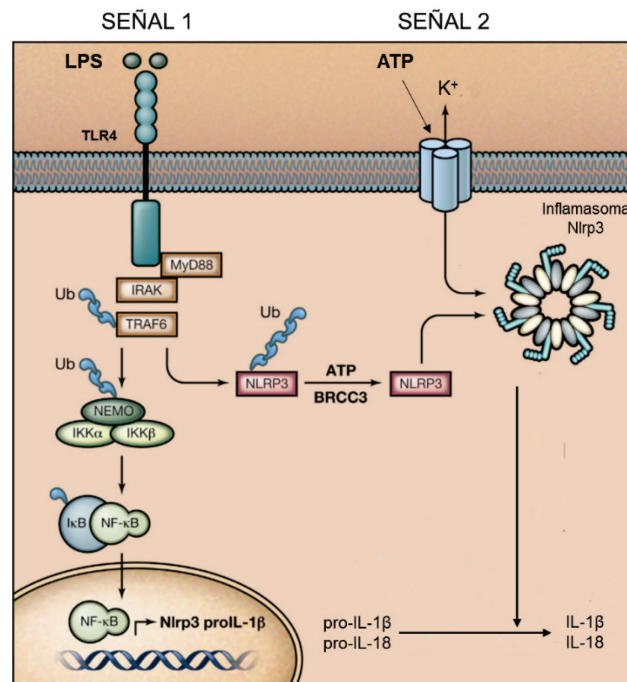
Este inflammasoma contiene elementos típicos de los NLRs: el dominio LRR, el dominio NBD o NOD y el dominio PYD N-terminal. En respuesta a un estímulo activador del inflammasoma NLRP3, la proteína NLRP3 oligomeriza. Este proceso requiere de la unión de ATP o deoxiATP a su elemento NBD o NOD, y está altamente regulado por la actividad ATPasa del elemento NBD (49) y por la concentración intracelular de potasio ( $K^+$ ) (50). Una vez que oligomeriza, la proteína NLRP3 recluta la proteína adaptadora ASC a través de interacciones de los dominios PYD (Figura 5) (51). La presencia de ASC en este inflammasoma, da lugar a la formación de agregados supramoleculares de un tamaño comprendido entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ , llamados *specks* o piroptosomas (52). Durante esta activación, se forma un único agregado por célula, que es el encargado de reclutar y activar la caspasa-1 a través de interacciones de los dominios CARD (38). La activación de la caspasa-1

desencadena finalmente un proceso de muerte celular inflamatoria conocido como piroptosis, que va precedida por la liberación de citoquinas proinflamatorias (52-54).

### 2.1.1 Modelos de activación del inflamasoma NLRP3

El inflamasoma NLRP3 es una plataforma de activación de caspasa-1, que controla la maduración y secreción de las interleuquinas IL-1 $\beta$  e IL-18, cuyas actividades proinflamatorias producen una respuesta a infecciones y a daño en el organismo de forma directa. En macrófagos, la expresión basal de la proteína NLRP3 no es suficiente para la activación del inflamasoma de las células (55, 56), y en reposo, estas células tampoco producen pro-IL-1 $\beta$  (57). Por ello, la activación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos es un proceso que necesita dos señales; una primera señal de activación llamada “*priming*” (a lo largo de esta memoria el proceso de *priming* es también llamado preactivación) que aumenta la expresión de NLRP3 y de pro-IL-1 $\beta$ , y una segunda señal de activación específica que promueve el ensamblaje del inflamasoma con la consecuente activación de la pro-caspasa-1 (Figura 6) (58).

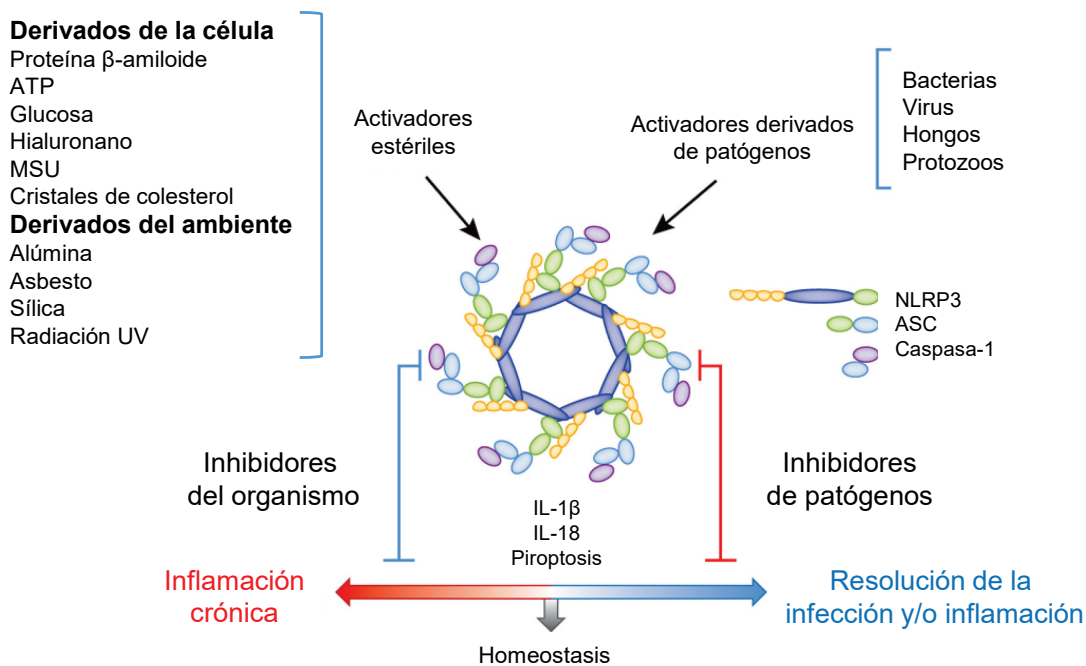
El “*priming*” ocurre a través de la activación de receptores que señalizan vía MyD88/TRIF o bien a través de otras vías de PRRs capaces de activar NF- $\kappa$ B, como las que incluyen los TLRs, IL-1R, TNFR (del inglés, *tumour necrosis factor receptor*) y NOD2 (55, 56). El principal papel del “*priming*” es aumentar la producción de NLRP3 hasta que la célula alcance los niveles necesarios para el ensamblaje del inflamasoma por un segundo estímulo, como ATP, nigericina o activadores cristalinos, y también el de inducir la producción de pro-IL-1 $\beta$  a través de NF- $\kappa$ B (55). Durante esta primera señal también tienen lugar modificaciones post-traduccionales necesarias para la activación del inflamasoma, como por ejemplo fosforilaciones a través de IRAK1 (del inglés, *interleuquin-1 receptor associated protein*) (58), de la activación de ERK (59) o la fosforilación de ASC dependiente de JNK y de SYK (del inglés, *spleen tyrosin kinase*) (60). Entre estas modificaciones también se encuentra la deubiquitinación de NLRP3 mediada por BRCC3 (del inglés, *breast cancer 1/breast cancer 2 (BRCA1/BRCA2) containing-complex subunit 3*) y la ubiquitinación lineal de ASC mediada por LUBAC (del inglés, *linear ubiquitin chain assembly complex*) (61, 62) (Figura 6 y Figura 8). Por otro lado, el “*priming*” de las células también causa cambios metabólicos importantes con alteraciones en la glucólisis y en la fosforilación oxidativa, que pueden influir en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) durante la primera señal. Esto promueve la síntesis de ácidos grasos nuevos y la alteración de la dinámica de la membrana, hecho que afecta a la activación del inflamasoma (63, 64).



**Figura 6. Modelo de activación del inflamasoma NLRP3.** Una primera señal desencadenada por PAMPs a través de los receptores TLRs lleva a la activación de NF- $\kappa$ B y a la transcripción de citoquinas. Adicionalmente, NF- $\kappa$ B también induce la expresión de NLRP3, factor limitante para el ensamblaje del inflamasoma. Durante la primera señal también tiene lugar la deubiquitinación de NLRP3. Una segunda señal desencadena el ensamblaje del inflamasoma formado por NLRP3, la molécula adaptadora ASC y la pro-caspasa-1, dando lugar a la activación de la caspasa-1, que activa las citoquinas pro-IL-1 $\beta$  e IL-18. Figura modificada de Lamkanfi y Dixit (65).

Una vez que las células han sido preactivadas, es necesario activar la caspasa-1 para que se produzca la maduración de pro-IL-1 $\beta$ . Este proceso ocurre gracias a la segunda señal de activación del inflamasoma. Existen numerosos estímulos capaces de desencadenar el ensamblaje del inflamasoma NLRP3, aunque los mecanismos a través de los que tiene lugar dicha activación aún no están totalmente dilucidados. Entre la amplia variedad de señales capaces de activar el inflamasoma se encuentran microorganismos como bacterias (66-69), virus (70, 71) y patógenos fúngicos (72-74), así como también toxinas formadoras de poros derivadas de bacterias, entre las que destacan la nigericina (de *Streptomyces hygroscopicus*) y la listeriolisina O (de *Listeria monocytogenes*) (75, 76). Estas toxinas actúan formando poros en las membranas produciendo una salida de K<sup>+</sup> en la célula infectada, que potencialmente influye sobre la estabilidad lisosomal, condición necesaria para la activación del inflamasoma NLRP3. La secreción de IL-1 $\beta$  tras la exposición celular a nigericina dependerá de la presencia de panexina-1, un hemicanal que forma poros grandes en la membrana plasmática y acidifica los componentes endosomiales (77-80). Además de estas señales asociadas a patógenos, también existen diversas señales de estrés celular capaces de activar el inflamasoma NLRP3, como el ATP extracelular (76). Éste es uno de los activadores del inflamasoma NLRP3 más estudiados en la literatura, y en el que se profundizará al detalle más adelante. El inflamasoma NLRP3 también tiene la habilidad de reconocer cristales

formados a partir de moléculas endógenas solubles, como cristales de urato monosódico (MSU, del inglés *monosodium urate*) y de pirofosfato cálcico dihidratado, compuestos que se acumulan en la enfermedad de gota y pseudogota respectivamente (81). Ambos cristales son capaces de activar el inflamasoma NLRP3 y causar artritis inflamatoria (82). De igual modo, estudios recientes han señalado que el NLRP3 es capaz de reconocer cristales de colesterol formados a partir de LDL (del inglés, *low-density lipoprotein*) oxidado (83). Contaminantes atmosféricos asociados con enfermedades inflamatorias, como el asbesto y la sílice (84-86), y luz ultravioleta (UV) (87) también son conocidos por activar el inflamasoma NLRP3. Otro de los campos que se ha investigado mucho, es el de los adyuvantes de las vacunas. Numerosos son los estudios que muestran que la alúmina, el adyuvante más utilizado hasta la fecha, es capaz de desencadenar la activación de la caspasa-1 y consecuente producción de IL-1 $\beta$ , a través de la activación del inflamasoma NLRP3 (84, 88-91). Agregados peptídicos como los formados por la proteína  $\beta$ -amiloide en pacientes con Alzheimer, también son detectados por el NLRP3 de las células de la microglia (92) (Figura 7).



**Figura 7. Activadores del inflamasoma NLRP3.** La formación del inflamasoma NLRP3 está regulada tanto por PAMPs (moléculas derivadas de patógenos) como por DAMPs (activadores estériles). Los inflamasomas pueden detectar patógenos intracelulares, productos microbianos que consiguen acceder al interior de la célula y también moléculas liberadas por el organismo durante estrés o daño celular. El balance entre las respuestas producidas tras la activación del inflamasoma puede dar lugar a una inflamación crónica o a la resolución de la inflamación. Figura modificada de Henao-Mejia et al. (93).

Dada la gran diversidad de agentes capaces de activar el inflamasoma NLRP3, es muy improbable que todos se unan directamente a él activándolo. En la literatura, los mecanismos que conducen a la activación del inflamasoma NLRP3 han sido intensamente debatidos en

los últimos años. A continuación, se detallarán los distintos modelos de activación que han sido descritos hasta la fecha.

El primer modelo señala la bajada de la concentración intracelular de  $K^+$  como mecanismo principal que activa el inflammasoma NLRP3 (Figura 8). Esta bajada es debida a la salida de  $K^+$  de la célula ante diferentes estímulos como son el ATP y las toxinas formadoras de poros y cristales (50, 85, 94, 95). Las toxinas formadoras de poros dan lugar a la salida directa de  $K^+$  mientras que el ATP extracelular estimula el receptor purinérgico P2X7. En un principio se pensó que tras la activación del receptor P2X7, se inducía un reclutamiento gradual del poro panexina-1 a la membrana (96), y este poro era el responsable de la salida de  $K^+$  de la célula. Sin embargo, el uso de ratones deficientes en panexina-1 puso en duda el papel de este hemicanal en la activación del inflammasoma NLRP3 (97, 98). Fue en 2013, cuando el grupo del Dr. Nuñez describió que el mecanismo relevante para todos los agonistas de NLRP3 conocidos hasta la fecha, incluyendo los particulados, era la salida de  $K^+$  de la célula, sin analizar si la panexina tenía o no un papel en ese proceso (94). Según este modelo, las bajas concentraciones intracelulares de  $K^+$  generadas tras la aplicación de agonistas de NLRP3, darán lugar al completo ensamblaje del piroptosoma, un complejo multimérico formado por dímeros de ASC que es necesario para la posterior activación de la caspasa-1 (52).

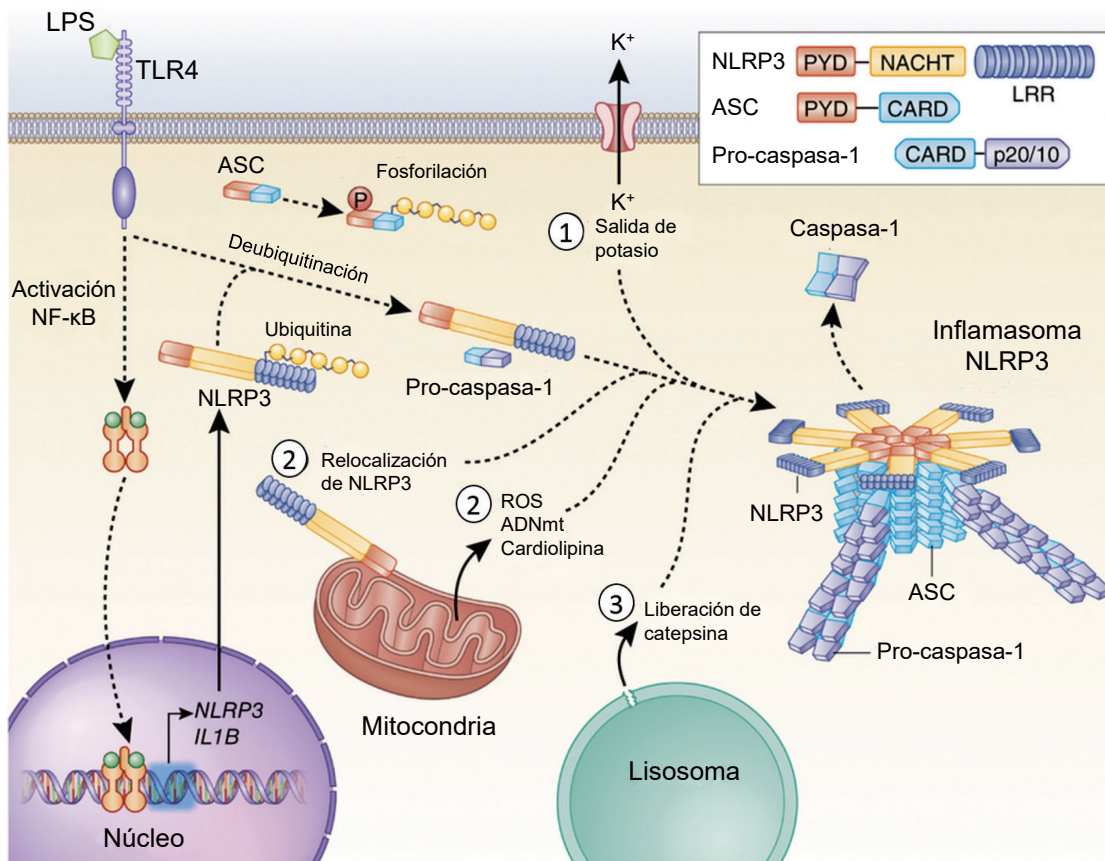
Dentro de este modelo de activación del inflammasoma NLRP3, Kanneganti *et al.* propusieron la existencia de una interacción directa ligando-receptor a través del dominio LRR de la proteína NLRP3, ya que los poros formados en la membrana pueden permitir la entrada de sus agonistas al citosol (96). Pero como ya se ha mencionado previamente, la diversidad estructural de los agonistas de NLRP3 se opone a la posibilidad de que todos los activadores puedan interactuar de manera directa con él.

El segundo modelo propuesto apunta al daño mitocondrial como activador del inflammasoma NLRP3 (Figura 8). Prácticamente todos los agonistas de NLRP3 testados (ATP, R837, MSU, asbesto y sílica) inducen la producción de ROS, y el bloqueo farmacológico de ROS, disminuye la producción de IL-1 $\beta$  madura, suprimiendo así la activación de la inflamación (50, 85, 86, 99). Los ROS producidos por los agonistas anteriormente mencionados, pueden ser de distinto origen y actúan antes del NLRP3, activándolo (50, 85, 86, 99). La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa lisosomal es una buena candidata como fuente principal de ROS, ya que su inhibición reduce la activación del inflammasoma NLRP3 (85), y también los ROS mitocondriales (mtROS) ejercen un papel importante en la activación del inflammasoma (100). Se ha descrito que la mayoría de los agonistas de NLRP3 producen ROS mitocondriales y su reducción atenúa la activación de NLRP3 (100-108). Sin embargo,



la participación de los ROS en la activación del inflamasoma ha sido muy debatida, ya que también se han encontrado activadores del inflamasoma NLRP3, como ciertos virus, en los que los mtROS son dispensables (109). Por otro lado, la participación de la mitocondria en la activación del inflamasoma va más allá; se ha visto que el NLRP3 se trasloca a la mitocondria (100, 101, 110), y que la liberación desde este orgánulo de ADN mitocondrial o del fosfolípido cardiolipina (104-106), también contribuyen a la activación del inflamasoma NLRP3.

El tercer mecanismo descrito es la desestabilización lisosomal (84) (Figura 8). Este mecanismo fue propuesto para los activadores del NLRP3 que forman estructuras cristalinas, como por ejemplo MSU, sílice, asbestos, alúmina y la proteína  $\beta$ -amiloide, ya que su internalización celular produce daño lisosomal. Este daño llevaría a una liberación de las catepsinas lisosomales al citosol, que serían detectadas por el inflamasoma NLRP3 como señal de peligro dando lugar a su activación (84, 92).



**Figura 8. Modelo de activación del inflamasoma NLRP3.** Una primera señal desencadenada por PAMPs a través de los receptores TLRs lleva a la activación de NF- $\kappa$ B, que induce la transcripción de citoquinas y de NLRP3. Una segunda señal desencadena la activación del inflamasoma NLRP3, principalmente a través de tres mecanismos: salida de  $K^+$ , daño mitocondrial y desestabilización lisosomal. La activación de P2X7 por ATP resulta en la formación de poros en la membrana que permiten la salida de potasio y la entrada de factores extracelulares al citosol que activan NLRP3. La fagocitosis de ciertos patógenos conduce a la ruptura de los lisosomas que liberan catepsina B al citoplasma y activan NLRP3. La generación de ROS, la traslocación de NLRP3 a la mitocondria y la liberación de ADN mitocondrial y cardiolipina también activan NLRP3. Figura modificada de Guo et al. (111).

### 2.1.2 **El ATP como activador del inflamasoma NLRP3 a través del receptor P2X7**

De todos los estímulos mencionados capaces de activar el inflamasoma NLRP3, la primera señal de peligro descrita y más estudiada hasta la fecha es el ATP (76). El ATP está presente en el interior celular en altas concentraciones y, gracias a la presencia de actividad ATPasa, se mantiene a concentraciones bajas en el exterior. Pero cuando las concentraciones extracelulares de ATP aumentan, éste actúa como un importante modulador de la inflamación, uniéndose y activando receptores purinérgicos, capaces de desencadenar cascadas de señalización inflamatorias (112). El papel crítico que desempeña el ATP extracelular como señal de peligro aún no está claro; la cantidad de ATP extracelular requerida para poder activar los macrófagos *in vitro* es relativamente alta (2-5 mM) y en condiciones *in vivo*, la mayoría del ATP extracelular es hidrolizado por las ectonucleotidasas (113). Numerosos estudios se han centrado en los mecanismos a través de los cuales el ATP puede aumentar su concentración extracelular. Se ha descrito que el ATP puede ser liberado a través de canales, como el formado por los receptores P2X7 (114), o hemicanales como la panexina y la conexina (115-117). Por otro lado, factores de crecimiento y perturbaciones mecánicas, como el estrechamiento celular e hinchamiento debido a cambios en la tonicidad del medio, pueden activar las conexinas y producir la liberación de ATP (116, 118). Además, el ATP también puede ser liberado tras la muerte celular o de una manera controlada a través de exocitosis de vesículas (115).

De todos los mecanismos de activación estudiados en la literatura, el efecto del ATP a través de los receptores purinérgicos P2X7 es el que más interés ha suscitado. Los receptores P2X7 son canales catiónicos no selectivos, que se activan por altas concentraciones de ATP (en el rango milimolar). Dado que estos receptores se encuentran altamente expresados en células de la línea hematopoyética, muchos trabajos se han centrado en estudiar el papel que juegan en los procesos inflamatorios (119-121). Así, la activación del inflamasoma NLRP3 y la caspasa-1 por la unión de ATP a los receptores P2X7, ha sido ampliamente descrita (76, 82, 122, 123). Las primeras evidencias proponían que la salida de K<sup>+</sup> provocada por la activación de este receptor por ATP extracelular era detectada por NLRP3, y conducía a una activación de la caspasa-1 (76). Posteriormente, tratando de averiguar los mecanismos que conducían a la activación del inflamasoma NLRP3 por ATP, se le atribuyó un papel en este proceso a la panexina-1 (78, 124), que como ya se ha indicado previamente se descartó años después (97).

Por otro lado, para profundizar más en la relación entre ATP e inflamasoma, también se han hecho estudios que demuestran que los receptores P2X7 inducen la producción de ROS, y que éstos, podrían mediar la activación del inflamasoma NLRP3 (125).

Para describir mejor el papel del ATP como activador del inflamasoma NLRP3 a través del receptor P2X7, en la literatura se ha recurrido al uso de ratones deficientes en las proteínas que forman el inflamasoma. El uso de ratones deficientes en ASC ha demostrado que la activación de la caspasa-1 mediada por ATP requiere de la proteína adaptadora y es, además, dependiente de la NLRP3 (126, 127). Estos hallazgos fueron confirmados con el uso de ratones deficientes en NLRP3 (76, 82, 122, 123), y quedó ampliamente demostrado que el ATP extracelular puede actuar como señal de peligro y activar el inflamasoma NLRP3, activando la caspasa-1 y generando la maduración de la IL-1 $\beta$ .

En la literatura, también se ha definido que en respuesta a LPS o bacterias que actúan vía TLR4, la activación del receptor P2X7 es necesaria para la activación del inflamasoma NLRP3. Una excepción a esa norma se encuentra en bacterias intracelulares como *Listeria*, en las que la ausencia del receptor P2X7 no es suficiente para impedir la activación de la caspasa-1 y la consecuente liberación de la IL-1 $\beta$  (128). Además, cabe destacar, que no sólo los microorganismos son capaces de externalizar ATP, activar el receptor P2X7 y desencadenar el completo ensamblaje del inflamasoma. Algunos estudios han demostrado que durante la inflamación estéril en riñón, la ausencia de activación del inflamasoma NLRP3 por ATP debida a una deficiencia del receptor P2X7, conduce a una mejora de la inflamación y a una reducción significativa del daño renal (129, 130). Además, también se ha visto que en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la activación del inflamasoma NLRP3 vía P2X7 contribuye a un empeoramiento de ésta (131).

Teniendo en cuenta todos estos datos, queda claro que la activación del inflamasoma NLRP3 por ATP extracelular a través del receptor P2X7, juega un papel importante en el desarrollo de la inflamación, tanto en presencia como ausencia de patógenos.

Para entender mejor la regulación de los receptores P2X7 es importante saber que, al igual que muchos otros receptores ionotrópicos, están asociados a las balsas lipídicas de la membrana celular (132-134), que son microdominios localizados en las membranas, ricos en colesterol y esfingolípidos. Las balsas lipídicas proporcionan, además, una plataforma para la organización de distintos complejos proteicos señalizadores (135, 136), por lo que alteraciones en su composición pueden interrumpir el ensamblaje de los complejos de señalización y afectar la actividad de las proteínas que se encuentran en ellas (137). En particular, se ha visto que la alteración de estas balsas modifica las rutas de señalización activadas por el receptor P2X7 que están asociadas a cambios en la activación de diferentes enzimas que intervienen en el metabolismo lipídico (138). El papel de las balsas lipídicas en la regulación de la función de los receptores P2X7 es interesante por varios motivos: 1) el ambiente lipídico de los receptores P2X7 varía de unas células a otras (137); 2) la activación



de los receptores P2X7 aumenta la producción de ceramidas (138-140); 3) las alteraciones de las balsas lipídicas y los cambios en los niveles de colesterol de la membrana plasmática están asociados con inflamación (141). Esto convierte al colesterol en un importante regulador lipídico de la actividad de muchas de las proteínas integradas en la membrana, entre ellas los canales iónicos (142). Por ello, dado el papel del receptor P2X7 como mediador proinflamatorio del ATP extracelular, es importante entender cómo esos cambios en la membrana pueden afectar a la función del receptor P2X7 en la respuesta inmune innata y en las enfermedades inflamatorias crónicas. El grupo del Dr. Murrell-Lagnado de la Universidad de Cambridge, ha llevado a cabo recientemente estudios sobre cómo cambios en los niveles de colesterol de las membranas pueden alterar la sensibilidad del receptor P2X7 (143). Este grupo ha demostrado que las propiedades de los receptores P2X7 son muy sensibles a alteraciones en los niveles de colesterol. La reducción con metil- $\beta$ -ciclodextrina (MCD) de los niveles de colesterol de las membranas causa un aumento en la formación del poro producida por la aplicación de los agonistas de P2X7, mientras que la incorporación de colesterol a las membranas celulares, inhibe ese proceso. Estos descubrimientos le han dado al colesterol un papel como regulador negativo de la formación del poro P2X7, protegiendo a las células de la muerte celular mediada por este poro (143).

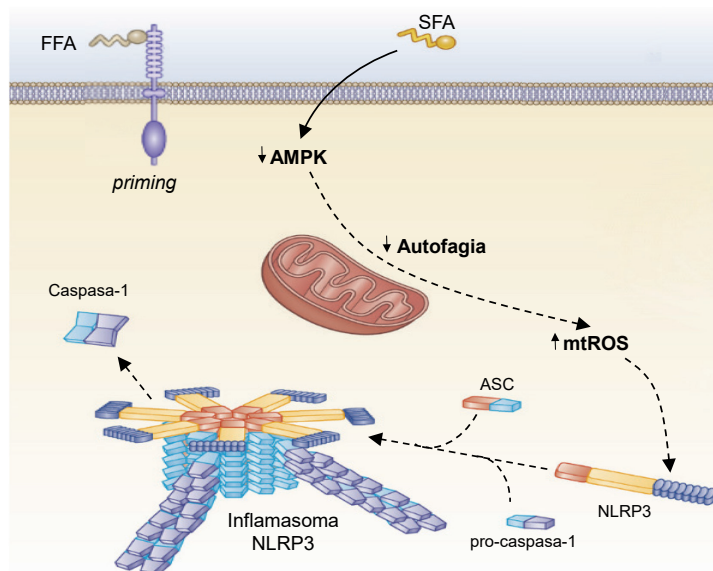
### 2.1.3 ***El inflammasoma NLRP3 y la diabetes tipo II. Activación por ácido palmítico.***

Recientemente se ha descrito que la activación del inflammasoma NLRP3 contribuye al desarrollo de resistencia a insulina y la consecuente aparición de diabetes tipo II (T2D, del inglés *type II diabetes*) (144, 145).

La T2D es una enfermedad inflamatoria crónica asociada a niveles circulantes elevados de TNF, interleuquinas y adipocinas liberadas del tejido adiposo. En particular, se ha visto que la IL-1 $\beta$  está estrechamente ligada a la T2D. En cultivo celular, la IL-1 $\beta$  disminuye la sensibilidad a insulina mediante la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1, del inglés *insulin receptor substrate*) por JNK, lo que impide la señalización por insulina a través de PI3K-Akt. Al mismo tiempo, la IL-1 $\beta$  induce la expresión de TNF- $\alpha$  (144), que a su vez puede alterar la señalización por insulina (146).

Cabe destacar que tanto en el plasma de pacientes como de animales diabéticos, se han encontrado niveles altos de ácidos grasos libres (FFAs, del inglés *free fatty acids*), por lo que el consumo de una dieta alta en grasa (HFD, del inglés *high fat diet*) y el consecuente desarrollo de obesidad son, probablemente, los factores más importantes que contribuyen al progreso de la enfermedad (147).

Los FFAs han sido propuestos como promotores de la respuesta inflamatoria a través de la unión directa a receptores TLR y posterior inducción de la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  y IL-6) a través de NF- $\kappa$ B (13, 148). Por ello, en los últimos años se ha profundizado en el estudio del papel de los FFAs que, además de desencadenar procesos inflamatorios, también actúan como señales de peligro endógenas. Los ácidos grasos saturados, que al igual que el ácido palmítico y las ceramidas aumentan durante una HFD induciendo T2D, pueden activar el inflamasoma NLRP3 (Figura 9) (144, 145). En el año 2011, Wen *et al.* describieron el papel del ácido palmítico como inductor de la activación del inflamasoma NLRP3, con la consecuente activación de la caspasa-1 y producción de IL-1 $\beta$  y IL-18 (144). En este trabajo demostraron que en macrófagos murinos preactivados con LPS, el ácido palmítico inhibía la actividad de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, del inglés *AMP-activated protein kinase*), dando lugar a una autofagia defectuosa y a la consecuente acumulación de ROS en estas células (144). Estos mecanismos, como ya se ha comentado previamente, son los que activarán el inflamasoma NLRP3.

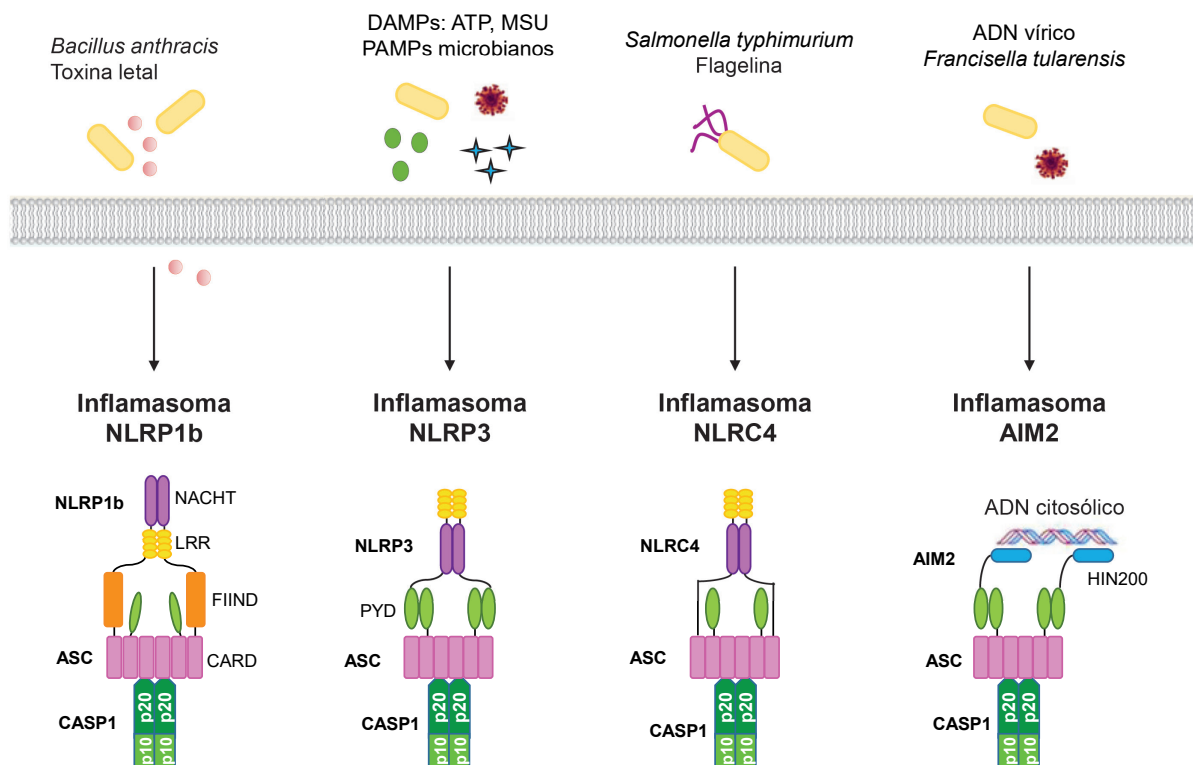


**Figura 9. Mecanismos de activación del inflamasoma por alteraciones metabólicas y en T2D en células mieloides.** Un aumento de FFAs puede preactivar el inflamasoma NLRP3 a través de la señalización vía TLR2-TLR4. Los ácidos grasos saturados (SFAs) como segunda señal inhiben la AMPK intracelular. Esto reduce la autofagia, originando un aumento en la producción de ROS mitocondriales (mtROS), que son activadores del inflamasoma NLRP3. Imagen modificada de Guo *et al.* (111).

## 2.2 OTROS INFLAMASOMAS CANÓNICOS: NLRP1, NLRC4 y AIM2

De los PRRs descritos capaces de formar inflamasomas para la activación de caspasa-1, junto al NLRP3 anteriormente descrito, se han confirmado otros complejos. Entre ellos destacan el inflamasoma NLRP1, el NLRC4 y el AIM2.

El inflamasoma NLRP1 es un mecanismo de defensa importante contra el microorganismo *Bacillus anthracis*, ya que tras la exposición a su toxina letal (LeTx), los macrófagos activan la caspasa-1 con la consecuente producción de IL-1 $\beta$  y piroptosis (149). En la activación de este inflamasoma, al igual que para la activación del NLRP3 es necesario que haya una salida de K<sup>+</sup> de la célula (150, 151), pero sin embargo, la proteína ASC es dispensable, ya que NLRP1 puede reclutar directamente a la caspasa-1 a través de su dominio CARD (152). El inflamasoma NLRC4 o IPAF es activado por flagelina y proteínas de los sistemas de secreción tipo III o IV, dos componentes críticos de bacterias Gram-negativas patógenas como *Salmonella typhimurium* (153-155). Al igual que ocurría con el inflamasoma NLRP1, tras su activación, la proteína NLRC4 puede interactuar directamente con la caspasa-1 a través de sus dominios CARD, aunque la presencia de la proteína adaptadora ASC potencia su activación (152, 156). El otro inflamasoma caracterizado es el AIM2, el cual se activa por ADN citoplasmático de patógenos intracelulares como citomegalovirus o *Francisella tularensis* (157, 158). En este caso, la activación de la caspasa-1 ocurre a través de la proteína adaptadora ASC, al igual que ocurre en el inflamasoma NLRP3 (Figura 10).



**Figura 10. Los inflasomas y sus activadores.** El inflamasoma NLRP1b es activado por la toxina de *Bacillus anthracis*, el inflamasoma NLRP3 puede ser activado por diversos DAMPs y PAMPs, el inflamasoma NLRC4 o IPAF es activado por flagelina y el inflamasoma AIM2 reconoce ADN de doble cadena. Figura modificada de Lamkanfi y Dixit (45).

### 2.3 PIROPTOSIS: MUERTE CELULAR PROINFLAMATORIA

El término piroptosis fue acuñado por primera vez en 2001 para designar un proceso de muerte celular. Este término deriva del griego, de la palabra “*pyros*” que significa fuego, ya que este tipo de muerte celular implica a la caspasa-1 y a la IL-1 $\beta$ , las cuales intervienen en los procesos de fiebre e inflamación, y la palabra “*ptosis*” que significa caída, y es también usada para otros tipos de muerte celular. Por ello, la piroptosis se ha descrito como un proceso de muerte celular proinflamatorio que requiere de la actividad de la caspasa-1, mediante el cual los inflamomas contribuyen a la respuesta inmune y la eliminación de patógenos bacterianos *in vivo* (159-164). Este proceso ha sido principalmente caracterizado en macrófagos y células dendríticas (150, 165), aunque también puede afectar a células del sistema nervioso central y cardiovascular bajo condiciones de isquemia (166).

Al igual que la apoptosis, la piroptosis es un tipo de muerte celular programada genéticamente. La principal diferencia en el desarrollo de uno u otro tipo de muerte celular, es la respuesta inflamatoria que lleva asociada. La apoptosis es una muerte celular inmunológicamente inerte, mientras que en la piroptosis tiene lugar la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33 al medio extracelular (167, 168). Esto se debe a que durante la piroptosis, se abren poros de 1-2 nm en la membrana plasmática a tiempos tempranos (169), resultando en un hinchamiento del citoplasma, con lisis osmótica y liberación del contenido plasmático, comúnmente cuantificado por la actividad lactato deshidrogenasa en el medio extracelular (170).

Por otro lado, estos dos tipos de muerte celular también presentan ciertas características bioquímicas comunes. Tanto en la apoptosis como en la piroptosis, las células son positivas en marcajes con anexina V unida a un grupo fluorescente, aunque las razones para que esto ocurra son diferentes. Durante la apoptosis, la fosfatidilserina (PS) que normalmente se encuentra localizada en la cara interna de la membrana celular, se transloca a la cara externa de la membrana, uniéndose a la anexina V (171). Durante la piroptosis, se forman poros en la membrana, que permiten el paso de anexina V al interior de la célula, marcando así la cara interna de la membrana celular. Además, en ambos tipos de muerte celular tiene lugar la condensación del compartimento nuclear y la fragmentación oligonucleosomal del ADN genómico (169, 172, 173), aunque en la apoptosis el núcleo se fragmenta y en la piroptosis permanece intacto (174, 175). Finalmente, otra característica que comparten, es que ambos procesos requieren de la actividad de caspasas, aunque las caspasas implicadas son diferentes. La piroptosis ocurre después de la activación de caspasa-1 y no hay implicación de otras caspasas apoptóticas (160, 170, 172, 176), mientras que la apoptosis, ocurre en ausencia de caspasa-1 activa (177, 178). El hecho de que la caspasa-1 activa, además medie

el procesamiento de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 a sus formas maduras, es lo que asocia a la piroptosis con un modelo de muerte celular proinflamatorio.

### 3 ENFERMEDADES AUTOINFLAMATORIAS

La posibilidad de que existieran enfermedades en las que el sistema inmune se volviera en contra del propio organismo ha despertado una gran fascinación a lo largo de los años, remontándose a los tiempos de Paul Ehrlich. En 1910, el inmunólogo alemán acuñó el término “*Horror Autotoxicus*”, para describir el ataque del sistema inmune a las células y tejidos del propio organismo (179). Esto es lo que hoy en día se conoce como autoinmunidad, y engloba las patologías que tienen un componente inflamatorio, con presencia de autoanticuerpos y de linfocitos T capaces de reconocer los antígenos propios. Estas enfermedades son progresivas, y no suelen ser desencadenadas por estrés ambiental. Sin embargo, hay otro grupo de enfermedades inflamatorias hereditarias monogénicas caracterizadas por episodios de inflamación sistémica sin causa aparente, pero que difieren de las enfermedades autoinmunes en que su patogénesis no está mediada por células del sistema inmune adaptativo, no hay presencia de autoanticuerpos reactivos y las células disfuncionales que promueven de forma directa la inflamación son los monocitos y los macrófagos (180). Este segundo grupo engloba las conocidas como enfermedades autoinflamatorias (Tabla 2).

Las enfermedades autoinflamatorias están caracterizadas por brotes recurrentes de fiebre e inflamación sistémica, y por estar reguladas y mediadas por la IL-1 $\beta$  y no por la actividad de TNF- $\alpha$ , más propio de enfermedades autoinmunes. Debido a esto, los pacientes que sufren enfermedades autoinflamatorias responden rápidamente al tratamiento con bloqueantes para la IL-1 $\beta$  y no a los neutralizadores de TNF- $\alpha$  (57).

Puesto que la activación de la IL-1 $\beta$  se controla a través de los inflamasomas, mutaciones en proteínas que constituyen el inflamasoma dan lugar a numerosos síndromes autoinflamatorios. Existe un amplio espectro de enfermedades autoinflamatorias asociadas al inflamasoma NLRP3, que colectivamente se conocen como síndromes periódicos asociados a criopirina (CAPS, del inglés *cryopyrina-associated periodic syndromes*). La mayoría de las mutaciones que dan lugar a CAPS se encuentran dentro del dominio NACHT del gen *NALP3* (181-183). Estas mutaciones producen una ganancia de función, y dan lugar a la activación constitutiva del inflamasoma NLRP3, lo que desencadena una producción excesiva de IL-1 $\beta$  (184). Dentro de los CAPS se encuentran síndromes que difieren bastante en la severidad de la patología, pero todos ellos presentan síntomas similares que incluyen episodios prolongados de fiebre, erupciones cutáneas y urticaria, pérdida auditiva, artralgia, amiloidosis renal y exceso de crecimiento óseo (181, 183). Un

exceso en la producción de IL-1 $\beta$  e IL-18 explica la aparición de estos síntomas, ya que tratamientos farmacológicos capaces de bloquear la acción de la familia IL-1 producen mejoría, mientras que la terapia basada en corticoesteroides o antiinflamatorios no esteroideos no es efectiva (185, 186). Tanto tratamientos realizados con anakinra (antagonista del receptor de IL-1), como con canakinumab (anticuerpos contra la IL-1 $\beta$ ) han resultado en una mejora rápida y persistente de los síntomas de estos pacientes (187, 188).

**Tabla 2.** Clasificación de las enfermedades autoinflamatorias monogénicas atendiendo a las características clínicas. Tabla modificada de Ozen y Bilginer (189).

<b>ENFERMEDADES AUTOINFLAMATORIAS MONOGENICAS</b>
<p><b>ENFERMEDADES DE FIEBRES PERIÓDICAS</b></p> <p>FMF (Fiebre Mediterránea Familiar)</p> <p>CAPS (Síndromes periódicos asociados a criopirina)</p> <p>TRAPS (Síndromes periódicos asociados al receptor de TNF)</p> <p>MKD/HIDS (Deficiencias de mevalonato quinasa/síndrome asociado a hiperinmunoglobulina D)</p>
<p><b>ENFERMEDADES CON LESIONES PIOGÉNICAS</b></p> <p>PAPA (Síndrome de artritis piogénica, pioderma gangrenoso y acné)</p> <p>DIRA (Deficiencia del agonista del receptor de IL-1)</p> <p>Síndrome de Majeed</p>
<p><b>ENFERMEDADES CON LESIONES GRANULOMATOSAS</b></p> <p>Síndrome Blau</p>
<p><b>ENFERMEDADES CON PSORIASIS</b></p> <p>DITRA (Deficiencia en el agonista del receptor de IL-36)</p>
<p><b>ENFERMEDADES CON LIPODISTROFIA INDUCIDA POR PANICULITIS</b></p> <p>JMP (Síndrome de contracturas articulares, atrofia muscular y lipodistrofia inducida por paniculitis)</p> <p>CANDLE (Dermatosis neutrofílica atípica crónica con lipodistrofia y fiebre elevada)</p> <p>NNS (Síndrome Nakajo-Nishimura)</p>
<p><b>OTRAS ENFERMEDADES</b></p> <p>APLAID (Síndrome de deficiencia de anticuerpos asociados a PLC<math>\gamma</math>-2 y desregulación inmune)</p>

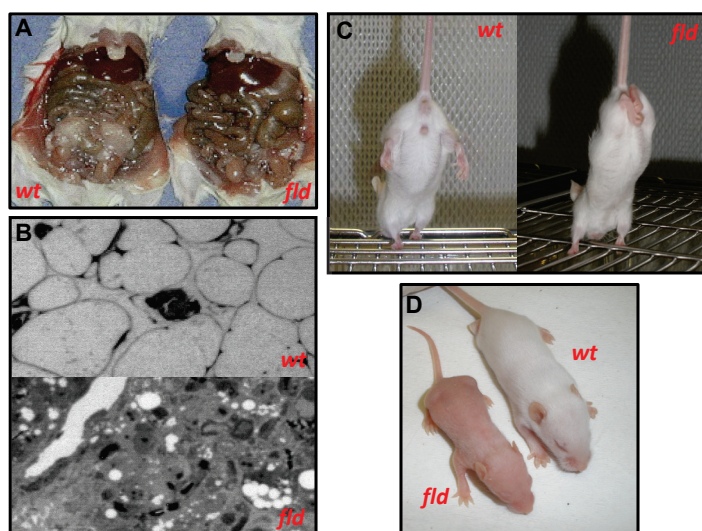
A parte del inflammasoma NLRP3, otros inflamasomas también se han relacionado con enfermedades autoinflamatorias. Polimorfismos de nucleótido simple en el promotor y regiones codificantes del gen *NLRP1* están relacionados con la presencia de vitíligo y enfermedad de Addison respectivamente. Dado que los polimorfismos están localizados en, o cerca de, los dominios NACHT, se cree que esos pacientes tienen reducido el umbral para la activación del inflammasoma y la producción de IL-1 $\beta$ . Por ello, los inhibidores de caspasa-1 y las terapias con anticuerpos para neutralizar la IL-1 $\beta$  son tratamientos potenciales para pacientes que sufran de vitíligo y de la enfermedad de Addison como consecuencia de mutaciones en *NLRP1* (190, 191).

Dentro de las enfermedades autoinflamatorias caracterizadas hasta la fecha es importante destacar el síndrome de Majeed, el cual no está generado por mutaciones en genes relacionados con el inflammasoma o la biología de la IL-1, sino que se debe a mutaciones de una enzima del metabolismo lipídico: la lipina-2.

## 4 LA FAMILIA DE LAS LIPINAS

### 4.1 DESCUBRIMIENTO DE LAS LIPINAS

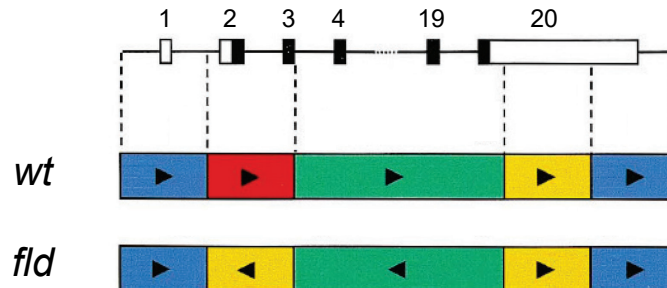
Las proteínas lipinas fueron identificadas gracias a la aparición de una mutación espontánea en la cepa de ratón BALB/cByJ. Estos ratones presentaban un fenotipo caracterizado por una neuropatía periférica progresiva y la aparición de un hígado graso durante la lactancia, característica que les dio el nombre: ratones *fld* (del inglés *fatty liver dystrophy*) (192). Los ratones *fld* además de tener hígado graso, también presentan hipertrigliceridemia durante el periodo de lactancia, dado que a través de la leche siguen una dieta alta en grasa. Estas dos características desaparecen tras el destete y cambio a una dieta adulta (192). Sin embargo, en los ratones *fld* adultos, el fenotipo que presentan está marcado por la carencia de tejido adiposo maduro, resistencia a insulina (193) y una neuropatía periférica progresiva debido a la desmielinización de las células de Schwann (194) (Figura 11). Además, los ratones machos *fld* son estériles, efecto que tal vez esté relacionado con los altos niveles de expresión de la lipina-1 en testículos en ratones de fenotipo silvestre (*wt*, del inglés *wild-type*) (195).



**Figura 11. Fenotipo de los ratones *fld*.** A) Vista ventral donde se observa una clara reducción del tejido adiposo epididimal en los ratones *fld*. B) Corte histológico del tejido adiposo epididimal. C) Comportamiento anómalo de las patas traseras de los ratones *fld*, cuando son agarrados por la cola, como consecuencia de su neuropatía periférica. D) Ratones *wt* y *fld* de dos semanas de edad, donde la diferencia de tamaño y desarrollo es apreciable. Las imágenes A y B son adaptadas de Peterfy et al. (196), mientras que, las imágenes C y D, son fotos de la colonia de ratones *fld* de nuestro laboratorio.



El gen causante de este fenotipo se identificó en 2001 por el grupo de la Dra. Reue mediante el uso de técnicas de clonaje posicional (196). Gracias a esta metodología descubrieron que el fenotipo observado se debía a mutaciones en un gen, que recibió el nombre de *Lpin1*, y pasaría a ser el miembro fundador de la familia de las lipinas (Figura 12).



**Figura 12. Estructura de los alelos mutantes fld.** Estructura de los alelos del gen *Lpin1* en ratones wt y fld. En la parte superior se muestran los exones numerados y representados en negro los codificantes y en blanco los no codificantes. El gen se divide en cinco segmentos de colores, de forma que en el alelo de los ratones fld hay una delección del segmento rojo que contiene los exones 2 y 3 y una inversión del segmento verde, que es la que contiene la mayor parte de exones codificantes. Además, el segmento amarillo, ha sido duplicado e invertido. Figura modificada de Peterfy et al. (196).

Posteriormente, a través de análisis de homología de secuencias en bases de datos, encontraron dos genes adicionales en mamíferos a los que llamaron *Lpin2* y *Lpin3* (196).

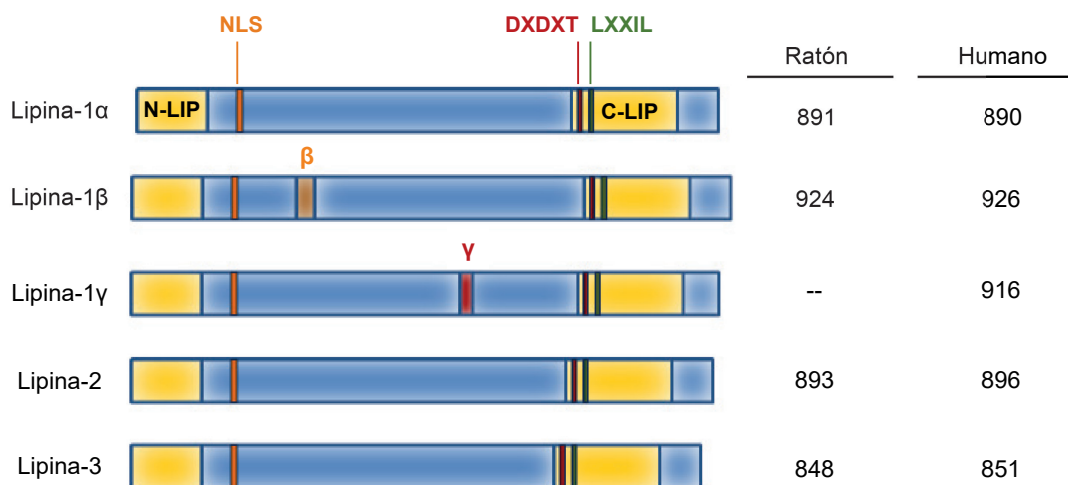
#### 4.2 FUNCIONES MOLECULARES DE LA FAMILIA DE LAS LIPINAS

En ratones, el procesamiento alternativo del gen *Lpin1* da lugar a dos isoformas conocidas como lipina-1 $\alpha$  y lipina-1 $\beta$ , que tienen 891 y 924 aminoácidos (aa) respectivamente (197). En humanos, el gen *LPIN1*, además de generar la lipina-1 $\alpha$  y lipina-1 $\beta$  de 890 y 923 aa respectivamente (198), produce un procesamiento alternativo que da lugar a otra isoforma de 916 aa denominada lipina-1 $\gamma$  (199). Los otros dos miembros identificados de la familia de las lipinas, la lipina-2 y la lipina-3 comparten una similitud de secuencia de aminoácidos con la lipina-1 de entre el 44-48 % (196, 200)

En la secuencia de las lipinas existen dos regiones altamente conservadas, una en el extremo amino-terminal, el dominio N-LIP (*N-terminal lipin*), y otra en el extremo carboxi-terminal, el dominio C-LIP (*C-terminal-lipin*) (Figura 13). Cerca del dominio N-LIP, se localiza una secuencia de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*) (201). En el dominio C-LIP se encuentran dos motivos funcionales bien definidos, el motivo DXDXT y el motivo LXXIL. El primero está presente en todas las especies y es el responsable de la actividad catalítica fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP, del inglés *phosphatidic acid phosphatase*). El segundo está descrito en toda la familia de lipinas de mamíferos y es



necesario para realizar la función de coactivador transcripcional, aunque *in vivo* esta función sólo se ha demostrado para la lipina-1 (202).



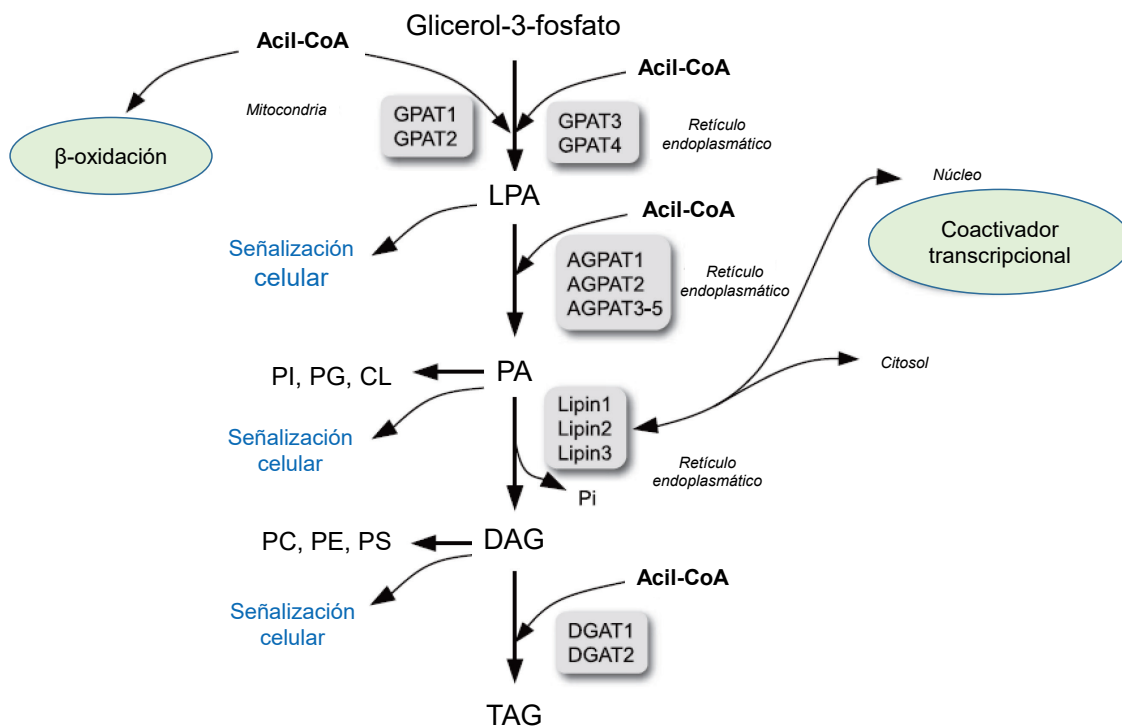
**Figura 13. Motivos estructurales y funcionales de las proteínas de la familia de las lipinas.** En este diagrama se muestran las proteínas que forman la familia de las lipinas y los dominios estructurales evolutivamente conservados. En el extremo amino terminal se encuentra el dominio N-LIPIN y la señal de localización nuclear (NLS), mientras que el extremo carboxi terminal se localiza el dominio C-LIP, que contiene el motivo catalítico (DXDXT) y el motivo de actividad transcripcional (LXXIL). También se puede observar la inserción de las secuencias específicas de la lipina-1β y lipina-1γ. Figura modificada de Bou Khalil et al. (203).

#### 4.2.1 Las lipinas codifican para enzimas responsables de la actividad PAP

La actividad PAP fue caracterizada por primera vez en los años 50, como componente de la ruta de Kennedy o ruta del glicerol fosfato (204, 205). Esta ruta comienza con la acilación secuencial del glicerol-3-fosfato para formar ácido fosfatídico (PA), que mediante la actividad PAP es convertido a diacilglicerol (DAG), que dará lugar a la síntesis de fosfatidilcolina (PC). El DAG formado también puede dar lugar a otros fosfolípidos como fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS), y también originar triacilglicerol (TAG) (Figura 14). Estudios posteriores revelaron que la enzima responsable de la actividad PAP era una enzima soluble, citosólica, responsable de generar la mayor parte del DAG necesario para la síntesis de glicerolípidos (206, 207), y que para esta síntesis era necesaria su traslocación desde el citosol al retículo endoplasmático (208); Además, era una actividad dependiente de magnesio y sensible a la presencia de agentes bloqueantes de los grupos tiol de las cisteínas (N-etil-maleimida, NEM) (209). A esta actividad PAP citosólica se le llamó PAP-1, para diferenciarla de las fosfatasa LPP (del inglés, *lipid phosphate phosphatase*). Las enzimas LPP se localizan en la membrana plasmática y presentan actividad PAP-2, que es independiente de magnesio e insensible a NEM. Además, intervienen en la síntesis de TAG por la ruta del monoacilglicerol fosfato, principalmente en el intestino (210, 211). La principal diferencia entre estos dos grupos de enzimas radica en que la actividad PAP-1 tiene especificidad para el PA, mientras que las

LPPs pueden hidrolizar los grupos fosfatos de otros lípidos, como el ácido lisofosfatídico, la ceramida-1-fosfato o la esfingosina-1-fosfato (195).

Numerosos investigadores intentaron sin éxito purificar la PAP-1 y así identificar los genes responsables que codificaban para las PAPs. Fue en el año 2006, cuando *Han et al.* desvelaron el misterio (212). Estos autores habían purificado e identificado la proteína Pah1p como responsable de la actividad PAP en levaduras, y mediante análisis de similitud de secuencia, identificaron las lipinas como las responsables de la actividad PAP en mamíferos. Los tres miembros de la familia (lipina-1, lipina-2 y lipina-3) presentaban actividad PAP específica de PA y dependiente de magnesio.



**Figura 14. Ruta del glicerol fosfato para la síntesis de novo de triacilglicerol (TAG) y glicerosfolípidos.** Las proteínas lipinas son enzimas con actividad PAP, que catalizan la conversión de ácido fosfatídico (PA) a diacilglicerol (DAG), precursor directo del triacilglicerol (TAG) y de los fosfolípidos fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS). El PA también puede ser utilizado para la síntesis de otros fosfolípidos, como fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipinas (CL). Las enzimas aciltransferasas, que son requeridas para la síntesis de TAG, se localizan de modo permanente en el retículo endoplasmático (RE), mientras que las lipinas residen en el citosol y se asocian de modo transitorio a la membrana del RE para llevar a cabo su actividad PAP. Por otro lado, las lipinas también pueden translocarse al núcleo para actuar como coactivador transcripcional. GPAT, glicerol-3-fosfato aciltransferasa; LPA, ácido lisofosfatídico; AGPAT, 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa; DGAT, diacilglicerol aciltransferasa. Figura modificada de Takeuchi y Reue (213).

Las lipinas muestran una alta especificidad por el PA como sustrato, y no son capaces de defosforilar otros lípidos (213, 214). La actividad PAP-1 de las lipinas en mamíferos no sólo depende de  $Mg^{2+}$ , sino que también es dependiente de la concentración de  $Mn^{2+}$  (199). Sin embargo, la actividad catalítica de las lipinas no depende de su estado de

oligomerización, ya que pueden ensamblarse y dar lugar a homo- y hetero-oligómeros sin que ésta se vea afectada (215). Por otro lado se ha descrito que las sales de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{Zn}^{2+}$  de PA pueden inhibir la actividad PAP (199, 216); en particular, la inhibición de la actividad PAP por  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido atribuida a su asociación con el sustrato PA, evitando así la reacción de defosforilación (217, 218). En general, la fosforilación de la lipina-1 no afecta a su actividad PAP, pero sí controla su localización subcelular y su actividad fisiológica (219, 220).

El motivo DXDXT donde reside la actividad catalítica, incluye a las lipinas dentro de la superfamilia de las haloácido halogenasas (HAD) (221, 222). El primer y el segundo residuo de aspártico son requeridos para la actividad PAP-1 de la lipina. De hecho, la sustitución del primer aspártico por un glutámico elimina completamente la actividad catalítica (202). Para la actividad PAP-1 también es importante un residuo de serina (S734 en humanos o su homólogo S731 en ratones) que se encuentra altamente conservado en el dominio C-LIP (223).

A pesar que todas las lipinas tienen actividad PAP-1, ésta es muy diferente en cada una de ellas ( $V_{\max}$  lipina-1>lipina-2>lipina-3) (Figura 15) (195). Por otro lado, cuando se compara la actividad de las tres isoformas de la lipina-1 en humanos, la lipina-1 $\alpha$  y lipina-1 $\beta$  presentan un perfil similar, mientras que la lipina-1 $\gamma$  posee una actividad considerablemente menor (Figura 15) (199).

A.

	Lipina-1 $\alpha$	Lipina-1 $\beta$	Lipina-2	Lipina-3
$K_{50}$	8,7 $\pm$ 0,25	7,0 $\pm$ 0,18	7,0 $\pm$ 0,44	6,9 $\pm$ 0,6
$V_{\max}$	25 $\pm$ 1,9	30,5 $\pm$ 1,3	24,6 $\pm$ 2,1	8,7 $\pm$ 1
Coef. Hill	10 $\pm$ 2,3	15,9 $\pm$ 0,7	3,7 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 1

B.

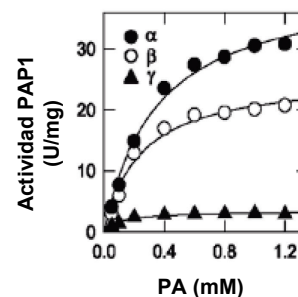


Figura 15. **Actividad enzimática de las lipinas en mamíferos.** A) La tabla muestra los valores de las constantes cinéticas de las diferentes lipinas. B) Actividad PAP-1 de las isoformas de la lipina-1 en humanos. Figura adaptada de Donkor et al. (195) y de Han y Carman (199).

El análisis de la actividad PAP-1 en tejidos de los ratones *fld* indica que la lipina-1 es la máxima responsable de dicha actividad en tejido adiposo, músculo esquelético, corazón y células del sistema nervioso periférico y, en menor medida, en hígado, cerebro y riñón (194, 195, 220). El hígado de los ratones *fld* presenta niveles normales de actividad PAP-1, por lo que se piensa que otros miembros de la familia de las lipinas podrían ejercer efectos compensatorios. Se ha observado que aunque los niveles de ARNm de lipina-2 en el hígado de ratones *fld* son normales, los niveles de lipina-3 están aumentados considerablemente

(195). Sin embargo, estudios de silenciamiento génico de lipina-2 en hepatocitos de ratones *wt* y *fld*, mostraron que la actividad PAP-1 disminuye drásticamente en ambos casos, fundamentalmente en los ratones *fld* (224). Por otro lado, en células HeLa, el tratamiento con siRNA frente a lipina-2 produce un incremento de la actividad PAP-1, debido a que se produce un aumento en la expresión de la lipina-1 (225). Estos datos sugieren que la contribución de cada una de las lipinas a la actividad PAP-1 total es dependiente del tipo celular.

#### 4.2.2 **Las lipinas actúan como reguladores transcripcionales**

Las lipinas de mamíferos contienen secuencias de localización nuclear que permiten su traslocación al núcleo para así promover la transcripción de genes requeridos para la toma de ácidos grasos y para la oxidación (200, 201, 223). Las tres lipinas descritas hasta la fecha contienen el motivo hidrofóbico en hélice- $\alpha$  LXXIL en el dominio C-LIP de la región conservada C-terminal, el cual es similar a un motivo de interacción de receptor nuclear (202, 203). Mediante mutagénesis dirigida se demostró que este motivo LXXIL es necesario para la interacción de la lipina-1 con PGC-1 $\alpha$  y PPAR $\alpha$  (202). Posteriormente, ensayos de genes reporteros de luciferasa pusieron de manifiesto que la lipina-2 también interactuaba con PGC-1 $\alpha$  y PPAR $\alpha$  a través de su motivo LXXIL (223). En estos ensayos se observó que la lipina-2 tenía prácticamente la misma actividad de coactivador transcripcional que la lipina-1, amplificando el efecto de PGC-1 $\alpha$ . Además, dentro del dominio C-LIP de las lipinas murinas se encuentra una serina altamente conservada, la S731, homóloga de la S734 encontrada en humanos. Esta S731 es necesaria para la actividad PAP-1, y para averiguar si también era requerida para la función de coactivador transcripcional, se hicieron estudios con un mutante de lipina-2 en el que se cambió esa serina por una leucina (S731L). Los resultados mostraron que el mutante de lipina-2 S731L mostraba la misma actividad de coactivador que el *wt* de lipina-1 $\alpha$  y de lipina-2, lo que indicaba que esta serina altamente conservada era requerida para la actividad PAP de las lipinas 1 y 2, pero no para su función coactivadora de la transcripción de genes.

#### 4.3 **EL PAPEL DE LAS LIPINAS EN EL SISTEMA INMUNE**

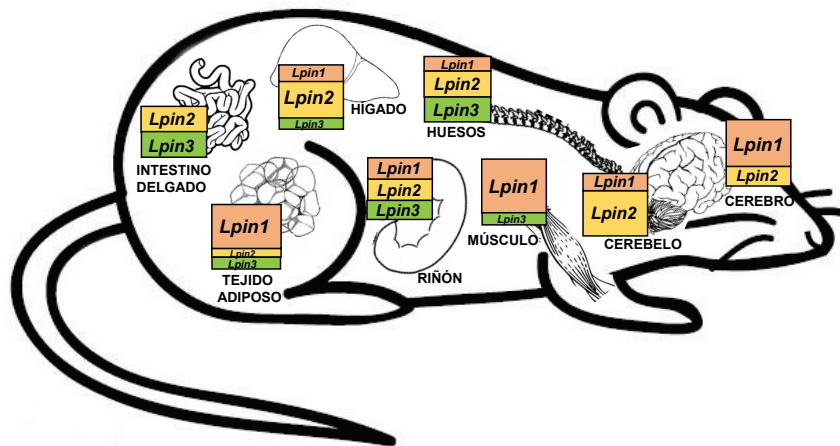
La implicación de las lipinas en la biosíntesis de glicerolípidos, y más específicamente en la generación de DAG, tiene una estrecha relación con el importante papel que juegan modulando la respuesta inflamatoria en macrófagos. Esto es posiblemente debido al hecho de que las lipinas controlan los niveles celulares de PA y DAG, dos lípidos bioactivos. A la lipina-1 se le ha atribuido un papel proinflamatorio (226). Mediante el uso de macrófagos procedentes de ratones *fld* se desveló que la lipina-1 modula las cascadas de señalización a través de TLR4, y que cuando está ausente, hay una disminución de la activación de las

MAPKs y del factor de transcripción AP-1 tras la estimulación con LPS. Como consecuencia, los macrófagos procedentes de los animales *fld* producen menos citoquinas proinflamatorias que los procedentes de animales *wt* (226). En esos estudios también se observó que los ratones *fld* se recuperan antes del tratamiento con LPS (226). Además, la falta de lipina-1 en macrófagos humanos disminuye el número de gotas lipídicas intracelulares e impide su aumento de tamaño tras el tratamiento con oleato (227). La lipina-1 también se ha implicado en la síntesis de eicosanoides, ya que su disminución reduce la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> citosólica del grupo IVA (cPLA<sub>2</sub> α) y la movilización del ácido araquidónico por diversos estímulos (227). El efecto de la lipina-1 sobre la cPLA<sub>2</sub> α podría deberse al papel del DAG en la activación de la PKC, que a su vez regularía las cascadas de fosforilación que culminan en la fosforilación y activación de la fosfolipasa o bien a la estimulación directa de la actividad de la cPLA<sub>2</sub> α (227).

Pero no sólo la lipina-1 está implicada en la respuesta inflamatoria, sino que varios estudios también han involucrado a la lipina-2 en procesos inflamatorios. El papel y los mecanismos a través de los cuales la lipina-2 podría regular la inflamación serán explicados en más detalle más adelante.

#### 4.4 LA LIPINA-2

La mayoría de los estudios que se han publicado desde el descubrimiento de la familia de las lipinas han sido dirigidos al miembro fundador, la lipina-1, y poco se ha estudiado sobre la lipina-2 y la lipina-3. Estas dos proteínas también tienen actividad PAP-1, pero su actividad es menor que la que presenta la lipina-1 (195). Al igual que la lipina-1, la lipina-2 también presenta en su estructura el motivo coactivador (motivo LXXIL) (202), y tiene funciones duales como fosfatasa de ácido fosfatídico y como coactivador transcripcional *in vitro* (195, 202, 212, 223). La lipina-2 parece desempeñar funciones similares a las que desempeña la lipina-1, pero difiere de ésta en su localización subcelular. Mediante estudios de sobreexpresión en células HeLa se ha observado que, tanto en células vivas como fijadas, la lipina-1 muestra una distribución citosólica difusa. Sin embargo, la lipina-2 muestra colocalización con marcadores del retículo endoplasmático en células vivas y en células fijadas aparece como una mezcla de proteína soluble y proteína asociada a retículo endoplasmático (225). Además, la lipina-2 exhibe un patrón de expresión tisular diferente al de la lipina-1, siendo su presencia mayoritaria en hígado y con niveles más bajos en cerebro, intestino delgado, riñón y pulmones (Figura 16) (195). El hecho de que los ratones *fld* deficientes en lipina-1 tengan una actividad fosfatasa de ácido fosfatídico normal en hígado, sugiere que son la lipina-2 y lipina-3 las responsables de la actividad PAP-1 en este tejido.



**Figura 16. Patrón de expresión tisular de las lipinas murinas en tejidos.** El diagrama indica los niveles relativos de la expresión de ARNm de Lpin1, Lpin2 y Lpin3 en tejidos murinos. La lipina-1 se expresa principalmente en tejido adiposo y músculo, y a niveles más bajos en muchos otros tejidos como cerebro, riñón e hígado. La lipina-2 se expresa principalmente en hígado y cerebelo, y también se encuentra en intestino, huesos y riñón. La lipina-3 se expresa principalmente en intestino delgado y huesos, y en menor nivel en los tejidos indicados. Figura modificada de Csaki et al. (228).

Como se ha mencionado previamente, la lipina-2 se expresa fundamentalmente en hígado (223) y en estudios en los que se ha bajado su expresión, se ha visto que contribuye sustancialmente a la actividad PAP-1 y a la síntesis de TAG en hepatocitos (224). Los cambios en los niveles de lipina-2 en el hígado de ratones vienen inducidos por ayuno, obesidad debida a dieta y también por estrés de retículo endoplasmático (223, 224, 229), lo que sugiere que la modulación de los niveles de lipina-2 es importante para la homeostasis lipídica en hígado.

La generación de ratones deficientes en lipina-2 por el grupo de la Dra. Reue permitió profundizar más en el estudio de esta enzima (230). Dada la notoria expresión de lipina-2 en hígado (195, 224) y la reducción de la actividad PAP-1 que se veía en hepatocitos al disminuir la lipina-2 (224), se esperaba que estos ratones redujeran drásticamente la actividad PAP-1 hepática y tuvieran alterado el metabolismo lipídico en hígado. Sin embargo, la actividad PAP-1 hepática estaba elevada en esos ratones ya que como mecanismo compensatorio habían aumentado los niveles proteicos de lipina-1 (230).

Además, gracias al uso de estos ratones, se desveló que la lipina-2 también desempeña un papel importante en la homeostasis lipídica en el cerebelo de ratones de edad avanzada. En el cerebelo procedente de ratones *wt* jóvenes, solamente se expresan la lipina-1 y la lipina-2, pero no la lipina-3. Cuando en esta región del cerebro falta la lipina-2, los ratones jóvenes expresan niveles abundantes de lipina-1 para compensar la carencia de la lipina-2. Sin embargo, al envejecer, los niveles proteicos de lipina-1 caen hasta casi desaparecer, y al no tener ninguna lipina en el cerebelo, se altera la composición de fosfolípidos. Este hecho da lugar a temblores y ataxia al moverse (230), síntomas que van acompañados de una

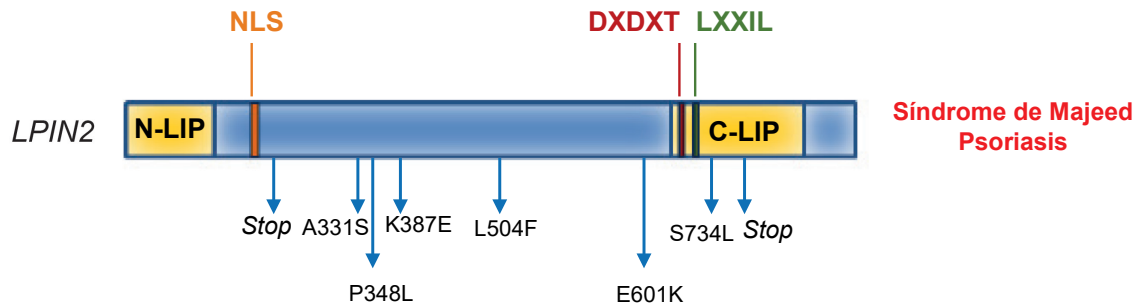
disminución en el número de células de Purkinje, indicando que la lipina-2 y la síntesis de glicerolípidos desempeñan algún tipo de función aún desconocida en el mantenimiento de este tipo celular.

Estos datos ponen de manifiesto las relaciones fisiológicas que existen entre los miembros de la familia de las lipinas, las cuales operan de una forma específica de tejido y de edad. En el caso de la lipina-1 y lipina-2 es claro que cada una de ellas tiene papeles únicos en tejidos específicos, mientras que existen ciertas funciones fisiológicas que son compartidas por ambas (228).

La lipina-2 también se expresa en macrófagos, donde ejerce un papel importante como moduladora de la inflamación, que parece ser opuesto al desempeñado por la lipina-1. *Valdearcos et al.* demostraron que la lipina-2 regulaba las rutas de señalización inflamatorias activadas por ácido palmítico, tanto en células RAW 264.7 como en macrófagos humanos (231), de modo que la falta de lipina-2 disminuía la incorporación de ácido palmítico en TAG y aumentaba la señalización proinflamatoria inducida por este ácido graso, a través de la activación de JNK. De ahí que a la lipina-2 se le haya atribuido un papel represor de la señalización inducida por ácido palmítico en macrófagos, mediante el secuestro de ácido palmítico en TAG (231), y se haya revelado un papel antiinflamatorio para este miembro de la familia de las lipinas, al menos en un contexto metabólico en macrófagos.

Se han descrito diferentes mutaciones del gen *LPIN2* no relacionadas entre sí, entre las que se incluyen mutaciones sin sentido (dan lugar a codón de *stop*) y una mutación con cambio de sentido (S734L) en el dominio C-LIP terminal (Figura 17). Además, variaciones genéticas en el gen *LPIN2* se han asociado a diferentes patologías en humanos. Mediante estudios de asociación del genoma completo se ha identificado un polimorfismo de nucleótido simple (SNP, del inglés *single-nucleotide polymorphism*) en la región UTR 3' del gen *LPIN2* y se ha relacionado con el riesgo a padecer diabetes, creyéndose que ese polimorfismo influye en el índice de masa corporal, la distribución de la grasa, desarrollo de esteatosis hepática, niveles de glucosa y resistencia a insulina en obesidad (232-234). También se han asociado a psoriasis varias mutaciones puntuales de la lipina-2, aunque las consecuencias funcionales de las sustituciones en esos aminoácidos aún no han sido evaluadas (235). Asimismo, se han revelado varias mutaciones en el gen *LPIN2* en el síndrome de Majeed, datos que avalan el papel importante de la lipina-2 en la regulación de la respuesta inflamatoria.





**Figura 17. Diagrama de las mutaciones de la proteína lipina-2 en humanos.** La posición y el tipo de mutaciones se muestran a lo largo de la proteína. El fenotipo asociado a estas mutaciones se muestra a la derecha. El stop representa el cambio de un simple nucleótido que introduce un codón de stop, y por tanto genera una proteína truncada. Figura modificada de Reue (236).

#### 4.4.1 El síndrome de Majeed

El síndrome de Majeed fue descrito por primera vez en 2001 como un desorden autoinflamatorio (237, 238). Años más tarde, *Ferguson et al.* identificaron en niños de dos familias en Jordán las primeras mutaciones en el gen responsable de este síndrome: el gen *LPIN2* (237). En estos estudios se describió la sintomatología común que presentaban los pacientes. Los síntomas iniciales, que generalmente aparecían durante el primer año de vida, eran fiebres recurrentes y dolor en huesos y articulaciones (238). El estudio mediante radiografías de estos pacientes también reveló la presencia de lesiones osteomielíticas cerca de los extremos de los huesos largos, pero esas lesiones eran estériles (238-241). Además, los sujetos desarrollaban anemia diseritropoyética congénita con diferentes grados de severidad (237, 239, 241) y algunos pacientes sufrían dermatosis inflamatoria transitoria e inflamación cutánea, aunque este síntoma no se ha considerado un fenotipo característico de la enfermedad.

El síndrome de Majeed es considerado una enfermedad muy rara que sólo se ha observado en cuatro familias, y todas ellas de Oriente Medio (242-244). Hasta la fecha se conocen cuatro mutaciones diferentes que dan lugar a este síndrome; tres mutaciones de cambio de marco de lectura o *splice site* que resultan en codones de *stop* prematuros y una mutación puntual. Entre las primeras se encuentran: una mutación de un residuo altamente conservado (R776S) en el extremo 5' del sitio de procesamiento del exón 17 (c.2327+1G>C) que produce un cambio de marco de lectura dando lugar a un codón de *stop* prematuro en el intrón 17 (242); una mutación de marco de lectura (c.540-541delAT) (T180P) que produce un codón de *stop* en la posición 181 (237); y una delección homocigótica de 2 pares de bases (c.1312-1313delCT) en el exón 9 que produce una proteína truncada de 454 aa (244). En la mutación puntual, tiene lugar el cambio de una serina conservada por una leucina (S734L) (237). Esta última mutación ocurre en una zona del gen posterior a la zona donde se



encuentra el sitio activo responsable de la actividad PAP y el motivo de coactivación transcripcional, en una serina que está altamente conservada en las lipinas-1, -2 y -3 de mamíferos (237). La mutación S734L anula la actividad PAP de la enzima, pero no impide la habilidad de la lipina-2 para asociarse a membranas microsomales ni su función como coactivador transcripcional (223), lo que es indicativo de que la pérdida de la actividad catalítica de la lipina-2 es suficiente para causar el síndrome de Majeed (Figura 17).

Dada la rareza y la baja prevalencia del síndrome de Majeed en la población, los estudios en humanos están limitados. A día de hoy se desconocen los mecanismos a través de los cuales las mutaciones en lipina-2 originan este síndrome, y la relación entre la lipina-2 y la patogénesis de la enfermedad aún es un misterio. Se pensó que la generación de ratones sin lipina-2 ayudaría a entender la etiología de la enfermedad, pero sorprendentemente esos ratones no desarrollaban la enfermedad. El grupo de la Dra. Reue reportó que estos animales no presentaban evidencias de lesiones óseas ni osteomielitis (230) aunque sí desarrollan anemia diseritropoyética (230), sugiriendo que existen componentes genéticos o ambientales adicionales a las mutaciones en el gen de la lipina-2, que contribuyen al desarrollo de este síndrome y a la aparición de las alteraciones óseas observadas en los pacientes.

Datos obtenidos recientemente en humanos han implicado la IL-1 $\beta$ , una citoquina proinflamatoria, en el síndrome de Majeed. En un estudio realizado en 2013 mediante análisis genéticos, clínicos e inmunológicos, se describió que dos hermanos que sufrían este síndrome presentaban una notable mejoría, tanto clínica como de parámetros de laboratorio, tras el tratamiento con fármacos que bloqueaban la acción de la IL-1 (tanto con anakinra como con canakinumab) (244). El hecho de que estos fármacos fueran capaces de controlar la inflamación de estos pacientes apoya la hipótesis de la importancia de la IL-1 en la patogénesis de la enfermedad y plantea la posibilidad de que la lipina-2 sea una proteína clave en la regulación de la producción de IL-1 $\beta$ .



## ***II. OBJETIVOS***

---



Teniendo en cuenta los antecedentes descritos anteriormente, el objetivo principal de este trabajo ha sido desvelar el posible papel de la lipina-2 en la activación *in vitro* del inflamasoma NLRP3, tanto de forma clásica como metabólica, y determinar su participación en algunos de los procesos que tienen lugar durante su activación *in vivo*.

Este objetivo general puede ser desglosado en varios objetivos más específicos:

- Estudiar la posible implicación de la lipina-2 en la primera señal de activación del inflamasoma NLRP3, describiendo sus efectos sobre los procesos de señalización por TLR4 en macrófagos, tanto murinos como humanos.
- Estudiar la posible implicación de la lipina-2 en la segunda señal de activación del inflamasoma NLRP3 por ATP, definiendo su papel en la actividad del receptor P2X7, los flujos de K<sup>+</sup>, la oligomerización de ASC, la activación de caspasa-1 y los procesos de muerte celular asociados a dicha activación.
- izar el papel del colesterol en la activación del inflamasoma NLRP3 mediada por lipina-2, y más concretamente, en la amplificación de la segunda señal de activación del inflamasoma.
- Caracterizar el papel de la lipina-2 en la activación *in vivo* del inflamasoma durante el desarrollo de inflamación inducida por LPS en un modelo murino.
- Estudiar la posible implicación de la lipina-2 en la activación del inflamasoma a través de un estímulo metabólico como es el ácido palmítico en macrófagos, tanto murinos como humanos.



### ***III. MATERIALES Y MÉTODOS***

---





## 1 MATERIALES Y REACTIVOS

### Anticuerpos utilizados

- Anticuerpo monoclonal IgG de ratón frente a IL-1 $\beta$  (Forma activa e inactiva) (Cell signaling. Ref. #12242)
- Anticuerpo policlonal IgG de conejo frente a la caspasa-1 p10 humana (Santa Cruz Biotechnologies. Ref. sc-514)
- Anticuerpo policlonal IgG de conejo frente a caspasa-1 p10 murina (Santa Cruz Biotechnologies. Ref. sc-515)
- Anticuerpo policlonal IgG de conejo frente a ASC (Santa Cruz Biotechnologies. Ref. sc-22514-R)
- Anticuerpo monoclonal IgG de conejo frente a I $\kappa$ B- $\alpha$  (Cell signaling. Ref #4814).
- Anticuerpo monoclonal IgG de conejo frente a *phospho*(Ser933)-p105 (Cell signaling. 18E6. Ref. #4806).
- Anticuerpo policlonal IgG de conejo frente a p50 (Santa Cruz Biotechnologies. Ref. sc-114)
- Anticuerpo monoclonal IgG de conejo frente a p65 (Cell signaling. D14E12. Ref #8242).
- Anticuerpo monoclonal IgG de conejo frente a *phospho*(Thr180/Tyr182)-p38 (Cell signaling. D3F9. Ref. #4511).
- Anticuerpo policlonal IgG de conejo frente a p38 (Cell signaling. Ref. #9212).
- Anticuerpo policlonal IgG de conejo frente a *phospho*(Thr202/Tyr204)-p44/42 (Cell signaling. Ref. #9101).
- Anticuerpo monoclonal IgG de conejo frente a p44/42 (Cell signaling. 137F5. Ref. #4695).
- Anticuerpo monoclonal IgG de conejo frente a *phospho*(Thr183/Tyr185)-SAPK/JNK (Cell signaling. 81E11. Ref. #4668).
- Anticuerpo policlonal IgG de conejo frente a SAPK/JNK (Cell signaling. Ref. #9252)
- Anticuerpo monoclonal de ratón frente a  $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich. clon AC-15. Ref. A5441)
- Anticuerpo monoclonal IgG de ratón frente a la proteína de la matriz nuclear p84 (Abcam. 5E10. Ref. ab487)
- Anticuerpo de burro frente a la IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (GE Healthcare. Ref. NA9340)
- Anticuerpo de burro frente a la IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (GE Healthcare. Ref. NA931)
- Anticuerpo de cabra frente a la IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific. Ref. A11008)

### **ELISAS utilizados**

- *Human IL-1 $\beta$  ELISA Ready-Set-Go!*<sup>®</sup> (eBioscience). Detección de IL-1 $\beta$  humana.
- *Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Ready-Set-Go!*<sup>®</sup> (eBioscience). Detección de IL-1 $\beta$  murina.
- *Human TNF- $\alpha$  ELISA Ready-Set-Go!*<sup>®</sup> (eBioscience). Detección de TNF- $\alpha$  humano.
- *Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Ready-Set-Go!*<sup>®</sup> (eBioscience). Detección de TNF- $\alpha$  murino.
- *Mouse IL-18 Platinum ELISA* (eBioscience). Detección de IL-18 murina.

### **Cultivos celulares**

- Medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (BioWhittaker<sup>®</sup>) (Lonza)
- Medio RPMI 1640 con glutamina (Gibco<sup>®</sup>, Life technologies, Thermo Fisher Scientific)
- Opti-MEM<sup>®</sup> (Gibco<sup>®</sup>, Life technologies, Thermo Fisher Scientific)
- Medio libre de suero para macrófagos (Gibco<sup>®</sup>, Life technologies, Thermo Fisher Scientific)
- Suero fetal bovino (FBS) (Gibco<sup>®</sup>, Life technologies, Thermo Fisher Scientific)
- Suero humano (Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León)
- L-Glutamina (Sigma-Aldrich)
- Penicilina/Estreptomicina (Gibco<sup>®</sup>, Life technologies, Thermo Fisher Scientific)
- Gentamicina (BioWhittaker<sup>®</sup>, Lonza)
- Ficoll-Paque<sup>™</sup> Plus (GE Health Care)
- Tripsina-EDTA (Lonza)
- Filtros estériles de 0,22  $\mu$ m (Merck-Millipore)
- Placas y frascos para cultivo celular (BD Biosciences)
- Raspadores de placas (BD Biosciences)
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml (BD Biosciences)

### **Microscopía**

- 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich)
- Bromuro de etidio (BrEt) (Sigma-Aldrich)
- Paraformaldehído 37% (Sigma-Aldrich)
- Sacarosa (Sigma-Aldrich)
- DABCO<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich)
- Poli-L-Lisina (Sigma-Aldrich)
- Polivinil-alcohol (Sigma-Aldrich)
- Placas de cultivo de 35 mm con fondo de cristal apto para microscopía para realizar experimentos *in vivo* (MatTek corporation)
- Cubres y portas para microscopía (Erie Scientific company)

## 1.1 ESTÍMULOS CELULARES E INHIBIDORES

- **LPS de *Escherichia coli* O111:B4** (Sigma-Aldrich). Lipopolisacárido, componente de la pared celular de bacterias Gram-negativa, ligando de TLR4. Reconstituido en PBS a una concentración de 1 mg/ml, almacenado a -20 °C. A no ser que se indique lo contrario, utilizado a una concentración de 200 µg/ml *in vitro* y a una dosis de 10 mg/kg *in vivo*.
- **ATP** (Sigma-Aldrich). Adenosina-5'-trifosfato. Utilizado para activar los receptores P2X7 y consecuentemente el inflamasoma NLRP3. Reconstituido en H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub> estéril a una concentración de 100 mM y almacenado a -20 °C. Utilizado a una concentración de 2 mM
- **Nigericina** (Calbiochem). Ionóforo que interrumpe el potencial de membrana. Utilizado como activador del inflamasoma NLRP3. Reconstituido en etanol a una concentración de 20 mM y almacenado a -20 °C. Utilizado a una concentración de 10 µM.
- **MSU** (Invivogen). Urato monosódico. Utilizado como activador del inflamasoma NLRP3. Reconstituido en PBS a una concentración de 5 mg/ml y almacenado a -20 °C. Utilizado a una concentración de 200 µg/ml.
- **Cristales de aluminio o alúmina** (Invivogen). Sulfato potásico de aluminio. Utilizado como activador del inflamasoma NLRP3. Reconstituido en PBS a una concentración de 20 mg/ml y almacenado a -20 °C. Utilizado a una concentración de 150 µg/ml.
- **Flagelina de *Salmonella typhimurium*** (Sigma-Aldrich) Proteína globular que forma los filamentos de los flagelos de las bacterias. Utilizada como activador del inflamasoma NLRC4. Reconstituido en H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub> estéril a una concentración de 100 µg/ml y almacenado a -20 °C. Utilizado a una relación de 100 ng/500.000 células.
- **Ácido palmítico** (Sigma-Aldrich). Se preparó nuevo para cada uso en NaOH 0,01 N a una concentración de 20 mM. Utilizado a una concentración de 300 µM.
- **Albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos y endotoxinas** (Sigma-Aldrich). Se resuspendió en PBS a una concentración de 3 mM (20 % p/v) y se almacenó a 4 °C. Utilizado a una concentración de 150 µM u 88,2 µM para complejar el ácido palmítico, según se indique.
- **Colesterol soluble en agua (MCD-CHL)** (Sigma-Aldrich). Contiene aproximadamente 40 mg de colesterol por gramo de producto, y se encuentra formando complejos con metil-β-ciclodextrina para aumentar su solubilidad. Se preparó nuevo para cada uso en el medio de estímulo a una concentración de 5 mg/ml. Utilizado a 100 µg/ml.
- **Inhibidor SB203582** (Calbiochem). Inhibidor selectivo de la MAPK p38. Reconstituido a 10 mM en DMSO y almacenado a -20 °C. Utilizado a 10 µM.
- **Inhibidor PD98059** (Sigma-Aldrich). Inhibidor específico de MAPKK (MKK/MEK), y como consecuencia inhibe la fosforilación de Erk1/2. Reconstituido a 50 mM en DMSO y almacenado a -20 °C. Utilizado a 10 µM.

- **Inhibidor SP600125** (Sigma-Aldrich). Inhibidor selectivo de JNK. Reconstituido a 10 mM en DMSO y almacenado a - 20 °C. Utilizado a 10 µM.
- **Inhibidor IV de caspasa-1 Ac-YVAD-AOM** (Calbiochem). Inhibidor selectivo de caspasa-1. Reconstituido a 20 mM en DMSO y almacenado a - 20 °C. Utilizado a 10 µM.
- **Inhibidor Z-VAD-FMK** (APEXBio). Inhibidor general de caspasas. Reconstituido a 20 mM en DMSO y almacenado a - 20 °C. Utilizado a 10 µM.
- **NAC (N-acetil-L-cisteína)** (Sigma-Aldrich). Antioxidante, inhibe la producción de ROS. Reconstituido a 1 M en DMSO y almacenado a - 20 °C. Utilizado a 2,5 mM.

## 1.2 TAMPONES Y SOLUCIONES

- Medios con distintas concentraciones de K<sup>+</sup>. Se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Composición de los medios con distintas concentraciones de K<sup>+</sup>

COMPUESTO	SOLUCIÓN 1	SOLUCIÓN 2
NaCl	114,87 mM	-----
KCl	-----	114,87 mM
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,81 mM	0,81 mM
NaHCO <sub>3</sub>	44,01 mM	44,01 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0,906 mM	0,906 mM
Glucosa	5,55 mM	5,55 mM
Piruvato sódico	1 mM	1 mM
FeCl <sub>3</sub> *6H <sub>2</sub> O o Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> *9H <sub>2</sub> O	2,47*10 <sup>-4</sup> mM	2,47*10 <sup>-4</sup> mM
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	1,80 mM	1,80 mM

Una vez preparadas las disoluciones, hay que burbujear con CO<sub>2</sub> para añadir el CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O. Finalmente, se ajusta el pH de cada una de las soluciones a 7,3.

Los medios con las distintas concentraciones de potasio se consiguieron mezclando los volúmenes adecuados de cada una de las dos soluciones anteriores.

- Tampón fosfato salino (PBS)

136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Se ajusta a pH 7,4.

- Tampón fosfato salino con Tween-20 (PBS-Tween-20)

PBS, 0,01% Tween-20 (v/v).

- Tampón de lisis celular

50 mM Tris-HCl a pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM sodio β-glicerol fosfato, 270 mM sacarosa, 0,1% β-mercaptoetanol. En el momento de la lisis se añade: 0,1 mM PMSF, PIC 1X, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF.

- Tampón de lisis de membrana

10 mM Tris-HCl a pH 7,5, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA, 100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
En el momento de la lisis se añade: 1 mM PMSF, PIC 1X, 0,5 mM DTT.

- Tampón de lisis nuclear

20 mM HEPES a pH 7,9, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25% glicerol (v/v). En el momento de la lisis se añade: 1 mM PMSF, PIC 1X.

- Tampón A para la obtención de oligómeros de ASC

10 mM Tris-HCl a pH 7,5, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EGTA, 100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>.  
En el momento de la lisis se añade: 1 mM PMSF, PIC 1X.

- Tampón CHAPS para la obtención de oligómeros de ASC

20 mM HEPES-KOH a pH 7,9, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM EGTA, 0,1 % CHAPS (p/v).  
En el momento de la lisis se añade: 1 mM PMSF, PIC 1X.

- Tampón de electroforesis de geles de acrilamida

25 mM Tris-base, 0,2 M glicina, 1 g/L SDS.

- Tampón de transferencia

25 mM Tris-base, 0,2 M glicina, 20 % metanol (v/v).

- Tampón de carga o Tampón de Laemmli (5X)

156 mM Tris, 50% glicerol (v/v), 10% SDS (p/v), 20% β-mercaptoetanol (v/v), 0,002% azul de bromofenol (p/v). Se ajusta a pH 6,8.

- Tampón de electroforesis para geles de agarosa (TAE 1X) (Tris-acetato-EDTA)

40 mM Tris-base, 0,1 % ácido acético glacial (v/v), 1 mM EDTA. Se ajusta a pH 8,8.

- Tampón de digestión (para extraer ADN genómico de cola de ratón)

100 mM Tris a pH 8,0, 5 mM EDTA a pH 8,0, 200 mM NaCl, 0,2 % SDS (p/v), 12,5 mg/ml Proteinasa K.

- Gelvatol

9,6% Polivinil-alcohol (p/v), 24% glicerol (v/v), 2,5% DABCO (p/v).

- Solución extracelular normal divalente reducida (RD-NES) (Para microscopía *in vivo*)

10 mM HEPES a pH 7,3, 149 mM NaCl, 0,8 mM KCl, 0,6 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,08 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glucose. Se ajusta a pH 7,3 con KOH.

- Solución estándar interna para experimentos de electrofisiología (*patch-clamp*)

125 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 5 mM MgATP, 10 mM HEPES. Se ajusta a pH 7,2 con KOH.

- Solución estándar externa para experimentos de electrofisiología (*patch-clamp*)

141 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucosa, 10 mM HEPES. Se ajusta a pH 7,4 con NaOH.

- Solución externa de N-metil-D-glucamida (NMDG<sup>+</sup>) para electrofisiología (*patch-clamp*)

140 mM NMDG, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucosa, 10 mM HEPES. Se ajusta a pH 7,4 con HCl.

## **2 MÉTODOS EXPERIMENTALES**

### **2.1 MEDIOS DE CULTIVO CELULARES**

- Medio de cultivo de células RAW 264.7:

Medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de FBS previamente inactivado (20 min a 56 °C), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (DMEM suplementado). La estimulación celular se hace en medio libre de suero para suprimir la posible activación basal que éste pudiera producir.

- Medio condicionado de cultivo de macrófagos murinos derivados de médula ósea (BMDM):

Medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FBS previamente inactivado (20 min a 56 °C), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina y 10 % de medio condicionado para macrófagos (sobrenadante de L929).

- Medio de cultivo de BMDM:

Medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FBS previamente inactivado (20 min a 56 °C), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. La activación celular se hace en medio libre de suero para suprimir la posible activación basal que éste pudiera producir.

- Medio de cultivo de fibroblastos L929:

Medio RPMI 1640 suplementado con 10 % (v/v) de FBS previamente inactivado (20 min a 56° C), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

- Medio de cultivo de macrófagos peritoneales murinos:

Medio RPMI 1640 suplementado con 10 % (v/v) de FBS previamente inactivado (20 min a 56° C) y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

- Medio de cultivo de macrófagos humanos:

Medio RPMI suplementado con 5% (v/v) de suero humano procedente de una mezcla de donantes sanos previamente inactivado (20 min a 56 °C) y 40 µg/ml de gentamicina. La activación celular se hace en medio libre de suero para suprimir la posible activación basal que éste produce.

## 2.2 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

En este trabajo se ha utilizado la línea celular macrofágica RAW 264.7, obtenida de la ATCC. Esta línea celular tiene características macrofágicas y proviene de la ascitis de un tumor inducido por la inyección intraperitoneal del virus Abelson de leucemia murina.

El cultivo de estas células se llevó a cabo en incubadores a 37 °C, en atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO<sub>2</sub>, siguiendo las pautas establecidas por la ATCC, teniendo especial importancia la utilización de las células entre los pases 1-10, para que en los experimentos donde se utilice transfección, la eficiencia sea máxima.

## 2.3 ANIMALES

Los ratones C57BL/6J *wildtype* (*wt*) y *Lpin2*<sup>-/-</sup> se adquirieron del *Toronto Centre for Phenogenomics*. Estos animales se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid en condiciones constantes de temperatura (20-24° C), con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y fueron alimentados *ad libitum* con dieta de piensos especial para animales de laboratorio y con libre acceso a agua estéril (Consejo de Comunidades Europeas, 1986). Los protocolos del estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, y todos los experimentos fueron realizados siguiendo la normativa 86/609/ECC de la Comunidad Europea y la legislación española que regula la investigación animal (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005), vigentes para el uso y cuidado de animales de experimentación.

En este estudio también se han utilizado macrófagos de médula ósea procedentes de fémures y tibias de animales C57BL/6J *wt*, *Nalp3<sup>-/-</sup>*, *Pycard<sup>+/-</sup>* y *Casp1<sup>-/-</sup>*, amablemente cedidos por el Dr. Pelegrín (Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca).

#### Genotipado de los ratones

Para extraer el ADN genómico de los ratones C57BL/6J *wt* y *Lpin2<sup>-/-</sup>* se incubaron 0,5-1 cm de cola de ratón de 3 semanas de edad en el tampón de digestión a 55 °C durante 16 h. A las muestras digeridas, se les añadieron 250 µl de NaCl 5 M, se agitaron, se mantuvieron 10 min en hielo y se centrifugaron durante 10 min a 16000 x g. Posteriormente se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo, se añadió 1 mL de etanol 96 ° y se centrifugó durante 5 min a 16000 x g. Una vez precipitado el ADN, se retiró el etanol, se dejó secar el pellet y se resuspendió en H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub> para su posterior cuantificación mediante espectroscopía en *Nanodrop* ND-1000 (Thermo Fisher *Scientific*).

Para determinar el genotipo de los animales, se amplificaron 10 ng del ADN obtenido de la cola de los ratones mediante PCR (245). Se empleó la enzima *BIOTOOLS DNA Polymerase* (BioTools), una variante genéticamente modificada de la enzima homónima de *Thermus sp.*, expresada en *E. coli*, y una mezcla equimolar de los cuatro dNTPs (BioTools). El termociclador usado fue un *Mastercycler Personal* (Eppendorf).

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, como se muestra en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Reacción de PCR convencional para el genotipado de ratones

Reactivo	Volumen
H <sub>2</sub> O <sub>mq</sub> estéril	Hasta 50 µl
ADN molde	10 ng
Tampón 10X con MgCl <sub>2</sub> para ADN polimerasa	5 µl
dNTPs (25 mM cada uno)	0,2 µl
Oligonucleótido 1 dir (10 µM)	0,8 µl
Oligonucleótido 2 rev (10 µM)	0,8 µl
Oligonucleótido 3 dir (10 µM)	1,5 µl
Oligonucleótido 4 rev (10 µM)	1,5 µl
ADN polimerasa (1 U/µl)	1 µl

\*Las secuencias de oligonucleótidos se muestran en la **Tabla 5**



**Tabla 5.** Oligonucleótidos usados en PCR convencional para el genotipado de ratones *wt* y *Lpin2*<sup>-/-</sup>. Adquiridos en MWG Biotech.

<i>Lpin2</i> dir (Oligonucleótido 1)	5'-GCAGTTGTATATTGGTGGTGAGCTG-3'	Set 1: 490 pb
<i>Lpin2</i> rev (Oligonucleótido 2)	5'-AGCTGAGCATTACAAGGACTGACAC-3'	
<i>TCP-Lac</i> dir (Oligonucleótido 3)	5'-CCATTACCAGTTGGTCTGGTGTC-3'	Set 2: 618 pb
<i>Lpin2</i> rev (Oligonucleótido 4)	5'-GTGGATGTCCTCCAGTGTTTG-3'	

El programa de temperaturas usado para la amplificación del ADN fue el siguiente:

1. 95 °C 3 min (Desnaturalización inicial)
2. 38 ciclos (Amplificación)
  - 95 °C 15 s Desnaturalización
  - 60 °C 17 s Anillamiento \*
  - 72 °C 45 s Extensión \*\*
3. 72 °C 1 min (Extensión final)
4. 4 °C indefinidamente

\*La temperatura óptima se determinó según la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos calculada empíricamente.

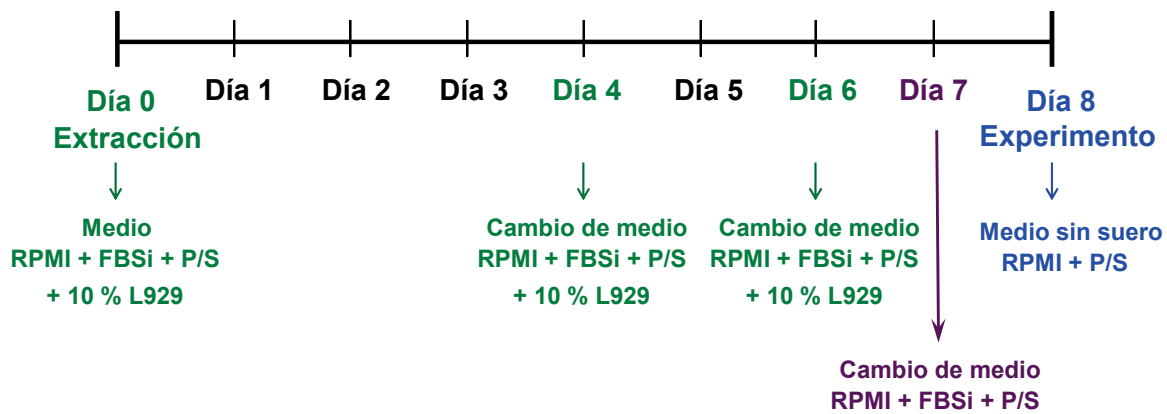
\*\*El tiempo de extensión se fijó en función del tamaño del fragmento esperado (1min/kilobase).

Para visualizar los fragmentos de ADN amplificados se utilizaron geles de agarosa al 3 % (p/v) en tampón TAE 1X, con *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) al 1X. Las muestras se mezclaron con el tampón de carga (*DNA loading Dye 6X*, Thermo Fisher Scientific) y se corrió en paralelo un patrón de marcadores de tamaño molecular conocido (*GeneRuler DNA ladder Mix*, Thermo Fisher Scientific). La presencia de *GelRed™* en el gel nos permitió visualizar las bandas de ADN bajo la luz ultravioleta en un transiluminador (GelDoc XR, Bio-Rad). Los animales *wt*, heterocigotos y homocigotos recesivos se pudieron diferenciar por las bandas obtenidas tras la amplificación. La banda de 490 pares de bases amplificada con el primer juego de oligonucleótidos está presente en los animales *wt* y en los heterocigotos, pero está ausente en los homocigotos recesivos. La banda de 618 pares de bases amplificada con el segundo juego de oligonucleótidos está presente en los animales heterocigotos y homocigotos recesivos, pero está ausente en los *wt*.

## 2.4 OBTENCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN.

Los ratones fueron sacrificados con dióxido de carbono y posterior dislocación cervical. Para obtener los macrófagos de la médula ósea, se extrajeron los fémures y tibias de los ratones liberándolos de la musculatura, y se liberaron las células de la médula ósea con una

jeringa con PBS. Para disminuir la variabilidad entre ratones, se recogieron varias médulas óseas en una misma placa; posteriormente se disgregaron las células hasta conseguir una suspensión homogénea que se filtró con filtros de Nylon® de 100 µm (BD Falcon 352360). Las células se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos y se resuspendieron en medio condicionado de cultivo de BMDM (Ver apartado 2.1). Una vez sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos (a razón de dos placas por ratón), se mantuvieron a 37° C en atmósfera saturada de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Al cuarto día, ya se observaba un cambio de la morfología celular y un aumento de la adhesión a la superficie de la placa debido a la diferenciación de los precursores de la médula ósea hacia la línea macrofágica. A día 4 y a día 6 se cambió el medio a las células por medio condicionado de cultivo de BMDM nuevo. A día 7 se cambió a medio de cultivo de BMDM sin medio condicionado y el día 8 se realizaron los experimentos.



#### Obtención del medio condicionado (sobrenadante de L929)

L929 (obtenidas del Centro de Investigaciones Biomédicas, Madrid) es una línea celular de fibroblastos de ratón que produce y libera al medio de cultivo las citoquinas necesarias para la diferenciación de BMDM (ver composición en (246)). Estas células producen principalmente gran cantidad de M-CSF (del inglés, *macrophage colony-stimulating factor*), que es el único factor de crecimiento capaz de estimular la proliferación y diferenciación de los macrófagos. Para conseguir este medio, se sembraron 500.000 células L929 en *flasks* de 75 cm<sup>2</sup> y se cultivaron en 20 ml de medio de cultivo de L929 (Ver apartado 2.1). El sobrenadante se recogió al cabo de 7-10 días, se centrifugó a 300 x g para eliminar las células en suspensión, se filtró y se mantuvo a -20 °C hasta el momento de su utilización.

## 2.5 OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN

Los ratones fueron sacrificados con dióxido de carbono y posterior dislocación cervical. Con la ayuda de tijeras y pinzas se abrió la piel abdominal con cuidado de no romper la capa serosa que rodea la cavidad abdominal. A continuación, se inyectaron en la cavidad abdominal 5 ml de PBS frío con una jeringuilla con aguja de tamaño 25G y, tras agitación suave, se recogió el líquido intraperitoneal. Las células extraídas se centrifugaron a 290 x g durante 10 min y se plaquearon 500.000 células/placa de 35 mm con cristales de *patch-clamp* (cubreobjetos de 12 mm de diámetro) previamente tratados con poli-L-lisina (0,01 mg/ml, 30 min). Las células se mantuvieron en medio de macrófagos peritoneales (Ver apartado 2.1), a 37° C en atmósfera saturada de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> durante 16 h, para permitir la adherencia de los macrófagos y enriquecerlos por sucesivos lavados con PBS. Posteriormente, se procedió a la realización de los análisis de *patch-clamp*.

## 2.6 INDUCCIÓN DE SHOCK SÉPTICO EN RATÓN

A los ratones C57BL/6J *wt* y *Lpin2<sup>-/-</sup>* se les indujo shock séptico mediante una inyección intraperitoneal de LPS 10 mg/kg disuelto en PBS estéril durante 3 h. A los ratones control se les inyectó solamente PBS. A las 3 h de tratamiento se les extrajo sangre para la obtención de suero (como se explica a continuación) y, posteriormente, los animales fueron sacrificados. Tras el sacrificio, se recogieron muestras de hígado y bazo, sumergiéndolas inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C. A las 24 h se realizó la extracción de ARN de los tejidos.

### *Extracción de suero de sangre de ratón*

Para analizar los niveles de citoquinas en suero de ratones a los que se les había administrado LPS (10 mg/kg) o PBS, se les extrajo sangre del seno venoso mandibular a las 3 h de tratamiento. Se recogieron aproximadamente 100 µl de sangre por ratón en tubos *ependorf*, mediante pinchazo con aguja del 25G en el seno venoso mandibular.

También se extrajo suero de corazón. Para ello, los ratones se anestesiaron con una mezcla de 100 mg/kg de ketamina (Merial) y 5 mg/kg de xilacina (Bayer) comprobando, mediante presión en las almohadillas de las patas posteriores, que el animal había llegado al plano quirúrgico de anestesia. Se buscó el latido del corazón y se realizó una punción cardiaca con una jeringa de 1 ml con aguja de 25G, ligeramente llena de aire. Una vez la sangre comenzó a borbotear, se recolectó en la aguja tirando del émbolo. Al concluir la extracción de la sangre, se realizó al animal una dislocación cervical.

En ambos casos, para que la sangre coagulara y así obtener el suero, la sangre se mantuvo en reposo durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 1500 x g durante 15 min a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes (suero) y se pasaron a tubos nuevos, almacenándose a -80 °C hasta su análisis.

## **2.7 OBTENCIÓN DE MONOCITOS Y MACRÓFAGOS HUMANOS**

Las células sanguíneas humanas se obtuvieron a partir de concentrados de paquetes globulares (*buffy coats*) de voluntarios sanos del grupo sanguíneo O, proporcionados por el Centro Regional de Hemodonación y Hemoterapia de Castilla y León.

El concentrado sanguíneo se diluyó en la proporción 1:1 (v/v) con PBS pH 7,4, y posteriormente se añadió sobre una solución de Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare) manteniendo la proporción de sangre-PBS/Ficoll-Paque 2:1 (v/v). Esta mezcla se centrifugó a 725 x g, sin freno, durante 30 min. Durante la centrifugación, se formaron varias fases: en la parte superior se situó la fase acuosa (plasma y PBS), un anillo de células mononucleares separa esta fase del Ficoll-Paque y en el fondo del tubo se situaron los eritrocitos y las células polimorfonucleares.

Las células mononucleares se recogieron mediante aspiración con pipeta Pasteur y, en caso de recoger glóbulos rojos, se realizó un choque osmótico añadiendo 1 volumen de NaCl 0,2% seguido de un volumen de NaCl 1,6 % para parar la reacción. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS mediante centrifugación a 450 x g, durante 10 min. Tras el recuento, se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 40 µg/ml de gentamicina, se distribuyeron 30 x 10<sup>6</sup> células en placas de cultivo de 10 cm<sup>2</sup> y se dejaron durante 2 h en el incubador para permitir la adherencia de los monocitos al plástico y su posterior separación de los linfocitos. Tras las 2 h, prácticamente la totalidad de los monocitos estaban adheridos a la placa y los linfocitos se pudieron eliminar mediante sucesivos lavados con PBS.

Para promover la diferenciación de los monocitos a macrófagos, las células se cultivaron durante 14 días en medio de cultivo de macrófagos humanos (ver apartado 2.1), realizándose cambios de medio cada 2-3 días (247).

## 2.8 SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNA

Los siRNAs (ARN pequeño de interferencia, del inglés *small interfering RNA*) son moléculas de ARNdc con una longitud de 19-23 nucleótidos que se caracterizan por tener en los extremos 3' dos nucleótidos sobresalientes (no apareados). El proceso de interferencia es un proceso de regulación post-transcripcional altamente coordinado en el cual se produce la degradación específica del ARNm. El complejo enzimático encargado de generar estas moléculas específicas a partir de pequeñas moléculas de ARNdc se denomina DICER y pertenece a la familia de nucleasas específicas de ARNdc. Los siRNA son reconocidos por el complejo enzimático RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN, del inglés *RNA-induced silencing complex*) que cataliza el desenrollamiento de la molécula de ARN dúplex, la unión e interacción específica con el ARNm endógeno y la rotura específica del mismo. El ARNm resultante es reconocido en la célula como aberrante y es destruido por otras ribonucleasas. Por tanto, el silenciamiento génico por siRNA es una herramienta poderosa para eliminar específicamente la expresión de determinados genes y poder estudiar sus funciones celulares.

Para silenciar el gen de la lipina-2 murina en células RAW 264.7, se utilizaron *ON-TARGET plus SMART pool siRNAs* (GE Dharmacon, Thermo Fisher Scientific), que son una mezcla de 4 siRNAs dirigidos contra secuencias distintas del mismo gen y que permiten una mayor eficiencia de reducción de ARNm diana y una menor toxicidad que otras estrategias. Las secuencias de siRNA utilizadas fueron las siguientes:

Para el gen de la lipina-2 murina (L-059435-01-0005): CCUCAGAUUUCAUCGCUAU, GGUAAAGACUGGACGCAUC, GGAACAAUCAUCGUAUCA y CCAAGGACAGCUACGAUUA. Para comprobar la especificidad del silenciamiento en cada experimento se utilizaron una mezcla de siRNAs que no tienen genes diana en la célula (D-00810-01-05), referidos en los experimentos como siRNA negativo o control (GE Dharmacon, Thermo Fisher Scientific).

Para la introducción de las moléculas de siRNA se utilizó el reactivo *Lipofectamine™ RNAiMAX* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), un reactivo catiónico que forma liposomas permitiendo la entrada del ARN en el interior de la célula. En todos los experimentos se observó una reducción de la expresión génica de la lipina-2 del 50-70 %.

El día previo a la transfección se plaquearon 150.000 células por pocillo, en placas de 6 pocillos, para conseguir una confluencia de un 30-50 % a la hora de transfectar, siguiendo las instrucciones del fabricante. En el momento de la transfección se cambió el medio de cultivo por medio *Opti-MEM®*. Se diluyó la *Lipofectamine™ RNAiMAX* en medio *Opti-MEM®*

y pasados 5 min se mezclaron con una dilución del siRNA en medio *Opti-MEM*<sup>®</sup> para una concentración final de 20 nM de siRNA. Pasados 20 min se añadió la mezcla gota a gota al pocillo y a las 6 h se cambió este medio por medio de cultivo fresco. Las células se mantuvieron en condiciones normales de cultivo durante 48 h, momento en el cuál se procedió a estimular las células con los tratamientos correspondientes según el experimento. Se analizaron los niveles de la expresión del gen diana mediante *RT-q-PCR* 48 h después de la transfección.

Para el silenciamiento génico en los macrófagos humanos, se utilizaron *Silencer*<sup>®</sup> *Select siRNAs* (Ambion). Para el gen *LPIN2* (4392420) se utilizó la secuencia sentido GAAGUUGGGUGUAACGGATT y la secuencia antisentido UCCGUUAUCACCCAACUUCAT. También se utilizaron siRNAs negativos (4390847) como control del silenciamiento. En este caso, la transfección se realizó mediante nucleofección. Para ello, se trataron los macrófagos con tripsina durante 90 minutos para levantarlos de las placas de cultivo, se centrifugaron a 200 x g durante 10 minutos, y se lavaron con PBS para eliminar cualquier resto de tripsina. Después las células se resuspendieron en 100 µl de la solución de nucleofección específica para macrófagos humanos (*Nucleofector*<sup>™</sup> kit *for human macrophages*), se añadió el siRNA para tener una concentración final de 20 nM en el pocillo y se les aplicó el programa Y-010 del *Nucleofector* (Amaxa Biosystems). Posteriormente, los macrófagos humanos se resuspendieron en medio para macrófagos libre de suero suplementado con 5% de suero humano inactivado por calor a 56°C durante 20 minutos y se mantuvieron en cultivo durante 16 h. A las 16 h se cambiaron a medio de cultivo de macrófagos humanos (ver apartado 2.1), y a las 24 h siguientes ya se procedió a la activación de las células. En todos los experimentos se observó una reducción de la expresión génica de la lipina-2 de aproximadamente el 90 %.

## 2.9 TRANSFECCIÓN DE FLAGELINA PARA ACTIVAR INFLAMASOMA NLRC4

Para la introducción de la flagelina en células RAW 264.7 se utilizó el reactivo jetPRIME<sup>®</sup> (Polyplus-transfection S.A.), un reactivo catiónico capaz de formar liposomas para así permitir la entrada de la proteína en el interior de la célula. La transfección de flagelina en RAW 264.7 se realizó en células que habían sido cultivadas en placas de 6 pocillos (35 mm), partiendo de 150.000 células/pocillo. Estas células habían sido silenciadas para reducir la expresión de la lipina-2, activadas con LPS y finalmente se transfectaron para introducir la flagelina. Para realizar este último paso, se diluyeron 100 ng de flagelina en 100 µl de jetPRIME<sup>®</sup> *buffer*, y posteriormente se añadieron 2 µl de jetPRIME<sup>®</sup> *reagent*. Una vez mezclados todos los productos, se agitó en un agitador tipo Vortex durante 10 s, se centrifugó durante 10 s y se incubó la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se añadió la

mezcla gota a gota al pocillo que contenía 800 µl de medio de cultivo sin antibiótico, y se incubaron en las condiciones de cultivo adecuadas durante 16 h. Transcurrido el tiempo de estímulo, se recogieron los sobrenadantes para su posterior análisis mediante ELISA.

## 2.10 MARCAJES INMUNOFLUORESCENTES

Las células RAW 264.7 fueron sembradas en cristales y transfectadas con siRNA control o siRNA frente a la lipina-2. Se estimularon y posteriormente se lavaron 2 veces con PBS. A continuación se fijaron con paraformaldehído al 4 % con 3 % de sacarosa durante 20 min. Las células se permeabilizaron con una solución de 0,1 % de Triton X-100 durante 2 min. Se lavaron 3 veces con PBS y se utilizó una solución de bloqueo (BSA al 0,5 % (p/v), 50 mM de glicina y suero de cabra al 4 % (v/v) en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente, para reducir la unión inespecífica de los anticuerpos. A continuación, se incubaron las células con el anticuerpo primario diluido en una solución de BSA al 0,1 % (p/v) en PBS durante 1 h. Se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en una solución de BSA al 0,1 % (p/v) en PBS durante 1 h. Se lavaron 3 veces con PBS y se utilizó 1 µg/ml de DAPI para marcar los núcleos. Se lavaron 3 veces con PBS y se montaron los cubres en los portas con Gelvatol.

Los anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia se resumen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Listado de anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Origen	Antígeno	Dilución	Conjugado
Anti-ASC	Conejo (policlonal)	ASC	1:50 IF	N/C
Anti-p65	Conejo (policlonal)	p65	1:50 IF	N/C
Alexa-Fluor anti-IgG de conejo	Cabra	Fc de conejo	1:250 IF	Alexa 488

IF: Inmunofluorescencia; N/C: no conjugado.

Para analizar la fluorescencia por microscopía confocal se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5X con láser supercontinuo de luz blanca que se ajusta libremente desde 470 nm a 670 nm. Para monitorizar la fluorescencia del DAPI (azul) se usó un láser de Diodo azul de 405 nm y se recogió la fluorescencia entre 439 y 475 nm. Para monitorizar la fluorescencia del Alexa Fluor 488 (verde) se usó la línea del láser blanco *Supercontinuum* visible a 485 nm, y se recogió la fluorescencia entre 508 y 545 nm.

## **2.11 OBTENCIÓN DE HOMOGENEIZADOS PROTEICOS E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS**

### **2.11.1 Obtención de homogeneizados celulares**

Los homogeneizados celulares se obtuvieron utilizando el tampón de lisis celular descrito en el apartado 1.2. Las células se lavaron con PBS frío (4 °C), se recogieron mediante raspado en el tampón de lisis celular y se incubaron en hielo durante 20 min. Posteriormente, el lisado celular se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 12000 x g y el sobrenadante obtenido se preservó a -20 °C hasta su posterior uso.

### **2.11.2 Obtención de extractos citoplasmáticos y nucleares**

Las células se resuspendieron en el tampón de lisis de membrana plasmática descrito, que al ser hipotónico permite que las células se hinchen y se rompan liberando los núcleos. Se incubaron a 4 °C durante 15 min, se añadió NP-40 al 0,05% (v/v) y se mezclaron vigorosamente durante 10 s para romper la membrana plasmática. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 800 x g durante 2 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante, conteniendo la fracción citoplasmática. El *pellet* resultante, correspondiente a la fracción nuclear, se lavó dos veces con el tampón de lisis usado anteriormente. Se resuspendió en el tampón hipertónico de lisis nuclear, se mezcló vigorosamente durante 10 s y se incubó a 4 °C durante 30 min en agitación. Por último, se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se recogió el sobrenadante, conteniendo la fracción nuclear. Ambos extractos, citoplasmático y nuclear, se conservaron -20 °C hasta su uso posterior.

### **2.11.3 Obtención de sobrenadantes para la detección de citoquinas mediante ELISA y para la concentración de proteínas que se encuentran en ellos.**

Los sobrenadantes celulares procedentes de células cultivadas en las condiciones experimentales requeridas, se centrifugaron a 300 x g durante 8 min a 4 °C para eliminar los restos celulares de la muestra. Los sobrenadantes obtenidos se guardaron a -80 °C hasta su posterior análisis mediante ensayo ELISA o se utilizaron para concentrar las proteínas que en ellos se encontrarán.

Para esta segunda finalidad, las proteínas de los sobrenadantes libres de células obtenidos tras la centrifugación anterior se concentraron mediante centrifugación a 12000 x g durante 30 min a 4 °C a través de una columna con un filtro de tamaño de poro de 10 kDa (Microcon®-10; Merk-Millipore). Se comprobó que todos los sobrenadantes estuvieran libres



de ADN genómico mediante absorbancia a 260 nm y amplificación por PCR. Las proteínas concentradas se analizaron posteriormente mediante *immunoblot*.

#### 2.11.4 **Obtención de oligómeros de ASC**

Para analizar la formación de oligómeros de ASC se siguió el método utilizado por Chuang *et al.* (248) con ligeras modificaciones.

Las células se recogieron en el tampón A descrito en el apartado 1.2 y se lisaron mediante 30 pases a través de una jeringa con aguja de tamaño 21G. Los lisados celulares se centrifugaron a 5200 x g durante 8 min a 4 °C, quedando en los sobrenadantes la proteína celular total. Una parte del homogeneizado celular (15 µl) se almacenó a - 20 °C para su posterior análisis y el resto fue procesado para obtener los oligómeros de ASC. Para ello, los sobrenadantes obtenidos se diluyeron con un volumen de tampón CHAPS y se incubaron durante 20 min en hielo. Tras la incubación en frío, se centrifugaron las muestras a 4000 x g durante 8 min y los *pellets* se resuspendieron en tampón CHAPS. Se añadió suberato de disuccinimidilo (DSS) (Thermo Fisher Scientific) 2 mM sobre las muestras y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, para que la unión de los oligómeros de ASC a través de puentes químicos tuviera lugar. Finalmente, se centrifugaron a 4000 x g durante 8 min y los *pellet* obtenidos, que es donde se encuentran los oligómeros formados, se resuspendieron en tampón CHAPS. Para que el posterior análisis mediante *immunoblot* no afectara a la unión de los oligómeros, las muestras se diluyeron en tampón de *Laemmli* sin β-mercaptoetanol.

#### 2.11.5 **Valoración de la concentración de proteína**

La concentración de las muestras proteicas se determinó mediante el método de *Bradford* (249), basado en el cambio del máximo de absorción de 465 a 595 nm tras la unión específica, en medio ácido, del colorante Azul Brillante Coomassie G-250 a las proteínas. Para ello, se realizó una dilución acuosa de la solución proteica a medir, manteniendo un volumen final de 800 µl. A continuación se añadieron 200 µl de reactivo *Bradford (Protein Assay Dye Reagent concentrate, Bio-Rad Laboratories)* y, tras mezclar bien y dejar reposar durante 5-15 minutos, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro *BioPhotometer Plus* (Eppendorf).

La concentración de proteína se determinó empleando una recta patrón elaborada a partir de concentraciones de BSA conocidas, utilizando la Ley de Lambert-Beer.

### **2.11.6 Electroforesis desnaturalizante y electrotransferencia de proteínas**

Para realizar el análisis de los niveles de expresión de proteínas, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (250), según el cual las proteínas se separan principalmente en función de su tamaño. El dodecilsulfato sódico (SDS) es un detergente iónico que disocia las proteínas oligoméricas en sus monómeros y rompe los enlaces de hidrógeno e hidrófobos entre los polipéptidos. El SDS desnaturaliza la estructura tridimensional de las proteínas y por su fijación uniforme les confiere una carga negativa proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica. Además, este sistema es discontinuo y se basa en la utilización de dos geles contiguos que presentan distintas características de porosidad, pH y fuerza iónica: un gel separador, situado en la parte inferior, y un gel concentrador, situado en la parte superior. Esta discontinuidad es la que permite la reducción del volumen de las muestras incorporadas al gel concentrador, favoreciendo la resolución de las bandas de proteína en el gel separador de acuerdo a su tamaño molecular.

Para llevar a cabo esta electroforesis, las muestras se redujeron y desnaturalizaron en tampón de carga a 100 °C durante 5 min. Las electroforesis se realizaron en cubetas *MiniProtean™* (Bio-Rad *laboratories*) utilizando geles separadores de 10, 12 y 15 % de acrilamida-bis-acrilamida (37,5:1) al 30% (Bio-Rad *laboratories*) según el peso molecular de las proteínas de interés, y tampón de electroforesis durante 90 min aplicando un voltaje constante de 120 V. En paralelo a las muestras, se corrieron estándares preteñidos de diferentes tamaños moleculares (Bio-Rad *laboratories*).

La transferencia de proteínas desde el gel de poli(acrilamida) a una membrana recibe el nombre de *Western blot* (251), y se llevó a cabo siguiendo el siguiente protocolo:

En primer lugar se equilibró el gel a transferir en el tampón de transferencia durante 5 min a temperatura ambiente. Después, se cortaron dos láminas de papel *Whatman™* 17 Chr (0,92 mm) y una membrana de transferencia *Inmobilon-P®* de difluoruro de polivinilo (PVDF) (Millipore). Las hojas de papel *Whatman* se empaparon en el tampón de transferencia y la membrana de PVDF (extremadamente hidrofóbica) se inactivó en metanol durante 1 min, tras lo cual se equilibró en tampón de transferencia. Finalmente, se transfirieron las proteínas del gel a la membrana en un sistema de transferencia semi-seca rápida *Pierce G2 Fast Blotter* (Thermo Scientific). Para ello se usó el tampón de transferencia Tris-glicina durante 10-20 min (en función del grosor del gel y del tamaño de la proteína) y se aplicó un amperaje constante de 1.3 A.

### 2.11.7 Inmunodetección de proteínas (immunoblot)

La detección inmunológica de proteínas inmovilizadas requiere la separación electroforética de las proteínas y su posterior transferencia a una membrana. Una vez en este soporte, las proteínas son expuestas a la unión de anticuerpos específicos para una determinada secuencia de aminoácidos (los denominados epitopos antigénicos). El protocolo utilizado fue el siguiente:

Con el objeto de bloquear los sitios activos de la membrana que no habían sido ocupados por proteína, la membrana se incubó con una solución de bloqueo compuesta por 5 % (p/v) de leche deslipidada o 5 % de BSA (p/v) en PBS, según la solución en la que se hiciese la dilución del anticuerpo primario. La incubación se realizó en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. A continuación se realizaron dos lavados de 10 min con PBS a temperatura ambiente. Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en una solución compuesta por 5 % de leche deslipidada (p/v) o por 5 % de BSA (p/v) en PBS Tween-20 0,1 % (v/v), en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, según la recomendación de la casa comercial. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario no adherido, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS Tween-20 0,1 % (v/v). A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en una solución compuesta por 0,5 % de leche deslipidada (p/v) o por 0,5 % de BSA (p/v) en PBS Tween-20 al 0,1 % (v/v), según la solución en la que se hubiese diluido el anticuerpo primario. La incubación se realizó en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, el exceso de anticuerpo secundario no adherido se eliminó realizando tres lavados con PBS Tween-20 0,1 % (v/v)

En la Tabla 7 se muestra el listado de los anticuerpos utilizados y la dilución empleada.

Las membranas se incubaron con el reactivo *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific), que permite la detección quimioluminiscente de los anticuerpos conjugados con peroxidasa, y la señal de quimioluminiscencia que se origina se detectó mediante películas autorradiográficas *Fuji-Medical X-Ray Film* (Fujifilm). Para ello, se colocó la película en el *cassette* de revelado (GE *Healthcare*, Amersham, Biosciences), y en completa oscuridad, se expuso la película autorradiográfica durante el tiempo adecuado para cada experimento. Posteriormente se reveló la película en el sistema de revelado (Curix 60, AGFA) y se digitalizaron mediante el escáner GS-800 *Calibrated Densitometer* (Bio-Rad). La densitometría cuantitativa de las bandas se realizó con el *software Quantity One v4.5.2* (Bio-Rad *Laboratories*), refiriendo la densidad de la banda correspondiente a la proteína de interés con la densidad de la banda correspondiente a una proteína constitutiva de referencia, siendo

ésta la  $\beta$ -actina (homogeneizados totales y extractos citoplasmáticos) o la proteína de la matriz nuclear p84 (extractos nucleares). Los datos de las gráficas se representaron como la media  $\pm$  desviación estándar de la expresión relativa de proteína.

**Tabla 7.** Listado de anticuerpos utilizados en Western Blot.

Anticuerpo	Origen	Antígeno	Dilución	Conjugado
Anti-IL-1 $\beta$	Ratón (monoclonal)	IL-1 $\beta$	1:1000 WB 1% BSA	N/C
Anti-caspasa-1	Conejo (policlonal)	Caspasa-1 p10 humana	1:250 WB 1% BSA	N/C
Anti-caspasa-1	Conejo (policlonal)	Caspasa-1 p10 murina	1:250 WB 1% BSA	N/C
Anti-ASC	Conejo (policlonal)	ASC	1:250 WB 1% BSA	N/C
Anti-I $\kappa$ B- $\alpha$	Conejo (monoclonal)	I $\kappa$ B- $\alpha$	1:1000 WB 5% BSA	N/C
Anti-fosfo-p105	Conejo (monoclonal)	p105 fosforilado	1:1000 WB 5% BSA	N/C
Anti-p50	Conejo (policlonal)	p50	1:500 WB 5% BSA	N/C
Anti-p65	Conejo (monoclonal)	p65	1:1000 WB 5% BSA	N/C
Anti-fosfo-p38	Conejo (monoclonal)	p38 fosforilado	1:1000 WB 5% BSA	N/C
Anti-p38	Conejo (policlonal)	p38	1:1000 WB 5% BSA	N/C
Anti-fosfo-p44/42	Conejo (policlonal)	p44/42 fosforilado	1:1000 WB 5% BSA	N/C
Anti-p44/42	Conejo (monoclonal)	p44/42	1:1000 WB 5% BSA	N/C
Anti-fosfo-SAPK/JNK	Conejo (monoclonal)	SAPK/JNK fosforilado	1:1000 WB 5% BSA	N/C
Anti-SAPK/JNK	Conejo (policlonal)	SAPK/JNK	1:1000 WB 5% BSA	N/C
Anti- $\beta$ -actina (clon AC-15)	Ratón (monoclonal)	$\beta$ -actina	1:20000 WB 0,5% leche	N/C
Anti-proteína de la matriz nuclear p84	Ratón (monoclonal)	p84	1:10000 WB 5% leche	N/C
Anti-IgG de conejo	Burro	Fc de conejo	1:5000 WB	HRP
Anti-IgG de ratón	Burro	Fc de ratón	1:5000 WB	HRP

WB: Western Blot; N/C: no conjugado; HRP: Peroxidasa de rábano.

## 2.12 MEDICIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE ELISA (ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS)

El ELISA (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*) es una técnica inmunoenzimática que se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante la unión a anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto puede cuantificarse mediante espectrofotometría.

En el presente trabajo se ha utilizado esta técnica para la detección de IL-1 $\beta$ , IL-18 y TNF- $\alpha$ , tanto en sobrenadantes de células como en sueros procedentes de ratones, obtenidos tal y como se indica en los apartados 2.11.3 y 2.6 respectivamente.

La cuantificación de las distintas citoquinas se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los anticuerpos específicos para la citoquina a detectar se pegaron en un soporte sólido, sobre el que después se añadieron las muestras problema y estándares para que reaccionaran con esos anticuerpos. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo biotinilado específico del antígeno a detectar, pero con un epítipo distinto del que lleva el anticuerpo que se ha usado para tapizar el soporte, y se añadió la peroxidasa de rábano para su unión a la biotina. Tras cada incubación, se hicieron lavados para eliminar los antígenos y anticuerpos no unidos. Finalmente, para poder medir los niveles de la citoquina a detectar, se añadió un sustrato específico que reacciona con la peroxidasa de rábano, dando lugar a una reacción colorimétrica que se cuantificó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en el espectrofotómetro *VersaMax Tunable Microplate Reader* (Molecular Devices).

## 2.13 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ARNm

### 2.13.1 *Extracción de ARN*

La extracción del ARN total de las muestras de tejido hígado y bazo así como de los cultivos celulares se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol<sup>®</sup> (Ambion, Thermo Fisher Scientific), cuyo método se basa en la diferente solubilidad de los ácidos nucleicos y proteínas entre dos fases no miscibles. El reactivo TRIzol<sup>®</sup> está compuesto por una mezcla de fenol, en el que los ácidos nucleicos son insolubles, e isotiocianato de guanidina, que actúa como agente desnaturante de proteínas e inhibidor de proteasas a pH 4,5. Así, la integridad del ARN se mantiene durante la extracción.

El ARN se extrajo siguiendo las instrucciones de la casa comercial. De forma resumida, las muestras se resuspendieron en 1 ml de TRIzol<sup>®</sup> hasta conseguir una solución homogénea

(en el caso de tejidos, éstos se disgregaron con la ayuda de varillas de homogeneización y posterior pase por jeringas de 1 ml con aguja de 23G). Después, se añadieron 200 µl de cloroformo y, tras agitar vigorosamente, se dejaron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 x g, durante 15 min a 4 °C, separándose la fase acuosa, que contiene el ARN y la fase orgánica, con las proteínas y el ADN. Posteriormente, se añadieron 500 µl de isopropanol, se mezclaron y se dejaron 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron de nuevo a 12000 x g durante 10 min a 4 °C para precipitar el ARN. El precipitado se lavó con etanol al 70 % en agua estéril libre de nucleasas. Una vez lavado, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas. La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría en el *Nanodrop* ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), midiendo la absorbancia a la longitud de onda de 260 nm, donde los ácidos nucleicos tienen mayor absorbancia. La pureza de la muestra de ARN se evaluó mediante el ratio de absorbancia 260 nm/280 nm, aceptando como puras las muestras cuyo ratio 260/280 tenía valores cercanos a 2.

### **2.13.2 PCR transcriptasa reversa (RT-PCR)**

La PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) es una reacción donde una hebra de ARN es transcrita a ADN complementario (ADNc), usando una enzima llamada transcriptasa reversa. La síntesis de ADNc se llevó a cabo usando el *RETROscript® Kit Reverse Transcription for RT-PCR* (Ambion®, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 2 µg de ARN y 100 U de la enzima transcriptasa reversa M-MVL (M-MVL-RT) en presencia de 40 U de un inhibidor de ribonucleasas (*SUPERase-In™ RNase Inhibitor*), 0,5 mM de cada uno de los cuatro dNTP (BioTools) y 5 µM de decámeros producidos al azar (*random decamers*) como cebadores. El volumen total de la reacción fue de 20 µl. Previamente a la reacción, el ARN se desnaturalizó durante 3 min a 78 °C, después se realizó la transcripción durante 1 h a 43 °C y finalmente se inactivó la enzima durante 10 min a 92 °C.

### **2.13.3 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR)**

La PCR cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR), es un método muy sensible que permite simultáneamente amplificar y cuantificar de forma relativa y absoluta el producto de la reacción de amplificación del ADN durante el transcurso de la PCR. La cuantificación relativa se realizó determinando el ciclo umbral (*Ct, cycle threshold*), ciclo de la reacción de PCR en el que la amplificación comienza a ser exponencial.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *Lightcycler 480* (Roche) mezclando 40 ng de ADNc, obtenido como se indica en el apartado anterior, y la mezcla comercial *KAPA SYBR Master mix qPCR* (Roche), que contiene *SYBR Green I*, Taq polimerasa, dNTPs y un tampón de reacción. La realización de una curva de disociación al final de cada PCR permitió detectar la presencia del producto amplificado y la especificidad de los oligonucleótidos utilizados.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l, como se indica en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Reacción para hacer RT-q-PCR

Reactivo	Volumen
H <sub>2</sub> O <sub>mq</sub> estéril	Hasta 20 $\mu$ l
ADNc molde	2 $\mu$ g
Oligonucleótido 1 dir (10 $\mu$ M)*	1 $\mu$ l
Oligonucleótido 2 rev (10 $\mu$ M)*	1 $\mu$ l
<i>KAPA SYBR Master mix qPCR</i> (2X)	10 $\mu$ l

\*Las secuencias de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 9 y en la Tabla 10

El programa de temperaturas usado para la amplificación del ADN fue el siguiente:

1. Preincubación o desnaturalización inicial 95 °C 3 min
2. Amplificación (40 ciclos)
  - 95 °C 15 s Desnaturalización
  - 60 °C 20 s Anillamiento \*
  - 72 °C 5 s Extensión \*\*
3. Curva de disociación (*melting curve*)
  - 95 °C 5 s
  - 65 °C 1 min
  - 97 °C 5 -10 adq/ °C
4. Enfriamiento 40 °C 10 s

\* Los oligonucleótidos para RT-q-PCR fueron diseñados para una temperatura óptima de anillamiento de 60 °C.

\*\*Dada la alta procesividad de la *KAPA SYBR DNA polimerasa*, 1 s a 71 °C es suficiente para amplificar amplicones de hasta 400 pares de bases.

Todas las reacciones se realizaron por triplicado y el análisis de cuantificación se realizó mediante el método  $\Delta\Delta Ct$  (252) comparando los valores de *Ct* de nuestro gen de interés con los valores de *Ct* de un gen constitutivo de referencia, en nuestro caso, *Ciclofilina B*, *Gapdh* o *ACTINA* según se indique. Los datos de las gráficas se representaron como la media  $\pm$  desviación estándar.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para cada gen estudiado, se muestran en la Tabla 9 y la Tabla 10.

**Tabla 9.** Oligonucleótidos de genes de ratón usados para RT-q-PCR. Adquiridos en MWG Biotech.

Gen Ratón	Oligonucleótido directo (5→3')	Oligonucleótido reverso (5→3')
<i>Lpin2</i>	AGTTGACCCCATCACCGTAG	CCCAAAGCATCAGACTTGGT
<i>Il1b</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>Il18</i>	CAAACCTTCCAAATCACTTCCT	TCCTTGAAGTTGACGCAAGA
<i>Nalp3</i>	ATCAACAGGCGAGACCTCTG	GTCCTCCTGGCATAACCATAG
<i>Casp1</i>	CTTGAGACATCCTGTCAGGG	AGTCACAAGACCAGGCATATTC
<i>Il1r1</i>	GTGCTACTGGGGCTCATTTG	GGAGTAAGAGGACACTTGCG
<i>Il6</i>	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>Tnfa</i>	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATCGGCTGACG
<i>Il12b</i>	TGGTTTGCCATCGTTTTGCTG	ACAGGTGAGGTTCACTGTTTCT
<i>Nos2 (iNOS)*</i>	CCAAGCCCTCACCTACTTCC	CTCTGAGGGCTGACACAAGG
<i>Il10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>P2x7r v1</i>	ACACCGTGCTTACAGGTGCTATG	GCAACAGCTGGGCAGAATG
<i>P2x7r v2</i>	TCAAAGGCCAAGAAGTTCCAGTA	TAGATCCGACCCCTCCTTCTG
<i>P2x7r v3</i>	AAGTCTGCAAGTTGTCAAAGG	TAGAGTCAGTCAAAGCATCTC
<i>P2x7r v4</i>	TTCCAACCTCCAGGAGAGTA	AAGCCTTCTCCTTCTTGGC
<i>P2x7r vk</i>	GCCCGTGAGCCACTTATGC	GGTCAGAAGAGCACTGTGC
<i>Ppib (Ciclofilina B)*</i>	TGGAGAGCACCAAGACAGAC	TGCCGGAGTCGACAATGAT
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

\* Nombre de la proteína para la que codifica el gen



**Tabla 10.** Oligonucleótidos de genes de humano usados para RT-q-PCR. Obtenidos de MWG Biotech

Gen Humano	Oligonucleótido directo (5→3')	Oligonucleótido reverso (5→3')
<i>LPIN2</i>	CCTCTCCTCAGACCAGATCG	GGAGAATCTGTCCCAAAGCA
<i>IL1B</i>	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTTCGTAGCTGGA
<i>IL18</i>	TCTTCATTGACCAAGGAAATCGG	TCCGGGGTGCATTATCTCTAC
<i>NALP3</i>	CCACAAGATCGTGAGAAAACCC	CGGTCCTATGTGCTCGTCA
<i>CASP1</i>	TTTCCGCAAGGTTTCGATTTTCA	GGCATCTGCGCTCTACCATC
<i>IL1R1</i>	ATGAAATTGATGTTTCGTCCCTGT	ACCACGCAATAGTAATGTCCTG
<i>IL6</i>	AAATTCGGTACATCCTCGACGG	GGAAGGTTTCAGGTTGTTTTCTGC
<i>TNFA</i>	ATGAGCACTGAAAGCATGATCC	GAGGGCTGATTAGAGAGAGGTC
<i>ACTINA</i>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

#### 2.14 ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ROS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para estudiar la producción de ROS celulares totales, las células RAW 264.7 se incubaron durante media hora en medio de cultivo sin suero con la sonda 2'7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFHDA) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 10  $\mu$ M, se estimularon sin cambiar el medio, se recogieron mediante raspado y se lavaron con PBS. Posteriormente, 5 min antes del análisis por citometría, se incubaron en oscuridad con 7-AAD (eBioscience), a una concentración de 0,25  $\mu$ g/10<sup>6</sup> células, para cuantificar la viabilidad celular. Finalmente, las células se analizaron en el citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter), adquiriendo la fluorescencia de 50.000 células por condición mediante el uso de un láser de argón azul (488 nm) para la excitación y detectando la fluorescencia a 505-545 nm (Canal FL-1, DCFHDA) y a 605-635 nm (Canal FL-3, 7-AAD). Los datos se analizaron con el *software Kaluza™* versión 1.1.

#### 2.15 ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-1

La activación de caspasa-1 se cuantificó por citometría de flujo utilizando una sonda fluorescente que se une a caspasa-1 activa (FAM-FLICA™ *in vitro* Caspase-1 Detection Kit,

ImmunoChemistry Technologies). Esta sonda se denomina FLICA™, y es realmente un inhibidor selectivo de caspasa-1, YVAD-FMK, unido a carboxifluoresceína (FAM). Este inhibidor se une covalentemente a la caspasa-1 activa, permitiendo medir el proceso de piroptosis intracelular.

La cuantificación de caspasa-1 activa se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se añadió el reactivo FLICA™ sobre las células ya tratadas con los distintos estímulos, y se incubó la mezcla entre 30 y 60 min a 37 °C, agitando vigorosamente cada 10 min. Después, las muestras se lavaron con un tampón de lavado y se incubaron de nuevo durante 10 min a 37 °C, para permitir que el FLICA™ no unido saliera de las células. Finalmente, se lavaron una vez más con tampón de lavado y se analizaron en el citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter), adquiriendo la fluorescencia de 50.000 células por condición mediante el uso de un láser de argón azul (488 nm) para la excitación y detectando la fluorescencia a 505-545 nm (Canal FL-1). Los datos se analizaron con el *software Kaluza™* versión 1.1.

## **2.16 ANÁLISIS DE LA APARICIÓN DE PIROPTOSIS**

### **2.16.1 Análisis de la permeabilización de membrana mediante ioduro de propidio (IP)**

El IP (Sigma-Aldrich) es un agente intercalante de ácidos nucleicos que emite fluorescencia. La membrana plasmática es impermeable al IP, pero cuando ésta se desintegra, el IP entra en la célula y se une a los ácidos nucleicos. En este trabajo se realizaron marcajes celulares con IP para cuantificar la integridad de la membrana plasmática. Las células tratadas se recogieron y se lavaron con PBS. Posteriormente se incubaron con 50 µg/ml de IP en PBS durante 5 minutos en oscuridad y se analizaron en el citómetro de flujo Gallios™ (Beckman Coulter), adquiriendo la fluorescencia de 50.000 células por condición mediante el uso de un láser de argón azul (488 nm) para la excitación y detectando la fluorescencia a 605-635 nm (Canal FL3). Los datos se analizaron con el *software Kaluza™* versión 1.1.

### **2.16.2 Análisis de la permeabilización de membrana mediante anexina V**

Las anexinas son un grupo de proteínas que se unen a fosfolípidos en presencia de calcio. Durante la piroptosis, la integridad de la membrana plasmática se pierde y la anexina V puede entrar en la célula y unirse a la fosfatidilserina de la membrana celular. Para cuantificar la integridad de la membrana celular se utilizó anexina V conjugada a Cy3 (*Annexin V-Cy3™ Apoptosis Detection Kit*, Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el procedimiento realizado es el siguiente: tras el tratamiento, las

células se lavaron con el tampón de unión y se preincubaron en tampón de unión 1X con anexina V-Cy3 (1 µg/ml) durante 5 min a 37 °C en atmósfera saturada de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las placas se colocaron en el microscopio confocal precalentado a 37 °C, se añadió el estímulo (ATP, 2 mM) y se adquirieron imágenes cada 5 min. Para analizar la fluorescencia se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5X con láser supercontinuo de luz blanca que se ajusta libremente desde 470 nm a 670 nm. La anexina V-Cy3 se detectó con esta línea de láser a 548 nm y se recogió la fluorescencia emitida a longitudes de onda comprendidas entre 562 y 618 nm. Usando el programa de análisis de imágenes *ImageJ* (Wayne Rasband), se calculó la intensidad media de fluorescencia por cada placa en función del tiempo.

### **2.16.3 Análisis de la permeabilización de membrana mediante bromuro de etidio**

Las células a analizar fueron lavadas con solución RD-NES. A continuación se incubaron en esa misma solución y se colocaron en el microscopio confocal precalentado a 37 °C. El bromuro de etidio (20 µM en solución RD-NES) y el ATP (2 mM) se añadieron a los tiempos indicados, y se adquirieron imágenes cada 2 s tras la aplicación del agonista. Para analizar la fluorescencia se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5X con láser supercontinuo de luz blanca que se ajusta libremente desde 470 nm a 670 nm. El bromuro de etidio se excitó con esta línea de láser blanco ajustada a 548 nm y se recogió la fluorescencia emitida a longitudes de onda comprendidas entre 562 y 618 nm. Usando el programa de análisis de imágenes *ImageJ* (Wayne Rasband), se calculó la intensidad media de fluorescencia por cada placa en función del tiempo.

### **2.16.4 Análisis de citotoxicidad mediante ensayo de LDH**

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima estable que normalmente está presente en el citosol de todas las células pero, ante situaciones de daño celular, es rápidamente liberada al exterior. Su actividad se determina mediante un ensayo enzimático de dos pasos: en el primer paso, la LDH oxida el lactato y da lugar a piruvato reduciendo el NAD<sup>+</sup> a NADH/H<sup>+</sup>; en el segundo paso, la diaforasa transfiere dos protones del NADH/H<sup>+</sup> a una sal de tetrazolio convirtiéndola en formazán. La cantidad de formazán producido en el sobrenadante se correlaciona directamente con el número de células muertas presentes en el cultivo y, dado que el formazán es soluble en agua, puede ser detectado midiendo su absorbancia a 500 nm. Usando este principio, la muerte celular o citotoxicidad se cuantificó utilizando el kit comercial *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se partió de sobrenadantes de células activadas en las diferentes condiciones experimentales, que habían sido centrifugados a 300 x g durante 10 min para

quedar libres de restos celulares. Posteriormente, se realizó el protocolo experimental que indica la casa comercial y se cuantificó la citotoxicidad midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm en el espectrofotómetro *VersaMax Tunable Microplate Reader* (Molecular Devices).

## **2.17 MEDIDA DE LOS NIVELES DE POTASIO EN UNA POBLACIÓN CELULAR**

La cuantificación de la concentración intracelular de potasio se realizó utilizando un espectrómetro de absorción atómica, siguiendo el protocolo descrito por *Katsnelson et al.* (253) con pequeñas modificaciones. Las células a analizar se lavaron con un medio libre de  $K^+$  (135 mM gluconato sódico, 1,5 mM  $CaCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 25 mM HEPES ajustado a pH 7,4) para eliminar todo el  $K^+$  residual que pudiese permanecer del medio de cultivo. A continuación, las células se incubaron con 2 ml de ácido nítrico al 10 % durante 2 h a temperatura ambiente para extraer todo el contenido celular. La cantidad de potasio fue cuantificada en cada uno de los lisados usando un espectrómetro de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP/OES, del inglés *Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometer* Varian 725-ES) (VARIAN Medical Systems, Inc).

## **2.18 PREPARACIÓN DE ÁCIDO PALMÍTICO**

El ácido palmítico (16:0) (Sigma-Aldrich) se preparó según el método descrito en el laboratorio de Schaffer y Ory (254).

El ácido palmítico se disolvió a una concentración de 20 mM en NaOH 0,01 N a 70 °C incubándose a esa temperatura durante 20-30 min y agitando la mezcla cada 5 min. La total disolución del ácido graso se consiguió añadiendo sucesivas alícuotas de 5-10  $\mu$ l de NaOH 1N cada 5 min (generalmente se necesitan 30  $\mu$ l), agitando entre alícuota y alícuota hasta obtener una solución transparente y manteniendo siempre la temperatura a 70 °C. Una vez que la solución estaba totalmente transparente, el ácido palmítico estaba listo para usar. El ácido graso se preparó siempre nuevo para cada experimento.

La BSA libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich) se preparó de forma paralela en PBS al 20 % (p/v) (3 mM). En un vaso de precipitado con agitador se añadió la mitad del volumen final de PBS necesario y después se añadió la BSA, permitiendo que el PBS percolara en la proteína, proceso que puede llevar varias horas. Posteriormente, se agitó suavemente hasta conseguir una mezcla totalmente homogénea y se ajustó el volumen de PBS. La BSA se filtró y preservó en alícuotas a 4 °C.

Una vez que ya estaban preparados tanto el ácido palmítico como la BSA, se procedió a formar los complejos en una relación molar de 3,4:1 (ácido palmítico:BSA). Para ello, se añadió el volumen necesario de ácido palmítico sobre la BSA precalentada a 37 °C, con mucho cuidado de no formar burbujas. Después se diluyeron los complejos ya formados en el medio de cultivo a la concentración correspondiente (300 µM:88,2 µM) y se filtraron con un filtro de 0,22 µm. En estas condiciones, el medio con el ácido palmítico era usado o almacenado a 4 °C hasta una semana.

## 2.19 MEDIDAS ELECTROFISIOLÓGICAS

### 2.19.1 *Fundamento*

Para estudiar las corrientes iónicas a través del receptor P2X7 se utilizó la técnica de *patch-clamp* en configuración *voltage-clamp*, utilizando el amplificador de *patch-clamp* Axopatch 200A (Axon Instruments). En esta configuración se controló el potencial de membrana con un sistema de retroalimentación electrónico que mide el potencial de la membrana celular y lo compara con el potencial establecido en el protocolo experimental. Las diferencias entre ambos potenciales quedan inmediatamente corregidas con una inyección de corriente, que refleja la corriente iónica que se está registrando. La modalidad de *voltage-clamp* que se usó en los experimentos mostrados en esta memoria es la de célula entera, en la que en primera instancia se sella la membrana con una punta de pipeta y después se rompe. Así se consigue una continuidad eléctrica entre el electrodo y el interior de la célula. Dado que el volumen celular es insignificante comparado con el volumen de la solución interna de la pipeta, se considera que la composición del medio de la cara intracelular de la membrana es idéntica a la de la solución interna.

### 2.19.2 *Procedimiento*

Los cubreobjetos sobre los que se cultivaron las células para experimentos de *patch-clamp* fueron tratados con 0,01 mg/ml de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) durante 30 min, y después aclarados con agua destilada autoclavada. Una vez secos, se almacenaron en esterilidad hasta su uso.

El cubreobjetos con las células adheridas fue colocado en la parte inferior de la cámara de registro. Se fabricó una pipeta de punta microscópica, que contiene un electrodo en su interior, y se rellenó con una solución interna. Esta micropipeta se fijó a la platina del microscopio, y con un manipulador macrométrico se acercó a la célula en medio de cultivo. Cuando el electrodo se encontraba muy próximo a la célula, se utilizó un micromanipulador para facilitar el acercamiento de la pipeta a la célula, y que la pipeta se apoyara sobre la

superficie celular. La resistencia de la pipeta en ese punto se monitorizó usando el *subroutine Seal Test* del *software* Clampex®, que graba las corrientes en respuesta a pulsos de -10 mV. En estas grabaciones se observaba que, cuando la pipeta se apoyaba en la célula, había una reducción en la corriente. El siguiente paso era sellar la célula. Para ello se aplicaba una succión ligera mediante un sistema de vacío acoplado a la pipeta hasta conseguir una alta resistencia (> 1 GΩ), característica indicativa de que la célula se había sellado. Después de sellar la célula, se establecía un potencial de membrana similar al potencial de membrana en reposo, generalmente en torno a -80 mV.

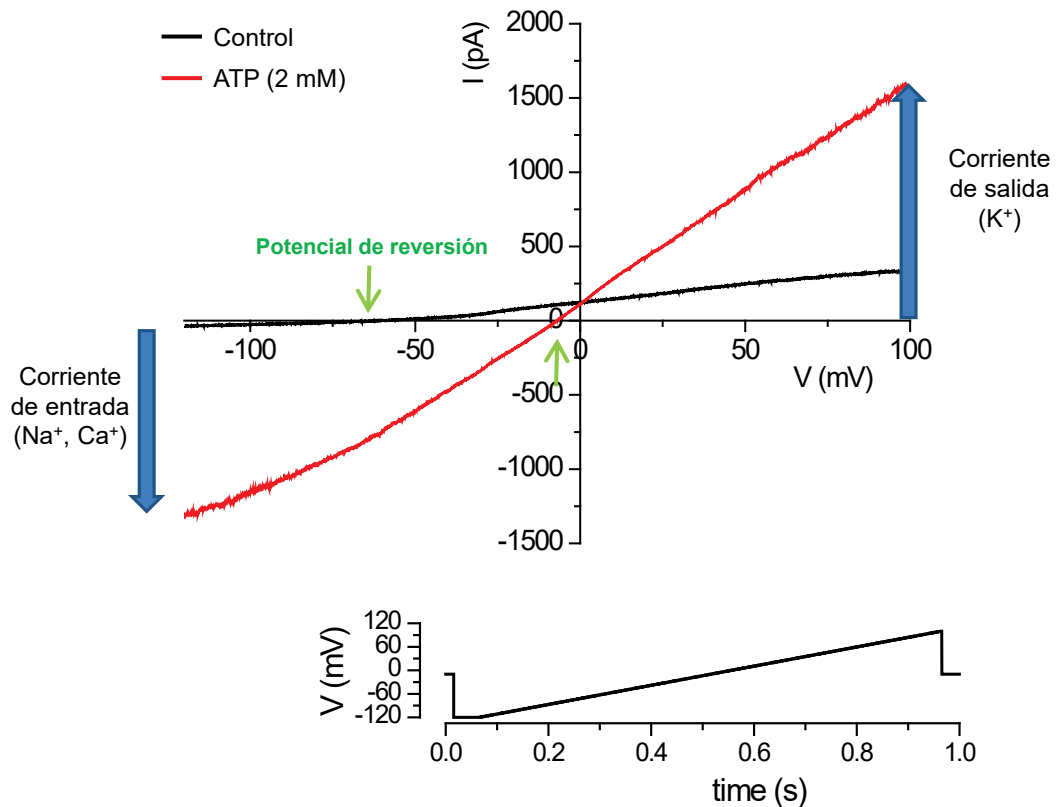
Para alcanzar la configuración de célula completa, era necesario entrar en la célula, estado que se conseguía aplicando otra succión o un pulso de voltaje (*zap*). El acceso eléctrico al citoplasma celular se confirmó por observación de los transitorios capacitivos correspondientes a la carga y descarga de la membrana en cada pulso. La amplitud y el tiempo de estos picos fueron usados para estimar la resistencia en serie (que determina la facilidad de acceso eléctrico y por tanto la velocidad de la fijación de voltaje) y la capacitancia de la membrana celular (como estimación del tamaño celular). Un buen registro debe tener un sello de al menos 1 GΩ, una resistencia en serie menor de 20 MΩ y una capacitancia y resistencia celular constante durante toda la grabación. Las corrientes obtenidas por el amplificador fueron filtradas a 1 o 2 kHz y digitalizadas a 5 o 10 kHz. Las corrientes de fuga y capacitativa fueron sustraídas *online* usando el protocolo P/4.

Los protocolos de estimulación eléctrica fueron diseñados con el *software* Clampex 10.2® (Axon Instruments, Inc.), que también permite monitorizar en tiempo real el comportamiento de la célula durante el experimento. Las grabaciones fueron analizadas con la subrutina Clampfit® 10.2 y con el programa Origin 7.5 (OriginLab Corp.). Este último *software* también fue utilizado para obtener las gráficas con los resultados.

### **2.19.3 Protocolo experimental de estimulación eléctrica**

El protocolo de estimulación eléctrica empleado en este estudio fue el basado en la aplicación de una rampa de despolarización cada 5 s, en la que a lo largo de un segundo el potencial que se impone a la célula varía progresivamente desde -120 mV a +100 mV. En los periodos entre rampas la célula se mantuvo a un potencial de reposo de -10 mV. Este protocolo permite obtener las corrientes totales de entrada y salida de cada célula en función del potencial (obteniendo una gráfica I/V) y, a partir de estas gráficas, se puede estimar el potencial de reversión, la selectividad iónica, la rectificación y la conductancia. Por último, si la amplitud de corriente se corrige por el tamaño celular (es decir, por la medida de la

capacidad que se ha obtenido previamente), se puede representar la densidad de corriente (pA/pF).



**Figura 18. Protocolo experimental de estimulación eléctrica empleado para medir las corrientes eléctricas producidas por ATP.**

En la Figura 18 se muestra el protocolo experimental que va a seguirse para analizar las corrientes iónicas generadas por ATP, debidas a la activación de receptores P2X7. El gráfico superior representa la intensidad de corriente en función del voltaje. El potencial de membrana ( $V_M$ ) en reposo está en torno a -60 mV (el punto de corte en el eje de abscisas), y es el potencial que tiende a mantener la célula. Este  $V_M$  en reposo se debe a la contribución dominante de la permeabilidad a  $K^+$  (con un potencial de equilibrio estimado en torno a -80 mV) sobre la permeabilidad a otros iones (fundamentalmente  $Na^+$ , cuyo potencial de equilibrio es de unos +60 mV). Cuando se aplica el protocolo de voltaje indicado en la gráfica de abajo, el  $V_M$  es por tanto el valor del potencial en el que no existe flujo neto (la corriente total es 0). Como los iones se mueven para llevar el  $V_M$  a su potencial de equilibrio, a valores por debajo tienden a entrar cargas positivas ( $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ ), y a valores por encima tienden a salir cargas positivas ( $K^+$ ). Los flujos basales, en células no estimuladas, están representados con el trazo negro y, como se observa, las corrientes totales son muy pequeñas. Sin embargo, tras aplicar ATP (trazo rojo), se observa la activación de una corriente a través de canales bastante importante, tanto de salida (+100 mV) como de entrada (-120 mV). El potencial de

reversión de esta corriente (el valor del potencial de membrana para el que no existe flujo neto de iones a través de los canales) se desplaza hasta casi 0 mV, lo que indica que los canales que se han activado tienen muy poca selectividad iónica, permitiendo el paso de cationes de forma inespecífica. Los flujos de entrada corresponden al movimiento de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y los flujos de salida al movimiento de  $\text{K}^+$ . La naturaleza de estas corrientes se puede demostrar mediante el uso de sustituciones iónicas, de tal forma que si, por ejemplo, se sustituye el  $\text{Na}^+$  del medio extracelular por N-metil-D-glucamida ( $\text{NMDG}^+$ ) (catión no permeable), se elimina una gran parte del flujo de entrada a valores negativos.

El gráfico inferior de la Figura 18 muestra el protocolo del cambio de voltaje a lo largo del tiempo. Se observa que se aplicaron rampas de despolarización durante 1 segundo desde -120 mV hasta +100 mV.

## 2.20 ANÁLISIS DE LOS NIVELES CELULARES DE COLESTEROL

La determinación de los niveles de colesterol se realizó mediante el método descrito por Zlatkis *et al.* (255), con ligeras modificaciones.

Las células a analizar se lavaron con PBS, se resuspendieron en agua, se sonicaron mediante 2 pulsos de 18 s en un sonicador de *tip* (Fisher Bioblock Scientific Vibra Cell 75115) y se cuantificó la cantidad de proteína de cada muestra. Partiendo de lisados que tuvieran 1 mg de proteína, se extrajeron los lípidos neutros con 5 volúmenes de *n*-hexano:isopropanol (3:2) (v/v), agitando la mezcla vigorosamente e incubando durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se realizó una centrifugación a 6000 x g durante 5 min para separar las fases y recoger la fase orgánica para su posterior evaporación en atmósfera de  $\text{N}_2$ . El extracto lipídico obtenido se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se guardó a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

Para cuantificar el colesterol total de estos extractos lipídicos, se añadió 1 ml de  $\text{FeCl}_3$  en ácido acético glacial 100 % (0,1 g/ml). La mezcla se agitó en un agitador tipo Vortex y se centrifugó a 12000 x g durante 1 min. Se cogieron 500  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se pasaron a un tubo nuevo, y se añadieron 300  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (93-98%). Se incubó la reacción durante 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm en el espectrofotómetro VersaMax *Tunable Microplate Reader* (Molecular Devices).

La concentración de colesterol se determinó utilizando la Ley de Lambert-Beer, a partir de una recta patrón elaborada con concentraciones de colesterol conocidas, y procesada exactamente igual que las muestras a analizar. La solución estándar de colesterol se preparó en ácido acético glacial 100 % (1 mg/ml).



La cantidad de colesterol en las muestras se normalizó con respecto a 1 mg de proteína.

## 2.21 ANÁLISIS DE ÉSTERES DE COLESTEROL

### 2.21.1 *Extracción de lípidos y separación por cromatografía en capa fina (TLC)*

Las células se resuspendieron en agua, se sonicaron mediante 2 pulsos de 18 s en un sonicador de *tip* (Fisher Bioblock Scientific Vibra Cell 75115) y se cuantificó la cantidad de proteína por muestra. Sobre las muestras se añadieron los estándares internos correspondientes (Colesteril erucato, CE (22:1 *n*-9), Sigma-Aldrich) y se procedió a la extracción de los lípidos celulares siguiendo el método descrito por Bligh y Dyer (256). Se añadieron 3,75 volúmenes de cloroformo/metanol 1:2, se agitó, se añadieron 1,25 volúmenes de H<sub>2</sub>O y 1,25 volúmenes de cloroformo, se agitó de nuevo y se centrifugó a 6000 x g durante 5 min a 18 °C con el fin de separar las fases. Posteriormente se extrajo la fase orgánica, que se pasó a otro tubo. Se hizo una segunda extracción añadiendo 2 volúmenes de cloroformo. Se extrajo la fase orgánica, que se juntó con la fracción anterior.

Posteriormente se procedió a la separación de las distintas clases de lípidos mediante TLC. Para ello, la fase orgánica extraída se evaporó en una centrifuga con vacío, se disolvió en 20 µl de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se aplicó en una TLC de silicagel G 20x20 cm (Macherey-Nagel), activada previamente mediante calor (4 h a 70 °C en estufa), junto con los patrones de las correspondientes clases de lípidos (Colesteril oleato, CE (18:1 *n*-9), Sigma-Aldrich). La TLC se desarrolló en un sistema *n*-hexano/dietil-éter/ácido acético 70:30:1 (v/v/v) para la separación de lípidos neutros. La porción de TLC donde se encontraban los patrones se cortó y se expuso a vapores de yodo, permitiendo su visualización. Los factores de retención (R<sub>f</sub>) de los patrones se utilizaron para localizar en la TLC las diferentes clases de lípidos de la muestra. Las porciones de sílice correspondientes a los ésteres de colesterol se recogieron en tubos y los lípidos fueron extraídos de la sílice mediante 1 ml de cloroformo/metanol 1:1 (v/v), seguido de 1 ml de cloroformo/metanol 2:1 (v/v), centrifugando en cada paso la sílice con el disolvente a 16000 x g a 18 °C durante 5 min.

### 2.21.2 *Análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)*

#### 2.21.2.1 *Derivatización de ácidos grasos*

Los ácidos grasos no pueden ser analizados de forma directa por GC/MS al no ser lo suficientemente volátiles para ser transportados por la fase gaseosa a lo largo de la columna. Para ello, se requiere de un paso de derivatización química anterior al análisis por GC/MS

que nos permita por una parte separar los ácidos grasos del esqueleto de glicerol o colesterol en el que se encuentran esterificados, y por otra, hacer los analitos mucho más estables y volátiles para su mejor separación en columna. Existen distintas derivatizaciones que nos proporcionan información estructural complementaria de los ácidos grasos válida para su caracterización. La derivatización de ácidos grasos para su análisis por GC/MS usada en este trabajo es a ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs, del inglés *fatty acid methyl esters*).

Para llevar a cabo esta derivatización, la fase orgánica extraída de la TLC se evaporó en una centrífuga con vacío, se disolvió en 100 µl de cloroformo/metanol 2:1 (v/v) y se introdujo en un tubo de vidrio roscado. Posteriormente, se añadió 1 ml de KOH 0,5 M en metanol y se incubó en agitación a 37 °C durante 60 min, produciéndose la transmetilación de los ácidos grasos. La reacción se neutralizó añadiendo un volumen de HCl 0,5 M, y los FAMEs se extrajeron dos veces con un volumen de hexano, centrifugando a 800 x g durante 5 min a 18 °C. La fase orgánica lipídica se recogió y se guardó a -80 °C en atmósfera de N<sub>2</sub> hasta su análisis.

#### 2.21.2.2 Análisis de ésteres metílicos

El análisis de los ésteres metílicos obtenidos se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas como detector (Agilent 5975) en modo de impacto electrónico (EI, 70 eV), equipado con un inyector automático (Agilent 7693) y una columna capilar modelo Agilent DB-23 (60 m de longitud x 250 µm diámetro interno x 0,15 µm de grosor de película) cuya fase estacionaria es de [(50 %-cianopropil)-metilpolisiloxano].

El programa de temperatura utilizado fue una modificación del descrito por Abu *et al.* (257). La temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 250 °C para que la muestra fuera rápidamente volatilizada tras la inyección, la temperatura de la línea de transferencia entre el final de la columna y la fuente de ionización del espectrómetro de masas se mantuvo a 250 °C, la temperatura del cuadrupolo se fijó a 150 °C y la de la fuente de ionización a 230 °C.

Se utilizó helio como gas portador, a una presión constante de 26,1 psi. En cada caso se inyectó 1 µl de muestra disuelta en *n*-hexano en modo *splitless* (sin división de la muestra).

La adquisición de datos en el analizador de espectrometría de masas se llevó cabo a partir del minuto 5 desde que se inyecta la muestra para evitar monitorizar la señal producida por el disolvente en el que se encuentra la misma, así como para proteger el filamento de la fuente de ionización. La identificación de compuestos se realizó en modo TIC (corriente total

de iones, del inglés *Total Ion Current*) usando el tiempo de retención característico para cada FAME y comparando con distintos FAME comerciales, así como con los espectros NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología).

La cuantificación de FAME se hizo en modo SIM (monitorización de iones seleccionados, del inglés *Selected Ion Monitoring*), usando para cada tipo de analito los siguientes fragmentos característicos: 74 y 87 para FAMEs saturados, 83 para monoinsaturados, 67 y 81 para diinsaturados y 79 y 91 para poliinsaturados (258). Para llevar a cabo esta cuantificación, se utilizó un estándar interno (lípidos análogos al lípido problema del cuál se quiere conocer la composición de ácidos grasos, pero con ácidos grasos de número impar de átomos de carbono, que son despreciables en la naturaleza) y mediante una curva de calibración externa para cada FAME. El *software* utilizado fue MSD Productivity Chemstation, G1701EA, revisión E.02.00 SP2 (G1701-64553).

Antes de realizar cada experimento, se comprobó que el espectrómetro de masas estuviese calibrado con un estándar de PTFBA (perfluorotributilamina).

## 2.22 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos presentados en este trabajo son resultados representativos de tres experimentos independientes. Los datos de las gráficas se representaron como la media  $\pm$  desviación estándar o como la media  $\pm$  error estándar, según se indique. Las diferencias entre los grupos experimentales se determinaron mediante el análisis estadístico *t de student* de dos colas, y se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95 % ( $p < 0,05$ ).



## ***IV. RESULTADOS***

---



# 1 CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA PRIMERA SEÑAL DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 DESCRIBIENDO SUS EFECTOS SOBRE LA SEÑALIZACIÓN POR TLR4 EN MACRÓFAGOS

## 1.1 LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

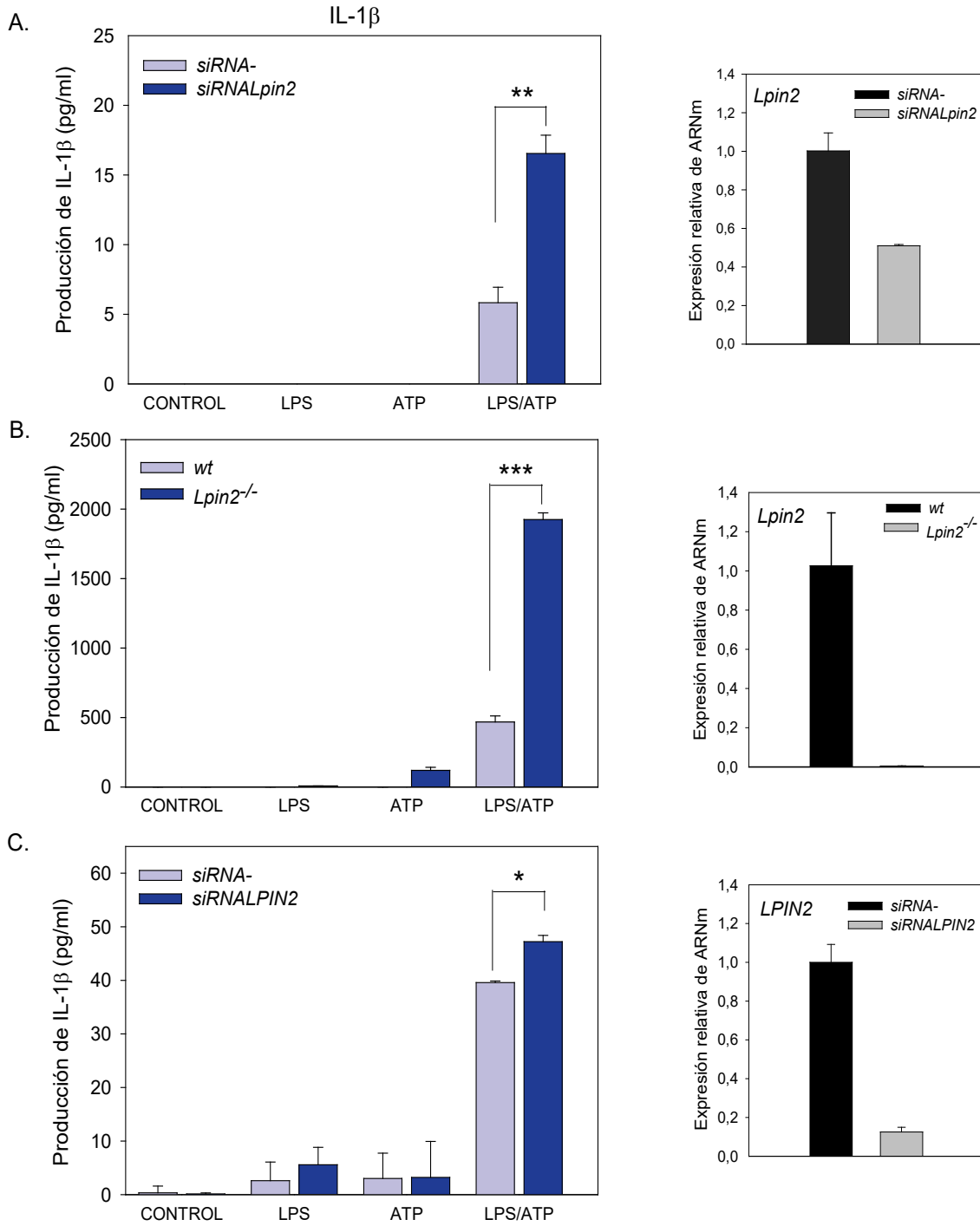
### 1.1.1 *La falta de lipina-2 aumenta la producción de IL-1 $\beta$*

La IL-1 $\beta$  es uno de los mediadores críticos en la inducción de respuestas inmunes y en el desarrollo de enfermedades inflamatorias. Los pacientes con síndrome de Majeed, que tienen mutada la lipina-2, presentan alteraciones en los niveles de diversas citoquinas, pero mejoran tras el tratamiento con fármacos que bloquean la acción de la IL-1 $\beta$ . A pesar de que hasta la fecha la lipina-2 ha sido estudiada principalmente como enzima metabólica y pocos son los estudios que avalan su papel en el sistema inmune (231), estos datos sugerían que la lipina-2 podría estar implicada en la producción de esta citoquina.

Para verificar esta hipótesis, se emplearon tres sistemas celulares: la línea celular macrofágica RAW 264.7 en la que la expresión de la lipina-2 se disminuyó mediante lipofección de un siRNA específico para la lipina-2, BMDM de ratones *wt* y *Lpin2*<sup>-/-</sup> y macrófagos humanos diferenciados *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica (a partir de ahora macrófagos humanos) en los que la expresión de la lipina-2 se redujo mediante nucleofección de un siRNA específico. En los sistemas en los que se usó el silenciamiento génico como herramienta para reducir los niveles de proteína, como control del experimento se utilizaron células tratadas con un siRNA negativo que no tiene genes diana en la célula. Esto, además, permitió evaluar la eficiencia del silenciamiento.

#### 1.1.1.1 *Efecto de la falta de lipina-2 sobre la producción de IL-1 $\beta$ tras activación del inflammasoma NLRP3 con LPS y ATP*

El presente estudio se comenzó analizando el efecto que la reducción o eliminación de la expresión de lipina-2 tenía sobre la producción de IL-1 $\beta$  en los tres sistemas anteriormente mencionados. Para producir la liberación de IL-1 $\beta$  en su forma activa, se escogió como estímulo de la señal 1 un ligando clásico del TLR4, el LPS, y como señal 2, un potente activador del inflammasoma NLRP3 y uno de los estímulos más utilizados con este fin en la literatura, el ATP.

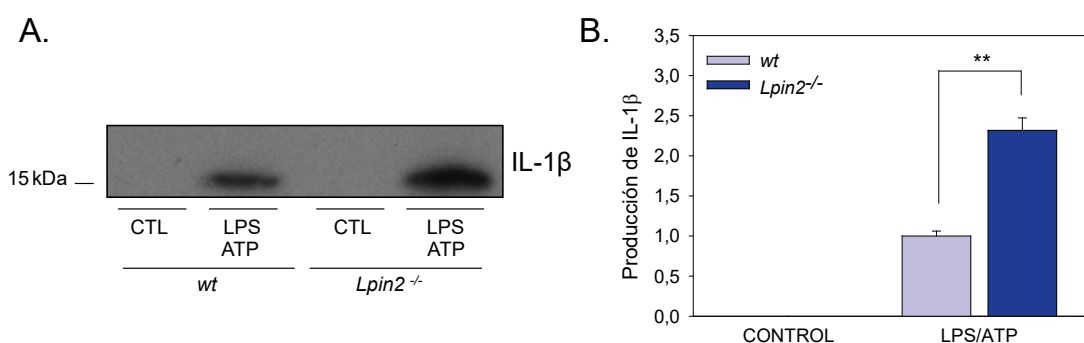


**Figura 19. Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$  en distintos tipos de macrófagos.** A) Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min. El panel de la derecha muestra los niveles del ARNm de la lipina-2 tras análisis por RT-q-PCR. B) Los BMDM de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup> fueron estimulados como en A. El panel de la derecha muestra los niveles del ARNm de Lpin2 tras análisis por RT-q-PCR. C) Los macrófagos humanos fueron silenciados por nucleofección con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2) y estimulados como en A. El panel de la derecha muestra los niveles del ARNm de LPIN2 tras análisis por RT-q-PCR. En A, B y C se recogieron los sobrenadantes celulares y se analizó la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



Los datos mostraron que la activación del inflamasoma con LPS y ATP, pero no la activación de las células con un único estímulo, generaba IL-1 $\beta$ , y que esta producción aumentaba de forma significativa en ausencia de lipina-2 en la línea celular macrofágica RAW 264.7 (Figura 19 A). Además, también se hicieron estos análisis en macrófagos murinos procedentes de animales que carecían por completo de la proteína de estudio, la lipina-2, y de nuevo los resultados apuntaban en la misma dirección, siendo las diferencias muy significativas (Figura 19 B). Al trasladar este estudio a células humanas, se observó que la lipina-2 modulaba de igual modo la producción de IL-1 $\beta$  (Figura 19 C).

Para corroborar los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA, se analizó mediante *immunoblot* la presencia de IL-1 $\beta$  madura en los sobrenadantes de BMDM. Para ello, tras el tratamiento de las células con los correspondientes estímulos se concentró la proteína de los sobrenadantes celulares mediante centrifugación usando columnas de tamaño de poro de 10 kDa (Millipore). Una vez concentrada la muestra, las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida mediante electroforesis y se analizó la IL-1 $\beta$  madura (17 kDa) mediante inmunodetección, usando un anticuerpo específico.



**Figura 20. Efectos de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$  madura en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup>.** Los BMDM fueron estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y después tratados con ATP (2 mM) durante 40 min. A) Expresión proteica de IL-1 $\beta$  madura en los sobrenadantes celulares obtenidos a partir del cultivo de esas células. B) Cuantificación de la proteína IL-1 $\beta$  madura mediante densitometría del immunoblot en el Software Quantity One®. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

El análisis de la liberación de IL-1 $\beta$  realizado mediante esta técnica apoya los resultados obtenidos mediante la técnica de ELISA (Figura 19), indicando que la falta de lipina-2 aumenta la producción de IL-1 $\beta$  tras el tratamiento con LPS y ATP en macrófagos (Figura 20).

Por todo ello, se puede concluir que la lipina-2 está frenando la producción de IL-1 $\beta$  en los tres tipos de macrófagos, tras una activación clásica del inflamasoma NLRP3 con LPS y ATP.

1.1.1.2 Efecto de la falta de lipina-2 sobre la producción de IL-1 $\beta$  tras activación del inflamasoma NLRP3 por estímulos distintos al ATP.

Posteriormente, se analizó si la falta de lipina-2 también producía cambios en la producción de IL-1 $\beta$  con otros estímulos del inflamasoma NLRP3 distintos al ATP. Para ello, se estimularon las células RAW 264.7 y los BMDM con LPS como señal 1 y como señal 2, se utilizó nigericina, MSU o alúmina. Tras esta activación, se analizó la producción de IL-1 $\beta$  en los sobrenadantes celulares mediante ELISA.

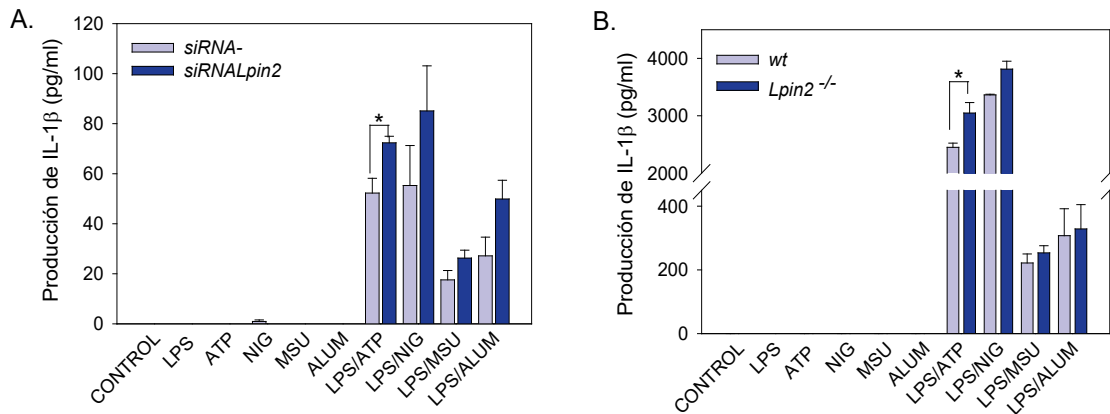
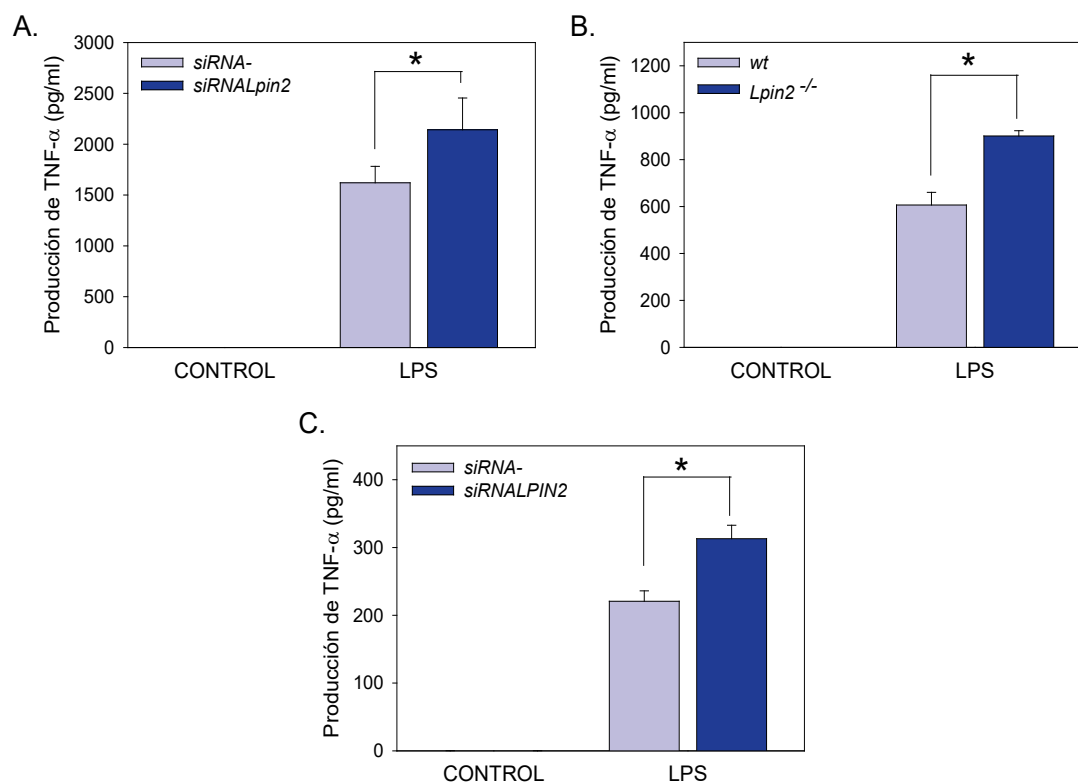


Figura 21. Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos tras estimulación con diferentes activadores del inflamasoma NLRP3. A) Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *Lpin2* (siRNALpin2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) o nigericina (10  $\mu$ M) durante 40 min o MSU (200  $\mu$ g/ml) o alúmina (150  $\mu$ g/ml) durante 6 h. B) Los BMDM procedentes de animales wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup> fueron estimulados como en A. En A y en B se analizó la producción de IL-1 $\beta$  en sobrenadantes libres de células mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* $p$ <0,05.

Tanto en células RAW 264.7 (Figura 21 A) como en BMDM (Figura 21 B), las diferencias en la producción de IL-1 $\beta$  entre las células que expresan lipina-2 y las que no, eran significativamente mayores cuando el activador de NLRP3 utilizado era el ATP, coincidiendo con datos mostrados previamente (Figura 19). Tras la activación de las células con nigericina, en ambos tipos celulares se observaba la misma tendencia que cuando el estímulo utilizado era el ATP, pero sin llegar a alcanzar significancia estadística. El uso de otros activadores del inflamasoma, como el MSU o la alúmina, mostró un comportamiento diferente en la línea celular y en los BMDM; en células RAW 264.7 se comportaban siguiendo la misma tendencia que el resto de activadores del inflamasoma, aunque sin alcanzar significancia estadística, mientras que en BMDM no aparecían diferencias entre las células procedentes de animales wt y las células procedentes de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup>.

### 1.1.2 La falta de lipina-2 aumenta la producción de TNF- $\alpha$ en macrófagos

Para saber si la lipina-2 desempeñaba un papel en la señal 1 de activación del inflamasoma, lo primero que se hizo fue analizar si la falta de lipina-2 modificaba la activación de receptores TLR4 por LPS. Para ello, se cuantificó la producción de TNF- $\alpha$  mediante la técnica de ELISA, ya que es una citoquina proinflamatoria que se genera tras la activación por ligandos de TLRs a tiempos tempranos y que sólo necesita de una única señal para ser producida y liberada en su forma activa.



**Figura 22. Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de TNF- $\alpha$  en distintos tipos de macrófagos.** A) Las células RAW 264.7 tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2); B) Los BMDM de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup>; C) Los macrófagos humanos silenciados por nucleofección con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2), fueron estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h. En A, B y C se recogieron los sobrenadantes y se analizó la producción de TNF- $\alpha$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ .

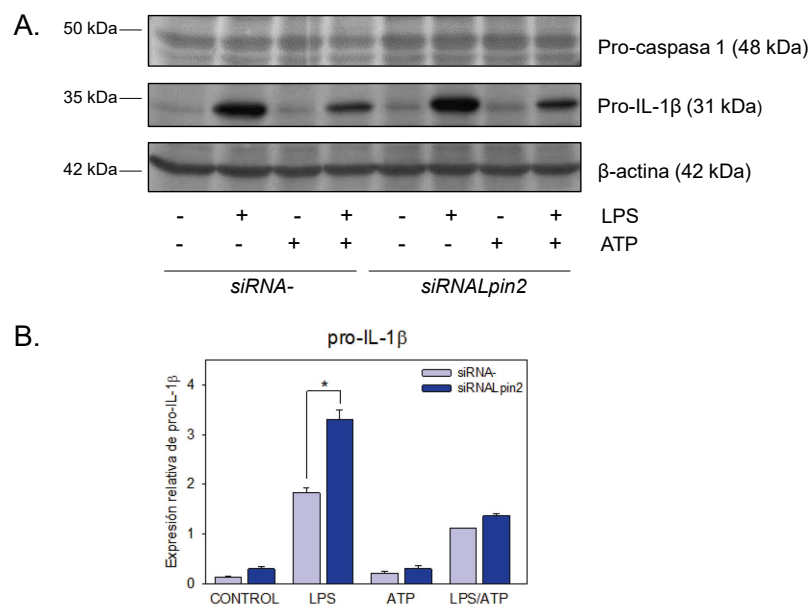
En la Figura 22 se observa que la activación con LPS genera una mayor producción de TNF- $\alpha$  en las células en las que faltaba o se había disminuido la expresión de la lipina-2. Esta alteración de los niveles de TNF- $\alpha$  era común en los tres sistemas celulares analizados. Estos resultados sugieren que la lipina-2 podría estar modulando la señalización mediada por el receptor TLR4.

## 1.2 LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA SEÑAL INFLAMATORIA A TRAVÉS DE TLR4

### 1.2.1 La falta de lipina-2 incrementa la producción de pro-IL-1 $\beta$

La IL-1 $\beta$  no se expresa de forma constitutiva en células en reposo. Para inducir su expresión, las células pueden ser activadas con diferentes estímulos como ligandos TLR, TNF- $\alpha$  o la propia IL-1 $\beta$  (55-57). El hecho de que la falta de lipina-2 aumentara la producción de TNF- $\alpha$ , podría estar causado porque la lipina-2 juegue un papel como moduladora de la señalización celular mediada por TLR4. Por ello, se planteó la hipótesis de que también podría regular la producción de la proteína inmadura, la pro-IL-1 $\beta$ , a través de este receptor. Para aceptar o rechazar la hipótesis propuesta, se procedió al análisis de la expresión de pro-IL-1 $\beta$  mediante *immunoblot*. Estos experimentos se realizaron en macrófagos de distintas procedencias, activados con LPS durante 4 horas. En estas condiciones, también se estudió la expresión del zimógeno de la enzima convertidora de IL-1 $\beta$ , mejor conocida como caspasa-1, aunque ya es sabido que esta enzima se expresa de forma constitutiva en células en reposo.

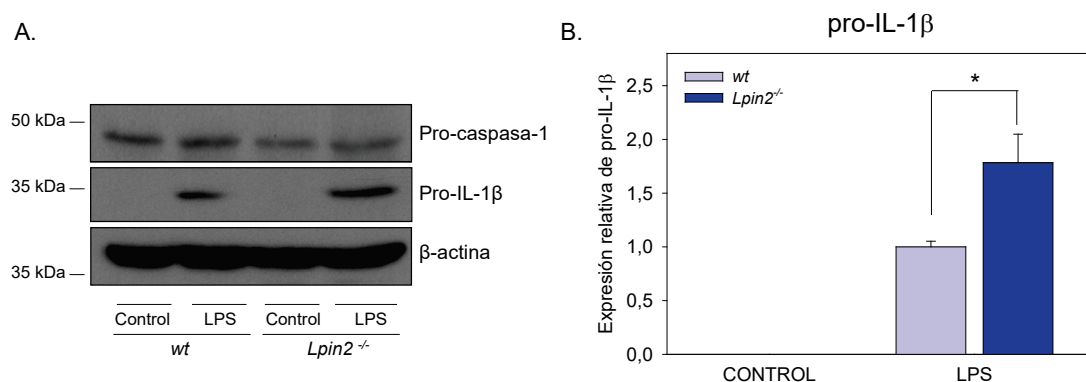
En primer lugar se analizó la producción de pro-IL-1 $\beta$  en la línea celular macrófaga RAW 264.7 (Figura 23).



**Figura 23. Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de pro-IL-1 $\beta$  durante la activación mediada por LPS en células RAW 264.7.** Las células RAW 264.7 fueron silenciadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h. A) Expresión proteica de pro-IL-1 $\beta$  y pro-caspasa-1 en los extractos celulares obtenidos a partir de esas células. Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico frente a  $\beta$ -actina. B) Cuantificación relativa de la expresión proteica de pro-IL-1 $\beta$  respecto a la  $\beta$ -actina realizada mediante densitometría de las bandas de interés utilizando el Software Quantity One®. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. \* p<0,05.

Tras activación por LPS, las células con una expresión reducida de lipina-2 presentaban niveles mayores de pro-IL-1 $\beta$  que las células control (Figura 23). Por otro lado, el tratamiento exclusivo con ATP no afectaba a la producción de pro-IL-1 $\beta$  en ninguno de los dos casos, mientras que el tratamiento conjunto de LPS y ATP, disminuía la presencia de pro-IL-1 $\beta$  con respecto a las células tratadas únicamente con LPS. También se analizó la expresión proteica de pro-caspasa-1, y se observó que se mantenía constante en las diferentes condiciones de estimulación.

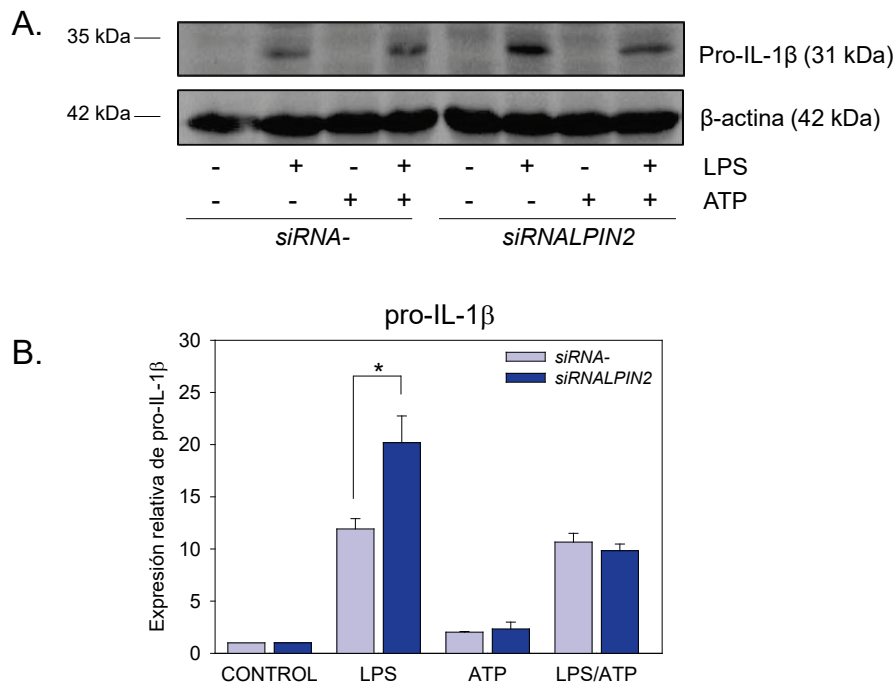
Estos análisis fueron también realizados en BMDM procedentes de animales que carecían totalmente de lipina-2 (Figura 24).



**Figura 24. Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de pro-IL-1 $\beta$  durante la activación mediada por LPS en BMDM.** Los BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup> fueron estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h. A) Expresión proteica de pro-IL-1 $\beta$  y pro-caspasa-1 en los extractos celulares obtenidos a partir de esas células. Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico frente a  $\beta$ -actina. B) Cuantificación relativa de la expresión proteica de pro-IL-1 $\beta$  respecto a la  $\beta$ -actina realizada mediante densitometría de las bandas de interés utilizando el Software Quantity One®. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. \* p<0,05

Los datos obtenidos en macrófagos murinos primarios apuntaban en la misma dirección que los obtenidos en la línea celular RAW 264.7. En la Figura 24 se observa que, tras activación del receptor TLR4 por LPS, las células que no expresaban lipina-2 producían mayor cantidad de pro-IL-1 $\beta$  que las células control. Así mismo, en BMDM, la pro-caspasa-1 se expresaba de forma constitutiva y se mantenía constante en todas las condiciones analizadas.

Finalmente, se trasladaron estos análisis a un sistema humano, para evaluar si la lipina-2 mediaba mediaba la producción de pro-IL-1 $\beta$  por LPS de forma similar a como lo hacía en un sistema murino.



**Figura 25. Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de pro-IL-1β durante la activación mediada por LPS en macrófagos humanos.** Los macrófagos fueron silenciados con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2) y estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h. A) Expresión proteica de pro-IL-1β en los extractos celulares obtenidos a partir de esas células. Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico frente a β-actina. B) Cuantificación relativa de la expresión proteica de pro-IL-1β respecto a la β-actina realizada mediante densitometría de las bandas de interés utilizando el Software Quantity One®. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. \* p<0,05

Tras estos análisis, se observó que los macrófagos humanos seguían el mismo comportamiento que los murinos: la producción de pro-IL-1β estaba disminuida en macrófagos humanos que expresaban lipina-2 con respecto a las células a las que se les había reducido la expresión de la enzima (Figura 25).

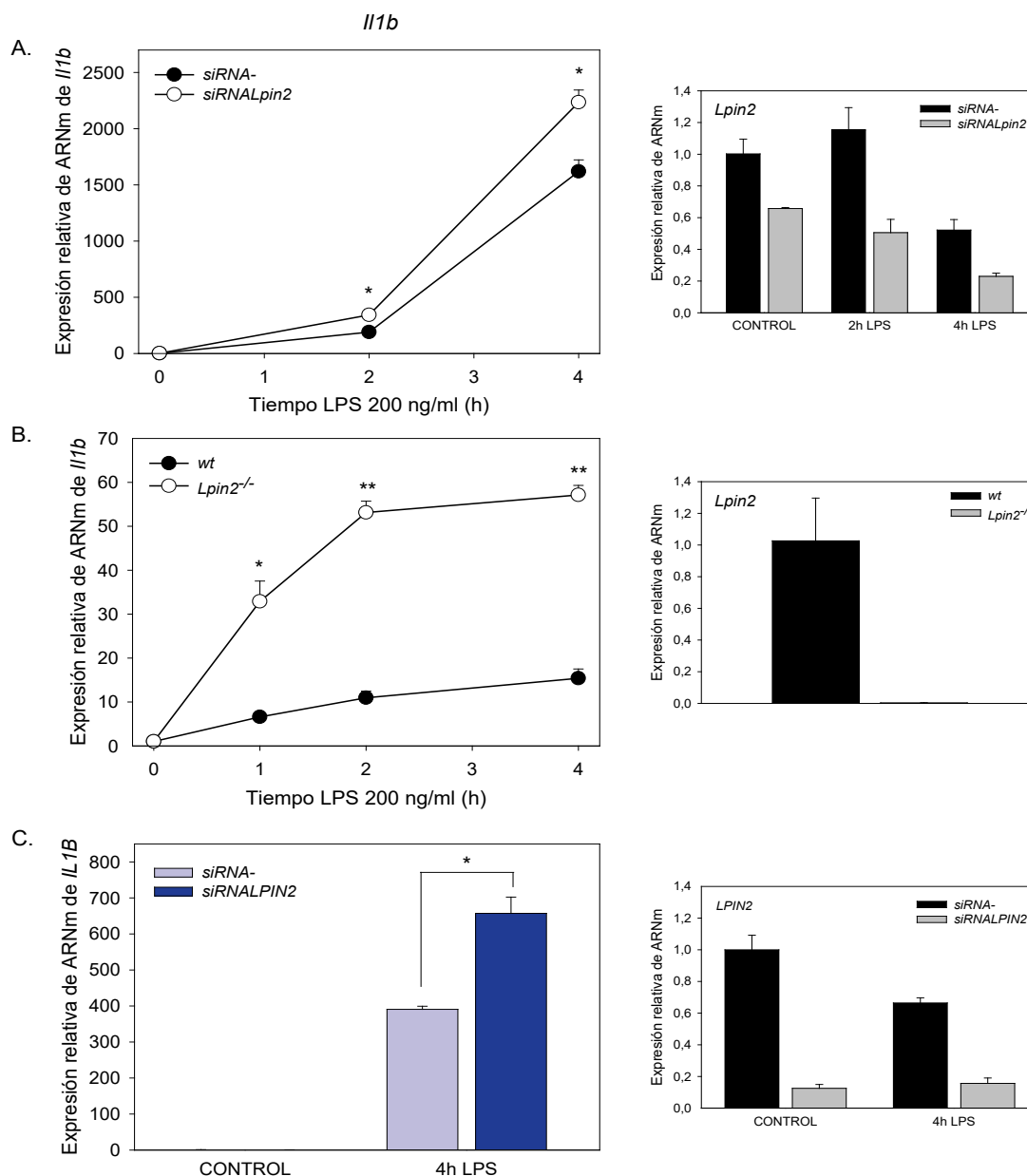
Teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que la lipina-2 controla los niveles de pro-IL-1β que se generan en macrófagos, tanto murinos como humanos, tras activación celular con LPS, hecho que apoya que la presencia de lipina-2 en las células reduce la señal 1 de activación del inflammasoma NLRP3.

### 1.2.2 La falta de lipina-2 aumenta la expresión génica de IL-1β y de otros genes proinflamatorios

Se decidió evaluar, a continuación, si la lipina-2 regulaba la expresión de pro-IL-1β a nivel de ARNm. Estos análisis se hicieron mediante RT-q-PCR en los distintos sistemas celulares estudiados en la presente memoria.

Los resultados mostraron que la expresión de ARNm de *Il1b* tras el tratamiento con LPS (200 ng/ml) estaba significativamente incrementada en células RAW 264.7 con expresión de

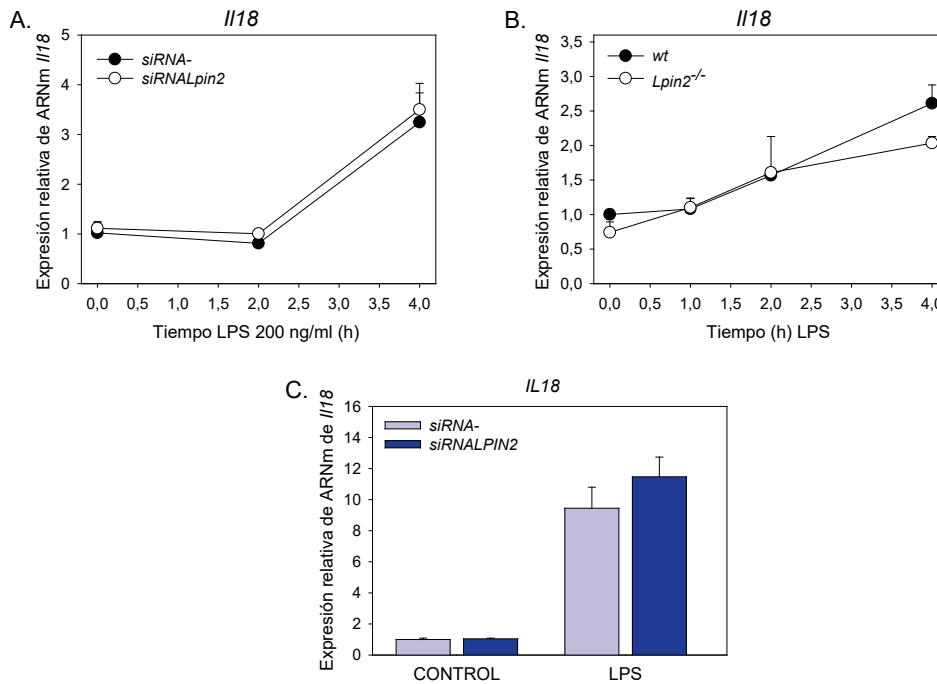
lipina-2 reducida respecto a las células control (Figura 26A). Las diferencias se observaban tanto a 2 h como a 4 h de tratamiento. Los efectos fueron aún más dramáticos en BMDM procedentes de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> (Figura 26B), y también se confirmaron en macrófagos humanos (Figura 26C). Los análisis realizados en los tres sistemas celulares por RT-q-PCR concuerdan con la mayor producción de proteína pro-IL-1 $\beta$  observada por ensayos de *immunoblot*.



**Figura 26. Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$  en distintos tipos de macrófagos.**

A) Las células RAW 264.7 tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *Lpin2* (siRNALpin2); B) Los BMDM procedentes de animales wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup>; C) Los macrófagos humanos silenciados por nucleofección con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2), fueron estimulados con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. En A, B y C se extrajo el ARN celular y se analizó la expresión del ARNm codificante para pro-IL-1 $\beta$  mediante RT-q-PCR utilizando cebadores específicos. Como genes de referencia se utilizaron la Ciclofilina B (A), la Gapdh (B) y la ACTINA (C). Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Posteriormente, también se llevó a cabo mediante RT-q-PCR el análisis de la expresión del gen que codifica para la IL-18, citoquina que a diferencia de la pro-IL-1 $\beta$  se expresa de forma constitutiva.

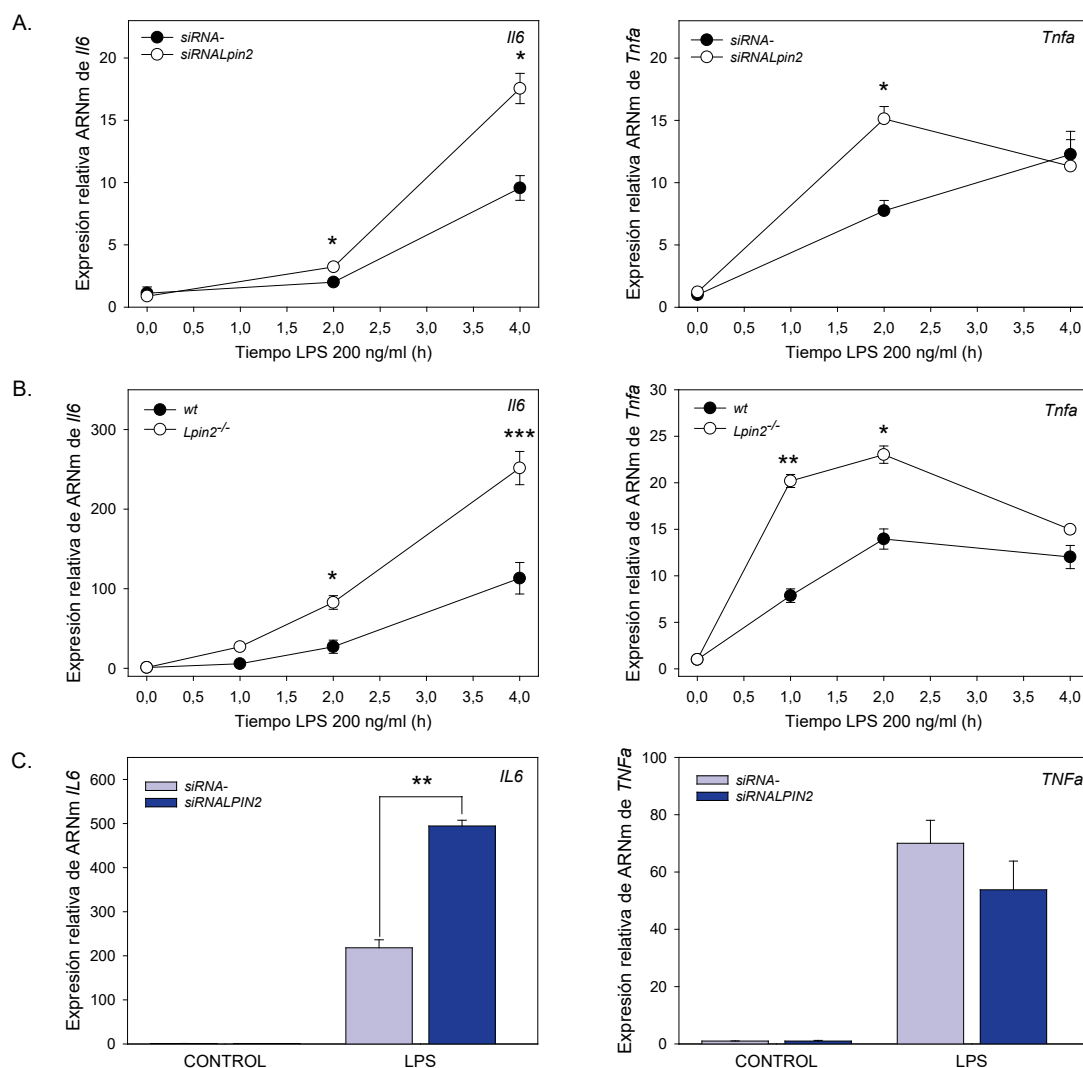


**Figura 27. Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de ARNm de IL18 en distintos tipos de macrófagos.** A) Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. B) Los BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup> se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos y se estimularon con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. C) Los macrófagos derivados de monocitos de sangre humana se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Fueron tratados con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h. En A, B y C se extrajo el ARN celular y se analizó la expresión del ARNm codificante para la IL-18 mediante RT-q-PCR utilizando cebadores específicos. Como genes de referencia se utilizaron la Ciclofilina B (A), la Gapdh (B) y la ACTINA (C). Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Al contrario de lo que se observaba en la expresión relativa de ARNm de *Il1b*, los niveles de ARNm del gen que codifica para la IL-18 no mostraron diferencias entre las células que expresan la lipina-2 y las que no (Figura 27). El hecho de que la pro-IL18 se exprese de forma constitutiva y no sea necesaria su inducción por ligandos de TLR, explicaría estos datos.

Dado que la lipina-2 parece jugar un papel importante en la inducción génica de *Il1b* por LPS, se decidió investigar su papel en la expresión de otros genes proinflamatorios, como los que codifican para TNF- $\alpha$  e IL-6 (Figura 28).





**Figura 28. Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión de genes proinflamatorios en los distintos tipos de macrófagos.** A) Expresión de *Il6* y *Tnfa* en células RAW 264.7. Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *Lpin2* (siRNALpin2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. B) Expresión de *Il6* y *Tnfa* en BMDM procedentes de animales wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup>. Los BMDM se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos y se estimularon con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados en la gráfica. C) Expresión de *IL6* y *TNFa* en macrófagos humanos. Los macrófagos humanos fueron tratados con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *LPIN2* (siRNALPIN2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h. En A, B y C se extrajo el ARN celular y se analizó la expresión del ARNm codificante para *IL-6* y *TNF-α* mediante RT-q-PCR utilizando cebadores específicos. Como genes de referencia se utilizaron la *Ciclofilina B* (A), la *Gapdh* (B) y la *ACTINA* (C). Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Los análisis de expresión génica en células RAW 264.7 indicaron que los niveles de ARNm de los genes proinflamatorios analizados estaban aumentados en aquellas células donde la expresión de la lipina-2 estaba disminuida (Figura 28 A). Este hecho también se observaba en BMDM, datos representados en la Figura 28 B. La expresión de los genes proinflamatorios *Il6* y *Tnfa* aumentaba a 1 h y 2 h de tratamiento con LPS, siendo esos niveles significativamente más elevados en los BMDM de ratones que carecían de lipina-2 que en los BMDM procedentes de ratones wt. Sin embargo, tras 4 h de tratamiento, los niveles de

ARNm de genes de producción temprana como *Tnfa* tendían a igualarse, mientras que los niveles de ARNm para genes de producción más tardía como *Il6* seguían aumentando, siendo mayores en las células carentes de lipina-2. Igualmente, en macrófagos humanos los niveles del ARNm de *IL6* estaban considerablemente aumentados en las células con expresión disminuída de lipina-2 tras 4 h de tratamiento con LPS (Figura 28 C). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles del mRNA de *TNF- $\alpha$* , probablemente debido a que esta citoquina tiene sus mayores niveles de expresión a tiempos más tempranos.

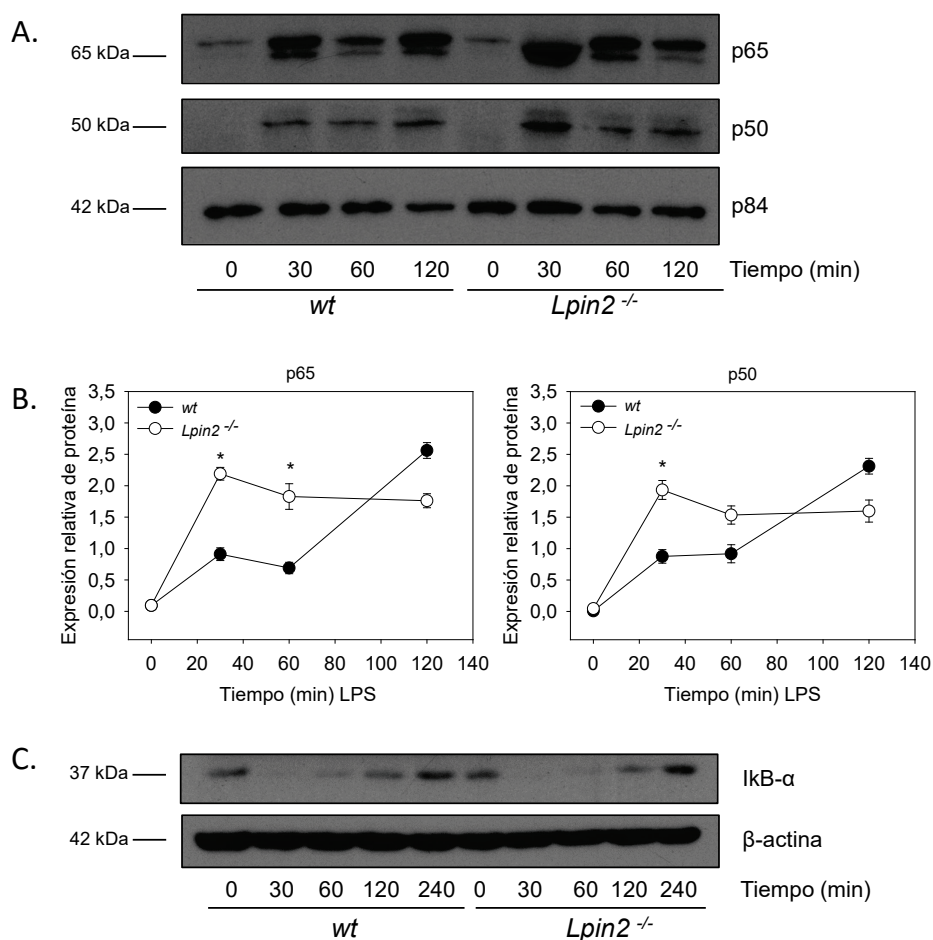
Considerando estos resultados, se planteó la hipótesis de que la lipina-2 era necesaria para una adecuada señalización celular vía TLR4 y se procedió a su estudio.

### **1.2.3 La falta de lipina-2 incrementa la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo tras la activación de TLR4.**

La expresión génica de *Il1b* depende de la activación de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción implicado en la inducción de numerosas citoquinas proinflamatorias, entre ellas la pro-IL-1 $\beta$  (55).

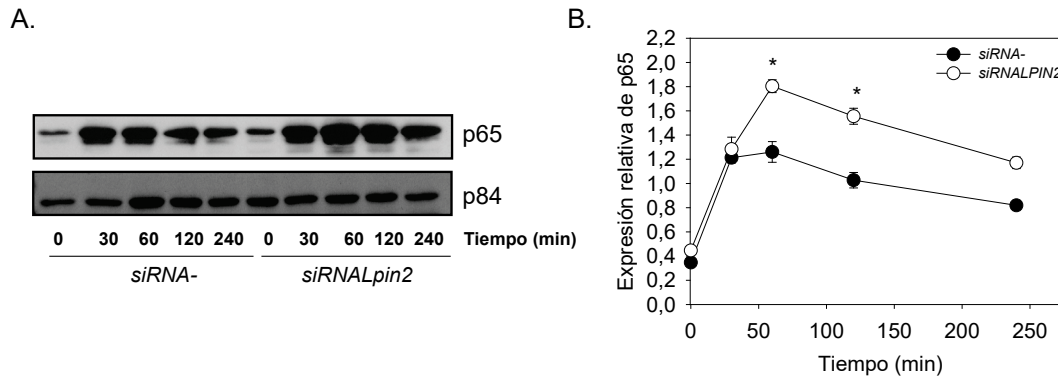
Puesto que la falta de lipina-2 producía un aumento de la expresión del ARNm que da lugar a pro-IL-1 $\beta$  tras estimulación celular (Figura 26), se planteó estudiar si esta enzima modulaba la activación de NF- $\kappa$ B. Para ello, se analizó el efecto que producía la disminución de la expresión de lipina-2, o su falta, sobre la traslocación de p65 y de p50 al núcleo, dos componentes de la familia de proteínas NF- $\kappa$ B (24). Estos análisis se llevaron a cabo mediante *immunoblot* en macrófagos celulares de distinta procedencia, tanto murinos como humanos.

La traslocación al núcleo de las proteínas p50 y p65 podía observarse tras 30 minutos de tratamiento con LPS en BMDM, siendo esa traslocación mayor en las células procedentes de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> que en las de animales *wt* (Figura 29 A). La presencia, tanto de p65 como de p50 en el núcleo, se mantenía durante las 2 horas de tratamiento analizado, presentando los niveles más altos y las mayores diferencias entre las células de los animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> y *wt* a los 30 minutos de tratamiento. Además, en estas mismas condiciones también se analizó la degradación de la proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , en el citoplasma. En la Figura 29 C se observa que la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  tras la activación celular con LPS es completa a los 30 minutos de tratamiento. Sin embargo, a 4 h de tratamiento de LPS, la expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  parece aumentar más en las células de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> frente a las células de animales *wt*, hecho que podría deberse a que el propio NF- $\kappa$ B, más activado en las células sin lipina-2, activa la expresión de su propio represor (259).



**Figura 29. Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de NF-κB durante la activación mediada por LPS en BMDM procedentes de animales wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup>.** Los BMDM fueron estimulados con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. A) Análisis de la expresión proteica de p65 y p50 en extractos nucleares por inmunoblot usando anticuerpos específicos y usando p84 como control de carga. B) Cuantificación relativa de la expresión proteica de p65 y p50 en núcleo respecto a p84 mediante densitometría de las bandas de interés utilizando el Software Quantity One®. C) Análisis de la expresión proteica de IκB-α en extractos citoplasmáticos por inmunoblot mediante anticuerpos específicos y usando actina como control de carga. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Del mismo modo que en BMDM, los macrófagos humanos con una reducida expresión de lipina-2 presentaron una mayor traslocación de la subunidad p65 de NF-κB al núcleo de la célula tras el tratamiento con LPS (Figura 30). En células control, la mayor traslocación de p65 a núcleo se producía a los 30 minutos de estimulación, manteniéndose durante la primera hora de tratamiento. Después de ese tiempo, los niveles de este factor de transcripción disminuían considerablemente. Sin embargo, los macrófagos humanos con niveles reducidos de lipina-2 presentaban una mayor traslocación de p65 a núcleo durante la primera hora de tratamiento, y los mantenían muy elevados hasta las 4 h analizadas. Estas diferencias en la activación de NF-κB entre las células que expresan y no expresan lipina-2, son las que podrían indicar el motivo por el cual la falta de lipina-2 lleva a un mayor aumento de la producción de pro-IL-1β.



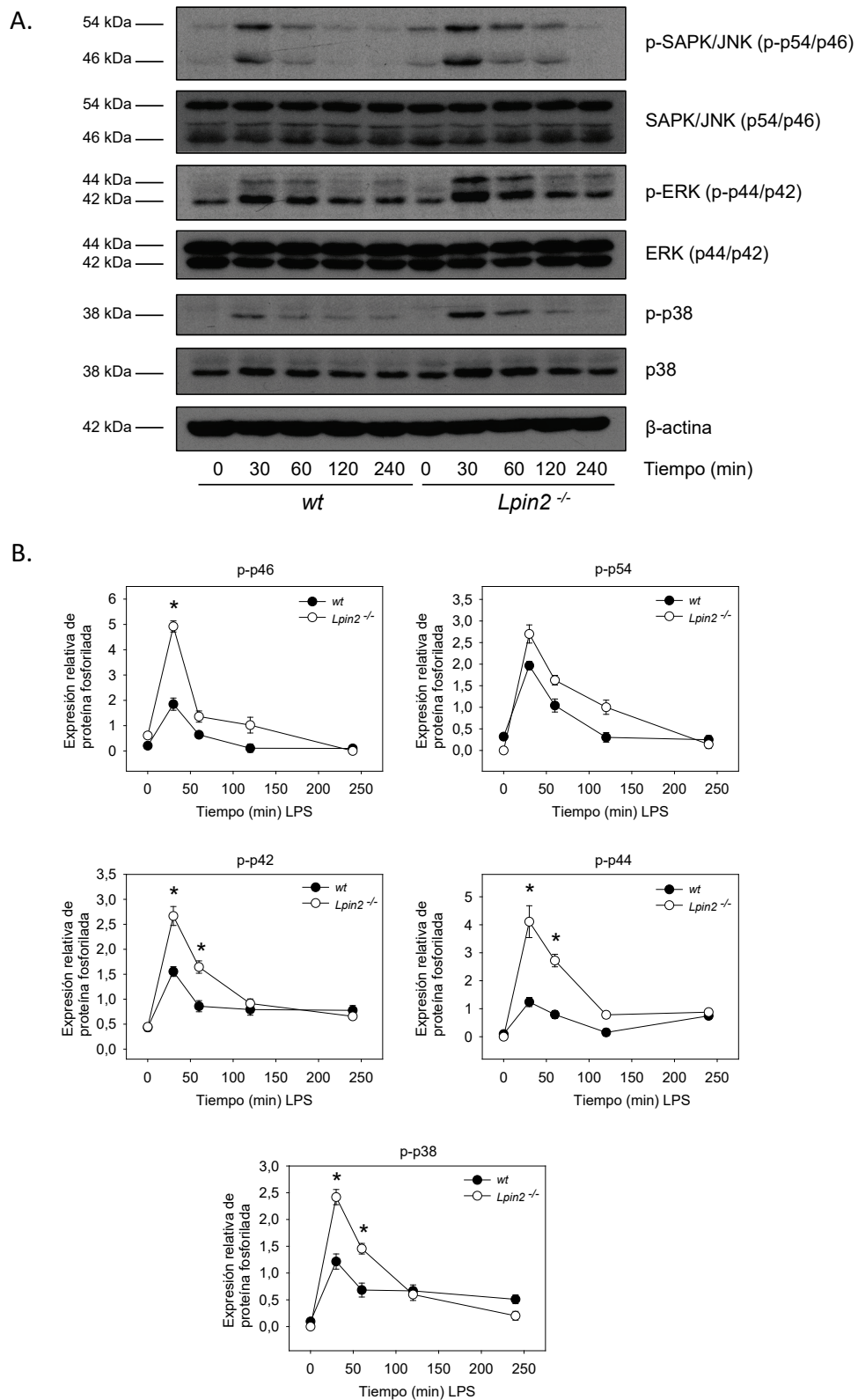
**Figura 30. Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de NF- $\kappa$ B durante la activación mediada por LPS en macrófagos humanos.** Los macrófagos humanos fueron silenciados con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a la lipina-2 (siRNALpin2) y estimulados con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. A) Análisis de la expresión proteica de p65 en extractos nucleares por inmunoblot usando un anticuerpo específico y usando p84 como control de carga. B) Cuantificación relativa de la expresión proteica de p65 en núcleo respecto a p84 mediante densitometría de las bandas de interés utilizando el Software Quantity One®. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Por tanto, teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que la lipina-2 regula la activación de NF- $\kappa$ B durante la estimulación por LPS tanto en macrófagos murinos como humanos.

#### 1.2.4 La falta de lipina-2 aumenta la activación de las MAPK tras la activación de TLR4

La cascada de señalización de las MAPK es otra de las vías que regulan la producción de citoquinas proinflamatorias a través de la activación de TLRs (19). Por ello, se planteó estudiar si la lipina-2 podría regular la activación de estas quinasas. Con esta finalidad, se analizó mediante *inmunoblot* el grado de fosforilación de cada uno de los componentes de esta familia de proteínas: JNK, ERK y p38, en BMDMs estimulados con LPS.

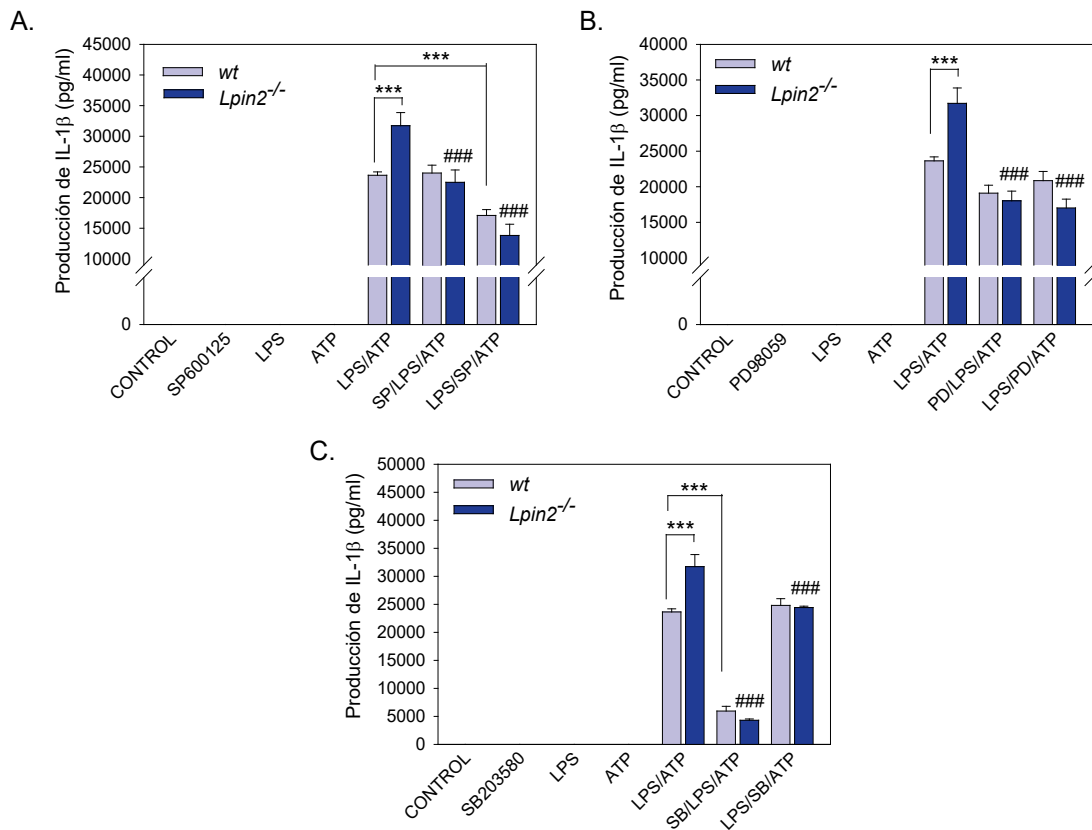
En la Figura 31 se aprecia que en BMDM, el tratamiento con LPS promueve la fosforilación de las MAPKs, JNK, ERK y p38 con un pico máximo a 30 minutos. Se observa también, que la falta de lipina-2 incrementa la fosforilación de las tres quinasas con respecto a las células control. Cabe destacar que la falta de lipina-2 en BMDM no sólo aumentaba la fosforilación de JNK a 30 minutos de tratamiento con LPS, sino que también, mantenía ese estado de fosforilación hasta las dos horas de tratamiento, mientras que en las BMDM procedentes de animales *wt*, la fosforilación de JNK desaparecía a partir de una hora de tratamiento. En el caso de la fosforilación de ERK y de p38, es importante señalar que las grandes diferencias entre células que expresan la lipina-2 y las que no, se observan a 30 y 60 minutos tras la estimulación con LPS, y que a partir de esos tiempos, los niveles en la fosforilación de esas dos MAPK disminuyen hasta casi desaparecer, tanto en las células de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> como en las de animales *wt*.



**Figura 31. Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de las MAPK durante la activación mediada por LPS en BMDM procedentes de animales *wt* y *Lpin2*<sup>-/-</sup>.** Los BMDM se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Los macrófagos fueron estimulados con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. A) Análisis del grado de fosforilación de JNK, ERK y p38 en extractos celulares por inmunoblot usando anticuerpos específicos y usando las proteínas totales como control de carga. B) Cuantificación relativa del grado de fosforilación de JNK, ERK y p38 respecto a las proteínas totales mediante densitometría de las bandas de interés utilizando el Software Quantity One®. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$ .

Gracias a estos resultados se puede concluir que la lipina-2 regula negativamente la activación de las MAPK a través de estímulos que activan el TLR4 como es el LPS. Esta podría ser otra de las causas por las que las células sin lipina-2 producen una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias por LPS. Además, dado que las MAPK podrían intervenir en la fosforilación y activación de ciertos componentes del inflammasoma, como ASC, los resultados indican que la lipina-2 también podría estar alterando la activación de ese complejo a través de las fosforilaciones que tienen lugar a través de las MAPK.

Para comprobar si la activación de las MAPK alteraba la producción de IL-1 $\beta$  madura, se utilizaron inhibidores de las tres quinasas estudiadas.



**Figura 32. Papel de las MAPK en la producción de IL-1 $\beta$  en BMDM.** Se recogieron sobrenadantes de BMDM que habían sido estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min, en presencia o no de los inhibidores de JNK (SP600125, 10  $\mu$ M) (A), MEK (PD98059, 10  $\mu$ M) (B) y p38 (SB203580, 10  $\mu$ M) (C), antes de la primera señal (LPS) o de la segunda señal (ATP) según se indica. Se analizó la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* muestran significancia con respecto al wt tratado con LPS y ATP. \*\*\*  $p < 0,001$ . # muestran significancia con respecto al Lpin2<sup>-/-</sup> tratado con LPS y ATP. ###  $p < 0,001$ .

Los resultados obtenidos indicaron que la sobreproducción de IL-1 $\beta$  dependiente de lipina-2 estaba relacionada con la activación de las MAPK (Figura 32). En las células control, la inhibición de JNK (S600125) inhibe la producción de IL-1 $\beta$  sólo cuando es añadido antes que el ATP (2<sup>a</sup> señal), pero no lo hace cuando se añade antes que el LPS (1<sup>a</sup> señal). El

inhibidor de la quinasa de ERK, MEK, PD98059, no reduce significativamente la producción de IL-1 $\beta$  en estas células. Por su parte el inhibidor de p38, SB203580, inhibe la producción de IL-1 $\beta$  exclusivamente cuando es añadido antes que el LPS, pero no si se añade antes que el ATP. Por todo ello, se puede concluir que en células control ERK no parece tener un papel claro en la producción de IL-1 $\beta$ , mientras que p38 interviene en la primera señal, y JNK en la segunda señal de activación del inflamasoma en BMDMs activados por LPS y ATP (Figura 32).

En cuanto a los BMDM procedentes de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup>, las tres MAPK estudiadas parecían controlar la producción de IL-1 $\beta$ . Esta idea viene apoyada por el hecho de que los inhibidores de las tres MAPKs utilizados reducen la sobreproducción de IL-1 $\beta$  generada en estas células. Y esto ocurre tanto cuando se emplean antes de la primera señal, como cuando se emplean antes de la segunda señal (Figura 32). Por tanto, las MAPK podrían estar relacionadas con una sobreactivación del inflamasoma, quizás a través de la fosforilación de NLRP3 o ASC, en ausencia de lipina-2.

### 1.3 LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3

#### 1.3.1 *La falta de lipina-2 aumenta la expresión de genes implicados en la formación del inflamasoma*

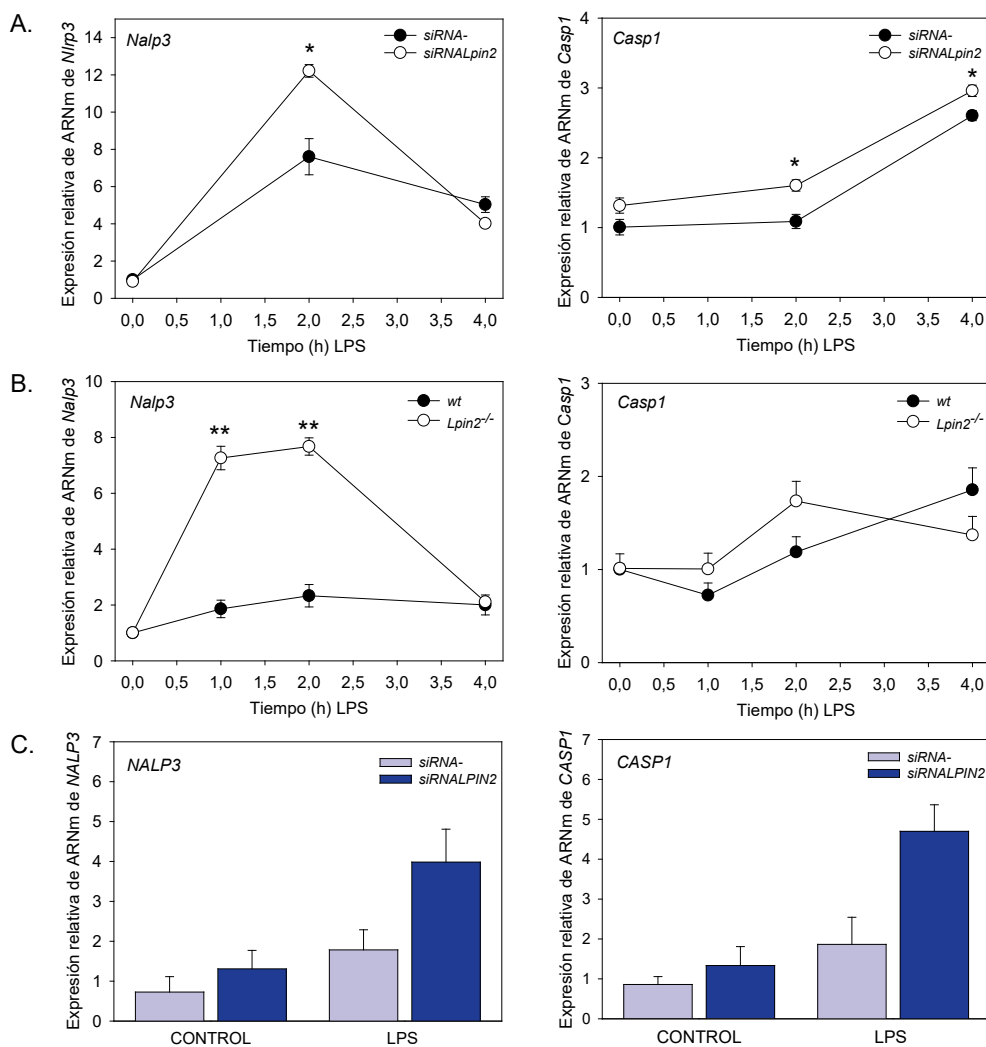
El inflamasoma NLRP3 es un complejo multiproteico que está formado por el receptor NLR, la proteína adaptadora ASC y la proteína efectora caspasa-1. Durante la activación con LPS, aumenta la expresión de NLRP3 por activación de NF- $\kappa$ B, alcanzando los niveles necesarios para el ensamblaje del inflamasoma por un segundo estímulo (55).

Dado que la ausencia de lipina-2 aumenta la maduración de IL-1 $\beta$ , se estudió si esta enzima podría estar impidiendo la expresión de genes que codifican para las proteínas que componen el inflamasoma, especialmente NLRP3. Para ello, se realizaron análisis mediante RT-q-PCR en distintos tipos de macrófagos activados por LPS del gen que codifica para NLRP3.

Los datos indicaron que, tras el tratamiento con LPS, las células RAW 264.7 con menor expresión de lipina-2 presentaban una inducción significativamente mayor de la expresión del ARNm de *Nalp3* (NLRP3) y *casp1* (caspasa-1) con respecto a las células control (Figura 33 A). El efecto de la preactivación por LPS sobre estos genes también se estudió en BMDM (Figura 33 B) y se observó que la expresión de ARNm de *Nalp3* aumentaba tras 1 y 2 horas de tratamiento, disminuyendo después de esos tiempos. Además, esos aumentos eran



significativamente mayores en las células procedentes de animales carentes de lipina-2. Por su parte, el ARNm del gen que codifica para caspasa-1 no cambió sus niveles por la falta de lipina-2, excepto en células RAW 264.7, donde sí parecen estar ligeramente incrementados. Aún así, esas diferencias no parecen ser importantes, ya que no se traducen en cambios en la expresión proteica de pro-caspasa-1 (Figura 23). Finalmente, se analizó el papel de la lipina-2 en la expresión de estos genes en macrófagos humanos. Los resultados indicaron que la activación por LPS incrementaba la inducción de los genes que codifican para NLRP3 y caspasa-1, siendo esa inducción mucho mayor en células que tenían inhibida la expresión de la lipina-2, pero sin llegar a presentar diferencias estadísticamente significativas (Figura 33 C).



**Figura 33. Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión de los genes que codifican para proteínas que componen el inflammasoma.** A) Las células RAW 264.7 transfectadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2); B) Los BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup>; C) Los macrófagos humanos silenciados por nucleofección con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2), fueron estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se extrajo el ARN celular y se analizó la expresión del ARNm codificante para los genes indicados mediante RT-q-PCR utilizando cebadores específicos. Como gen de referencia se utilizaron la Ciclofilina B (A), la Gapdh (B) y la ACTINA (C). Los datos se representan como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* p<0,05, \*\* p<0,01.

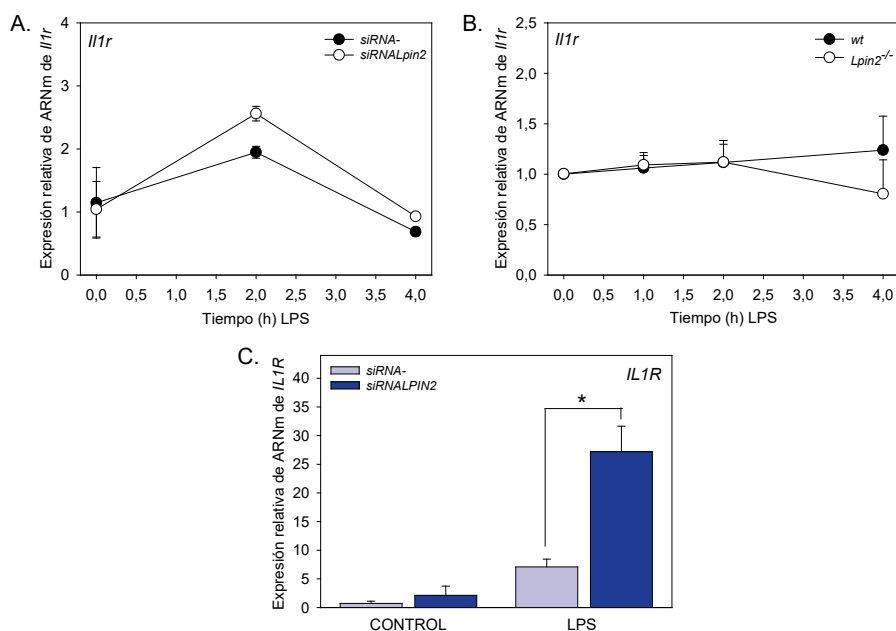


En conjunto parece que la lipina-2 regula de forma negativa la producción de NLRP3 durante la primera señal de activación del inflamasoma. Estos datos invitan a pensar que, tanto en células humanas como en células murinas en las que se ha disminuido la expresión de lipina-2, la activación del inflamasoma podría llegar a niveles mayores, entre otras cosas, por la mayor presencia de NLRP3.

### 1.3.2 La falta de lipina-2 induce la expresión de IL-1R en macrófagos humanos

El receptor de IL-1 $\beta$ , el IL-1R1 es un mediador importante implicado en la respuesta inflamatoria inducida por varias citoquinas, y además de IL-1 $\beta$ , reconoce IL-1 $\alpha$  y al antagonista IL-1RA.

Mediante RT-q-PCR, se analizó la expresión del gen que codifica para este receptor en los distintos tipos de macrófagos.



**Figura 34. Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión del gen que codifican para IL1R.** A) Las células RAW 264.7 transfectadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *Lpin2* (siRNALpin2); B) los BMDM procedentes de animales wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup>; C) los macrófagos humanos silenciados por nucleofección con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *LPIN2* (siRNALpin2), fueron estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se extrajo el ARN celular y se analizó la expresión del ARNm codificante para los genes indicados mediante RT-q-PCR utilizando cebadores específicos. Como gen de referencia se utilizaron la *Ciclofilina B* (A), la *Gapdh* (B) y la *ACTINA* (C). Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* $p < 0,05$ .

En macrófagos murinos, tanto células RAW 264.7 (Figura 34 A) como BMDM (Figura 34 B), no se encontraron incrementos significativamente importantes en la inducción de *Il1r* entre las células con o sin lipina-2 tras el tratamiento con LPS. Sin embargo, este mismo análisis en macrófagos humanos reveló que la activación por LPS aumentaba significativamente la

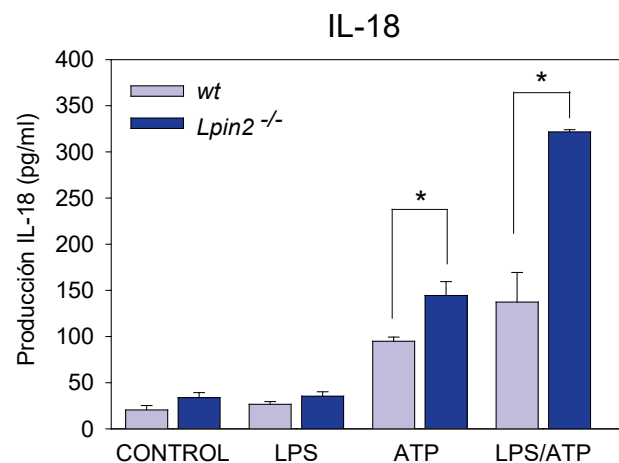
inducción de IL1R en las células con expresión reducida de lipina-2 con respecto a las células control (Figura 34 C).

Según estos datos se puede concluir que la lipina-2 regula la expresión del gen que codifica para IL-1R en macrófagos humanos, pero no en macrófagos murinos.

## 2 CARACTERIZACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE LA LIPINA-2 EN LA SEGUNDA SEÑAL DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 POR ATP, DEFINIENDO SU PAPEL EN LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR P2X7, LOS FLUJOS DE K<sup>+</sup>, LA OLIGOMERIZACIÓN DE ASC, LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-1 Y LOS PROCESOS DE MUERTE CELULAR ASOCIADOS A DICHA ACTIVACIÓN.

### 2.1 LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA PRODUCCIÓN DE IL-18 EN MACRÓFAGOS

Numerosos estudios han descrito que la activación del inflammasoma NLRP3 da lugar no sólo al procesamiento de pro-IL-1 $\beta$ , sino también al de pro-IL-18 (34). La pro-IL-18 es una citoquina que se expresa de forma constitutiva, y su activación y procesamiento también está marcado por la caspasa-1 activa. Para estudiar si la falta de lipina-2 producía aumentos en la liberación de IL-18 en macrófagos, se analizó la presencia de esta citoquina en los sobrenadantes celulares mediante ELISA, tras una activación clásica del inflammasoma NLRP3 con LPS y ATP.



**Figura 35. Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-18 en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup>.** Los BMDM se diferenciaron según el protocolo descrito en materiales y métodos, y fueron estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y posteriormente con ATP (2 mM) durante 40 min. Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la producción de IL-18 mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ .

La Figura 35 representa la producción de IL-18 tras la activación del inflamasoma en BMDM. El análisis mostró un aumento sustancial de la producción de esta citoquina tras el tratamiento con ATP en BMDM preactivados con LPS, siendo ese aumento mucho mayor en macrófagos procedentes de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> que en macrófagos procedentes de animales *wt*. Además, estos aumentos también eran visibles cuando los macrófagos estaban activados únicamente con ATP, ya que la formación de IL-18 madura sólo precisa de la activación del inflamasoma (señal 2).

Estos resultados confirman, por tanto, que la lipina-2 está desempeñando un papel importante para frenar la activación del inflamasoma NLRP3 (señal 2) por ATP.

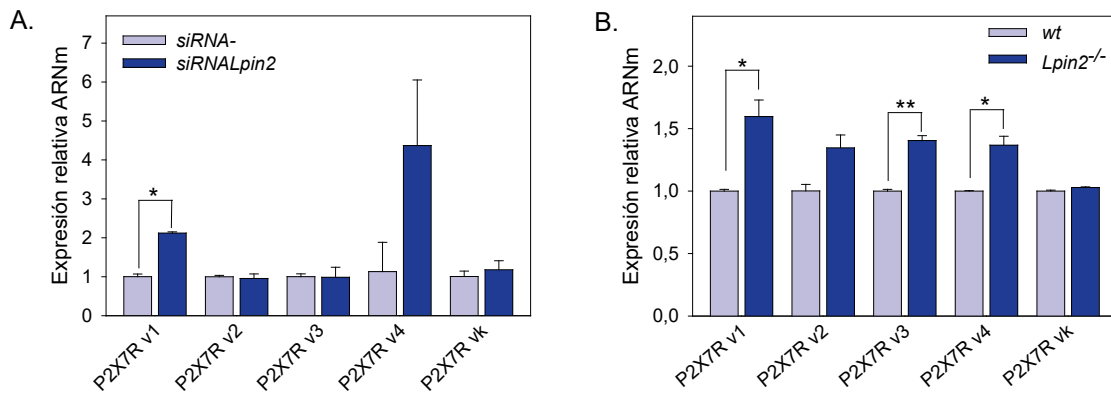
Para resolver la hipótesis que se planteaba con este hallazgo, si la lipina-2 podría regular la ruta que conduce a la activación de la caspasa-1 (señal 2), se estudió el efecto de la preactivación celular por LPS sobre la expresión de ARNm de los distintos componentes que conforman el inflamasoma.

## **2.2 LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 POR ATP A TRAVÉS DEL RECEPTOR P2X7 EN MACRÓFAGOS**

Los receptores P2X7 son canales catiónicos no selectivos activados por ligando, cuyo agonista natural es el ATP, y que se expresan altamente en células de la línea hematopoiética (119-121). Como se ha visto a lo largo de la memoria, la activación de estos receptores por altas concentraciones de ATP puede desencadenar la activación del inflamasoma, con la consecuente secreción de IL-1 $\beta$  madura. Además, dado que los receptores P2X7 están asociados a balsas lipídicas y que la lipina es una enzima del metabolismo lipídico, se planteó la hipótesis de si la lipina-2 podría estar alterando la activación del inflamasoma por cambios en el entorno lipídico del receptor P2X7 y en su activación.

### **2.2.1 La falta de lipina-2 incrementa la expresión de algunas variantes del receptor P2X7**

Se evaluó en primer lugar si en ausencia de lipina-2 podría haber cambios en la expresión de los receptores P2X7. Para ello, se analizó la expresión del ARNm que codifica para cada una de las variantes del receptor (v1-v4 y vk) mediante RT-q-PCR, tanto en células RAW 264.7 como en BMDM de ratón.



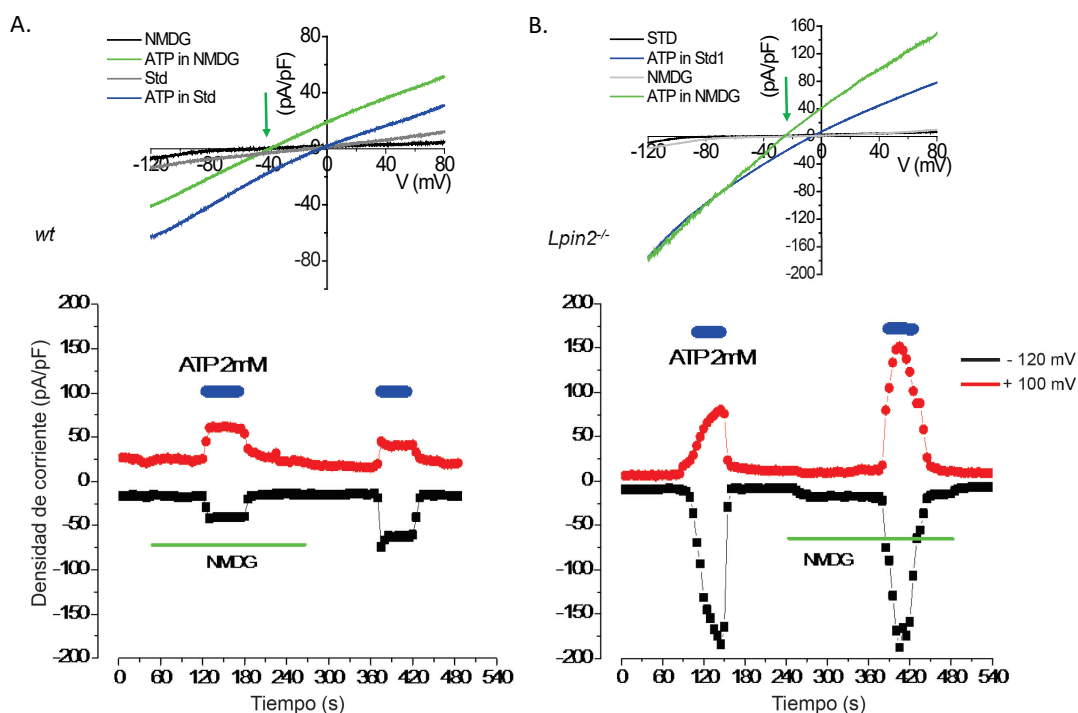
**Figura 36. Efecto de la falta de lipina-2 en la expresión génica de las distintas variantes de los receptores P2X7 en distintos tipos de macrófagos murinos en reposo.** A) Expresión génica de las distintas variantes de los receptores P2X7 en células RAW 264.7. Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2). B) Expresión génica de las distintas variantes de los receptores P2X7 en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup>. Los BMDM se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos. En A, B y C se extrajo el ARN celular y se analizó la expresión del ARNm codificante para los genes de las distintas variantes de P2X7R mediante RT-q-PCR utilizando cebadores específicos. Como genes de referencia se utilizaron la Ciclofilina B (A) y la Gapdh (B). Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Los resultados mostraron que la expresión génica de la variante 1 aumentaba de forma significativa en células RAW 264.7 en las que se había disminuido la expresión de lipina-2 (Figura 36 A). También se observó una tendencia a aumentar la expresión relativa de ARNm de la variante 4 sin llegar a presentar diferencias estadísticamente significativas en presencia y ausencia de lipina-2. Sin embargo, las variantes 2, 3 y k no se vieron alteradas. El análisis realizado en BMDM reveló incrementos significativos de la variante 1, 3 y 4, cuando las células no tenían lipina-2, sin observarse modificaciones en las variantes 2 y k (Figura 36 B).

A la espera de confirmación mediante análisis de niveles de proteína, con estos experimentos se puede concluir que la lipina-2 controla la expresión de ciertas variantes del receptor P2X7.

### 2.2.2 La falta de lipina-2 incrementa las corrientes de iones por ATP a través del canal P2X7

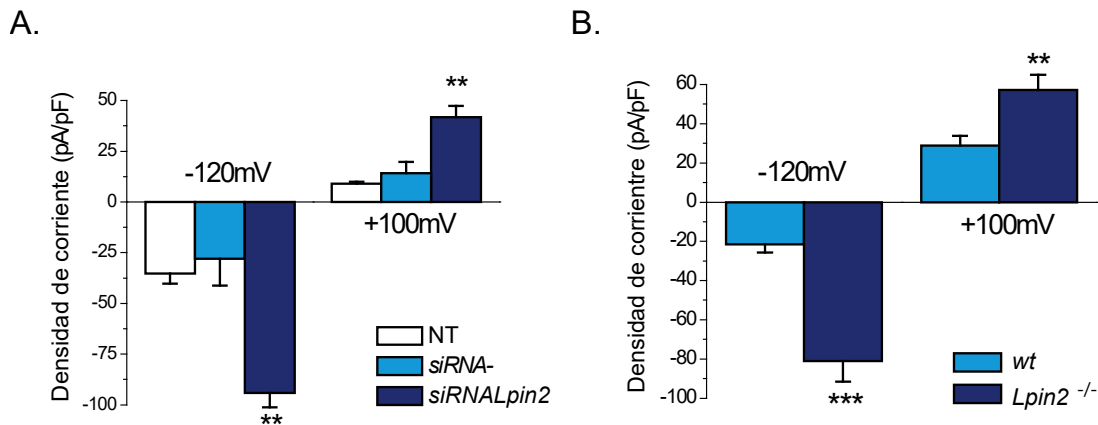
A continuación se estudió si la lipina-2 podía influenciar la funcionalidad del receptor P2X7. Para ello se realizaron técnicas de electrofisiología, realizando experimentos de *patch-clamp* en la configuración de célula entera. Estos ensayos fueron realizados en macrófagos peritoneales procedentes de ratones wt y ratones Lpin2<sup>-/-</sup>, así como también en células RAW 264.7 control y con expresión de lipina-2 reducida.



**Figura 37. Registros de corrientes de iones producidas por ATP en macrófagos peritoneales.** Los macrófagos peritoneales se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Se muestran experimentos de patch-clamp en macrófagos procedentes de animales WT (A) o animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> (B) tratados con ATP (2 mM) en presencia o ausencia de NMDG<sup>+</sup> (140 mM). Los gráficos superiores muestran las curvas de densidad de corriente en función del voltaje. Los gráficos inferiores muestran la densidad de corriente a lo largo del tiempo para los valores de potencial extremos (-120 mV y +100 mV). Los gráficos son representativos de 25 células procedentes de 6 animales wt y 39 células obtenidas de 3 animales *Lpin2*<sup>-/-</sup>.

En las células procedentes de animales wt (Figura 37 A) se observa que, tras el tratamiento con ATP (2 mM), tanto las corrientes de entrada (-120 mV) como las de salida (+100 mV) aumentan de forma considerable, recuperando los niveles iniciales al retirar el ATP del medio extracelular. Además, al aplicar ATP, el potencial de reversión de la célula (Figura 37 A derecha, flecha verde) era cercano a 0 mV. Al sustituir la solución estándar extracelular por NMDG<sup>+</sup> (140 mM), se observa una reducción muy importante de las corrientes de entrada producidas por activación celular con ATP, y en estas condiciones, el potencial de reversión de la célula se desplazaba de 0 mV a -50 mV, más cercano al potencial de equilibrio del K<sup>+</sup>. Posteriormente, se estudiaron las corrientes de iones en las células carentes de lipina-2 (Figura 37 B). Se registraron también aumentos importantes en las corrientes de entrada y salida por el ATP, mayores que los observados en los macrófagos de animales wt. Curiosamente, cuando faltaba la lipina-2, la aplicación de NMDG<sup>+</sup> basal como solución extracelular no cambiaba el efecto del ATP, e incluso aumentaba las corrientes de salida de la célula. Otra diferencia encontrada al comparar los registros de corrientes de las células sin lipina-2 con respecto a las de animales wt era que el potencial de reversión en presencia de NMDG<sup>+</sup> en las células sin lipina-2 era cercano a -30 mV, estando más alejado

del potencial de membrana de reposo (cercano a  $-80$  mV) que el de las células de animales *wt* ( $-50$  mV).



**Figura 38. Densidad media de corriente en macrófagos murinos de distinta procedencia.** A) Densidad de corriente media en células RAW 264.7 tras análisis de patch-clamp de célula entera. Las corrientes de células RAW 264.7 tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *Lpin2* (siRNALpin2) o no transfectadas (NT) se analizaron tras la estimulación por ATP (2 mM) usando el software pClamp® 10.2. B) Densidad de corriente media en macrófagos peritoneales de animales WT y de animales carentes de lipina-2 tras análisis de Patch-clamp de célula entera. Los macrófagos peritoneales se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Las corrientes se obtuvieron tras la estimulación por ATP (2 mM) usando el software pClamp® 10. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de 4-6 células obtenidas de 3 experimentos diferentes (A) y de 25 células procedentes de 6 animales WT y 39 células obtenidas de 3 animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> (B). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 38 se representa la densidad media de corriente registrada a  $-120$  mV y  $+100$  mV, expresada como el cociente entre intensidad (picoAmperios) y capacitancia (picofaradios), tanto en células RAW 264.7 como en BMDM.

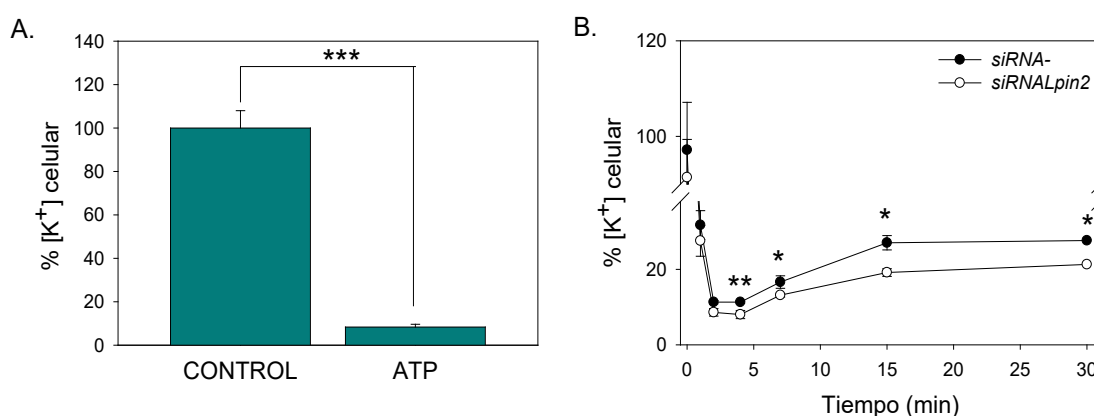
Tras estimular las células RAW 264.7 con ATP (Figura 38 A), se observó que las células con expresión de lipina-2 disminuida presentaban una mayor densidad de corriente, tanto de entrada ( $-120$  mV) como de salida ( $+100$  mV), con respecto a las que habían sido tratadas con un siRNA control. Además, se analizaron también células RAW 264.7 que no habían sido sometidas al proceso de silenciamiento génico, observándose en ellas un comportamiento similar que el presentaban las células tratadas con el siRNA control. Estos datos demuestran, por tanto, que la transfección por lipofección para disminuir la expresión de la lipina-2, no afecta a las corrientes iónicas de la célula. En la Figura 38 B, se representa la densidad media de corriente obtenida en macrófagos peritoneales de animales *wt* y *Lpin2*<sup>-/-</sup>, observándose un comportamiento similar al de las células RAW 264.7; los macrófagos carentes de lipina-2 presentaban una densidad media de corriente de entrada y salida muy significativamente mayor que las células procedentes de animales *wt*.

Considerando estos datos, se puede concluir que la lipina-2 juega un papel importante en la función de los receptores P2X7 tras la activación por ATP a altas concentraciones, de

modo que la ausencia de lipina-2 produce un mayor flujo iónico en respuesta a ATP, motivado posiblemente por la presencia de un poro diferente y más grande.

### 2.2.3 La falta de lipina-2 aumenta la salida de $K^+$ tras la activación del inflammasoma con LPS/ATP

Los niveles de  $K^+$  intracelulares son muy importantes para regular la activación del inflammasoma. En la literatura se ha descrito que la activación del inflammasoma NLRP3 por ATP y elementos particulados está promovida por una caída en los niveles de  $K^+$  en el interior celular (94, 96), que es detectada por la célula como señal de peligro, provocando el ensamblaje del inflammasoma. Dado que en las células sin lipina-2 había mayores corrientes de iones tras la aplicación de ATP a una concentración de 2 mM, se planteó estudiar si la falta de la lipina-2 podría incrementar la salida de  $K^+$  y así regular los niveles de  $K^+$  celulares tras la activación del receptor P2X7. Utilizando como modelo celular las células RAW 264.7 activadas con ATP, se midió el contenido celular de  $K^+$  mediante espectrometría de absorción atómica, según la técnica descrita en materiales y métodos.



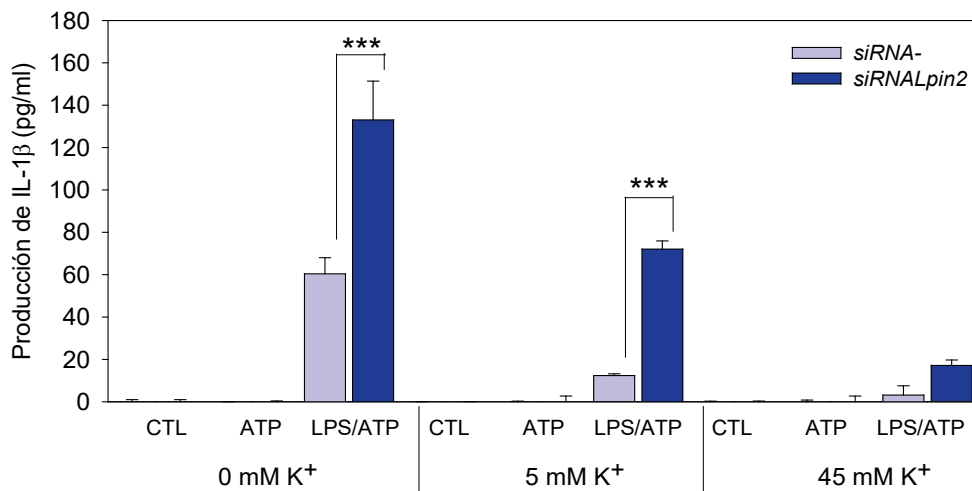
**Figura 39. Efecto de la falta de lipina-2 en el análisis de los niveles de  $K^+$  intracelulares en células RAW 264.7 tras la activación con ATP.** A) Células RAW 264.7 tratadas con ATP 2 mM durante 40 min en medio con 5 mM  $K^+$ . B) Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con ATP (2 mM) durante los tiempos indicados en medio con 5 mM  $K^+$ . En A y B, el contenido intracelular de  $K^+$  se cuantificó mediante espectrometría de emisión atómica de plasma ICP-OES (Varian). Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 39 se muestra que los niveles intracelulares de  $K^+$  sufren una rápida y abrupta caída tras tratamiento con ATP. Tras 2 min de aplicación de ATP, los niveles de  $K^+$  intracelulares disminuían alcanzando sus niveles mínimos, y a los 4 min de tratamiento, ya eran significativamente menores en las células con expresión de lipina-2 reducida. Además, cabe destacar que durante el resto del experimento se mantuvieron diferencias significativas de los niveles intracelulares de  $K^+$ , entre las células con y sin lipina-2, siendo esos niveles siempre menores cuando la lipina-2 estaba reducida.

Estos datos son indicativos de que la lipina-2 está implicada en la regulación de las corrientes de salida de  $K^+$  a través del poro P2X7.

### 2.2.4 Efecto de la concentración extracelular de $K^+$ sobre la producción de IL-1 $\beta$ en células sin lipina-2

Para verificar que los niveles intracelulares de  $K^+$  influían en la activación del inflamasoma en células sin lipina-2, se estimularon las células en medios con distintas concentraciones de  $K^+$ , que permitían regular la salida de este ión de la célula. Cuando en el medio extracelular existen altas concentraciones de este ión (45 mM  $K^+$ ), se impide la salida de  $K^+$  intracelular, y se favorece su salida cuando en el medio extracelular existen bajas concentraciones de  $K^+$  (0 mM  $K^+$ ).



**Figura 40. Efecto de los niveles extracelulares de  $K^+$  sobre la producción de IL-1 $\beta$  en células RAW 264.7.** Los sobrenadantes de células RAW 264.7 tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2), y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min en medios con distinta concentración de  $K^+$  (0 mM  $K^+$ , 5 mM  $K^+$  y 45 mM  $K^+$ ), fueron analizados para cuantificar la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Los resultados indicaron que las células tratadas con LPS y ATP en un medio extracelular sin  $K^+$ , producían más IL-1 $\beta$  que las células tratadas en un medio con concentraciones fisiológicas de  $K^+$  (5 mM), siendo en ambos casos la liberación de IL-1 $\beta$  significativamente mayor en las células en las que la expresión de lipina-2 había sido disminuida con respecto a las células control (Figura 40). Este efecto podría ser debido a que la estimulación en medio sin  $K^+$ , producía una mayor o más rápida salida del ión. Sin embargo, cuando las células eran estimuladas en un medio con alto contenido de  $K^+$  (45 mM), la producción de IL-1 $\beta$  disminuía. En estas condiciones, aunque la producción de IL-1 $\beta$  en células con menor expresión de lipina-2 seguía la misma tendencia que la observada al



incubar las células en medios con 0 y 5 mM K<sup>+</sup>, no se encontraron diferencias significativas con respecto a las células control (Figura 40). Esto podría deberse a que al estimular las células en un medio con 45 mM de K<sup>+</sup>, la diferencia osmótica originada impedía la salida de K<sup>+</sup> de la célula, manteniendo su concentración intracelular independientemente de que el receptor de ATP fuera activado o no, y en esta situación, la regulación que la lipina-2 pudiera ejercer sobre la actividad del receptor P2X7 no tendría relevancia en cuanto a la activación del inflamasoma.

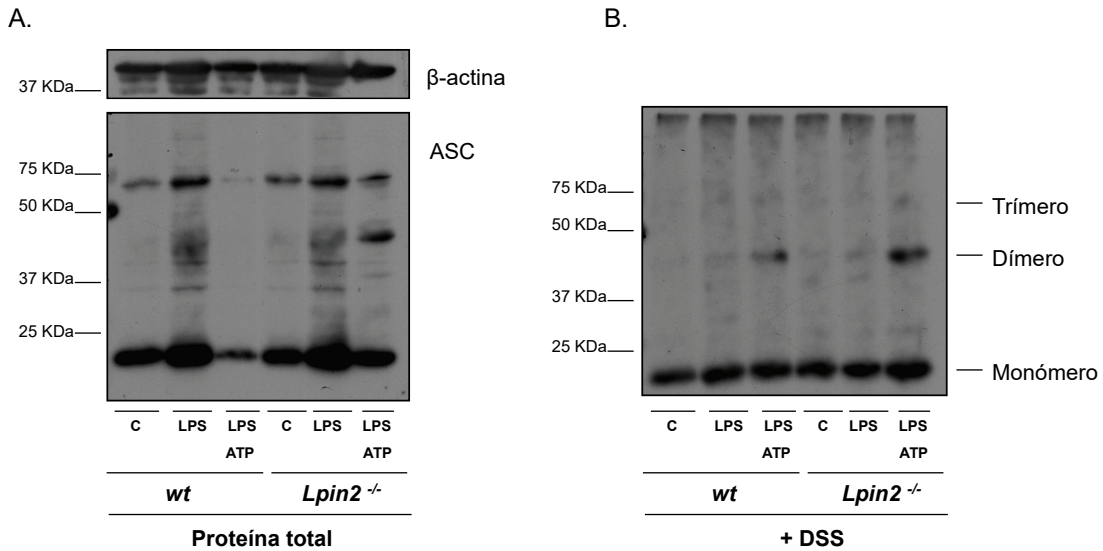
Todo ello apoya la idea de que una mayor salida de K<sup>+</sup> o una salida de K<sup>+</sup> más sostenida en el tiempo en las células sin lipina-2 es, al menos en parte, responsable del aumento de la activación del inflamasoma en estas células, influyendo en la capacidad celular de producir IL-1 $\beta$ .

### 2.3 LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA OLIGOMERIZACIÓN DE ASC MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA CON LPS/ATP

La oligomerización de ASC y formación de *specks* dependiente de NLRP3 es considerada un mecanismo común de la activación de este inflamasoma. Una vez oligomerizada, la proteína ASC ya es capaz de reclutar a la caspasa-1, que se autoprocresa y activa (52).

Los datos presentados hasta ahora en la memoria sugieren que la falta de lipina-2 incrementa la activación del inflamasoma NLRP3, produciendo niveles mayores de IL-1 $\beta$ . En este apartado se estudió si la lipina-2 intervenía en la oligomerización de ASC.

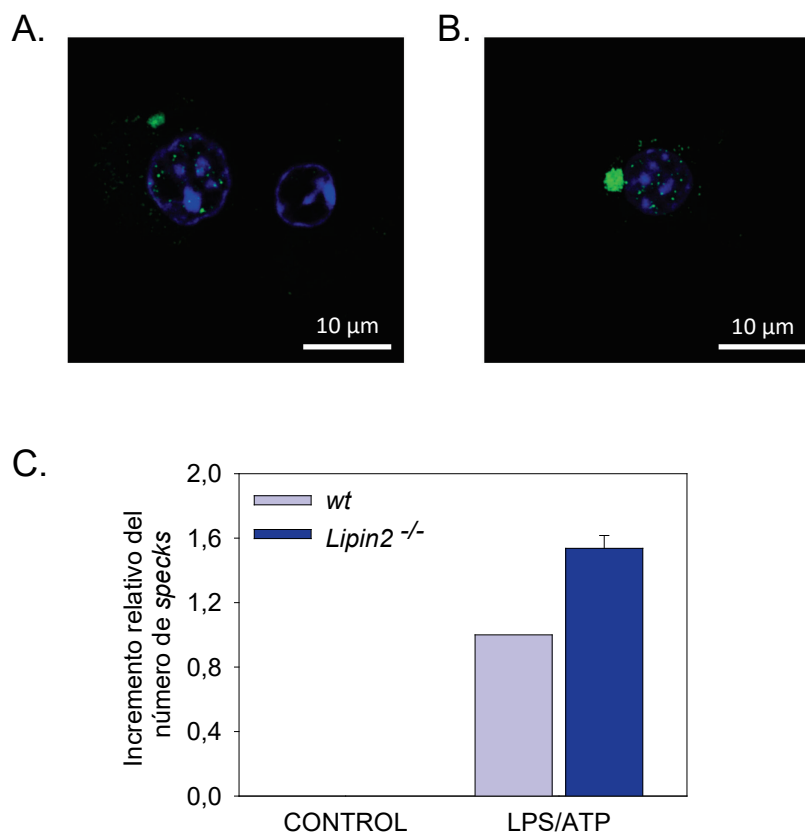
Para ello se obtuvieron BMDM de ratones *wt* y de ratones *Lpin2*<sup>-/-</sup>, y se estimularon con LPS y ATP. El estado de oligomerización de ASC en estas células se estudió tratando los lisados celulares con DSS, un reactivo que produce puentes químicos (*crosslinking*) y mantiene los oligómeros de ASC unidos. Posteriormente, mediante *immunoblot* usando un anticuerpo específico para ASC, se visualizó la formación de oligómeros de ASC producidos en cada una de las condiciones a estudiar.



**Figura 41. Efecto de la falta de lipina-2 en la formación de oligómeros de ASC por LPS/ATP en BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup>.** Los BMDM se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Las células una vez diferenciadas se trataron con LPS (1 µg/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min. A) Análisis de la expresión proteica de ASC en extractos celulares por inmunoblot usando un anticuerpo específico y usando la actina como control de carga. B) Análisis por inmunoblot de la formación de oligómeros de ASC obtenidos mediante crosslinking de extractos celulares. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes

Los resultados obtenidos indicaron que las células carentes de lipina-2, presentaban una mayor formación de oligómeros de ASC (Figura 41), principalmente dímeros, tras el tratamiento conjunto de LPS y ATP. Los dímeros de ASC podrían después, oligomerizar formando estructuras supramoleculares más complejas, responsables de activar la caspasa-1.

Posteriormente se analizó si la ausencia de lipina-2, tenía o no efecto sobre el número de specks que se producían tras estimular las células con LPS y ATP. Para ello se realizaron tinciones inmunofluorescentes con anticuerpos específicos para ASC y se cuantificó la presencia de specks por microscopía.



**Figura 42. Efecto de la falta de lipina-2 sobre la formación de specks en BMDM.** Los BMDM procedentes de animales wt (A) y *Lpin2*<sup>-/-</sup> (B) fueron tratados con LPS (1 μg/ml, 4 h) y con ATP (2 mM, 40 min). Posteriormente, se realizó una tinción por inmunofluorescencia con un anticuerpo frente a ASC, usando un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. El número de specks en las células se analizó mediante microscopía confocal (40X) (C). Los datos se representan como la media ± desviación estándar de varios campos de células elegidos aleatoriamente. Se analizaron 700 células procedentes de animales wt y 1400 células procedentes de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup>. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 42 se observa que la formación de *specks* inducida tras el tratamiento de las células con LPS y ATP era mayor cuando faltaba la lipina-2. Tras activación celular, los macrófagos procedentes de animales wt presentaban, además, *specks* de menor tamaño que los procedentes de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup>. Este resultado se correlacionaba con el aumento de oligomerización de ASC observado en las células carentes de lipina-2, tratadas con estos mismos estímulos (Figura 41).

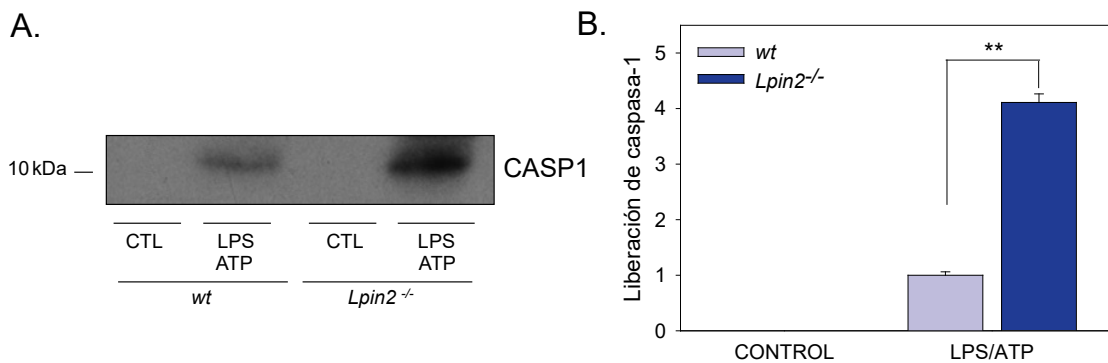
Los datos obtenidos sugieren que la lipina-2 controla la activación del inflammasoma NLRP3 a través de la oligomerización de ASC.

## 2.4 LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA ACTIVACIÓN DE LA CASPASA-1 TRAS LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA CON LPS/ATP.

Dado que la falta de lipina-2 aumentaba la activación de los receptores P2X7 y la consiguiente oligomerización de ASC, el siguiente proceso a estudiar fue la activación de la caspasa-1, último paso de esta vía que dará lugar a la conversión de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18 en IL-1 $\beta$  madura e IL-18 madura respectivamente.

La activación de la caspasa-1 se puede determinar mediante el análisis por *immunoblot* de esta proteína en sobrenadantes de células que hayan sido activadas. Esto se debe a que la caspasa-1 activa, sale de la célula acompañada por la IL-1 $\beta$  madura.

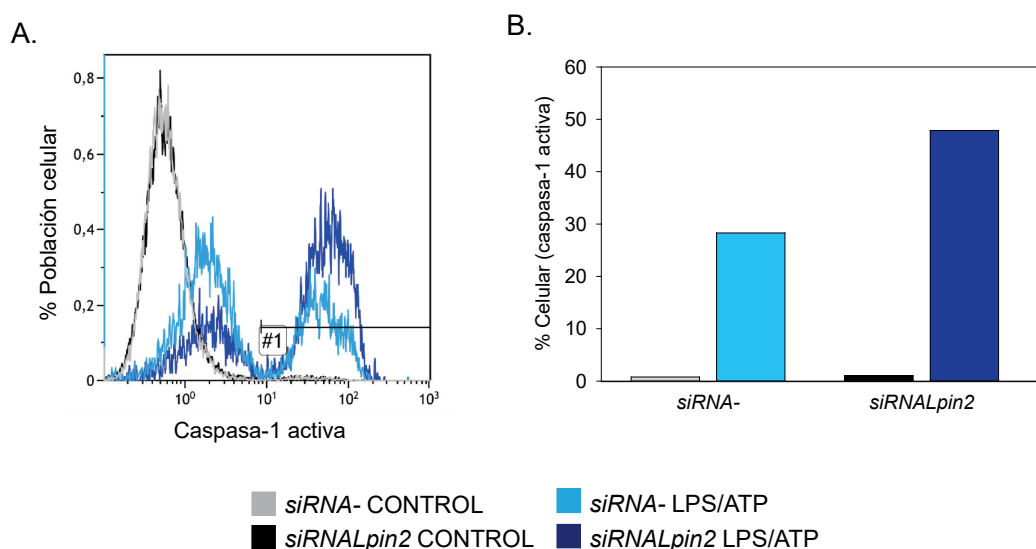
Para analizar los niveles de caspasa-1 en el sistema aquí empleado, los BMDM de ratones *wt* y de ratones *Lpin2*<sup>-/-</sup> preactivados con LPS, fueron tratados con ATP para activar el ensamblaje del inflammasoma NLRP3.



**Figura 43. Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de la caspasa-1 y de la IL-1 $\beta$  en BMDM procedentes de animales *wt* y *Lpin2*<sup>-/-</sup>.** Los BMDM se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Estos macrófagos fueron después estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min. A) Expresión proteica de la caspasa-1 activa en los sobrenadantes celulares obtenidos a partir del cultivo de esas células. B) Cuantificación relativa de la expresión proteica de la caspasa-1 mediante densitometría del inmunoblot en el Software Quantity One®. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

En estos estudios se observó que los BMDM de ratones *Lpin2*<sup>-/-</sup> liberaban una mayor cantidad de caspasa-1 activa (10 kDa) que los macrófagos de ratones *wt* (Figura 43), lo que concuerda con una mayor liberación de IL-1 $\beta$  madura en las células carentes de lipina-2, indicando que la lipina-2 también regula negativamente la liberación de caspasa-1 activa.

A continuación se evaluó la actividad caspasa-1 intracelular en célula viva y se estudió el papel de la lipina-2 en este proceso. Para ello se cuantificó la activación de la caspasa-1 intracelular mediante citometría de flujo, utilizando un inhibidor específico e irreversible de caspasa-1 activa, unido a FITC (FLICA®).



**Figura 44. Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de la caspasa-1 por LPS/ATP en células RAW 264.7.** Las células RAW 264.7 se trataron con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min, después de haber sido silenciadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *Lpin2* (siRNALpin2). Posteriormente, se marcaron con FLICA® según se indica en materiales y métodos. A) Análisis de la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. B) Representación de la cuantificación en % de las células que presentan caspasa-1 activa. Los datos se procesaron mediante el software Kaluza™ y por condición se analizaron 30000 eventos. Los diagramas son representativos de tres experimentos independientes.

Tras la activación del inflammasoma NLRP3 con LPS y ATP, las células RAW 264.7 en las que la lipina-2 había sido disminuida mediante tecnología de siRNA, mostraron un mayor porcentaje de células fluorescentes, indicativo de caspasa-1 activa, que las células tratadas con un siRNA control (Figura 44). Estos resultados concordaban con los datos obtenidos mediante inmunoblot en los BMDM *wt* y *Lpin2*<sup>-/-</sup> (Figura 43), y permitían concluir que la lipina-2 participa en los procesos de activación de la caspasa-1.

Para profundizar más en el papel que desempeñaba la caspasa-1 en la producción de IL-1 $\beta$  en ausencia de lipina-2, se analizó la producción de IL-1 $\beta$  en presencia o ausencia de dos inhibidores: YVAD, que es un inhibidor específico de la caspasa-1, y ZVAD, que es un inhibidor que inhibe todas las caspasas.

Los datos indicaron que la producción de IL-1 $\beta$  en células *wt* y la sobreproducción de IL-1 $\beta$  en células *Lpin2*<sup>-/-</sup> disminuía casi por completo en presencia de YVAD, pero sin llegar a desaparecer (Figura 45). Tras inhibir de forma general las caspasas mediante el uso de ZVAD, se observó una disminución de la producción de IL-1 $\beta$  muy similar a la encontrada cuando se usaba el inhibidor específico de caspasa-1 (Figura 45). Por tanto, el principal mecanismo implicado en la producción exacerbada de IL-1 $\beta$  que tenía lugar cuando faltaba la lipina-2 era la activación de la caspasa-1.

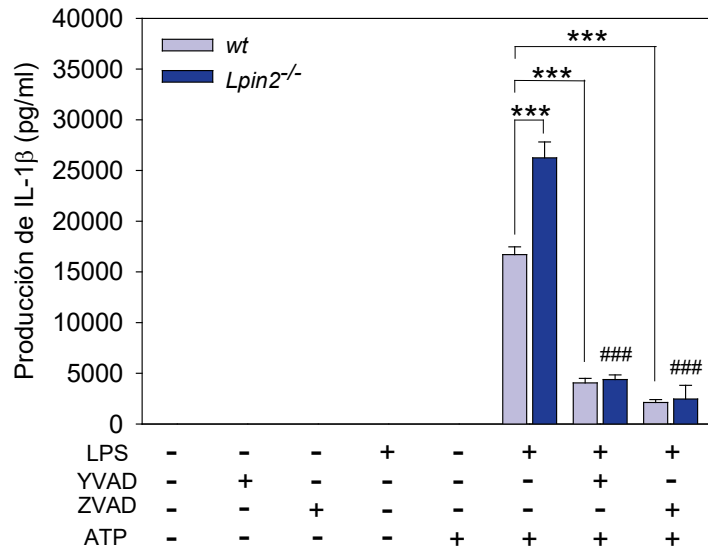


Figura 45. Efecto de los inhibidores de caspasa en la producción de IL-1β en BMDM de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup>. Los BMDM fueron tratados con el inhibidor de caspasa-1, YVAD (10 μM) o con el inhibidor general de caspasas, ZVAD (10 μM), y estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min. Posteriormente, se recogieron sobrenadantes y se analizó la producción de IL-1β mediante ELISA. Los datos se representan como la media ± desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. # muestran significancia con respecto al Lpin2<sup>-/-</sup> tratado con LPS y ATP. ### p<0,001.

Para comprobar que los efectos observados con estos inhibidores se deben a la inhibición de caspasas y no a efectos no deseados, en esas mismas condiciones se analizó la producción de TNF-α.

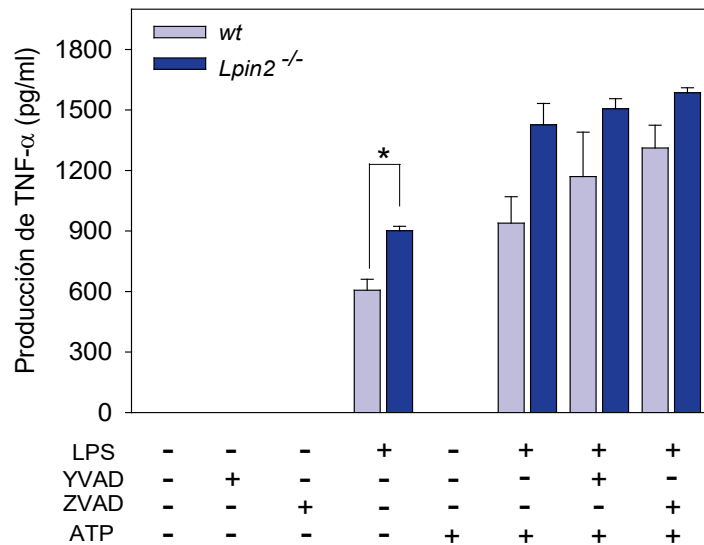
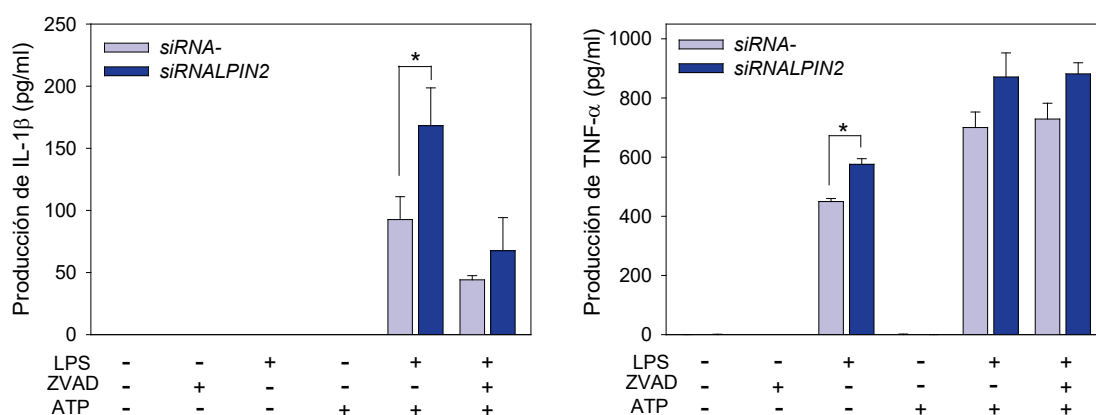


Figura 46. Producción de TNF-α en macrófagos murinos derivados de médula ósea de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup>. Se recogieron sobrenadantes de macrófagos tratados con el inhibidor de caspasa-1, YVAD (10 μM) o con el inhibidor general de caspasas, ZVAD (10 μM) y estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min. Posteriormente, se analizó la producción de TNF-α mediante ELISA. Los datos se representan como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

En la Figura 46 se observa que la producción de TNF- $\alpha$  tras activación clásica del inflamasoma, no se ve alterada en presencia del inhibidor de la caspasa-1 (YVAD), ni del inhibidor general de caspasas ZVAD. Esto indica que las bajadas en la producción de IL-1 $\beta$  observadas son debidas a la inhibición de las caspasas, y no a efectos secundarios.

Estos mismos experimentos fueron realizados en el sistema humano utilizado a lo largo de la memoria, para corroborar si los efectos eran los mismos que en el sistema murino.



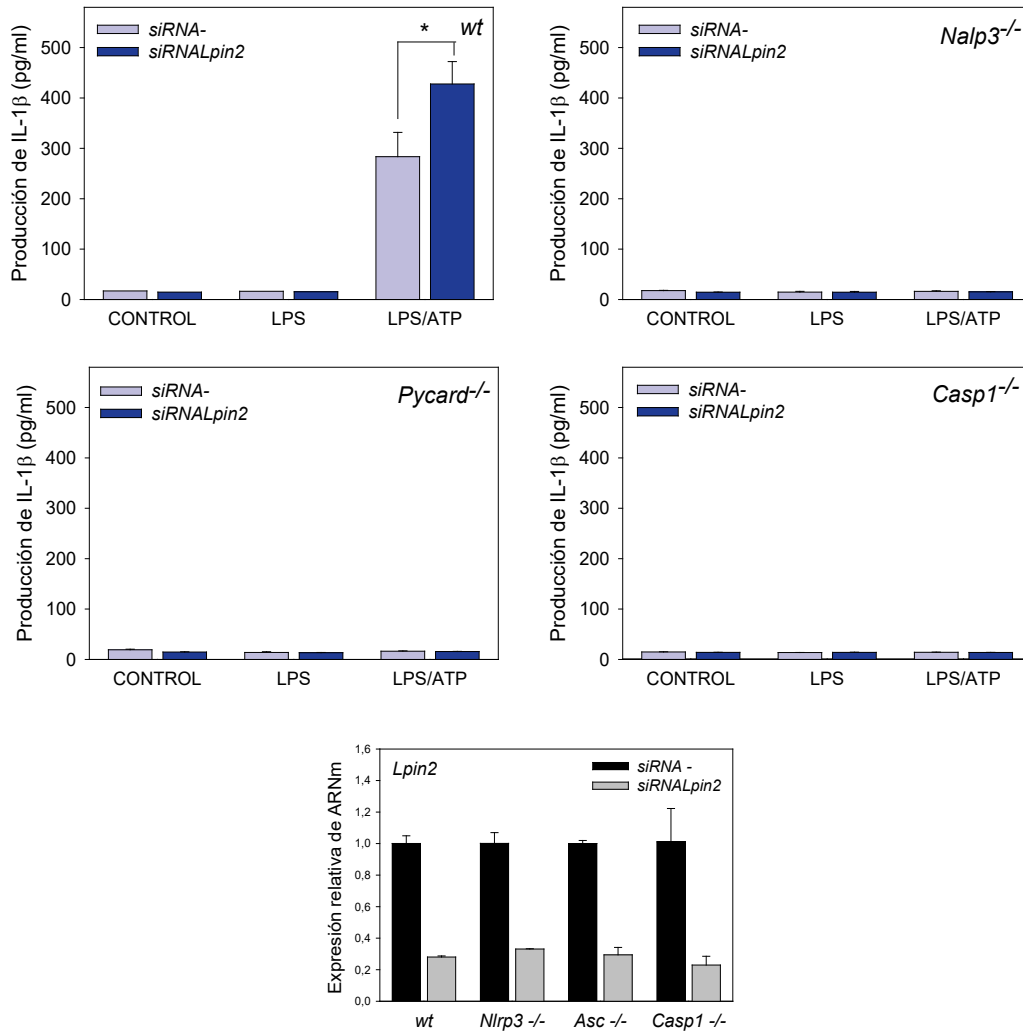
**Figura 47. Efecto de la inhibición de caspasas en la producción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en macrófagos humanos.** Los sobrenadantes procedentes de macrófagos humanos, pretratados con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2), y estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min en presencia o ausencia del inhibidor general de caspasas, ZVAD (10  $\mu$ M), fueron analizados mediante ELISAS específicos para la IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ . Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En macrófagos humanos, no se pudo inhibir la actividad de la caspasa-1, ya que el inhibidor específico YVAD tenía efectos inespecíficos en este sistema celular (datos no mostrados). Por ello, se empleó ZVAD, observándose una disminución en la producción de IL-1 $\beta$ , tanto en células tratadas con un siRNA control como en las tratadas con un siRNA frente a la lipina 2 (Figura 47). Se analizó también en este caso la producción de TNF- $\alpha$  en todas las condiciones estudiadas. Los resultados obtenidos indicaron que las bajadas en la producción de IL-1 $\beta$  se debían a la inhibición de las caspasas, ya que la producción de TNF- $\alpha$  se mantenía igual, tanto cuando se inhibían las caspasas como cuando no se inhibían (Figura 47).

## 2.5 EL AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\beta$ EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2 ESTÁ MODULADO A TRAVÉS DEL INFLASOMA NLRP3-ASC-CASPASA-1.

Considerando que la disminución de actividad de caspasa-1 mediante el uso de inhibidores no anulaba por completo la producción de IL-1 $\beta$ , no se podía descartar la existencia de otros mecanismos a través de los cuales la falta de lipina-2 pudiera aumentar

esa producción. Para verificar si la lipina-2 alteraba la producción de IL-1 $\beta$  a través de la vía del inflammasoma NLRP3-ASC-caspasa-1, se obtuvieron BMDM de animales *wt*, *Nalp3*<sup>-/-</sup>, *Pycard*<sup>-/-</sup> y *Casp1*<sup>-/-</sup> y se disminuyó la expresión de la lipina-2 mediante silenciamiento génico con siRNAs específicos y lipofección. Posteriormente, se estimuló de forma clásica el inflammasoma NLRP3 con LPS y ATP y se analizó la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA.



**Figura 48. Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$  en BMDM procedentes de ratones *wt*, *Nalp3*<sup>-/-</sup>, *Asc*<sup>-/-</sup> y *Casp1*<sup>-/-</sup>.** Se recogieron sobrenadantes de BMDM que habían sido tratados con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *Lpin2* (siRNALpin2) y estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min y se analizó la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Como muestra la Figura 48, tras la estimulación con LPS y ATP, los BMDM de ratones *wt* en los que se había inhibido la expresión de lipina-2, producían una mayor cantidad de IL-1 $\beta$  que aquellos que habían sido tratados con un siRNA control. Sin embargo, en los BMDM procedentes de ratones *Nalp3*<sup>-/-</sup>, *Pycard*<sup>-/-</sup> y *Casp1*<sup>-/-</sup>, la producción de IL-1 $\beta$  se anulaba por completo, tanto en los que expresaban lipina-2 como en los que la tenían disminuida.

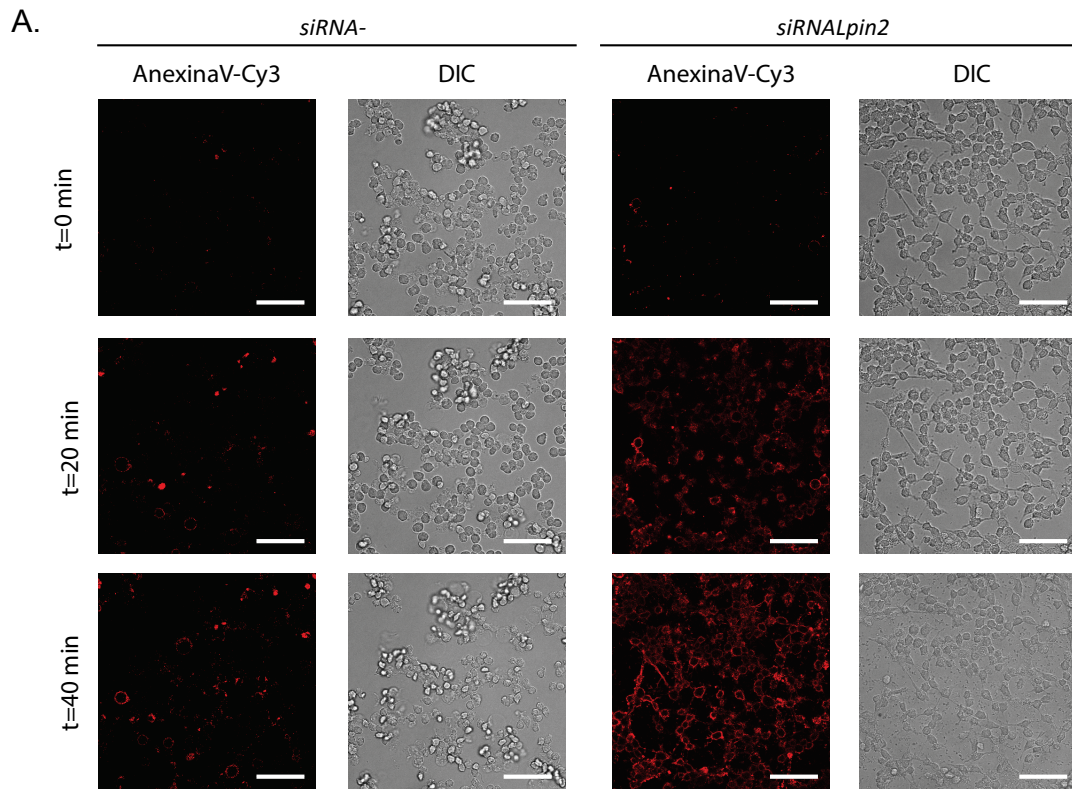


Teniendo en cuenta estos resultados, se puede concluir que en BMDM, los aumentos observados en la producción de IL-1 $\beta$  debidos a la falta de lipina-2, bajo estas condiciones de estimulación ocurren a través del inflamasoma NLRP3, por la vía NLRP3-ASC-CASP1.

## 2.6 LA FALTA DE LIPINA-2 AUMENTA LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANA

La proteína ASC es un mediador clave entre inflamación y apoptosis, puesto que tras oligomerizarse en complejos supramoleculares y activar la caspasa-1, desencadena el proceso de muerte programada conocido como piroptosis. La piroptosis es un tipo especial de muerte celular dependiente de caspasa-1 que comparte características con la necrosis y la apoptosis. Una característica común entre la piroptosis y la apoptosis es que en ambos procesos las células son positivas en marcajes con anexina V unida a un grupo fluorescente, aunque las razones para que esto ocurra son diferentes. Durante la apoptosis, la fosfatidilserina que normalmente se encuentra localizada en la cara interna de la membrana celular, se transloca a la cara externa de la membrana, uniéndose a la anexina V (171). Durante la piroptosis, se forman poros en la membrana, que permiten el paso de anexina V al interior de la célula, tiñendo así la cara interna de la membrana celular.

Puesto que la lipina-2 controla la activación de la caspasa-1, se planteó si además de influir en la generación de IL-1 $\beta$ , podría controlar también el proceso de piroptosis. Para contestar esta cuestión, se monitorizó *in vivo* mediante microscopía confocal la unión de la anexina V-Cy3 a la fosfatidilserina de células RAW 264.7 estimuladas.



B.

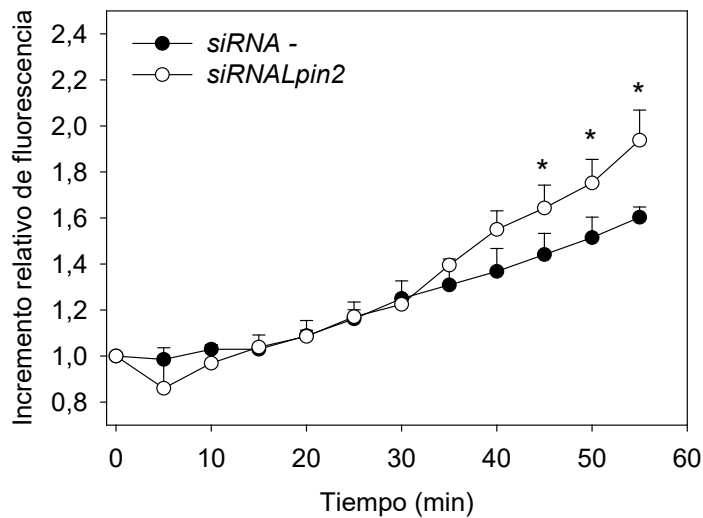
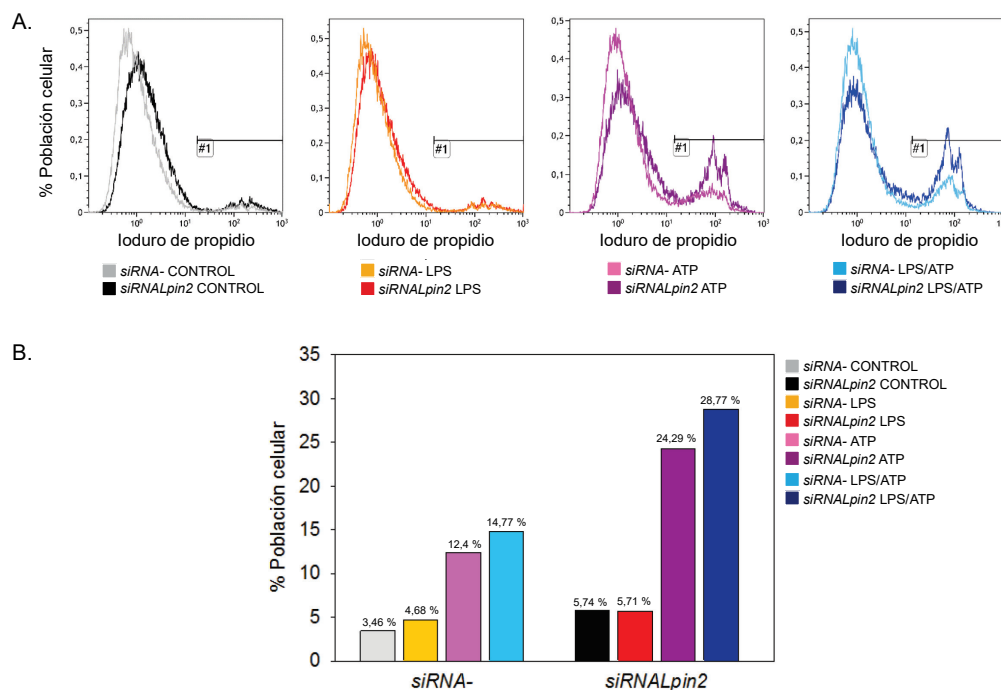


Figura 49. **Efecto de la falta de lipina-2 en la unión de anexina V durante la activación del inflammasoma.** Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (*siRNA-*) o con 20 nM de siRNA frente a *Lpin2* (*siRNALpin2*) y primadas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h. Posteriormente se incubaron con anexina V-Cy3 (1 µg/ml, 15 minutos) y trataron con ATP (2 mM) durante los tiempos indicados. Se tomaron imágenes cada 5 min mediante microscopía confocal (60X) y se analizaron con el software ImageJ. La barra de escala de cada una de las imágenes corresponde a un tamaño de 50 µm. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Los datos se representan como la media ± error estándar. \*  $p < 0,05$

Las imágenes obtenidas mostraron que las células que tenían la expresión de lipina-2 disminuida, presentaban una mayor fluorescencia en comparación con las células control, siendo las diferencias estadísticamente significativas, tras 45 minutos de tratamiento con ATP (Figura 49). Por tanto, la lipina-2 parece reducir la unión de anexina V a la PS en las células en las condiciones estudiadas.

Dado que la tinción con anexina V es una característica común entre las células apoptóticas y las piroptóticas, se hicieron tinciones con IP para diferenciar las células que sufren piroptosis (permeables a este compuesto) de las que que sufren apoptosis (impermeables a IP) (171), y así investigar el papel de la lipina-2 en este proceso.



**Figura 50. Efecto de la falta de lipina-2 en la entrada de IP en la célula tras la activación del inflammasoma.** Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y/o ATP (2 mM) durante 40 min. Posteriormente, se marcaron con IP (0,5 µg/ml). A) Análisis de la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. B) Representación de la cuantificación en % de las células que han incorporado el IP. Los datos se procesaron mediante el software Kaluza™ y por condición se analizaron 50000 eventos. Los diagramas son representativos de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos indicaron que las células con expresión disminuida de lipina-2, tanto pretratadas como no pretratadas con LPS, presentaban un mayor marcaje con IP que las células control tras el tratamiento con ATP. Sin embargo, el tratamiento exclusivo con LPS no modificaba la permeabilidad de la membrana (Figura 50). Estos resultados sugieren, por tanto, que las membranas celulares de las células sin lipina-2 quedaban más dañadas tras la exposición a ATP, de modo que la lipina-2 podría estar regulando negativamente la aparición de poros en la membrana plasmática en las condiciones estudiadas.

La permeabilidad de la membrana celular que precede a la piroptosis también se estudió mediante la entrada de BrEt en BMDM. Para ello, el receptor P2X7 se activó con ATP a concentraciones del rango mM, que producen apertura y activación del poro P2X7 con la consecuente entrada en la célula de moléculas del tamaño del BrEt. La entrada en la célula del BrEt se cuantificó midiendo su fluorescencia mediante microscopía confocal (Figura 51).

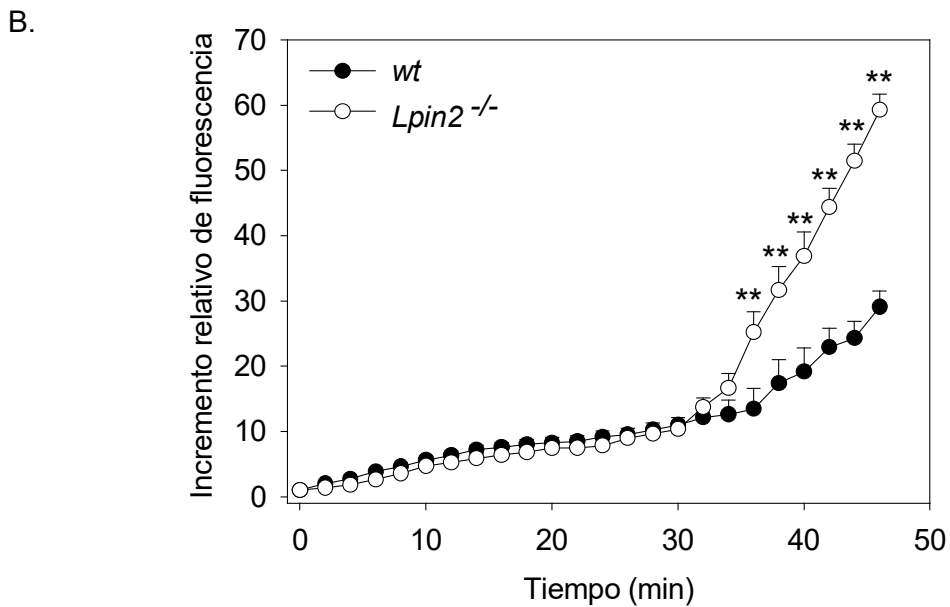
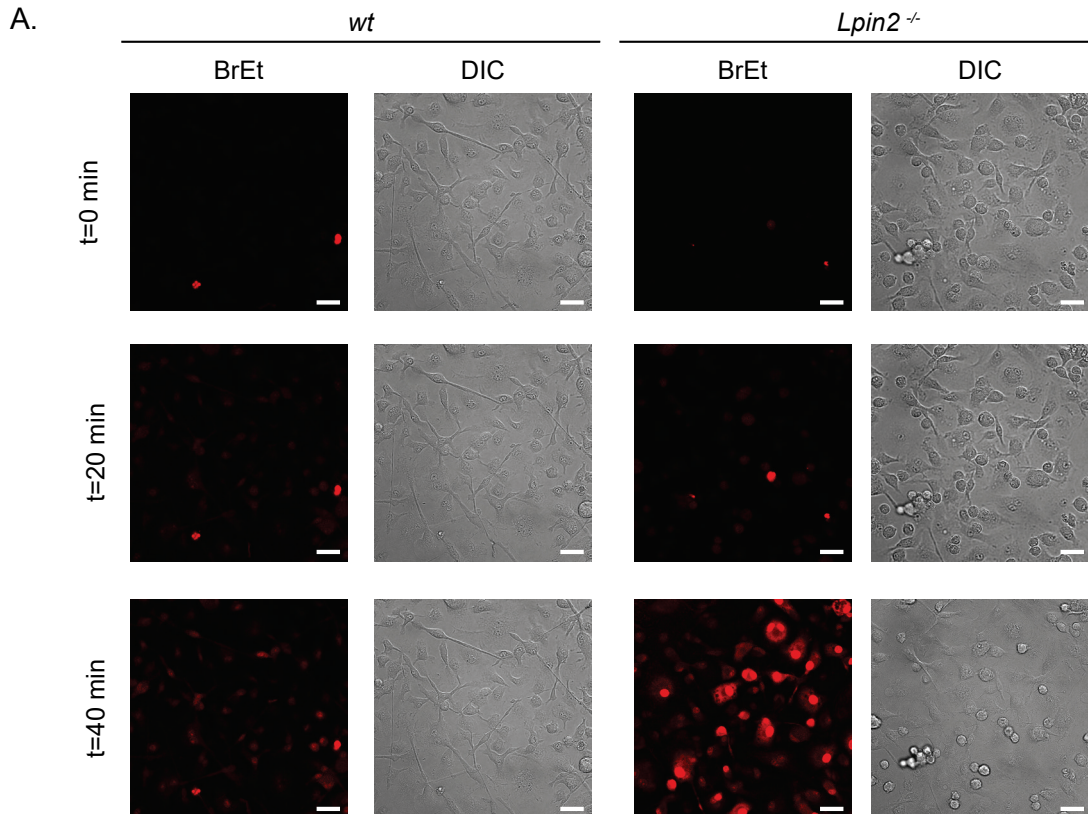
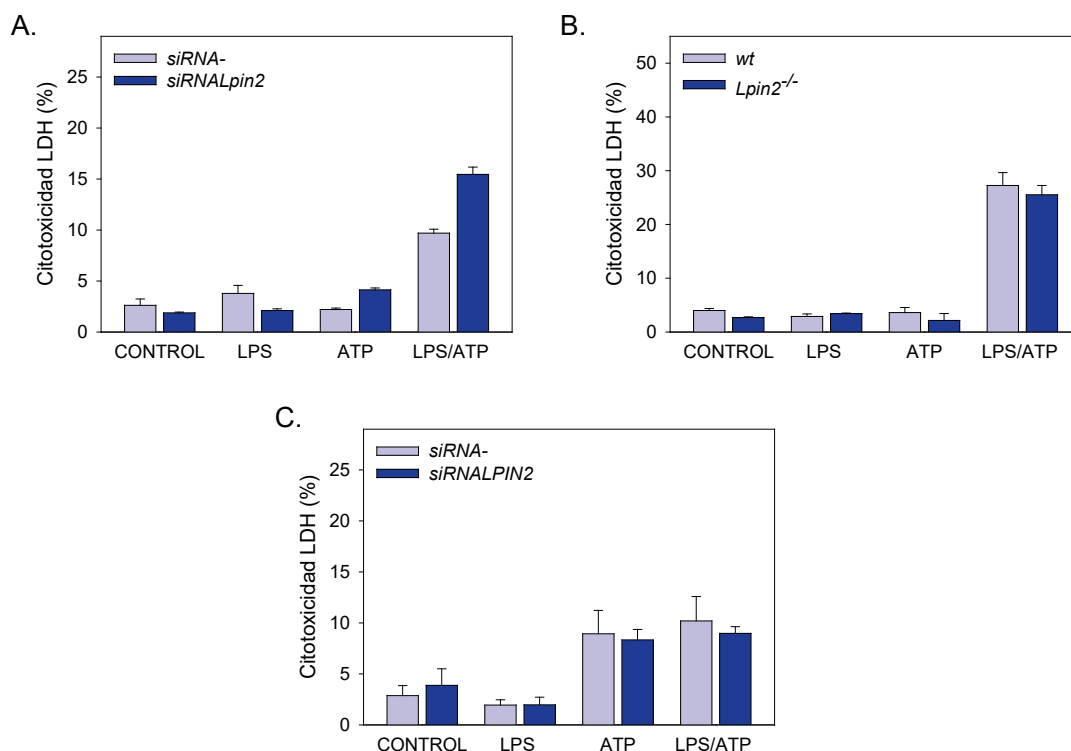


Figura 51. Efecto de la falta de lipina-2 en la permeabilización de la membrana por ATP en BMDM. Los BMDM fueron teñidos con BrEt (20  $\mu$ M) y posteriormente tratados con ATP (2 mM). Se tomaron imágenes cada 2 min para ver la incorporación de BrEt en las células, así como el contraste interferencial de fases (DIC), y se analizaron con el software ImageJ. La barra de escala de cada una de las imágenes corresponde a un tamaño de 25  $\mu$ m. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Los resultados indicaron que en estas condiciones de estimulación, la entrada de BrEt en la célula era mucho mayor en las células carentes de lipina-2 en comparación con las células procedentes de animales wt (Figura 51).

Finalmente, se analizó muerte celular mediante la actividad LDH presente en el sobrenadante celular.



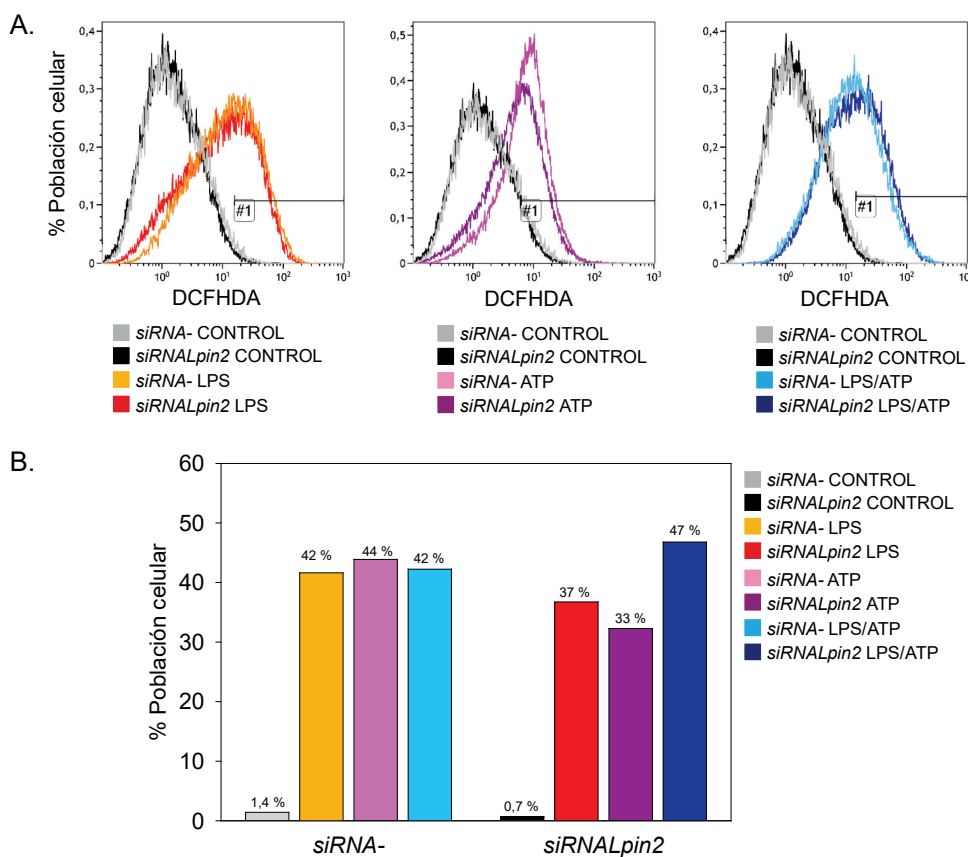
**Figura 52. Efecto de la falta de lipina-2 en la citotoxicidad tras tratamiento celular con LPS/ATP.** A) Las células RAW 264.7 fueron tratadas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y/o ATP (2 mM) durante 40 min, después de haber sido silenciadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2). B) BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup> fueron estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y/o ATP (2 mM) durante 40 min. C) Macrófagos humanos fueron tratadas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y/o ATP (2 mM) durante 40 min, después de haber sido silenciadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2). En A y B, se recogieron sobrenadantes libres de células y se analizó la presencia de actividad LDH. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

El ensayo de muerte celular en macrófagos no reveló diferencias en este proceso entre las células que expresaban lipina-2 y las que no (Figura 52). El tratamiento de las células con un único estímulo, bien LPS o bien ATP, no desencadenó aumentos en la liberación de LDH con respecto a las células sin tratar. Sin embargo, el tratamiento conjunto de ambos estímulos sí incrementaba el porcentaje de muerte celular, aunque este era igual en presencia y ausencia de lipina-2. De este experimento cabe destacar que la falta de lipina-2, a pesar de aumentar la permeabilidad de membrana, no altera la muerte celular en macrófagos. Este hecho podría ser debido al tiempo de estímulo utilizado, que podría corresponderse con una fase inicial de muerte celular en la que tiene lugar la desintegración de la membrana celular pero aún no se ha desencadenado la liberación de LDH.

## 2.7 LA PRODUCCIÓN DE ROS NO INTERVIENE EN LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\beta$ MEDIADA POR LIPINA-2

El inflamasoma NLRP3 puede ser activado por diferentes mecanismos que terminan desencadenando la salida de K<sup>+</sup> de la célula, bien sea por daño lisosomal o por daño mitocondrial (260). Entre estos mecanismos se encuentra la producción de ROS, implicada en la activación del inflamasoma NLRP3 en diversas enfermedades (261, 262). Para determinar si la activación exacerbada del inflamasoma causada por la falta de lipina-2 dependía de la producción de ROS, se usó la sonda DCFHDA. Esta sonda permite monitorizar y cuantificar la producción de ROS totales que se producen en la célula.

Gracias a esta herramienta, se pudo estudiar si los aumentos de IL-1 $\beta$  que se veían en las células a las que les faltaba la lipina-2 eran debidos a un aumento de la producción de ROS en esas circunstancias.



**Figura 53. Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de ROS en la activación del inflamasoma en células RAW 264.7.** Las células RAW 264.7 fueron silenciadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNA-Lpin2). Posteriormente se incubaron con la sonda DCFHDA (10  $\mu$ M) durante 30 min y después se trataron con LPS (200 ng/ml, 4 h) y/o ATP (2 mM, 15 min). A) Análisis de la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. B) Representación de la cuantificación en % de las células que producen ROS. Los datos obtenidos se procesaron mediante el software Kaluza<sup>TM</sup> y por condición se analizaron 50000 eventos. Los diagramas son representativos de tres experimentos independientes.



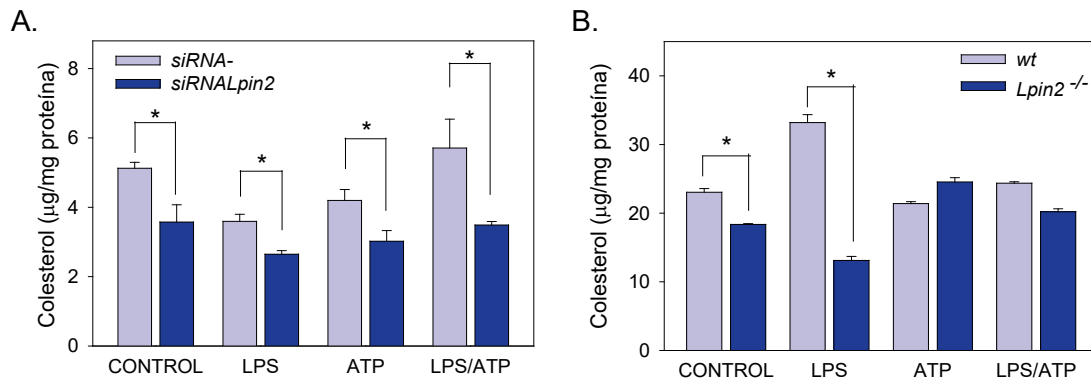
La producción de ROS fue analizada en células RAW 264.7 a las que mediante tecnología de siRNA se les disminuyó la lipina-2 (Figura 53). En las células en reposo, tanto las que tenían inhibida la expresión de la lipina-2 (negro) como las células control (gris) no producían ROS. Tras tratamiento con LPS, la cantidad de células que producían ROS era similar en las poblaciones celulares tratadas con un siRNA frente a la lipina-2 (rojo, 37%) y en las tratadas con un siRNA control (naranja, 42%), sin encontrarse grandes diferencias que pudieran ser causantes de una mayor activación del inflamasoma (Figura 53). Lo mismo ocurría tras tratamientos realizados únicamente con ATP. El estudio de la producción de ROS tras el tratamiento con ATP en células preactivadas con LPS también determinó que la cantidad de células que producían ROS era igual en las células a las que se le había reducido la expresión de la lipina-2 (azul oscuro, 47%) que en las células control (azul claro, 42%) (Figura 53).

En conclusión, la lipina-2 no parece ser importante en la producción de ROS en RAW 264.7.

### **3 CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL COLESTEROL EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 DESENCADENADA POR LA FALTA DE LIPINA-2, Y MÁS CONCRETAMENTE, EN LA AMPLIFICACIÓN DE LA SEGUNDA SEÑAL**

#### **3.1 LA FALTA DE LIPINA-2 DISMINUYE LOS NIVELES DE COLESTEROL DE LA CÉLULA EN CONDICIONES DE ACTIVACIÓN CLÁSICA DEL INFLAMASOMA NLRP3.**

Con el fin de averiguar los mecanismos causantes de las mayores corrientes de iones y de las bajadas de los niveles intracelulares de potasio observados en las células sin lipina-2, se profundizó en el estudio de las posibles causas de esas diferencias. El grupo de Murrell-Lagnado describió que la actividad de los receptores P2X7 se veía modificada por alteraciones en los niveles de colesterol en la membrana plasmática (143). En sus estudios muestran que, aumentos de colesterol en la membrana plasmática, dan lugar a una menor actividad del receptor P2X7, con menores salidas de  $K^+$ . Sin embargo, cuando disminuían los niveles de colesterol, ocurría el efecto contrario. Con el fin de averiguar si entre los mecanismos causantes del aumento de las corrientes de iones y bajadas de los niveles de  $K^+$  en las células sin lipina-2 se encontraba una alteración de los niveles de colesterol celular, se midieron los niveles de este lípido en las distintas condiciones de activación del inflamasoma, tanto en células RAW 264.7 como en BMDM.



**Figura 54. Efecto de la falta de lipina-2 en los niveles de colesterol en macrófagos tras la activación clásica del inflammasoma.** A) Células RAW 264.7 tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a *Lpin2* (siRNALpin2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y/o ATP (2 mM) durante 40 min. B) BMDM de animales wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup> estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y/o ATP (2 mM) durante 40 min. Posteriormente, en A y B, se analizó el contenido de colesterol mediante el método descrito por Boyle et al., tal y como se indica en materiales y métodos. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 54 se representan los niveles de colesterol total obtenidos, tanto en células sin estimular como durante las distintas fases de activación del inflammasoma NLRP3. En las células RAW 264.7 con expresión de lipina-2 disminuida, los niveles de colesterol total en estado basal eran menores respecto a las células control, y al someter las células a una estimulación clásica del inflammasoma, se mantenían esas diferencias. Por otro lado, en BMDM, tanto en situación de reposo como tras estimulación con LPS, el contenido de colesterol era menor en células procedentes de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> que en las de wt, igualándose cuando se utilizaba el ATP como estímulo único o en combinación con ATP. Cabe destacar, que tanto las células RAW 264.7 como los BMDM con expresión de lipina-2 reducida o ausente, presentaban niveles menores de colesterol en el momento de inducir la activación del inflammasoma NLRP3 con ATP (tras tratamiento con LPS), hecho que podría ser el determinante de que el ATP ejerza un mayor efecto sobre la activación de caspasa-1 cuando la lipina-2 está ausente.

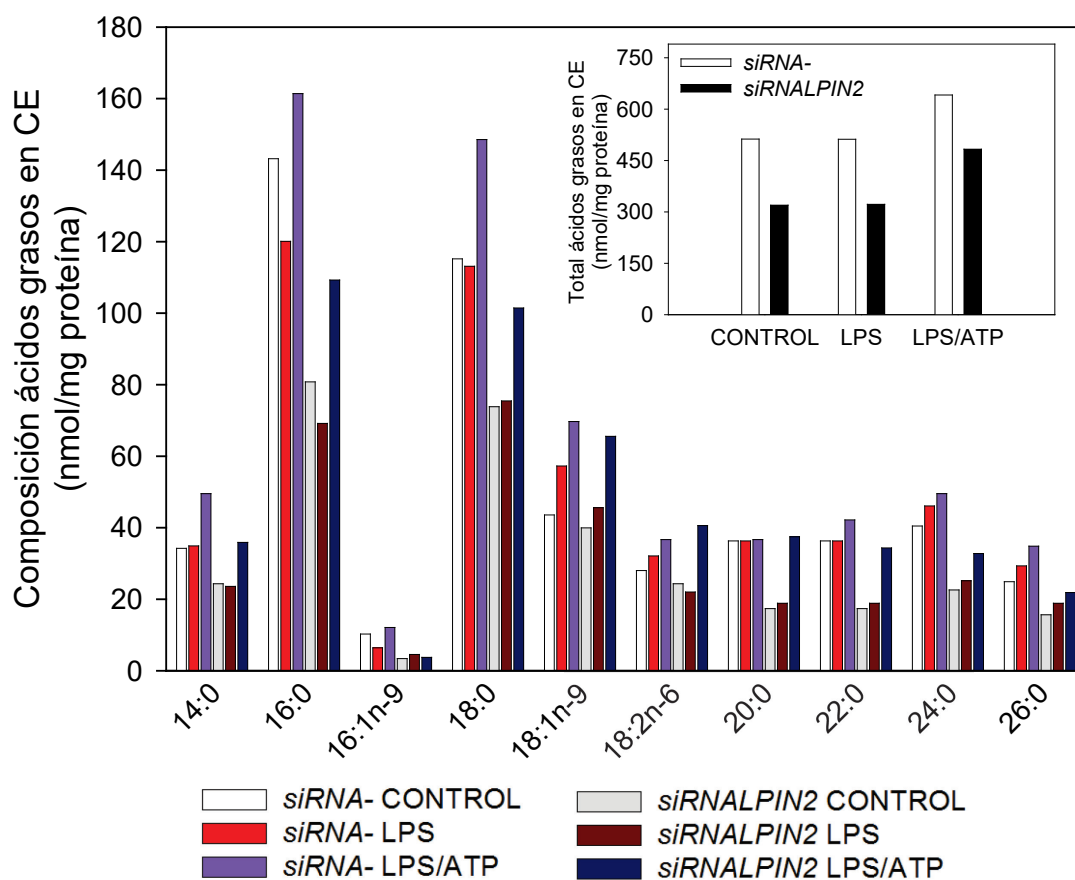
Teniendo en cuenta estos datos, se puede concluir que la lipina-2 interviene de alguna manera en el mantenimiento de los niveles celulares de colesterol.

### 3.2 FALTA DE LIPINA-2 DISMINUYE LOS NIVELES DE ESTERES DE COLESTEROL DE LA CÉLULA.

Puesto que los resultados obtenidos en macrófagos murinos indicaban una disminución en los niveles de colesterol en las células que tenían la lipina-2 reducida, se decidió evaluar por técnicas de GC/MS, la composición en ácidos grasos y la concentración de ésteres de



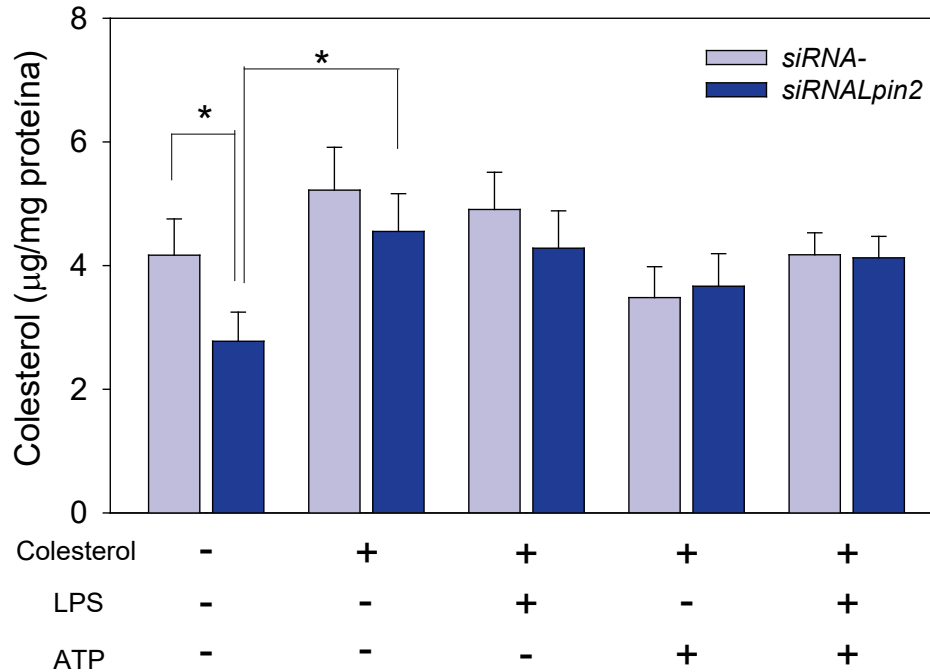
colesterol de los macrófagos humanos. Los análisis lipidómicos se hicieron tanto en condiciones basales como en las condiciones experimentales de activación de inflammasoma utilizadas a lo largo de este trabajo.



**Figura 55. Efecto de la ausencia de la lipina-2 en la composición en ácidos grasos y en el contenido total de los ésteres de colesterol de macrófagos humanos.** Los macrófagos derivados de monocitos de sangre humana se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Estos macrófagos fueron silenciados con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2) y estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min. Se extrajeron los lípidos totales, se separaron mediante TLC y se analizó la composición en ácidos grasos de los ésteres de colesterol mediante GC/MS. El inserto en el panel muestra el contenido total de ésteres de colesterol.

En los macrófagos humanos se estudiaron los niveles de los distintos ácidos grasos esterificados en el colesterol, siendo mayoritarios el ácido palmítico (16:0), el ácido esteárico (18:0), el ácido oleico (18:1n-9) y en menor cantidad el ácido mirístico (14:0), el (16:1n-9), el ácido linoleico (18:2n-6), el ácido araquídico (20:0), el ácido docosanoico (22:0), el ácido tetracosanoico (24:0) y el ácido hexacosanoico (26:0) (Figura 55). Los macrófagos sin lipina-2 presentaron una reducción significativa del contenido de los ácidos grasos 16:0 (ácido palmítico), 18:0 (ácido esteárico), 20:0 (ácido araquídico) y 22:0 (ácido docosanoico) y 24:0 (ácido tetracosanoico) en ésteres de colesterol (Figura 55), así como una disminución significativa del contenido total de ésteres de colesterol (inserto de la Figura 55) con respecto a los macrófagos control.

A continuación se realizaron experimentos para reconstituir los niveles celulares de colesterol. Esto se consiguió gracias a la incubación de las células durante 30 minutos con un complejo formado por colesterol unido a MCD, que permite su solubilidad en agua y su incorporación en la célula.

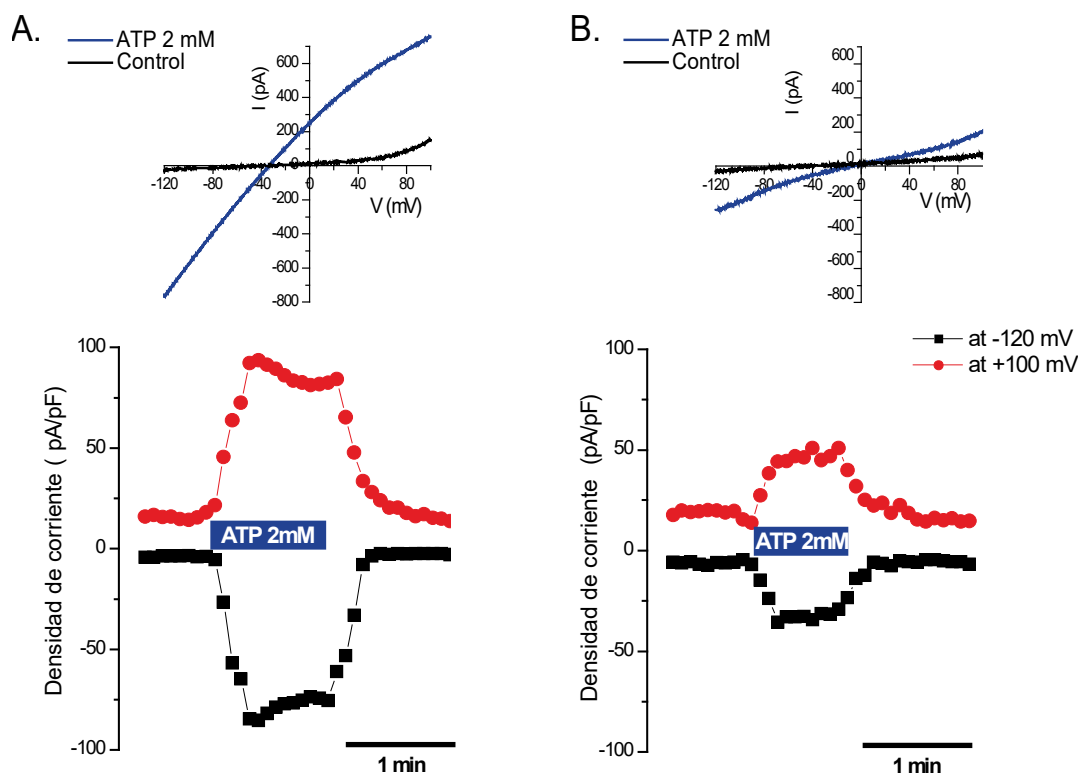


**Figura 56. Medida de los niveles celulares de colesterol tras el tratamiento con colesterol-MCD en células deficientes en lipina-2 tras la activación clásica del inflammasoma.** A) Células RAW 264.7 tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) fueron preincubadas con colesterol-MCD (100 µM) durante 30 minutos. Posteriormente, fueron estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y/o ATP (2 mM) durante 40 min, y se analizó el contenido de colesterol mediante el método descrito por Boyle et al., tal y como se indica en materiales y métodos. Los datos se representan como la media ± desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 56 se muestran los cambios observados en el contenido celular de colesterol tras incubar las células RAW 264.7 con colesterol unido a MCD. En situación de reposo, las células que tenían disminuida la expresión de lipina-2 presentaban niveles menores que las células control. Sin embargo, tras reconstituir las células con colesterol unido a MCD, los niveles de este lípido se igualaban en ambas células. Además, cabe destacar que la incubación con colesterol previa estimulación del inflammasoma para igualar sus niveles en células con y sin lipina-2, impedía una caída de los niveles de éste en las células carentes de lipina-2, que cómo se había mostrado (Figura 54), disminuía de forma significativa con respecto a las células control tras la estimulación celular con LPS.

### 3.3 EL TRATAMIENTO CON COLESTEROL DISMINUYE LAS CORRIENTES DE K<sup>+</sup> EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2

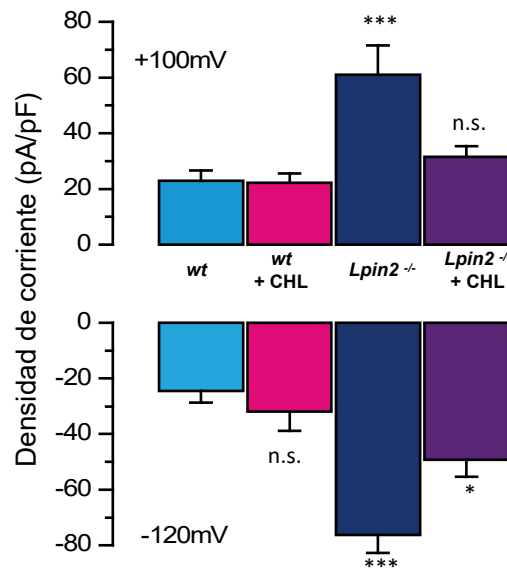
La reducción de los niveles de colesterol en las células con una expresión de lipina-2 disminuida podría ser una de las causas por las que en esas células hay una mayor densidad de corriente cuando el receptor P2X7 se activa con ATP. Para corroborar esta hipótesis, se reconstituyeron los niveles de colesterol en células carentes de lipina-2 y se evaluaron de nuevo las corrientes iónicas generadas por estimulación con ATP.



**Figura 57. Efecto del colesterol en los registros de corrientes de iones producidas por ATP en macrófagos peritoneales carentes de lipina-2.** Los macrófagos peritoneales se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos, y se analizaron las corrientes generadas por ATP (2 mM) en macrófagos procedentes de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> sin preincubar con colesterol (A) o preincubados con colesterol (B). Los gráficos superiores muestran las curvas de intensidad de corriente en función del voltaje. Si se representan los valores de corriente obtenidos a los voltajes externos (-120 mV y +100 mV) en cada rampa, se obtienen las curvas inferiores, que muestran el curso temporal de las corrientes a esos dos potenciales. Los gráficos son representativos de 15-18 células en cada condición, obtenidas de dos animales diferentes

En la Figura 57 se muestra que la aplicación de ATP (2 mM) generaba corrientes de entrada (-120 mV) y de salida (+100 mV) mucho mayores en las células sin lipina-2 que no habían sido preincubadas con colesterol que en las preincubadas con el lípido, y que esas corrientes se reducían por la simple incorporación de colesterol a las membranas celulares previa estimulación con ATP. Estos datos eran indicativos de que la simple restauración de los niveles de colesterol en las células sin lipina-2 era capaz de disminuir las corrientes iónicas desencadenadas por la aplicación de ATP.

Estos experimentos se hicieron también en macrófagos de animales *wt*, para poder comparar la respuesta en presencia y ausencia de lipina-2.

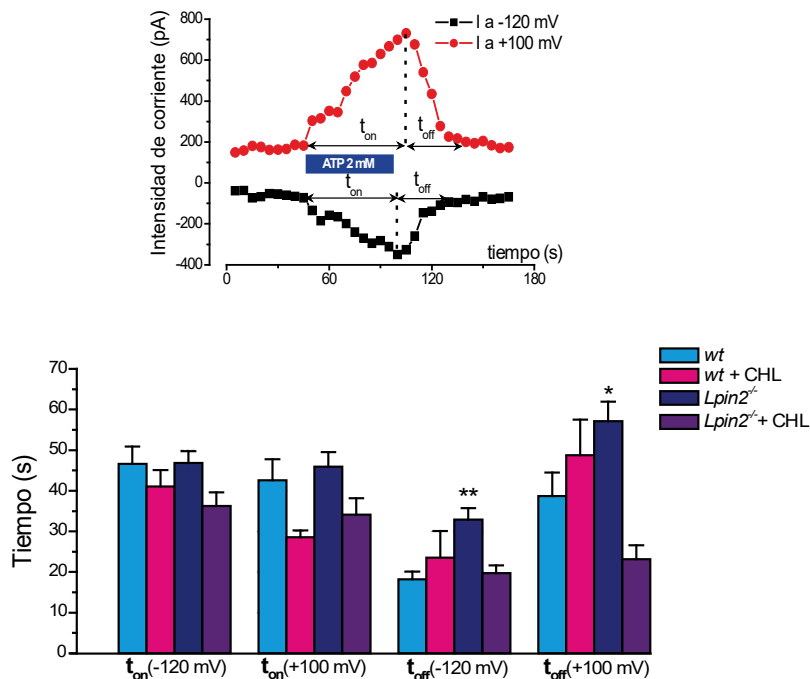


**Figura 58. Efecto del colesterol en las corrientes iónicas generadas por el receptor P2X7 tras tratamiento con ATP.** Los macrófagos peritoneales procedentes de animales *wt* y *Lpin2<sup>-/-</sup>* se obtuvieron según el protocolo descrito en materiales y métodos. Las corrientes se obtuvieron mediante la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera tras la preincubación de las células con complejos de colesterol y MCD (100 µg/ml) durante media hora, usando como estímulo el ATP (2 mM). Los datos se representan como la media ± error estándar de 14-40 células obtenidas de 2-4 animales diferentes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 58 se muestran las densidades medias de corriente obtenidas a -120 mV y + 100 mV en macrófagos primarios procedentes de animales *wt* y *Lpin2<sup>-/-</sup>*. Mediante este tipo de análisis se corroboró de nuevo que las corrientes eran mayores en los macrófagos carentes de lipina-2 con respecto a los *wt*. Además, estos datos también indicaron la restauración de los niveles de colesterol en macrófagos sin lipina-2 reducía la densidad de corriente de forma significativa, acercándose más al comportamiento típico de las células procedentes de animales *wt*. Sin embargo, este efecto no tenía lugar cuando los macrófagos de animales *wt* eran tratados con estos complejos.

Para analizar con más detalle el comportamiento de estos canales en las células *wt* y *Lpin2<sup>-/-</sup>*, se estudió el curso temporal de apertura y cierre de los canales en ambos grupos (*wt* y *Lpin2<sup>-/-</sup>*) con y sin tratamiento con MCD-CHL. El análisis se llevó a cabo como se muestra de forma esquemática en la parte superior de la Figura 59. Se definió  $t_{on}$  como el tiempo desde la aplicación del estímulo hasta que se alcanza la amplitud máxima de la corriente, y  $t_{off}$  como el tiempo desde este pico máximo de corriente hasta que se recuperan los valores basales. Los datos obtenidos cuando se comparan todas las condiciones muestran la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la velocidad y el curso temporal de

apertura de los canales. Sin embargo, los canales de ATP de los ratones *Lpin2*<sup>-/-</sup> permanecen más tiempo abiertos, y este efecto se corrige en las células de los ratones *Lpin2*<sup>-/-</sup> tratados con MCD-CHL. Sin embargo, el tratamiento con MCD-CHL tampoco modifica el tiempo de cierre de los canales en las células *wt* de forma significativa.

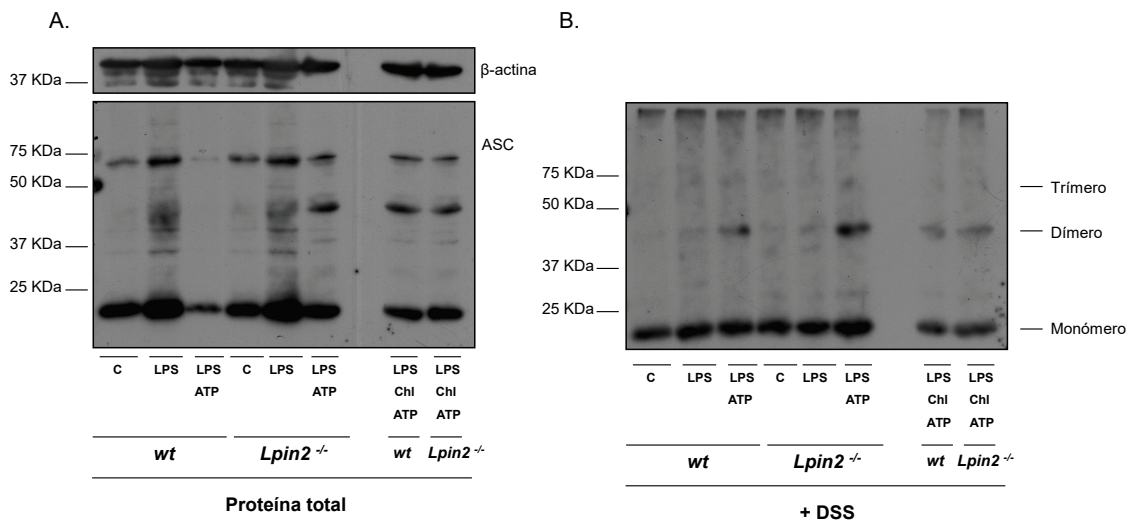


**Figura 59. Efecto del colesterol en el curso temporal de apertura y cierre del receptor P2X7 tras tratamiento con ATP.** Las corrientes en macrófagos peritoneales procedentes de ratones *wt* y *Lpin2*<sup>-/-</sup> se obtuvieron mediante la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera tras la preincubación de las células con complejos de colesterol y MCD (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante media hora, usando como estímulo el ATP (2 mM). Se representa el tiempo que transcurre desde que se abre el receptor hasta el pico máximo de actividad ( $t_{on}$ ) y el tiempo que transcurre desde el pico máximo de actividad hasta el cierre del receptor ( $t_{off}$ ). Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de 14-40 células obtenidas de 2-4 animales diferentes. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

En conclusión, los niveles reducidos de colesterol en la membrana de macrófagos carentes de lipina-2 podrían jugar un papel importante durante la activación de los receptores P2X7 por ATP, permitiendo un importante incremento de las corrientes iónicas generadas en este contexto con respecto a las células control. Estos datos sugieren que los cambios en el entorno lipídico de la membrana podrían estar modificando las propiedades cinéticas de los canales, así como su permeabilidad. Se crearía así un poro más grande que permanece abierto por más tiempo favoreciendo los flujos de salida de  $\text{K}^+$ . Sin embargo, no se pueden excluir otras posibles alteraciones en los canales que pudieran contribuir a este efecto, como cambios en el número de canales expresados a nivel de la membrana.

### 3.4 EL TRATAMIENTO CON COLESTEROL DISMINUYE LA FORMACIÓN DE OLIGÓMEROS DE ASC POR LPS/ATP EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2

La disminución de los niveles de colesterol total en las células en las que la expresión de la lipina-2 está reducida, parece ser uno de los factores que está regulando las corrientes de iones a través del receptor P2X7 y por lo tanto, podría ser una de las causas por las que en esas células hay una mayor activación del inflamasoma NLRP3. Para corroborar si las variaciones en los niveles de colesterol afectaban a la activación del inflamasoma, se analizó inicialmente si estas alteraciones estaban influyendo en la formación de oligómeros de ASC. Para llevar a cabo este estudio, las membranas de BMDM se enriquecieron con colesterol y posteriormente, se activó el inflamasoma con LPS como primera señal y ATP como señal 2.

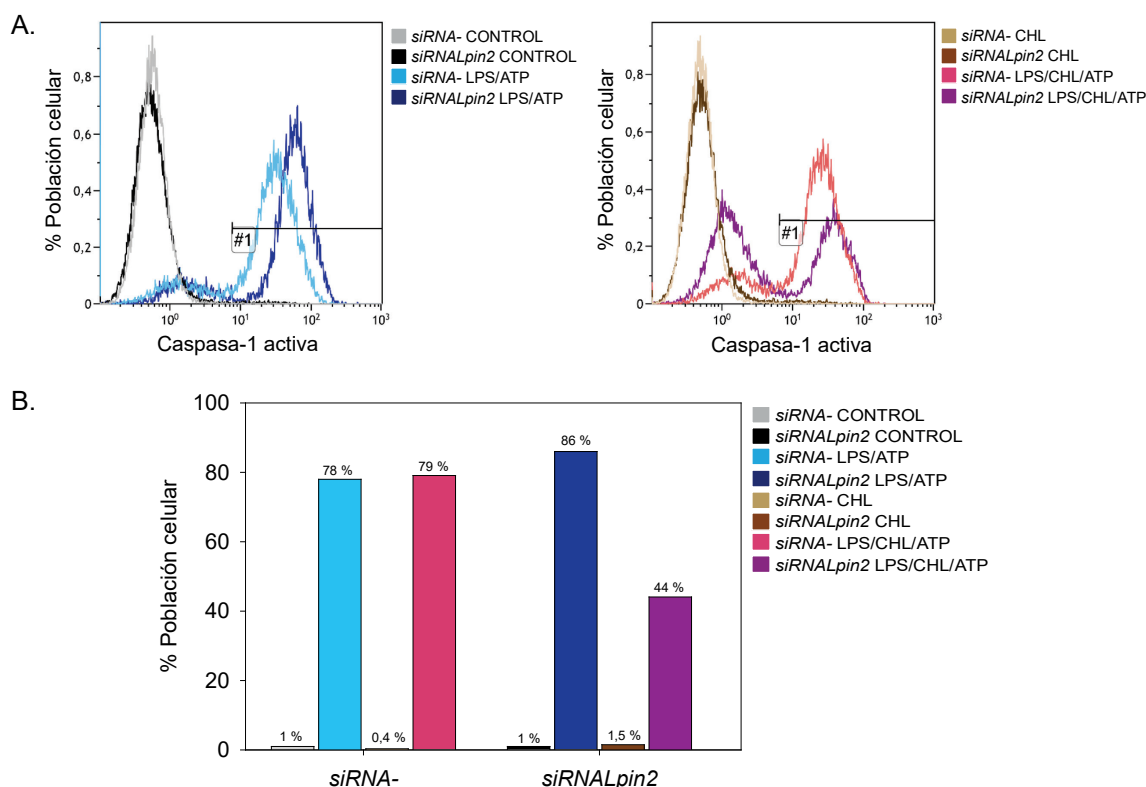


**Figura 60. Papel del colesterol en la formación de oligómeros de ASC por LPS/ATP en BMDM carentes de lipina-2.** Los BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup> se trataron con LPS (1 µg/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min, y en los casos indicados habían sido pretratados con colesterol-MCD (100 µg/ml) durante 30 min como se indica en la figura. A) Análisis de ASC en extractos celulares por inmunoblot usando un anticuerpo específico y la actina como control de carga. B) Análisis de la formación de oligómeros de ASC obtenidos mediante crosslinking de extractos celulares analizados en A, como se indica en materiales y métodos. Los datos son representativos de tres experimentos independientes

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 60. Cuando las células eran enriquecidas con colesterol, la formación de oligómeros de ASC disminuía notablemente en las células sin lipina-2, igualándose con las células procedentes de animales wt. Estos datos indican que la restauración de los niveles de colesterol disminuye la oligomerización exacerbada de ASC promovida por la falta de lipina-2.

### 3.5 EL TRATAMIENTO CON COLESTEROL DISMINUYE LA ACTIVACIÓN DE CASPASA-1 EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2

La reconstitución de las membranas celulares con colesterol parece ser importante para disminuir procesos relevantes en la activación del inflamasoma NLRP3 en las células cuando falta la lipina-2: reducía las corrientes de iones y también la formación de oligómeros de ASC. Por ello, el siguiente proceso a analizar en esas condiciones fue la activación de caspasa-1.



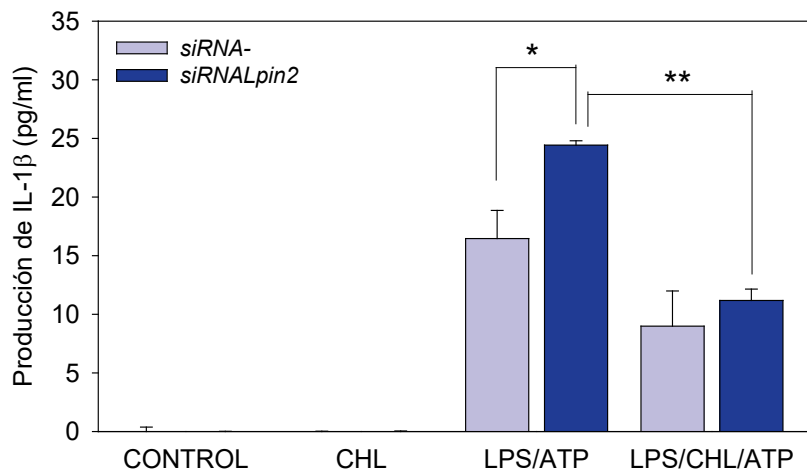
**Figura 61. Efecto del colesterol exógeno en la activación de caspasa-1.** Las células RAW 264.7 tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) fueron activadas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ATP (2 mM) durante 40 min, en presencia o ausencia de colesterol-MCD (100 µg/ml). Posteriormente, se marcaron con FLICA® según se indica en materiales y métodos. A) Análisis de la intensidad de fluorescencia en las distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo. B) Representación de la cuantificación en % de las células que presentan caspasa-1 activa. Los datos se procesaron mediante el software Kaluza™ y por condición se analizaron 30000 eventos. Los diagramas son representativos de tres experimentos independientes.

En la Figura 61 se muestra el efecto del colesterol exógeno sobre la presencia de caspasa-1 activa en células RAW 264.7 analizado mediante citometría de flujo. Tras el tratamiento con LPS y ATP se observó que los niveles de caspasa-1 activa eran mayores en las células con expresión reducida de lipina-2 (mayor media de fluorescencia) y, además, había mayor porcentaje de células fluorescentes (azul oscuro, 86%) que en las células control (azul claro, 78%). Sin embargo, la reconstitución de los niveles de colesterol produjo una reducción importante del número de células con caspasa-1 activa en la población celular con expresión reducida de lipina-2 (morado, 44%), mientras que se mantuvo el porcentaje de

células con caspasa-1 activa en la población de células control (rosa, 79 %). Es importante señalar que la restauración de los niveles de colesterol se realizó previa activación con ATP, para así analizar únicamente el efecto que este lípido tiene en la activación del inflamasoma por este estímulo sin afectar a la señalización vía TLR4.

### 3.6 EL TRATAMIENTO CON COLESTEROL DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\beta$ EN CÉLULAS CARENTES DE LIPINA-2

Teniendo en cuenta que el aumento de colesterol en las células estaba disminuyendo la formación de oligómeros de ASC y la cantidad de caspasa-1 activa, se planteó analizar si estos efectos se veían reflejados en una disminución en la producción de IL-1 $\beta$ .



**Figura 62. Efecto del colesterol exógeno en la producción de IL-1 $\beta$ .** Los sobrenadantes de células RAW 264.7 tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y preactivadas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h fueron estimulados con ATP (2 mM) durante 40 min, en presencia o ausencia de colesterol-MCD (100  $\mu$ g/ml). Posteriormente, se analizó la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 62 se muestra la producción de IL-1 $\beta$  tras la activación del inflamasoma NLRP3 con LPS y ATP en células RAW 264.7, cuyas membranas habían sido enriquecidas con colesterol. Los datos obtenidos mostraron que la reconstitución de los niveles de colesterol igualaba la producción de IL-1 $\beta$  en las células con diferente expresión de lipina-2.

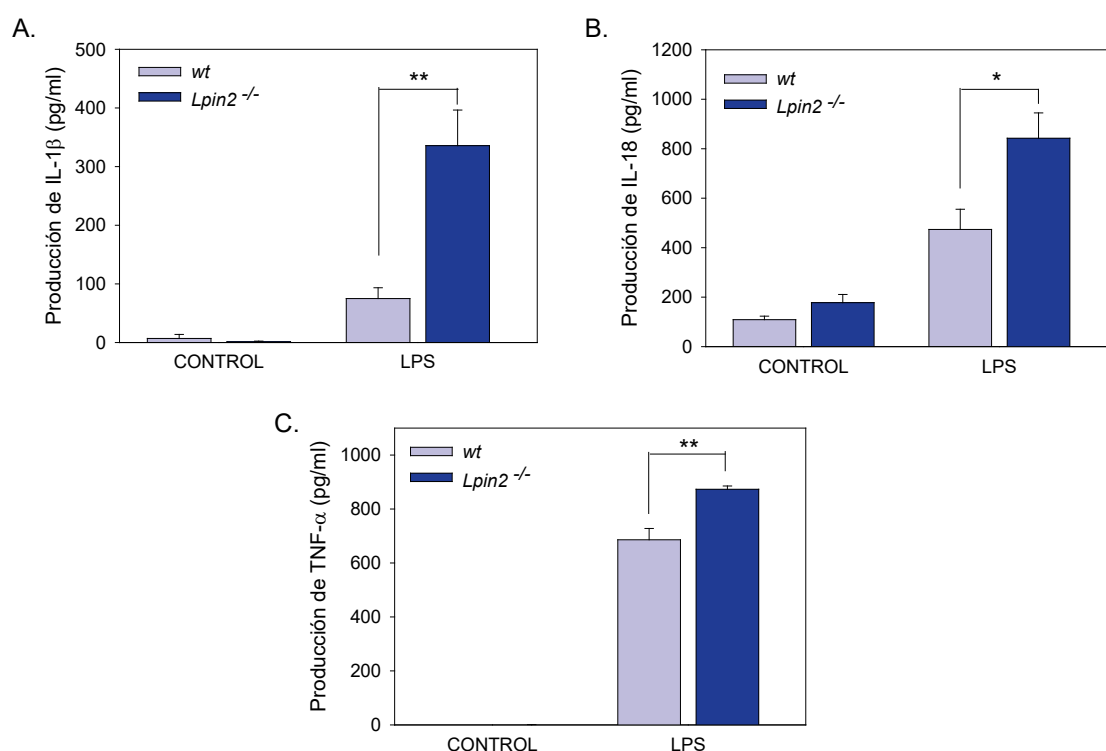
Con todo ello, se puede concluir que la reconstitución de los niveles de colesterol en las membranas celulares de células RAW 264.7 carentes de lipina-2, disminuye la producción excesiva de IL-1 $\beta$  en estas células.



## 4 CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN *IN VIVO* DEL INFLAMASOMA DURANTE EL DESARROLLO DE INFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS EN UN MODELO MURINO

### 4.1 PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS TRAS EL TRATAMIENTO DE RATONES CON LPS

Para estudiar si en un modelo *in vivo* la lipina-2 también era capaz de modular la respuesta inflamatoria y la activación del inflamasoma, se evaluaron los niveles de IL-1 $\beta$  y de IL-18 presentes en el suero de ratones *wt* y *Lpin2*<sup>-/-</sup> tras tratamiento con LPS (10 mg/kg) durante 3 h.

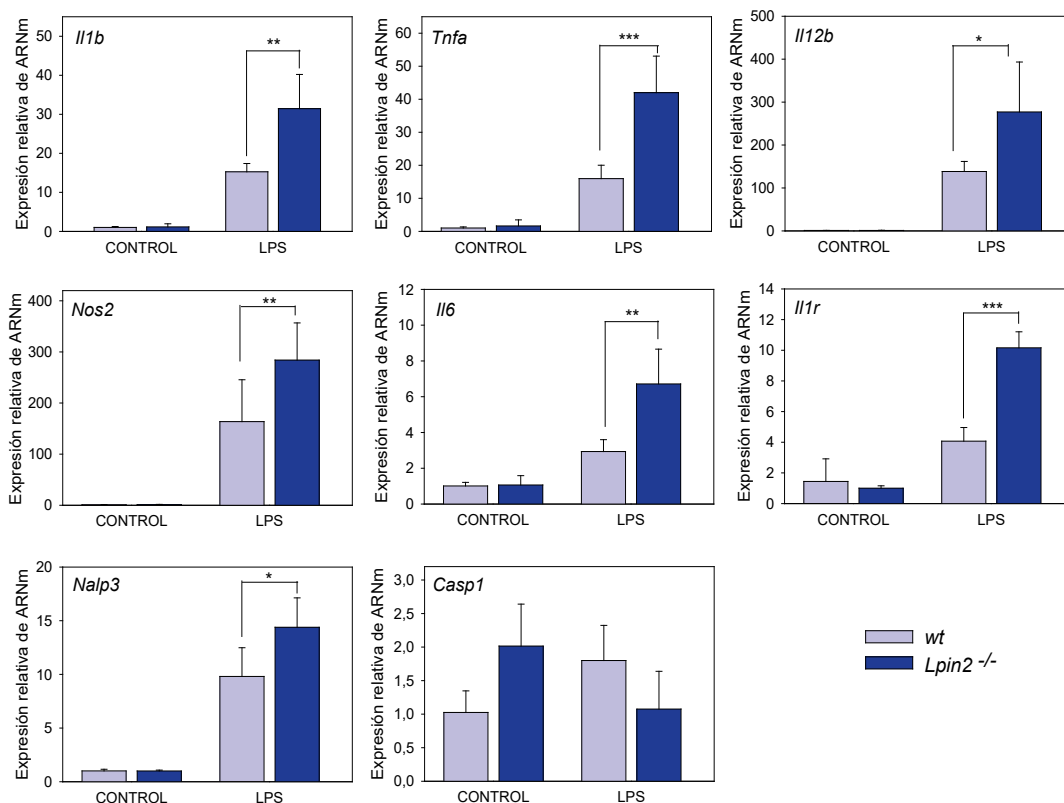


**Figura 63. Producción de IL-1 $\beta$ , IL-18 y TNF- $\alpha$  en suero de ratones carentes de lipina-2.** Los ratones *wt* y *Lpin2*<sup>-/-</sup> se trataron con LPS (10 mg/kg) o PBS y a las 3 h se recogió sangre del corazón mediante punción, según se indica en material y métodos. Se obtuvo el suero a partir de la sangre recogida y se analizó la producción de IL-1 $\beta$ , IL-18 y TNF- $\alpha$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes con una n=5. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

El análisis de citoquinas proinflamatorias en los sueros de animales tratados con LPS mostró un aumento significativo de IL-1 $\beta$ , IL-18 y TNF- $\alpha$  en animales carentes de lipina 2 con respecto a los animales control (Figura 63). Los resultados obtenidos iban en la misma dirección que los obtenidos *in vitro*, indicando que en ratones *Lpin2*<sup>-/-</sup> hay una mayor activación del inflamasoma que en ratones *wt*.

## 4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES PROINFLAMATORIOS EN HÍGADO Y BAZO DE RATONES *Lpin2*<sup>-/-</sup> TRAS TRATAMIENTO CON LPS.

Un estudio más exhaustivo fue llevado a cabo analizando la expresión de genes proinflamatorios y relacionados con el inflamasoma en los hígados y bazos de animales, tanto *wt* como *Lpin2*<sup>-/-</sup>, que habían sido tratados con LPS. Se escogieron estos dos órganos porque se ven especialmente afectados por el tratamiento con LPS. El bazo actúa en el organismo como principal reservorio de monocitos y sintetizando anticuerpos, y el hígado está selectivamente enriquecido en células del sistema inmune, como las células Kupffer, que se especializan en la detección y captura de patógenos de la sangre y son capaces de responder a estímulos bacterianos como el LPS produciendo una respuesta inflamatoria (263, 264).



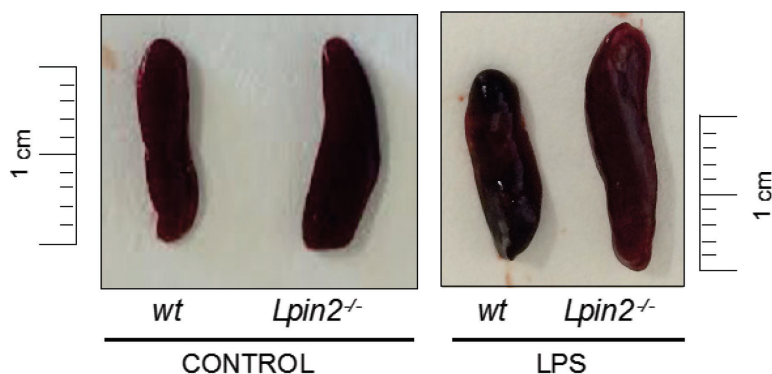
**Figura 64. Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias y proteínas relacionadas con la biología de la IL-1 $\beta$  en hígado de ratones tras el tratamiento LPS.** Los animales fueron tratados con LPS (10 mg/Kg) o PBS durante 3 h. Se extrajo el ARN del hígado y se analizó la expresión del ARNm codificante para los genes indicados mediante RT-q-PCR utilizando cebadores específicos. Como gen de referencia se utilizó la *Gapdh*. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

El análisis de la expresión de citoquinas proinflamatorias tras 3 h de LPS reveló que los niveles de ARNm de *Il1b*, *Il6*, *Tnfa* y *Il12b* eran significativamente mayores en los hígados de animales carentes de lipina-2 con respecto a los hígados de animales control (Figura 64). A

ese tiempo de tratamiento, también se observaban aumentos significativos de la expresión de otras moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria, como *Nos2*.

Por otro lado, también se examinó la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria mediada por el inflammasoma NLRP3. Los animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> presentaban una mayor expresión de ARNm de *Il1r* y *Nalp3* tras tratamiento con LPS, mientras que la expresión de *Casp1* (gen que se expresa de forma constitutiva) no variaba (Figura 64).

Como se mencionó previamente, dado que el bazo es el órgano responsable de proteger al organismo de patógenos y es crucial para la respuesta inflamatoria, tanto inmune como adaptativa, también se estudió la respuesta producida en este órgano tras tratar los animales con LPS.



**Figura 65. Tamaño de los bazo tras el tratamiento de ratones wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup> con LPS.** Ratones wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup> se trataron con LPS (10 mg/kg) o PBS y a las 3 h fueron sacrificados. Se extrajeron los bazo (n=5) y se fotografiaron.

Aunque la pérdida de peso de los animales wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup> no variaba tras el tratamiento por LPS, incluso a 24 h de tratamiento (datos no mostrados), el tamaño de los bazo de los ratones *Lpin2*<sup>-/-</sup> era significativamente mayor que el de los bazo de animales wt tras la inyección intraperitoneal de LPS durante 3 h (Figura 65). Este dato parece indicar que el LPS tiene un efecto mayor sobre los bazo de los animales que carecen de lipina-2.

Posteriormente, mediante RT-q-PCR, al igual que se había hecho en hígados, se analizaron diferentes genes en los bazo de animales wt y *Lpin2*<sup>-/-</sup>, que habían sido tratados con LPS.

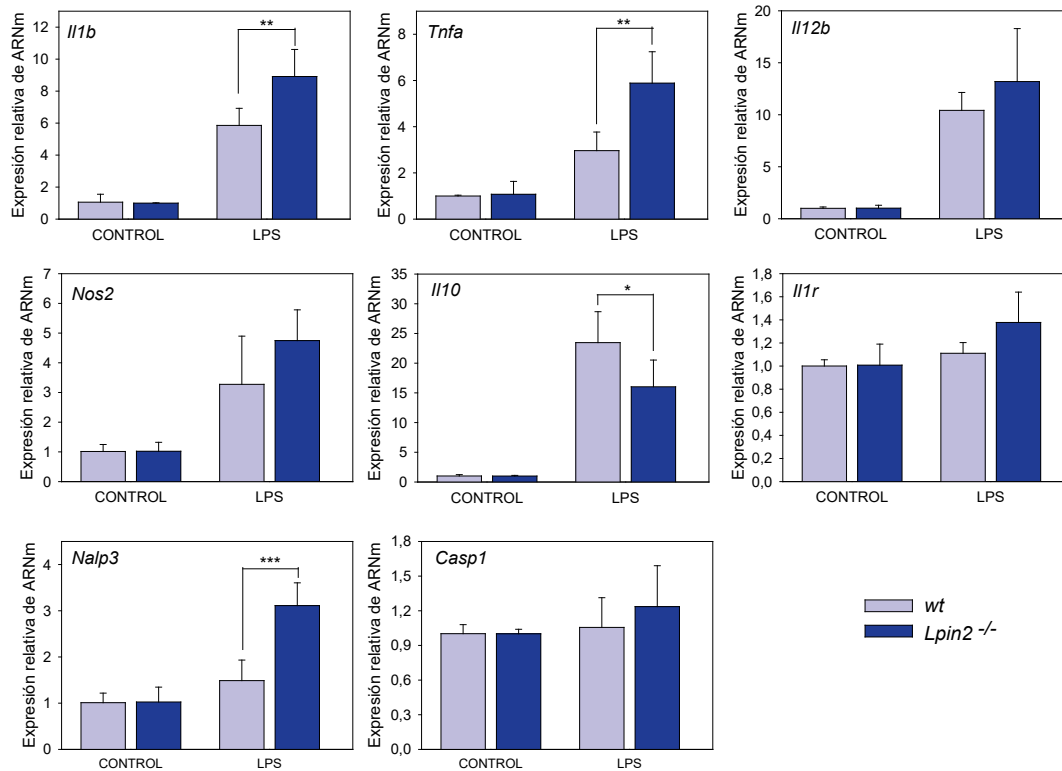


Figura 66. Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias y proteínas relacionadas con la biología de la IL-1 $\beta$  en bazo de ratones tras el tratamiento LPS. Los animales fueron tratados con LPS (10 mg/Kg) o PBS durante 3 h. Se extrajo el ARN del bazo y se analizó la expresión del ARNm codificante para los genes indicados mediante RT-q-PCR utilizando cebadores específicos. Como gen de referencia se utilizó la Gapdh. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Tras 3 h de tratamiento con LPS, en los bazos de animales carentes de lipina-2, se encontraron niveles significativamente mayores de ARNm de *Il1b* y *Tnfa* con respecto a los bazos de animales control (Figura 66). Sin embargo, la expresión de otros genes relacionados con la respuesta inflamatoria, como *Il12b*, *Ccl2* y *Nos2* no se vieron modificados. También se analizó la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con el inflamasoma. Se observó que los niveles del ARNm de *Nalp3* aumentaban de forma significativa por el LPS en los bazos de ratones *Lipin2<sup>-/-</sup>* con respecto a los de animales *wt* (Figura 66). De nuevo, los niveles de ARNm de *Casp1* se mantenían igual en todas las condiciones y genotipos.

Colectivamente estos datos apoyan los efectos encontrados *in vitro*, y permiten afirmar que la lipina-2 inhibe la activación del inflamasoma y otros eventos inflamatorios *in vivo*.

## 5 CARACTERIZACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA EN MACRÓFAGOS A TRAVÉS DE UN ESTÍMULO METABÓLICO COMO ES EL ÁCIDO PALMÍTICO

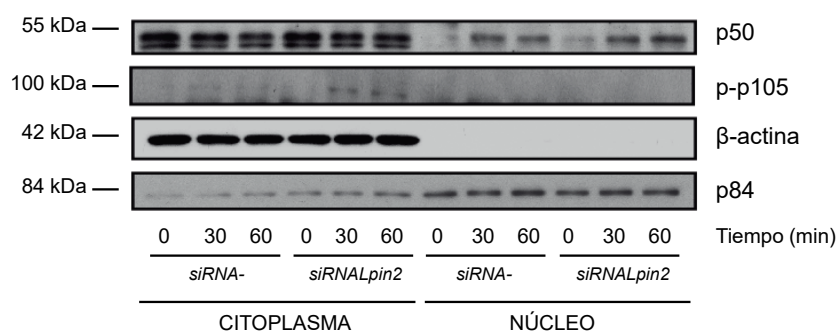
### 5.1 LA LIPINA-2 MODULA LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA A TRAVÉS DEL ÁCIDO PALMÍTICO

Los ácidos grasos saturados alteran la homeostasis celular a través de diferentes vías, entre las que se encuentran la activación del TLR2 y TLR4 (148). El ácido palmítico, uno de los ácidos grasos saturados más estudiados, es capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria en macrófagos induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias. Estudios previos del laboratorio (231) han demostrado que la lipina-2 atenúa la generación de TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1 en macrófagos activados con ácido palmítico. Sin embargo, el papel de esta enzima en la generación de IL-1 $\beta$  y la activación del inflamasoma no fue examinado en estos análisis.

#### 5.1.1 La falta de lipina-2 aumenta la activación de NF- $\kappa$ B por ácido palmítico

Considerando estos antecedentes, se evaluó la producción de IL-1 $\beta$  en células estimuladas con ácido palmítico, y el papel que la lipina-2 tenía en esa respuesta. Para ello, se analizó primero el papel que podría estar desempeñando en la señal 1. Se inhibió la expresión de la lipina-2 en células RAW 264.7 mediante tecnología de siRNA, y posteriormente se activaron las células con ácido palmítico para ver la respuesta inflamatoria inducida.

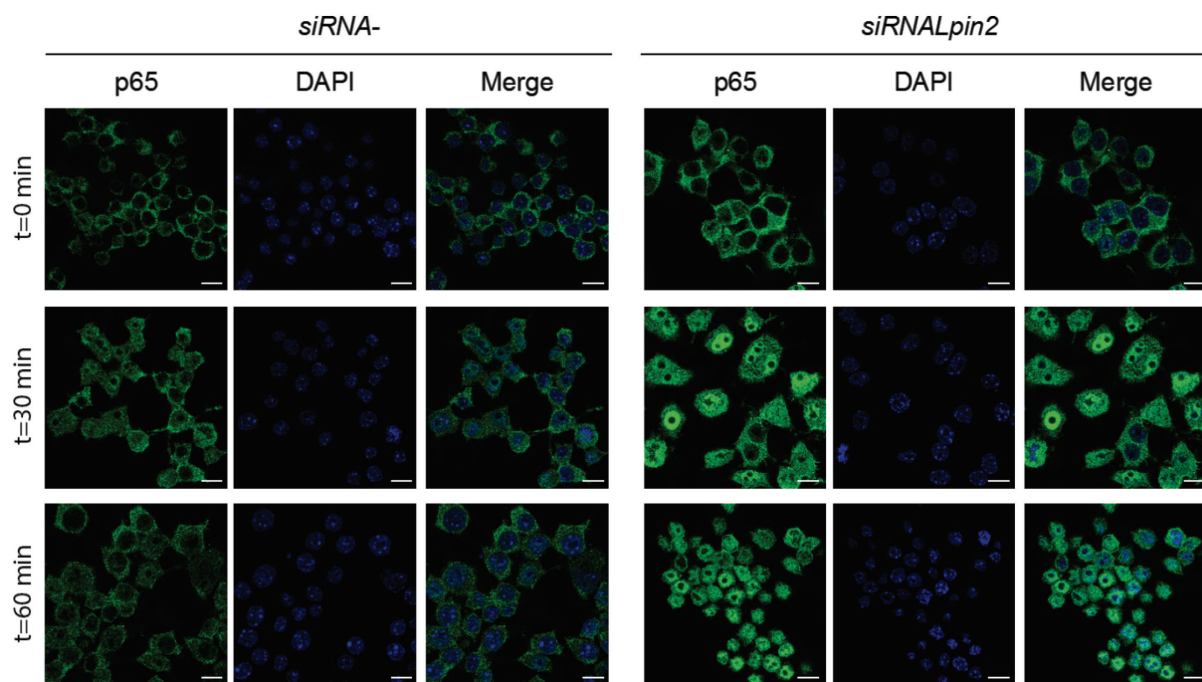
El primer proceso que se estudió fue la traslocación de la subunidad p50 de NF- $\kappa$ B al núcleo. Se realizó mediante inmunoblot de lisados citoplasmáticos y nucleares.



**Figura 67. Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de NF- $\kappa$ B en células RAW 264.7 tras la activación con ácido palmítico.** Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y activadas con ácido palmítico (300  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. A) Análisis de la expresión proteica de p50 y p-p105 en extractos nucleares y citoplasmáticos por inmunoblot usando anticuerpos específicos y usando la  $\beta$ -actina y p84 como controles de carga. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

En las células en las que se había reducido la expresión de la lipina-2, el tratamiento con ácido palmítico provocó una mayor fosforilación de p105, evento que precede al procesamiento que dará lugar a la forma activa de 50 kDa de NF-κB, p50 (Figura 48). Además, coincidiendo con este dato, las células con menor expresión proteica de lipina-2, tenían una mayor traslocación al núcleo de la subunidad de NF-κB p50 en comparación con las células control (Figura 67).

Posteriormente, se analizó también la traslocación a núcleo de la subunidad p65 de NF-κB por tratamiento con ácido palmítico. Este estudio se realizó mediante análisis por microscopía confocal.

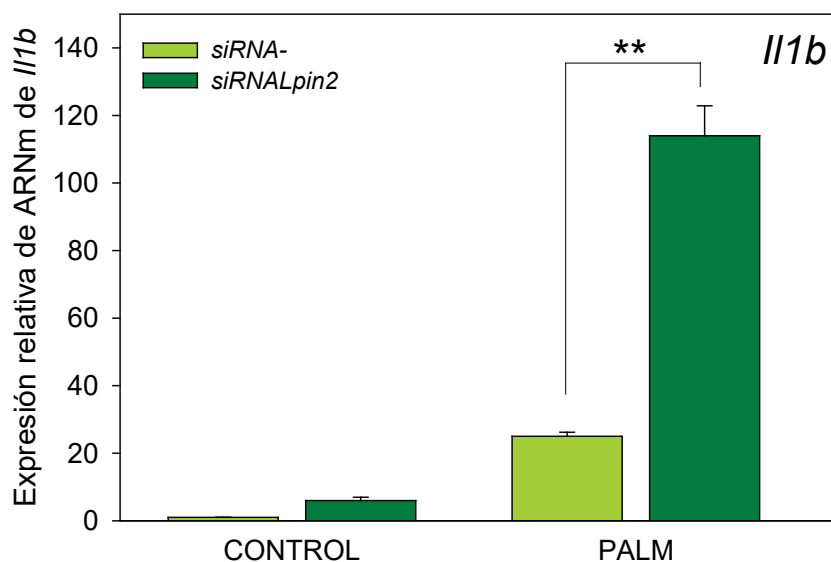


**Figura 68. Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de NF-κB en células RAW 264.7 tras la activación con ácido palmítico.** Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y activadas con ácido palmítico (300 μM) durante los tiempos indicados. Se tiñeron por inmunocitoquímica con un anticuerpo específico frente a p65, y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (verde). Posteriormente, se tiñeron los núcleos con DAPI (azul). La fluorescencia presente en las células se analizó mediante microscopía confocal (60X). La barra de escala de cada una de las imágenes corresponde a un tamaño de 10 μm. Las imágenes son representativas de 30 células analizadas por preparación.

En la Figura 68 se muestra la localización de la fluorescencia de la proteína p65 (verde), tras tratar las células con ácido palmítico durante 30 y 60 minutos. Estas imágenes indican que, en las células carentes de lipina-2, la traslocación de p65 al núcleo era mucho mayor tras el tratamiento con ácido palmítico que en las células que habían sido tratadas con un siRNA control. Todos estos datos, junto con resultados previamente obtenidos en el laboratorio (265) apuntan que la lipina-2 modula la respuesta inflamatoria asociada a la activación de NF-κB por ácido palmítico.

### 5.1.2 La falta de lipina-2 aumenta la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ por ácido palmítico

Dado que la transcripción de la pro-IL-1 $\beta$  está controlada por NF- $\kappa$ B, una vez comprobado que en las células sin lipina-2 tenía lugar una mayor traslocación de NF- $\kappa$ B al núcleo por ácido palmítico, se analizó la expresión génica de la pro-IL-1 $\beta$  en estas condiciones mediante RT-q-PCR.



**Figura 69. Efecto de la falta de lipina-2 sobre la expresión de IL-1 $\beta$ .** Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con ácido palmítico (PALM) (300  $\mu$ M) durante 8h. Se extrajo el ARN celular y se analizó la expresión del ARNm codificante para IL-1 $\beta$  mediante RT-q-PCR utilizando cebadores específicos. Como gen de referencia se utilizó la ciclofilina B. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

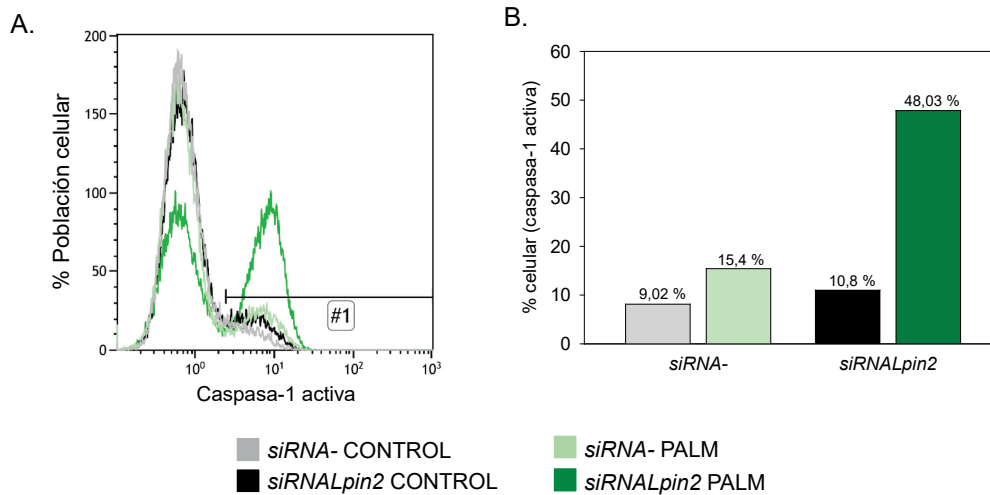
En la Figura 69 se muestra que, en ausencia de lipina-2, la expresión de pro-IL-1 $\beta$  inducida tras 8 h de activación con ácido graso, era mucho mayor que en las células tratadas frente a un siRNA control.

Estos datos señalan que la lipina-2 modula la señal 1 de activación del inflammasoma, en particular la producción de pro-IL-1 $\beta$ , a través del ácido palmítico.

Pero el ácido palmítico, además de actuar a través de receptores celulares, también puede entrar en la célula y ahí ejercer su acción como DAMP (144). Por ello se pasó a analizar el efecto de la lipina-2 sobre eventos que se desencadenan por activación del inflammasoma NLRP3 tras estimulación celular con este ácido graso.

5.1.2.1 La falta de lipina-2 aumenta la activación de caspasa-1 por ácido palmítico

Para analizar si la lipina-2 desempeñaba un papel importante en la señal dos de activación del inflamasoma por ácido palmítico, se estudió la activación de la caspasa-1 tras estimulación con el ácido graso mediante citometría de flujo, como se había hecho anteriormente.



**Figura 70. Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de la caspasa-1 por ácido palmítico en células RAW 264.7.** Las células RAW 264.7 se trataron con el vehículo (BSA) o con ácido palmítico (PALM) (300  $\mu$ M) durante 20 h después de haber sido silenciadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2). Posteriormente, se marcaron con FLICA® según se indica en materiales y métodos. A) Análisis de la intensidad de fluorescencia en las distintas poblaciones celulares mediante citometría de flujo. B) Representación de la cuantificación en % de las células que presentan caspasa-1 activa. Los datos se procesaron mediante el software Kaluza™ y por condición se analizaron 30000 eventos. Los diagramas son representativos de tres experimentos independientes.

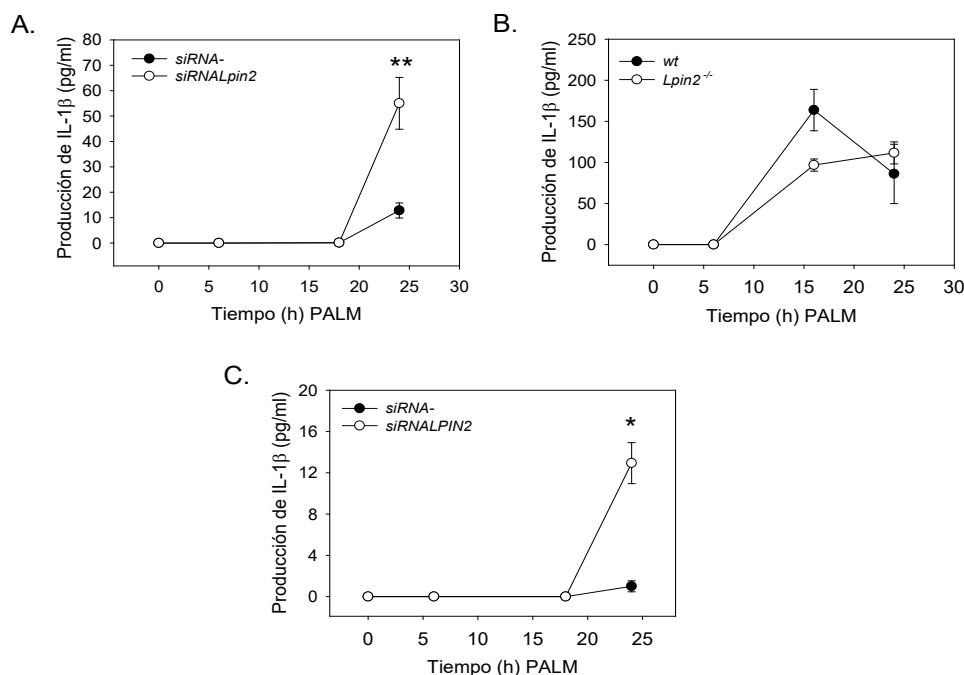
En la Figura 76 se representa el porcentaje de la población celular que tiene la caspasa-1 activa dentro de la célula. Antes de comenzar la activación del inflamasoma en las células con ácido palmítico, tanto las células control como las células tratadas con el siRNA frente a la lipina-2, no presentaban caspasa-1 activa. Tras estimulación celular durante 20 h con ácido palmítico, la cantidad de células que tenían caspasa-1 activa aumentó, siendo mayor en la población celular que tenía la lipina-2 disminuida (47,86 %) que en la control (15,42 %). Estos resultados apoyan la idea de que la lipina-2 regula negativamente la activación de la caspasa-1 por ácido palmítico.

5.1.2.2 La falta de lipina-2 aumenta la producción de IL- $\beta$  madura por ácido palmítico

Una vez estudiada la implicación de la lipina-2 en la producción de pro-IL1- $\beta$  y en la activación de caspasa-1 por ácido palmítico, se evaluó si la alteración de estos dos eventos se traducían en un incremento de proteína madura. Como el ácido palmítico puede actuar como señal 2 en la activación del inflamasoma (144), y también interviene en la señalización



por TLR4, se planteó la posibilidad de que en el sistema aquí utilizado el ácido palmítico fuera capaz de realizar las dos señales.



**Figura 71. Efecto de la falta de lipina-2 sobre la producción de IL-1β por ácido palmítico en macrófagos.**

A) Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1β en células RAW 264.7. Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con ácido palmítico (PALM) (300 μM) durante los tiempos indicados. B) Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1β en BMDM de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup>. Los BMDM se diferenciaron según el protocolo descrito en materiales y métodos, y fueron estimulados como en A. C) Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1β en macrófagos humanos. Los macrófagos humanos fueron silenciados por nucleofección con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2) y estimulados como en A. Los sobrenadantes de A, B y C se recogieron y se analizaron para cuantificar la producción de IL-1β mediante ELISA. Los datos se representan como la media ± desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

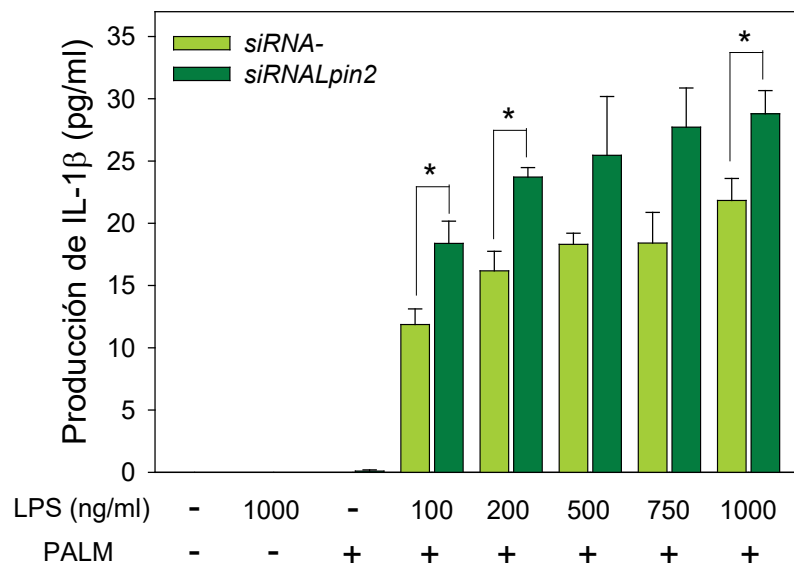
Al tratar las células solamente con ácido palmítico durante 24 h, las células que tenían la lipina-2 disminuida mostraban una mayor producción de IL-1β madura (Figura 71). Estos datos indicaban que, el ácido palmítico por sí sólo, era capaz de realizar las dos señales necesarias para la activación del inflammasoma, y que la respuesta estaba incrementada cuando la lipina-2 estaba disminuida. Este comportamiento se observaba por igual en macrófagos de la línea celular RAW 264.7 (Figura 71 A) y en macrófagos humanos (Figura 71 C). Sin embargo, en macrófagos murinos primarios ocurría el efecto contrario (Figura 71 B). Los BMDM procedentes de animales Lpin2<sup>-/-</sup> no presentaban diferencias en la producción de IL-1β con respecto a los BMDM procedentes de animales wt tras activación por ácido palmítico. Es destacable que las BMDM generaron IL-1β antes que el resto de macrófagos en respuesta a ácido palmítico (16 h frente a 24 h).

En conclusión, tras la activación celular con ácido palmítico, la lipina-2 regula la producción de IL-1β en células RAW 264.7 y en macrófagos humanos, pero no en BMDM.

### 5.1.3 La falta de lipina-2 aumenta la producción de IL-1 $\beta$ por ácido palmítico en células preactivadas con LPS

Posteriormente, se evaluó el efecto del ácido palmítico como DAMP en células preactivadas con LPS, de modo que así actuaría como señal 2 de activación del inflamasoma NLRP3.

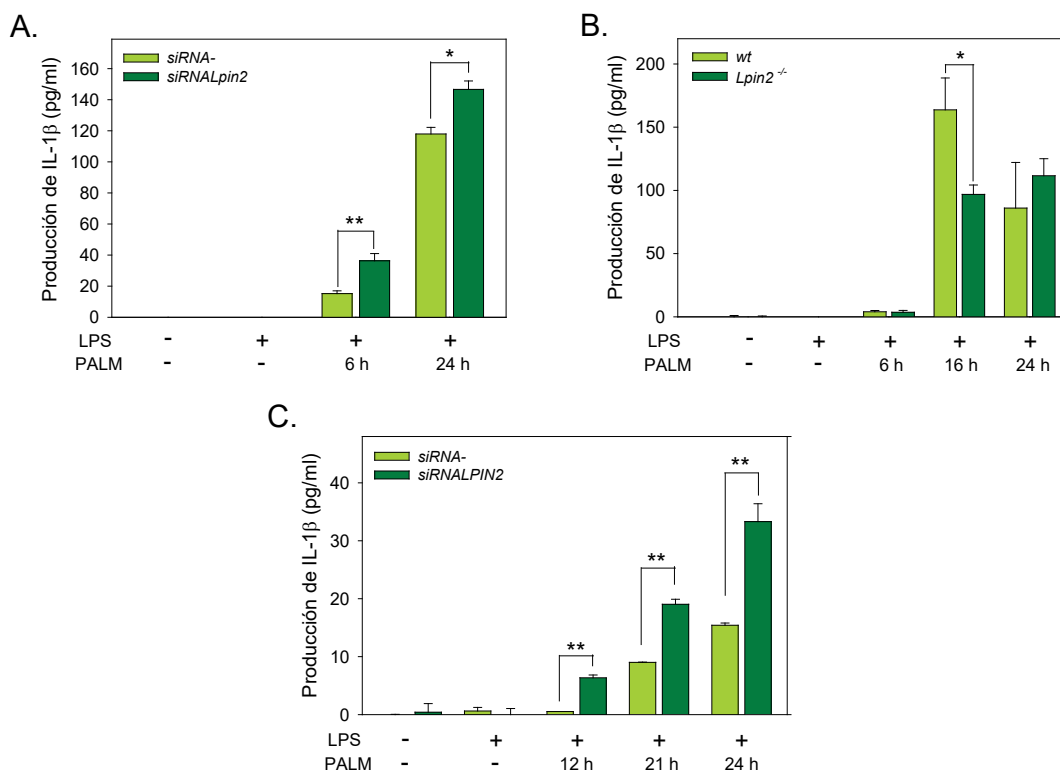
El estudio se inició con una dosimetría de LPS, para ver si a diferentes dosis de LPS, la producción de IL-1 $\beta$  por ácido palmítico variaba.



**Figura 72. Efecto de la falta de lipina-2 sobre la producción de IL-1 $\beta$  por ácido palmítico en células RAW 264.7 preactivadas con distintas dosis de LPS.** Se recogieron sobrenadantes de células RAW 264.7. Estas células fueron silenciadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con las dosis indicadas de LPS durante 4 h y ácido palmítico (PALM) (300  $\mu$ M) durante 6 h y se analizó la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Los análisis mediante ELISA revelaron que, la producción de IL-1 $\beta$  por ácido palmítico en células primadas con LPS, era mayor en las células que tenían la lipina-2 disminuida (Figura 72). Esto ocurría en todas las condiciones estudiadas, de forma independiente a la dosis de LPS utilizada. Dado que la concentración de LPS apenas influía en la producción final de IL-1 $\beta$ , se decidió emplear la misma dosis utilizada en el modelo clásico de activación del inflamasoma por LPS y ATP: 200 ng/ml de LPS.

Una vez seleccionada la dosis de LPS adecuada para preactivar los macrófagos, se analizó el tiempo de ácido palmítico necesario para activar el inflamasoma NLRP3. Se realizó un ensayo de tiempo-respuesta con el ácido graso sobre células preactivadas con LPS.



**Figura 73. Efecto de la falta de lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$  por ácido palmítico en macrófagos preactivados con LPS.** A) Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ácido palmítico (PALM) (300  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. B) Los BMDM procedentes de animales wt y Lpin2<sup>-/-</sup> fueron estimulados como en A. C) Los macrófagos humanos fueron silenciados por nucleofección con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a LPIN2 (siRNALPIN2) y estimulados como en A. Los sobrenadantes de A, B y C se recogieron y se analizaron para cuantificar la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

En la Figura 73 se muestra la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos de distinta procedencia preactivados con LPS y, posteriormente, tratados con ácido palmítico. Los datos indican que, al utilizar ácido palmítico como señal dos, el efecto sobre la producción de IL-1 $\beta$  era mucho más rápido que cuando éste ejercía por sí sólo las dos señales. Los niveles de IL-1 $\beta$  madura se empezaron a detectar a partir de las 6 h de estimulación con el ácido graso, siendo mayores en las células RAW 264.7 y en macrófagos humanos con una expresión disminuida de lipina-2 a todos los tiempos de estimulación estudiados (Figura 73 A y Figura 73 C). Sin embargo, al igual que ocurría cuando los BMDM eran estimulados únicamente con ácido palmítico, la producción de IL-1 $\beta$  era igual o menor en los BMDM procedentes de animales Lpin2<sup>-/-</sup> que en los procedentes de animales wt (Figura 73 B).

Según estos estudios se puede concluir que la lipina-2 atenúa la producción de IL-1 $\beta$  por ácido palmítico en células RAW 264.7 y en macrófagos humanos preactivados con LPS, pero no en BMDM.

5.1.3.1 El aumento de producción de IL-1 $\beta$  por ácido palmítico en células sin lipina-2 preactivadas con LPS es dependiente de la activación de MAPK

Tras describir que la lipina-2 era capaz de modular la activación del inflamasoma por ácido palmítico como señal 2, se pasó a definir como era esa regulación.

En la literatura se ha descrito que, tanto p38 como JNK, son dos de las MAPK que intervienen en la producción de IL-1 $\beta$  (60, 266-268). Para comprobar si alguna de las proteínas de la familia de las MAPK estaba implicada en la producción de la IL-1 $\beta$  en el modelo aquí propuesto, se recurrió al uso de inhibidores, para después analizar el efecto que tenían sobre la producción de esta citoquina.

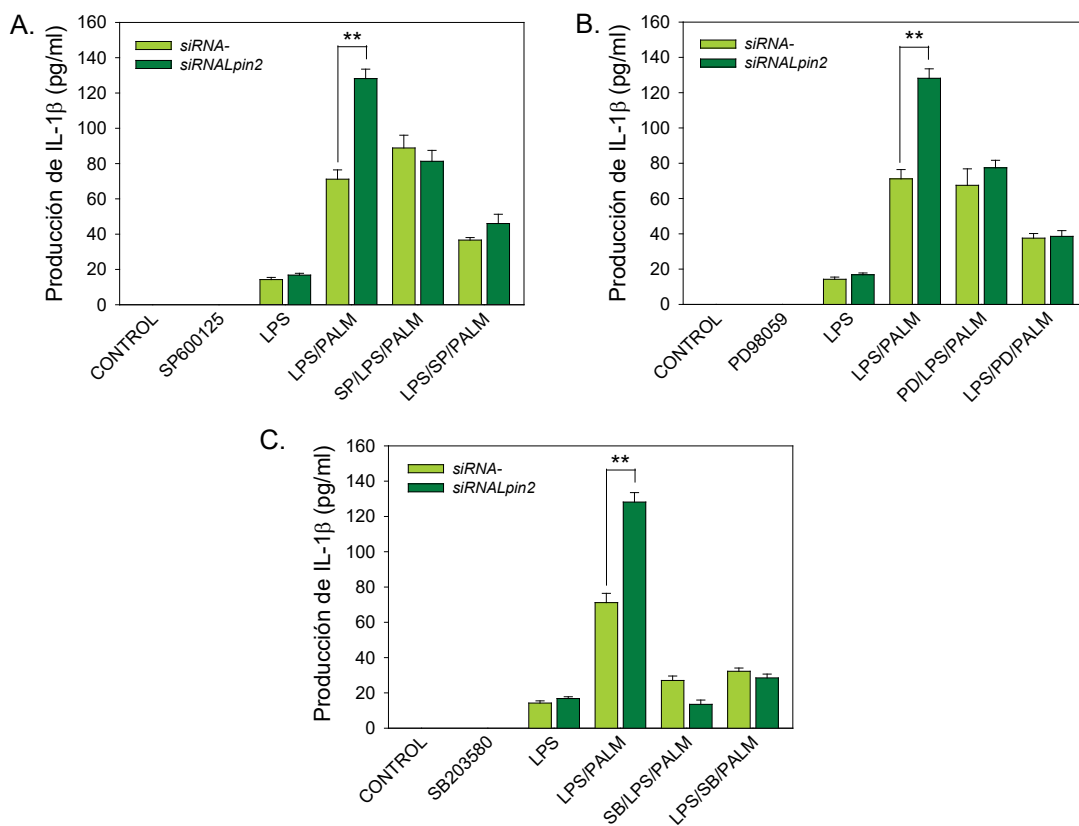


Figura 74. **Papel de las MAPK en la producción de IL-1 $\beta$  en células RAW 264.7 con diferente expresión de lipina-2.** Se recogieron sobrenadantes de células RAW 264.7 que fueron silenciadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimulados con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y ácido palmítico (PALM) (300  $\mu$ M) durante 6 h, en presencia o no de los inhibidores de JNK (SP600125, 10  $\mu$ M) (A), MEK (PD98059, 10  $\mu$ M) (B) y p38 (SB203580, 10  $\mu$ M) (C), antes de la primera señal (LPS) o de la segunda señal (ácido palmítico) según se indica. Se analizó la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

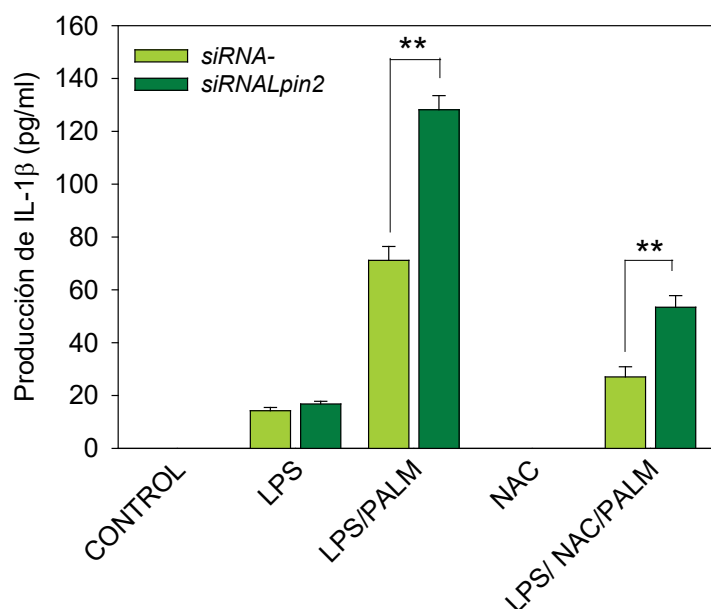
Los resultados obtenidos indicaron que la sobreproducción de IL-1 $\beta$  dependiente de lipina-2 estaba modulada por la activación de las MAPK. Cuando se inhibieron JNK y ERK antes de la señal 1, con SP600125 y PD98059 respectivamente, la producción de IL-1 $\beta$  se

igualó entre las células que tenían la lipina-2 disminuida y las células control (Figura 74). También se observó que p38 jugaba un papel importante en esta producción. Tras el uso de su inhibidor, el SB203580, la producción de IL-1 $\beta$  se inhibía casi por completo, tanto en las células tratadas con siRNA frente a lipina-2 como en las tratadas frente al siRNA control. Por otro lado, cuando se inhibían las MAPK antes de la señal 2 (por tanto sin alterar la producción de pro-IL-1 $\beta$ ), la IL-1 $\beta$  madura también disminuía. Esto era indicativo de que las MAPKs podrían estar también relacionadas con la activación del inflamasoma en este contexto, quizás por fosforilación de NLRP3 o ASC.

En conclusión, el aumento de la producción de IL-1 $\beta$  que tiene lugar en ausencia de lipina-2 tras la estimulación con ácido palmítico en células primadas con LPS, está regulado por la activación de proteínas que componen la familia de MAPK.

### 5.1.3.2 El aumento de producción de IL-1 $\beta$ por ácido palmítico en células sin lipina-2 es independiente de la producción de ROS

Otra de las causas de activación del inflamasoma NLRP3, cómo ya se ha mencionado previamente, es la formación de ROS. Para evaluar si los ROS producidos por el ácido palmítico podrían estar aumentando la activación del inflamasoma NLRP3 cuando falta la lipina-2, se incubaron las células en presencia de NAC, un antioxidante muy utilizado en la literatura por su capacidad de minimizar los efectos negativos asociados a estrés oxidativo.

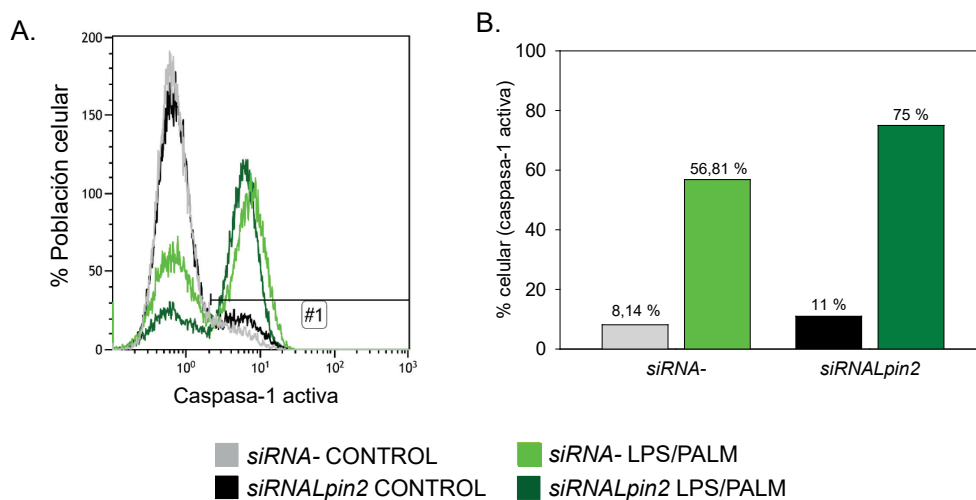


**Figura 75. Papel de los ROS en la producción de IL-1 $\beta$  en células RAW 264.7 por ácido palmítico.** Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a la Lpin2 (siRNALpin2). Posteriormente, las células RAW 264.7 fueron preactivadas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y estimuladas con ácido palmítico (PALM) (300  $\mu$ M) durante 6 h en presencia o ausencia del antioxidante NAC (2,5 mM). Se recogieron los sobrenadantes celulares y se analizó la producción de IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 75 se muestra que, tras el tratamiento con NAC, la producción de IL-1 $\beta$  por ácido palmítico en células preestimuladas con LPS disminuía. Sin embargo, la disminución observada en la producción de IL-1 $\beta$  ocurría de forma similar en las células con y sin lipina-2 y en las que tenían esta proteína disminuida, indicando que la producción de ROS no estaría mediando la sobreproducción de IL-1 $\beta$  asociada a la falta de lipina-2.

### 5.1.3.3 La falta de lipina-2 aumenta la activación de caspasa-1 por ácido palmítico en células preactivadas con LPS

Para profundizar en el estudio de la activación del inflamasoma por ácido palmítico como señal 2, se estudió si la lipina-2 afectaba a la presencia de caspasa-1 activa intracelular en esas condiciones de estimulación. Los análisis se hicieron mediante citometría de flujo, de nuevo cuantificando la unión irreversible de la caspasa-1 activa a su inhibidor fluorescente.

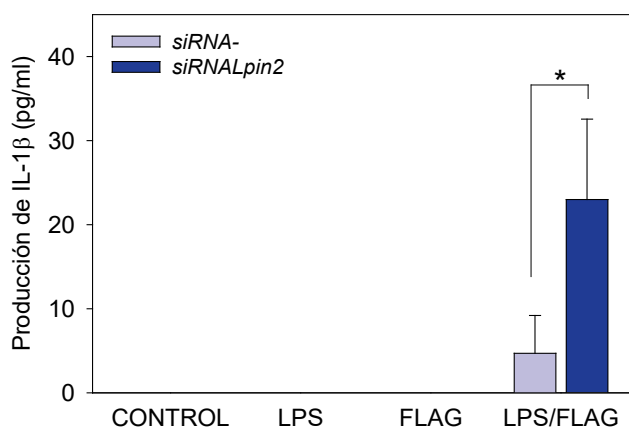


**Figura 76. Efecto de la falta de lipina-2 en la activación de la caspasa-1 por ácido palmítico en células RAW 264.7.** Las células RAW 264.7 se trataron con LPS durante 4 h y el vehículo (BSA) o ácido palmítico (PALM) (300  $\mu$ M) durante 20 h después de haber sido silenciadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2). Posteriormente, se marcaron con FLICA® según se indica en materiales y métodos. A) Análisis de la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. B) Representación de la cuantificación en % de las células que presentan caspasa-1 activa. Los datos se procesaron mediante el software Kaluza™ y por condición se analizaron 30000 eventos. Los diagramas son representativos de tres experimentos independientes.

En la Figura 76 se representa el porcentaje de la población celular que tiene la caspasa-1 activa dentro de la célula. Antes de comenzar la activación del inflamasoma con ácido palmítico, ni las células control ni las células tratadas con el siRNA frente a Lpin2 presentaban caspasa-1 activa. Tras estimular las células preactivadas con LPS con ácido palmítico durante 20 h, el porcentaje de células que contenían caspasa-1 activa, fue mayor en las células que tenían reducida expresión de lipina-2 (verde oscuro, 75%) con respecto a las control (verde claro, 56,81%). Estos resultados apoyan la idea de que la lipina-2 regula negativamente la activación de la caspasa-1 por ácido palmítico.

## 6 LA LIPINA-2 TAMBIÉN MODULA LA PRODUCCIÓN DE IL-1 $\beta$ A TRAVÉS DEL INFLAMASOMA NLRC4.

La producción de IL-1 $\beta$  puede estar regulada, además de por el inflamasoma NLRP3, por otros inflamasomas. Otro de los complejos multiproteicos más estudiados, también implicado en la producción de IL-1 $\beta$ , es el inflamasoma NLRC4. El modelo de activación de este inflamasoma es similar al del NLRP3, ya que también son necesarias dos señales; una señal 1 que active los receptores TLR para producir pro-IL-1 $\beta$ , y una señal 2 que desencadene el ensamblaje del inflamasoma NLRC4. Sin embargo, en el caso del inflamasoma NLRC4, el receptor NLR tras ser activado es capaz de reclutar directamente la caspasa-1 activándola, aunque la proteína adaptadora ASC sería necesaria para la completa activación del complejo (269). Para activar el inflamasoma NLRC4, los estímulos más empleados como señal dos son la flagelina bacteriana o sistemas de secreción bacterianos tipo III. En este estudio, para ver si la lipina-2 tenía alguna implicación en la respuesta a través del inflamasoma NLRC4, se utilizaron células RAW 264.7 tratadas con un siRNA frente a la lipina-2, y activadas con LPS como señal 1 y flagelina como señal 2.



**Figura 77. Producción de IL-1 $\beta$  en células RAW 264.7 a través del inflamasoma NLRC4.** Las células RAW 264.7 fueron tratadas con 20 nM de siRNA negativo (siRNA-) o con 20 nM de siRNA frente a Lpin2 (siRNALpin2) y estimuladas con LPS (200 ng/ml) durante 4 h y/o flagelina (FLAG) (100 ng) durante 16 h, y se analizó la producción de IL-1 $\beta$  en sobrenadantes mediante ELISA. Los datos se representan como la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

En la Figura 77 se representa la liberación de IL-1 $\beta$  madura en los sobrenadantes de células tratadas en las condiciones anteriormente mencionadas. La producción de IL-1 $\beta$  madura es mayor en las células con expresión de lipina-2 disminuída que en células control.

En conclusión, la lipina-2 también regula la producción de IL-1 $\beta$  desencadenada por activadores del inflamasoma NLRC4 en células RAW 264.7 preactivadas con LPS.





## **V. *DISCUSIÓN***

---



La biología de la IL-1 $\beta$  está relacionada con el desarrollo de enfermedades autoinflamatorias, y hasta la fecha, la única enfermedad autoinflamatoria descrita no relacionada con mutaciones en proteínas que conforman el inflamasoma o intervienen en la acción de la IL-1 $\beta$ , es el síndrome de Majeed, producido por mutaciones en el gen *LPIN2*. El trabajo experimental realizado en la presente tesis doctoral pone de manifiesto por primera vez la importancia de la lipina-2, una enzima del metabolismo lipídico, en la regulación de la producción de IL-1 $\beta$  desencadenada por la activación del inflamasoma NLRP3 en macrófagos.

El hecho de que las lipinas sean enzimas del metabolismo lipídico, ha dirigido durante décadas la atención de los investigadores al estudio de su función en tejidos metabólicamente activos, como son el hígado y el tejido adiposo, mientras que su posible función en el sistema inmune o las células que lo componen, ha sido poco explorada hasta la fecha. Aun así, existen investigaciones que indican que las lipinas podrían tener un nicho en la activación proinflamatoria de las células del sistema inmune innato. Por ejemplo, hace más de 15 años se desveló que la actividad PAP-1, característica de las lipinas, interviene en la generación de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) a través de la expresión de COX-2 (270). Diez años después se describió que la liberación de ácido araquidónico generada por la activación de la cPLA<sub>2</sub>  $\alpha$  tras la estimulación del receptor TLR4, es también dependiente de la actividad PAP-1 (271). Estos estudios se basaron en el uso de inhibidores de la actividad PAP-1 no específicos, como el propranolol. La elucidación de la secuencia génica de las lipinas a principios de los años 2000, permitió la generación de herramientas más potentes y específicas que el uso de inhibidores, como la tecnología siRNA, para estudiar su papel en la célula. Gracias a ello, en los últimos años se han publicado diversas investigaciones que desvelan un importante papel para la lipina-1 y lipina-2 en los procesos inflamatorios desencadenados por los macrófagos (226, 227, 231). La idea de que la lipina-2 podía tener un papel importante del sistema inmune, surgió del hecho de que las mutaciones en el gen que la codifican, daban lugar al síndrome de Majeed y a algunos tipos de psoriasis (235, 237, 242), enfermedades cuyo cuadro clínico presenta un importante componente inflamatorio. Hasta la fecha, pocas son las publicaciones que profundizan en los mecanismos a través de los cuales aparece este síndrome, aunque sí es sabido que fármacos que bloquean la acción de la IL-1 $\beta$  producen una disminución de los niveles de citoquinas proinflamatorias en el suero de estos pacientes (244). Estos datos llevaron a especular que la lipina-2 estaba modulando la activación del inflamasoma, y los resultados presentados en esta memoria apoyan esa hipótesis.

# **1 CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA PRIMERA SEÑAL DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 DESCRIBIENDO SUS EFECTOS SOBRE LOS PROCESOS DE SEÑALIZACIÓN POR TLR4 EN MACRÓFAGOS.**

## **1.1 ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN POR LPS.**

En este estudio, se ha descrito que la falta de lipina-2 incrementa la producción de IL-1 $\beta$ , en parte, por un aumento en la señalización a través de TLR4.

Ante diversos estímulos, el receptor TLR4 desencadena una cascada de fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas, modificaciones post-traduccionales importantes que controlan un rango amplio de procesos biológicos, entre los que se encuentran la inducción génica de pro-IL-1 $\beta$  y la activación del propio inflammasoma (55, 60).

En el sistema aquí estudiado, la sobreproducción de IL-1 $\beta$  en ausencia de lipina-2 se reduce por inhibidores específicos de la MAPK JNK. En la literatura se ha descrito que la activación de JNK fosforila c-Jun, un miembro de la familia de proteínas Jun, que forma parte del factor de transcripción AP-1 y regula la transcripción de distintos genes proinflamatorios (272), entre ellos el que codifica para la pro-IL-1 $\beta$  (273). Por ello, la mayor fosforilación/activación de JNK observada en células sin lipina-2 podría colaborar en la inducción de pro-IL-1 $\beta$  y el resto de genes proinflamatorios analizados a través de AP-1. De hecho, trabajos anteriores hechos en el laboratorio han demostrado que en ausencia de lipina-2, la activación macrofágica produce la fosforilación de c-Jun y la activación de AP-1 dependiente de JNK (231) que da lugar a una mayor transcripción de genes proinflamatorios. En esos estudios, la activación se realizaba con ácido palmítico, que actúa, al menos en parte, a través de TLR4 (13). Por tanto, los resultados podrían ser extrapolables a sistema de activación con LPS empleado en esta memoria, apoyando la idea de que AP-1 podría estar colaborando con otros factores de transcripción como NF- $\kappa$ B en el aumento de pro-IL-1 $\beta$  observada en ausencia de lipina-2. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que JNK esté contribuyendo a una mayor activación del inflammasoma por fosforilación de alguno de sus componentes (ver más abajo).

Por otro lado, la importancia de las fosforilaciones y desfosforilaciones durante la activación del inflammasoma NLRP3 ya ha sido ampliamente descrita en la literatura, destacando el papel de diferentes quinasas como PKC- $\delta$ , PKR, DAPK, Syk y MAPK, aunque los mecanismos de acción a través de los que actúan aún permanecen oscuros (60, 267, 274-276). En particular, se ha demostrado que JNK es una de las quinasas implicadas en la

actividad del inflamasoma en macrófagos, regulando la formación de *specks* mediante la fosforilación de ASC en múltiples residuos, entre los que se encuentra la Tyr144, esencial para este proceso (60). La mayor fosforilación de JNK tras tratamiento con LPS en células carentes de lipina-2 (Figura 31) podría ser causante, al menos en parte, de la mayor activación del inflamasoma NLRP3 observada en esas células. El mecanismo subyacente a esta activación podría ser, entre otros, un aumento de la fosforilación de ASC dependiente de JNK, con el consecuente incremento en la activación de caspasa-1. Por ello, el análisis de la fosforilación de ASC en el modelo aquí estudiado, ayudaría a vislumbrar si esta vía está implicada en la hiperproducción de IL-1 $\beta$  en ausencia de lipina-2. De ser así, inhibidores diseñados específicamente para inhibir este proceso podrían ser fármacos potenciales para el tratamiento del síndrome de Majeed.

La activación de p38 también juega un papel importante en la producción de IL-1 $\beta$ , si bien la relación de esta quinasa con la lipina-2 es diferente para la señal 1 que para la señal 2 (Figura 32). De hecho, durante la señal 1, p38 parece controlar la producción de IL-1 $\beta$  de forma independiente de lipina-2, ya que su inhibición durante el tratamiento con LPS reduce casi por completo los niveles de la citoquina, tanto en células que expresan como en células que no expresan lipina-2. Por tanto, p38 tiene gran relevancia en este paso. A favor de estos resultados, experimentos previos del laboratorio no mostrados en esta memoria indican que la inhibición de p38 anula casi por completo la expresión de ARNm para IL-1 $\beta$ . En la literatura se ha descrito que C/EBP $\beta$  es sustrato de p38 y podría actuar como activador transcripcional para *Il1b* en macrófagos (267, 277-279). Por ello, sería interesante analizar si existen otros factores de transcripción dependientes de p38 capaces de aumentar la expresión del gen *Il1b* en las células carentes de lipina-2, o si C/EBP $\beta$  participa en esta función. Sin embargo, durante la señal 2, que promueve la maduración de la pro-IL-1 $\beta$ , p38 es necesaria para que la falta de lipina-2 consiga incrementar los niveles de la citoquina por encima de las células control, sin llegar a afectar la producción de IL-1 $\beta$  por éstas últimas. De ello se desprende que deben existir mecanismos de regulación de la activación del inflamasoma, aún no descritos, que dependan de p38, y a través de los cuales la falta de lipina-2 incrementaría la maduración de IL-1 $\beta$ .

En cuanto a ERK, cuya fosforilación también aumenta en células carentes de lipina-2 activadas por LPS, su inhibición tan sólo parece afectar a la sobreproducción de IL-1 $\beta$  generada en ausencia de lipina-2 (Figura 32). Posiblemente por esta razón, por no afectar a la generación de IL-1 $\beta$  en células procedentes de animales *wf*, poco se sabe sobre el posible mecanismo de acción que ejerce esta MAPK en la activación del inflamasoma, y estudios adicionales serían necesarios para dilucidar el paso en el que podría intervenir.

La activación de NF- $\kappa$ B está principalmente gobernada por la activación de las IKKs, que posteriormente fosforilan los inhibidores I $\kappa$ Bs, entre los que se encuentran I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$ . La fosforilación de I $\kappa$ Bs conlleva procesos de poliubiquitinación y su consecuente degradación, que dará lugar a la liberación de distintos dímeros de NF- $\kappa$ B, con su consecuente translocación al núcleo (revisado en (280)). Por ejemplo, tras activación de TLR4, se desencadenan cascadas de señalización que culminan en la activación de IKK $\beta$  que fosforila I $\kappa$ Bs, entre las que se encuentra I $\kappa$ B $\alpha$ , cuya degradación es muy rápida y da lugar a la liberación principalmente de dímeros de p65 y p50 (281-285). Los resultados presentados en esta memoria muestran que la falta de lipina-2 aumenta la activación de NF- $\kappa$ B (medida por translocación a núcleo de p65 y p50), uno de los principales factores de transcripción implicados en la inducción génica de pro-IL-1 $\beta$ , tanto en macrófagos murinos como humanos (Figura 29 y Figura 30). Es posible que las diferencias observadas en la activación de NF- $\kappa$ B en las células con y sin lipina-2, se deban a alteraciones en la degradación de las diferentes I $\kappa$ Bs. En este trabajo se ha analizado únicamente la expresión proteica de I $\kappa$ B $\alpha$  en macrófagos murinos, sin apreciarse grandes diferencias entre las células con y sin lipina-2, probablemente debido a que su degradación es muy rápida, y ya es total a 30 min de tratamiento (Figura 29). Pero en la activación de NF- $\kappa$ B también participan otras I $\kappa$ Bs, que no han sido exploradas en este trabajo, y que es posible que estén involucradas en el aumento de traslocación a núcleo de p65 y p50 observado en las células sin lipina-2. Entre las I $\kappa$ Bs que podrían intervenir en esta respuesta se encuentran la I $\kappa$ B $\beta$  o I $\kappa$ B $\epsilon$ , cuya degradación e inducción posterior tiene una cinética más lenta y tardía que la de I $\kappa$ B $\alpha$  (285-288). En concreto, la I $\kappa$ B $\epsilon$  que es exclusiva de las células de la línea mielóide, podría estar controlando la activación de NF- $\kappa$ B a tiempos más tardíos a través de su fosforilación en los residuos de serina S157 y S161 por IKK, (285, 289, 290), ya que se ha observado que a 4 horas de activación por LPS, las células deficientes en lipina-2 aún tienen incrementada la activación de NF- $\kappa$ B (Figura 30).

La idea de que la lipina-2 modula la activación de NF- $\kappa$ B también viene avalada por el significativo aumento de la producción de TNF- $\alpha$  en ausencia de lipina-2, otro evento dependiente de la activación de este factor de transcripción. Dado que se ha descrito en la literatura que la preactivación de las células con TNF- $\alpha$  es suficiente para inducir la activación de caspasa-1 por ATP (55), es posible que la señalización tanto por TNFR1 como por TNFR2 participen en la producción exacerbada de IL-1 $\beta$  cuando la lipina-2 no está presente.

Por otro lado, datos iniciales aquí presentados apuntan a un papel de la lipina-2 en la producción de IL-1 $\beta$  a través del inflammasoma NLRC4 (Figura 77). Puesto que la fosforilación del receptor NLRC4 después de la estimulación con sus ligandos también es un proceso crítico para su activación (275), es posible que en este modelo la alteración de procesos de

fosforilación y desfosforilación en ausencia de lipina-2 sean los moduladores de la generación de IL-1 $\beta$ .

## **1.2 ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA INDUCCIÓN DE GENES QUE COMPONEN EL INFLAMASOMA.**

Durante la primera señal de activación del inflamasoma, la producción de pro-IL-1 $\beta$  no es el único proceso clave. La inducción de NLRP3 es otro de los eventos necesarios para que el inflamasoma pueda activarse por completo, y también está controlado por NF- $\kappa$ B. El hecho de que el tratamiento con LPS aumente la inducción de NLRP3 en células sin lipina-2 con respecto a las células control (Figura 33), apoya de nuevo el papel de la lipina-2 como moduladora de la activación de NF- $\kappa$ B. Pero los niveles de NLRP3 también dependen de mecanismos post-traduccionales que estimulen su deubiquitinación (61, 291, 292), ya que en células sin estimular, NLRP3 está altamente ubiquitinado en diferentes dominios (291). Se ha descrito que tanto la activación por LPS como por ATP, pueden activar enzimas deubiquitinadas que podrían actuar sobre diferentes dominios de NLRP3, favoreciendo así la activación del inflamasoma. Aunque en este trabajo se ha mostrado que la lipina-2 juega un papel importante en la regulación transcripcional de NLRP3, no se puede descartar la posibilidad de que intervenga también en su deubiquitinación y falta de degradación proteosomal, procesos que también forman parte del proceso de activación de este inflamasoma. Además, en varios pacientes con enfermedades autoinflamatorias se ha descrito una desregulación de la expresión de NLRP3 por incrementos en la actividad de su promotor (293). Sería interesante estudiar si la falta de lipina-2 afecta a dicha actividad ya que esos estudios, junto al uso de inhibidores de la activación de NF- $\kappa$ B, podrían aportar nuevas vías terapéuticas para tratar a los pacientes con síndrome de Majeed.

## **2 CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA SEGUNDA SEÑAL DE ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 MEDIADA POR ATP**

Aunque los inflamasomas tienen un importante papel durante la activación de la inmunidad innata dirigida a patógenos, una activación excesiva o desregulada de éstos, especialmente del inflamasoma NLRP3, conlleva la aparición de enfermedades autoinflamatorias y autoinmunes (revisado en (45)), y pueden representar dianas potenciales para el desarrollo de nuevas terapias que ayuden a su control o cura. Por ello, entender los procesos básicos y los mecanismos implicados en la activación de la segunda señal del inflamasoma es de gran importancia. En este estudio se ha descrito que la lipina-2 no sólo regula la activación del inflamasoma NLRP3 a través de la señalización por LPS, sino también a través de la actividad de caspasa-1 tras estimulación con ATP (Figura 43 y Figura 44).

La pro-IL-18 se expresa mayoritariamente de forma constitutiva, por lo que aumentos de la liberación de su forma activa solamente se podrían explicar por una mayor activación de la caspasa-1. El hecho de que se detectaran incrementos en la liberación de IL-18 madura en células carentes de lipina-2 (Figura 35), fue uno de los datos clave que llevó a especular sobre la posibilidad de que la lipina-2 estuviera implicada en la activación del inflamasoma a nivel de la segunda señal. Por ello, a partir de esos resultados, se abordó el estudio de la implicación que podría tener la lipina-2 en los distintos eventos que se desencadenan durante la segunda señal de activación.

Los hallazgos de los últimos años en torno al inflamasoma NLRP3, han puesto de manifiesto una gran diversidad de estímulos no relacionados entre sí, ni química ni estructuralmente, capaces de activarlo. Esto llevó a pensar que una señal intracelular común para todos ellos debía ser la desencadenante de dicha activación, y se apuntó a la bajada en la concentración intracelular de  $K^+$  como posible señal (94). El ATP es un potente activador del inflamasoma NLRP3 que disminuye los niveles intracelulares de  $K^+$  actuando a través de los receptores P2X7. Estos canales iónicos son especiales, y para su activación requieren concentraciones de ATP al menos 100 veces mayores (en el rango mM) (294) que las necesarias para activar otros receptores P2X (desde 1  $\mu$ M a 30  $\mu$ M) (119). Además, se caracterizan también por tener dos fases de activación: se abren inicialmente formando un poro conductor de cationes que permite que cationes monovalentes y divalentes permeen la membrana celular, pero en respuesta a prolongadas y repetidas aplicaciones de su agonista, sufren un proceso de sensibilización. Este proceso provoca un aumento de la amplitud de corriente y promueve la transición a un estado dilatado del poro, que se distingue por su capacidad para permitir el paso de cationes orgánicos de mayor tamaño, como NMDG<sup>+</sup> y marcadores fluorescentes. Además, una vez que el receptor alcanza ese estado dilatado, su reversión a un estado basal es más difícil de conseguir, y ante la aplicación consecutiva de sus agonistas, el poro se dilata más pudiendo eventualmente producir muerte celular (295, 296). Además, la relevancia de los cambios intracelulares en los niveles de  $K^+$  en la activación del inflamasoma también fue demostrada por *Petrilli et al.* al comprobar que altas concentraciones de  $K^+$  en el medio extracelular inhibían la maduración de pro-IL-1 $\beta$  (50). Posteriormente, *Muñoz-planillo et al.*, describieron que ante ciertos estímulos entre los que se encuentra el ATP, la generación de daño mitocondrial, ROS y cambios en el volumen celular no eran eventos necesarios para activar el inflamasoma NLRP3, ya que la simple bajada de la concentración intracelular de  $K^+$  era suficiente para activar la caspasa-1 (94). Teniendo esto en cuenta se realizaron experimentos de activación del inflamasoma en medios con distinta concentración de  $K^+$ , en los que quedó reflejada la importancia de la concentración intracelular de  $K^+$  en el modelo de activación del inflamasoma NLRP3 aquí utilizado.



Las células activadas con LPS+ATP en un medio con alta concentración de  $K^+$  (45 mM), que impide la caída de los niveles intracelulares de  $K^+$ , apenas produjeron IL-1 $\beta$ , independientemente de la expresión de lipina-2. Sin embargo, las células activadas en ausencia de  $K^+$  en el medio, condición que facilita la salida del ión, produjeron grandes cantidades de la citoquina, siendo la producción mayor en las células carentes de lipina-2 (Figura 40). Estos resultados apoyan la idea de que una mayor la salida de  $K^+$  intracelular sea el mecanismo por el que el inflamasoma NLRP3 se activa más en las células sin lipina-2.

Con el fin de analizar si la activación del poro P2X7 por sí misma e independientemente de señales previas provenientes de la activación con LPS, estaba alterada en células carentes de lipina-2, se analizó la caída de  $K^+$  intracelular en células activadas únicamente con ATP. En esas condiciones, se observó que aunque la caída de  $K^+$  era igual de abrupta en células con o sin lipina-2 (alcanzando un máximo a los 2 minutos de aplicación del estímulo), los niveles de  $K^+$  intracelular de las células sin lipina-2 eran siempre significativamente menores que los de las células control (Figura 37). Bien es cierto, que las diferencias son pequeñas y hacen muy difícil explicar el incremento de producción de IL-1 $\beta$  que tiene lugar en las primeras. Es posible que la utilización de otra metodología para el estudio de las concentraciones intracelulares de  $K^+$  (como por ejemplo, el uso de indicadores fluorescentes como el benzofurano isoftalato de unión a  $K^+$  en su forma acetoxi-metil-éster) pudiera abrir más luz en este tema. En este sentido, los resultados obtenidos por *patch-clamp* son mucho más informativos y demuestran claramente que las células sin lipina-2 tienen mayores corrientes de iónicas que las células control, lo que daría a entender que la salida de  $K^+$  debe ser más rápida en las primeras (Figura 38 y Figura 39). Por otra parte, estos experimentos también han desvelado que el poro P2X7 permanece más tiempo abierto tras estimulación en las células carentes de lipina-2, y por tanto, la descompensación iónica que de ello deriva debe ser más prolongada en el tiempo en estas células. En definitiva, aunque los experimentos de medida de  $K^+$  intracelular no nos ayudan en explicar si una mayor bajada (o más rápida) de este ión en las células sin lipina-2 es el responsable de una mayor activación del inflamasoma, los experimentos *patch-clamp* han sido mucho más concluyentes. En base a esto, se puede decir que las células sin lipina-2 presentan una mayor apertura del poro P2X7 y que éste permanece abierto durante más tiempo, manteniendo más bajos los niveles intracelulares de  $K^+$ , hechos que deben contribuir a la mayor activación del inflamasoma NLRP3.

Además de utilizar ATP como activador de la segunda señal del inflamasoma, también se utilizaron otros compuestos, los cuales actúan por mecanismos muy diferentes al ATP. Así, la nigericina activa el inflamasoma NLRP3 a través de la salida de potasio mediante un

intercambio iónico  $H^+/K^+$  no dependiente del receptor P2X7, y la alúmina y el MSU lo hacen a través fagocitosis y consiguiente daño lisosomal (82, 84). Si en lugar de utilizar ATP como segunda señal, se utilizaba cualquiera de los compuestos previamente mencionados, la lipina-2 no parecía afectar la producción de IL-1 $\beta$  de forma estadísticamente significativa (Figura 21). Estos datos son de gran importancia para este trabajo, ya que desvelan que la lipina-2 ejerce su función principalmente a través de del control de la activación del receptor P2X7, y no de otros posibles activadores del inflamasoma NLRP3.

Otra de las señales descrita como mecanismo común de activación del inflamasoma NLRP3 por los distintos estímulos es la producción de ROS. Sin embargo, los datos obtenidos sugieren que en el modelo aquí estudiado, la generación de ROS no juega un papel crucial en el incremento de la activación del inflamasoma NLRP3 (Figura 53).

En macrófagos, la activación del inflamasoma culmina con la activación de caspasa-1, responsable de producir IL-1 $\beta$  y de inducir piroptosis (171). La metodología más utilizada en la literatura para estudiar este tipo de muerte celular es mediante la cuantificación de actividad LDH en el sobrenadante de las células. Aunque en los estudios aquí presentados la falta de lipina-2 promueve la activación de caspasa-1 y la apertura de poros en la membrana celular que permiten la entrada de marcadores fluorescentes como el IP, o de proteínas fluorescentes como la anexina V marcada con Cy3, no se pudo detectar mayor actividad LDH que nos permitieran concluir que hay más piroptosis en estas células (Figura 49, Figura 50, Figura 51 y Figura 52). Esto podría explicarse porque la liberación de LDH es un evento más tardío y es posible que para su liberación, las células requieran un mayor tiempo de exposición a ATP del que se ha empleado en estos estudios y que, previamente a la piroptosis, la membrana ya pierde su integridad, generándose poros por donde los marcadores mencionados pueden entrar en la célula y unirse a ácidos nucleicos (IP) o a la fosfatidilserina de la cara interna de la membrana (anexina V) (171). El hecho de que las células carentes de lipina-2 presenten una mayor permeabilidad a IP y anexina V sugiere un aumento del número de poros en la membrana celular o igual número pero mayor tamaño de los mismos, o que éstos se formen de manera más rápida.

En las células sin lipina-2, el aumento de la permeabilidad de la membrana podría hipotéticamente dar lugar a una mayor liberación al medio extracelular de partículas de ASC (20-80 kDa). Se ha descrito en la literatura que estas partículas a su vez pueden activar macrófagos vecinos que las internalizan, propagando así la señal inflamatoria a través de la activación de la caspasa-1 y producción de IL-1 $\beta$  (297). Esto es posible porque los complejos multiproteicos formados tras activación con LPS y ATP son de menor tamaño que la LDH, que es una proteína citosólica de 140 kDa y un diámetro de 26,6 nm (298). Esta información

tiene aplicabilidad clínica. De hecho, ya se ha reportado que durante los episodios de inflamación, pacientes con CAPS presentan niveles elevados de partículas de ASC en suero (297). Esto mismo podría ocurrir en pacientes con síndrome de Majeed, y de ser así el incremento de partículas de ASC estaría contribuyendo a extender la activación macrofágica y así aumentar la producción de IL-1 $\beta$  y los síntomas asociados. De confirmarse esta hipótesis, el análisis de partículas de ASC en el suero de estos pacientes podría representar una estrategia adicional para la diagnosis de la enfermedad y así avanzar en los tratamientos para su cura.

### **3 CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DEL COLESTEROL EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA NLRP3 DESENCADENADA POR LA FALTA DE LIPINA-2, Y MÁS CONCRETAMENTE, EN LA AMPLIFICACIÓN DE LA SEGUNDA SEÑAL POR ATP.**

El colesterol es un precursor lipídico de las hormonas esteroideas y sales biliares, que juega un papel muy importante en la estructura biológica de las membranas. El colesterol actúa regulando la fluidez de la membrana plasmática así como la actividad de receptores proteicos que se encuentran embebidos en ella. Entre estos receptores destacan el receptor de transferrina (299), el receptor de insulina (300), el receptor del EGF (301) o el receptor P2X7 (143). Existen al menos dos mecanismos conocidos a través de los cuales el colesterol modula la actividad de los receptores: cambios en la fluidez de la membrana e interacción específica entre el receptor y el colesterol (302-305). Dado que el colesterol es esencial para mantener la rigidez de las membranas celulares, una disminución de sus niveles conlleva un aumento de la fluidez de membrana. Estas alteraciones perturban la función de algunos receptores impidiendo la unión de sus ligandos, como ocurre en el caso del receptor de serotonina (302) o evitando la interacción directa entre el colesterol y el receptor, lo que anula la actividad de éste, tal y como ocurre con el receptor de la oxitocina, el transportador de la serotonina y el receptor 2 de la galanina (303-305).

Los datos aquí presentados sugieren que la lipina-2 ayuda a mantener los niveles celulares de colesterol (Figura 54 y Figura 55) siendo especialmente importantes en el contexto que nos ocupa, los niveles de colesterol de la membrana plasmática. El colesterol está altamente regulado a nivel celular, a través de su biosíntesis y de su entrada (influjo) o salida (eflujo) a través de receptores y transportadores, y es muy posible que la lipina-2 module alguno de esos procesos.

La síntesis de colesterol está gobernada por numerosas enzimas que coordinada y secuencialmente generan este lípido a partir de acetil-CoA. De todas ellas, la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCR) es la principal reguladora del proceso ya que es la que

cataliza el paso limitante de la vía en una reacción irreversible (306). Dada su importancia en la ruta de síntesis del colesterol, la HMGCR representa la principal diana para el desarrollo de fármacos que controlen la hipercolesterolemia y reduzcan el riesgo a sufrir enfermedades cardiovasculares. Entre los fármacos ya desarrollados se encuentran las estatinas, que son estructuralmente similares a la mevalonolactona y, por tanto, actúan como inhibidores competitivos de la enzima (307). La expresión de esta enzima puede inhibirse a través de diferentes mecanismos: por un incremento de la fosforilación de AMPK (308), por un aumento de la activación de PKA (309) o bien mediante retroalimentación negativa por aumentos de colesterol (308, 310). La lipina-2 podría actuar en alguno de los mecanismos de regulación anteriormente citados, favoreciendo la activación de la HMGCR por fosforilación a través de AMPK y PKA o bien facilitando la transcripción del gen que codifica para HMGCR. Este proceso está altamente controlado por las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP, del inglés *sterol regulatory element binding protein*), y una inhibición de la translocación de SREBP a núcleo en células sin lipina-2, disminuiría la síntesis de HMGCR y como consecuencia se reducirían los niveles celulares de colesterol (311, 312).

A parte de una posible participación de la lipina-2 en la biosíntesis, esta enzima podría regular los niveles celulares de colesterol a nivel de transporte. Los receptores X del hígado (LXR, del inglés *liver X receptors*) pertenecen a una familia de factores de transcripción activados por oxisteroides, y juegan un papel importante en el transporte reverso de colesterol (313). Entre sus funciones se encuentra la de regular la expresión de distintos transportadores, de modo que el aumento de la activación de los LXRs desencadena un incremento en la expresión de ABCA1 y ABCG1 (314), e induce la salida de colesterol de la célula, ya que ABCA1 y ABCG1 son las dos proteínas principales responsables del transporte de colesterol a través de las membranas celulares (315). Teniendo estos datos en cuenta, es posible que falta de lipina-2 promueva alteraciones en la actividad de los LXRs y consecuentemente en la expresión de ABCA1 y ABCG1. De confirmarse esta hipótesis, se podría explicar, al menos parcialmente, los niveles reducidos de colesterol observados en estas células.

La desregulación de la homeostasis del colesterol afecta a numerosos procesos inflamatorios. Por ejemplo, tras exposición a *Salmonella*, las células del epitelio intestinal acumulan colesterol y activan la ruta PI3K/Akt, desencadenando una señal antiinflamatoria (316). Además, los niveles de colesterol en la membrana plasmática se correlacionan con la edad (317), hecho que se correlaciona con una disfunción en la respuesta inmune innata (318). Los datos obtenidos en la presente memoria también dejan constancia de la importancia del colesterol en la respuesta antiinflamatoria mediada por lipina-2. Este hallazgo podría tener una gran relevancia en un contexto inmune, en particular en el síndrome de

Majeed, ya que la mera restauración de los niveles de colesterol revierte la activación del inflammasoma por LPS y ATP en células carentes de lipina-2, disminuyendo tanto la oligomerización de ASC, como los niveles de caspasa-1 activa, como la producción de IL-1 $\beta$  (Figura 60, Figura 61 y Figura 62).

Es importante destacar que en los experimentos aquí mostrados, los niveles de colesterol fueron reestablecidos en las células sin lipina-2 antes de la activación con ATP, para que los efectos producidos se debieran a cambios en la actividad del receptor P2X7 y no alteraran la señalización vía TLR4. Sin embargo, los experimentos realizados no permiten concluir aún si el factor responsable del cambio de función del receptor P2X7 en las células carentes de lipina-2 es un cambio en la fluidez de la membrana o una pérdida de la interacción entre el colesterol y el P2X7 que pueda ser importante para su funcionalidad. En la literatura se ha descrito la regulación de la actividad del receptor P2X7 por colesterol, observándose que la disminución de los niveles de este lípido incrementa las corrientes iónicas y la permeabilización de membrana a través de este receptor, mientras que el aumento de colesterol reduce su función (143). Además, el análisis de las regiones del receptor P2X7 implicadas en la sensibilidad a colesterol indicó que las propiedades de apertura y cierre del receptor P2X7 están reguladas por la interacción del colesterol, tanto a través de la región N-terminal como la región C-terminal de éste (143).

En la Figura 78 se muestra el modelo propuesto de cómo el colesterol podría estar modulando la actividad de los receptores P2X7 en células deficientes en lipina-2.

Diferentes estudios han confirmado que la apertura y cierre del receptor P2X7 es particularmente sensible a la naturaleza lipídica de su microentorno (139, 319). Existe un amplio rango de lípidos capaces de potenciar la acción de los agonistas del receptor P2X7 por su capacidad para integrarse en bicapas lipídicas, interrumpiendo su estructura y aumentando la fluidez (319). También, la acumulación de ceramidas por un aumento de la síntesis *de novo* inducido por ATP, y dependiente de la activación del receptor P2X7, está implicada en la muerte celular dependiente de caspasa (139). Asimismo, dado que la lipina es una enzima del metabolismo lipídico, es posible que su falta también desencadene cambios en la estructura y organización del entorno lipídico del receptor P2X7, alterando la composición de lípidos de la membrana plasmática a través de cambios en los niveles de ácido fosfatídico y diacilglicerol de la célula, precursores directos de fosfolípidos. Las posibles modificaciones de la organización lipídica, junto a los niveles disminuidos de colesterol, serían los responsables de la alteración de las propiedades de apertura y cierre del receptor P2X7 observados en las células carentes de lipina-2. Esta idea viene apoyada por el hecho de que, en estas células, el receptor P2X7 es permeable a NMDG<sup>+</sup> (Figura 37), catión

orgánico monovalente de un tamaño mucho mayor al del  $K^+$ , característica que refleja un estado de dilatación del poro del receptor P2X7 que no ocurre en las células control.

En los últimos años, el ambiente lipídico ha sido considerado un elemento crucial para mantener la estructura y función de las proteínas de membrana, hecho que ha llevado al desarrollo de nuevos métodos para entender las interacciones entre lípidos y proteínas de membrana (320). Entre estos métodos se encuentra la espectrometría de masas de alta resolución, por lo que estudios de lipidómica con esta nueva tecnología para monitorizar la interacción entre el receptor P2X7 y los lípidos de su entorno, en presencia y ausencia de lipina-2, podrían desvelar nuevos datos sobre cómo esta enzima regula la funcionalidad del receptor P2X7 y la respuesta inflamatoria.

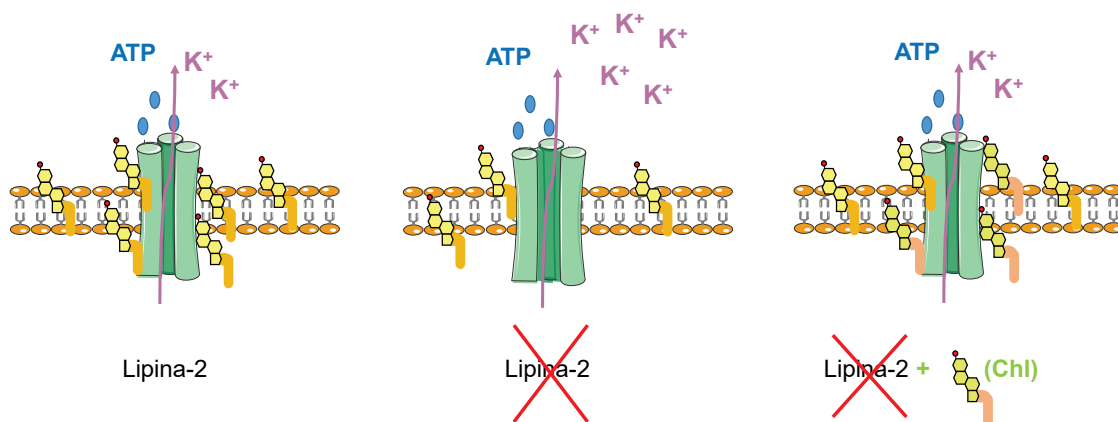


Figura 78. **Posible papel de la lipina-2 en la actividad de los receptores P2X7.** En situación control, los niveles de colesterol son los adecuados para el funcionamiento del receptor tras activación por ATP. Cuando en las células no hay lipina-2, disminuyen los niveles de colesterol y el receptor sufre una mayor dilatación tras su activación por ATP, desencadenando mayores corrientes iónicas. La restauración de los niveles de colesterol en las células sin lipina-2 recupera la actividad normal del receptor P2X7.

#### 4 CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN *IN VIVO* DEL INFLAMASOMA DURANTE EL DESARROLLO DE INFLAMACIÓN INDUCIDA POR LPS EN UN MODELO MURINO

A diferencia de los humanos con mutaciones en el gen de la lipina-2, los ratones *knock out* para dicha proteína no desarrollan el síndrome de Majeed. Según radiografías y escáneres microcomputarizados, estos ratones no presentan inflamación en las articulaciones ni lesiones osteomielíticas, aunque sí anemia, otro de los síntomas característicos de la enfermedad (230). Gracias a un modelo de shock séptico por LPS, el trabajo aquí presentado aporta nuevas evidencias sobre el papel de la lipina-2 en el sistema inmune en ratones y su relación con los procesos inflamatorios descritos en los pacientes con síndrome de Majeed. Está ampliamente descrito que la inyección intraperitoneal de altas dosis de LPS desencadena la producción de  $IL-1\beta$  de forma dependiente del inflammasoma

NLRP3, sin que en este sistema sea necesaria una segunda señal (90, 321, 322). Mediante este tipo de tratamiento, se analizaron en el suero de ratones citoquinas proinflamatorias halladas en el suero de pacientes con síndrome de Majeed, como IL-1 $\beta$ , IL-18 y TNF- $\alpha$ , y se detectaron niveles mayores en los ratones sin lipina-2 que en los ratones control (Figura 63). Por tanto, aunque los ratones *knock out* para lipina-2 no presenten síntomas del síndrome de Majeed, en condiciones de estimulación sus respuestas inflamatorias son exacerbadas. El mayor estado proinflamatorio promovido por la administración intraperitoneal de LPS en ratones deficientes en lipina-2 sugiere que agentes como bacterias, podrían ser el factor ambiental adicional que contribuyese a la aparición del síndrome de Majeed, y que lo harían a través de una hiperactivación del inflammasoma NLRP3, y consiguiente aumento de IL-1 $\beta$ .

El bazo es el órgano linfático periférico más grande, y juega un papel muy importante en la respuesta inmune a endotoxinas ya que, como primera línea de defensa, reconoce moléculas microbianas específicas como el LPS. En la literatura se ha descrito que la administración de LPS induce una respuesta oxidativa marcada en bazo, caracterizada por un aumento de éste, un aumento en la concentración de TBARS (del inglés, *thiobarbituric acid reactive substances*) y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, en esa situación también se produce una disminución de GSH (glutatión reducido), uno de los antioxidantes más importantes del organismo, encargado de eliminar los radicales libres de todos los tipos celulares (323, 324). Es posible que tanto el aumento de tamaño observado en los bazos de animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> como el incremento de la expresión de ARNm de citoquinas proinflamatorias en los bazos e hígados de estos animales tratados con LPS (Figura 64 y Figura 65 y Figura 66), se deban a una respuesta oxidativa mayor desencadenada por la ausencia de lipina-2. Un análisis de los parámetros anteriormente citados podría ayudar a entender el papel que juega este órgano inmune en el desarrollo de la enfermedad autoinflamatoria. Aunque *in vitro* la lipina-2 no parece regular la producción de ROS, es posible que *in vivo* sí lo haga, especialmente en bazo, ya que la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en este órgano se debe fundamentalmente a la acción de la superóxido dismutasa presente no sólo en macrófagos, sino también en neutrófilos, eosinófilos y células epiteliales.

#### 4.1 FACTORES DIFERENCIALES ENTRE RATONES Y HUMANOS QUE PODRÍAN SER LOS CAUSANTES DE PROMOVER LA APARICIÓN DEL SÍNDROME DE MAJEED

Como se ha mencionado previamente, existe la posibilidad de que factores genéticos adicionales a la mutación del gen que codifica para la lipina-2 o la exposición a diversos factores ambientales, contribuyan al desarrollo del síndrome de Majeed en humanos. El hecho de que los ratones de una colonia de laboratorio no estén expuestos a dichos factores adicionales, podría explicar por qué los ratones deficientes en lipina-2 no desarrollan la

enfermedad. Dado que el LPS desencadena una inflamación mayor en ausencia de lipina-2, entre esos factores podrían incluirse agentes infecciosos, como bacterias y virus, a los que los recién nacidos se exponen durante el primer año de vida. Entre las infecciones más comunes a las que se exponen los recién nacidos se encuentran los virus de las familias *Herpesviridae* (ADN de doble cadena), *Parvoviridae* (ADN de cadena simple) y *Picornaviridae* (ADN de cadena simple, como rinovirus y coxsackievirus) (325, 326), y existe una estrecha relación entre las infecciones virales y la activación del inflamasoma y otras vías de activación de la respuesta inmune innata. Por ejemplo, se ha descrito que la infección por rinovirus humanos, que son la principal causa de catarro común en bebés, participa en el desarrollo de asma (327), y que los coxsackievirus intervienen y potencian la activación del TLR4 (328, 329). Asimismo, los virus de ADN de doble cadena son capaces de activar NF- $\kappa$ B a través de STING (del inglés, *stimulator of interferon genes*) (330) o entrar en el citosol y activar directamente el inflamasoma AIM2 (43, 44). También pueden activar el inflamasoma NLRP3 a través de la síntesis de ROS y salida de K<sup>+</sup> (331), y se ha descrito que el ARN vírico de cadena sencilla aumenta la producción de IL-1 $\beta$  dependiente de caspasa-1 (332). Si los recién nacidos con mutaciones en el gen de la lipina-2 se exponen a estos agentes, las infecciones que en bebés sanos causarían pequeños episodios de inflamación, podrían acabar desencadenando el cuadro clínico propio del síndrome de Majeed, debido a que la ausencia de lipina-2 aumentaría la aparición de IL-1 $\beta$  y las consiguientes respuestas asociadas. En este momento aún se desconoce si la lipina-2 también puede participar en los procesos de resolución de la inflamación. Si fuera así, su falta también impediría una apropiada resolución inflamatoria, contribuyendo a mantener los síntomas de la enfermedad.

También cabe destacar, que la luz ultravioleta y otros irritantes cutáneos inducen la secreción de IL-1 $\beta$  de forma dependiente del inflamasoma NLRP3 (87, 333, 334). La colonia de ratones no se ve expuesta a estos agentes, pero sí los humanos, por lo que podrían afectar a los bebés recién nacidos con mutaciones en el gen que codifica para lipina-2 y promover en ellos episodios inflamatorios, y esta podría ser la causa de la aparición de psoriasis y dermatitis transitoria asociada a pacientes con síndrome de Majeed (237).

La identificación de compuestos que inhiban la activación de los inflamasomas y consiguiente producción de IL-1 $\beta$  es de gran importancia clínica (335, 336). Para poder suministrar a los pacientes que sufren de enfermedades autoinflamatorias una terapia efectiva, es necesario conocer el inflamasoma implicado en cada patología. Datos iniciales presentados en esta memoria indican que la lipina-2 podría, además de regular la activación del inflamasoma NLRP3, modular la activación del inflamasoma NLRC4 (Figura 77). Por ello, estudiar modelos de activación de este inflamasoma *in vivo* a través de un modelo de inducción de inflamación mediada por flagelina, o estudiar otros inflamasomas como el AIM2



por infección con virus de ADN de doble cadena sería de gran utilidad. Estos estudios podrían aportar nuevas respuestas al origen de la producción exacerbada de citoquinas proinflamatorias que presentan los pacientes del síndrome de Majeed, dilucidando si otros inflamomas, además del NLRP3, están implicados.

## **5 CARACTERIZACIÓN DEL PAPEL DE LA LIPINA-2 EN LA ACTIVACIÓN DEL INFLAMASOMA POR ÁCIDO PALMÍTICO.**

Cuando el sistema inmune es activado por algún agente agresor, el organismo moviliza todos los recursos para erradicarlo. Al llegar a término, la respuesta inflamatoria se resuelve y el sistema inmune regresa a su estado inicial. En casos particulares, el sistema inmune no es capaz de resolver la inflamación, desencadenando inflamación crónica. En los individuos obesos, la incapacidad para resolver la inflamación del tejido adiposo debido a la continua presencia de ácidos grasos saturados, origina un estado de inflamación crónica de bajo grado (337), que acaba provocando resistencia a insulina, hiperglucemia e incrementan el riesgo de sufrir T2D (144, 338). Tanto en obesidad como otros desórdenes metabólicos que implican un aumento de la exposición a lípidos, los macrófagos juegan un papel importante, generando respuestas celulares a ácidos grasos saturados (13, 339, 340). En concreto, investigaciones que describen que dietas ricas en ácidos grasos saturados aumentan la producción de IL-1 $\beta$ , se han visto corroboradas por diferentes estudios en los que se ha definido el efecto proinflamatorio del ácido palmítico *in vitro* (145, 341). La implicación de la IL-1 $\beta$  en T2D o aterosclerosis está ampliamente documentada (342), y se ha sugerido que el componente clave que controla la transición de la obesidad a las enfermedades mencionadas es el inflamoma NLRP3 (343). Para entender mejor la patogenia de estas enfermedades sería conveniente conocer los mecanismos a través de los cuales los ácidos grasos saturados activan el inflamoma NLRP3 y se desarrolla IR. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) se han convertido en los últimos años en la herramienta preferida de los genetistas para encontrar genes asociados a diabetes y obesidad. Recientemente se ha descubierto un polimorfismo no codificante de la lipina-2 (SNP9-rs3745012) asociado a individuos con T2D que poseen un índice de masa corporal elevado, haciendo de la lipina-2 un candidato para ser un gen “ahorrador” (*thrifty gene*) (232, 344). Hasta la aparición de nuevos datos que expliquen las consecuencias reales de ese polimorfismo, los datos aquí mostrados, confirman trabajos anteriores que señalan al ácido palmítico como activador del inflamoma NLRP3 (144, 345) y además, asignan un papel importante a la lipina-2 como moduladora de esa activación, controlando los efectos proinflamatorios del ácido palmítico a través de la activación de NF- $\kappa$ B en macrófagos y de la activación del inflamoma NLRP3. Todo ello sugiere que las alteraciones en la expresión de la lipina-2 podrían influir en el desarrollo de

condiciones como la T2D, que están relacionadas con el estado inflamatorio del tejido adiposo del paciente.

A día de hoy, el papel de enzimas del metabolismo lipídico capaces de modular los niveles de lípidos bioactivos en las cascadas de señalización en la respuesta inmune es aún poco claro. Dentro de este grupo de enzimas, las lipinas se encontrarían regulando los niveles de DAG y PA. Hasta la fecha, se ha demostrado que la lipina-1 juega un papel proinflamatorio en macrófagos en respuesta a LPS, contribuyendo a la activación de MAPKs y proteínas del factor de transcripción AP-1 que finalmente coordinan la expresión de genes proinflamatorios (226). Sin embargo, se ha observado que la lipina-2 tiene un papel antiinflamatorio, ya que la falta de lipina-2 aumenta la activación de JNK y AP-1 con la consiguiente inducción de genes proinflamatorios por ácido palmítico (231). Teniendo en cuenta todos estos datos, parece claro que la lipina-1 y la lipina-2 juegan papeles diferentes, e incluso opuestos durante la activación inmune. Los datos aquí presentados aportan nueva información sobre el papel de la lipina-2 como un participante clave en la regulación de la activación proinflamatoria de macrófagos humanos y murinos por LPS y ácidos grasos saturados, presentando una mayor activación de caspasa-1 tras el tratamiento con ácido palmítico. Curiosamente, dado que la caspasa-1 activa es la principal desencadenante de piroptosis, este hallazgo coincide con el hecho de que la eliminación de la fosfatasa de ácido fosfatídico en levadura haga a las células más sensibles a la toxicidad por ácidos grasos (243).

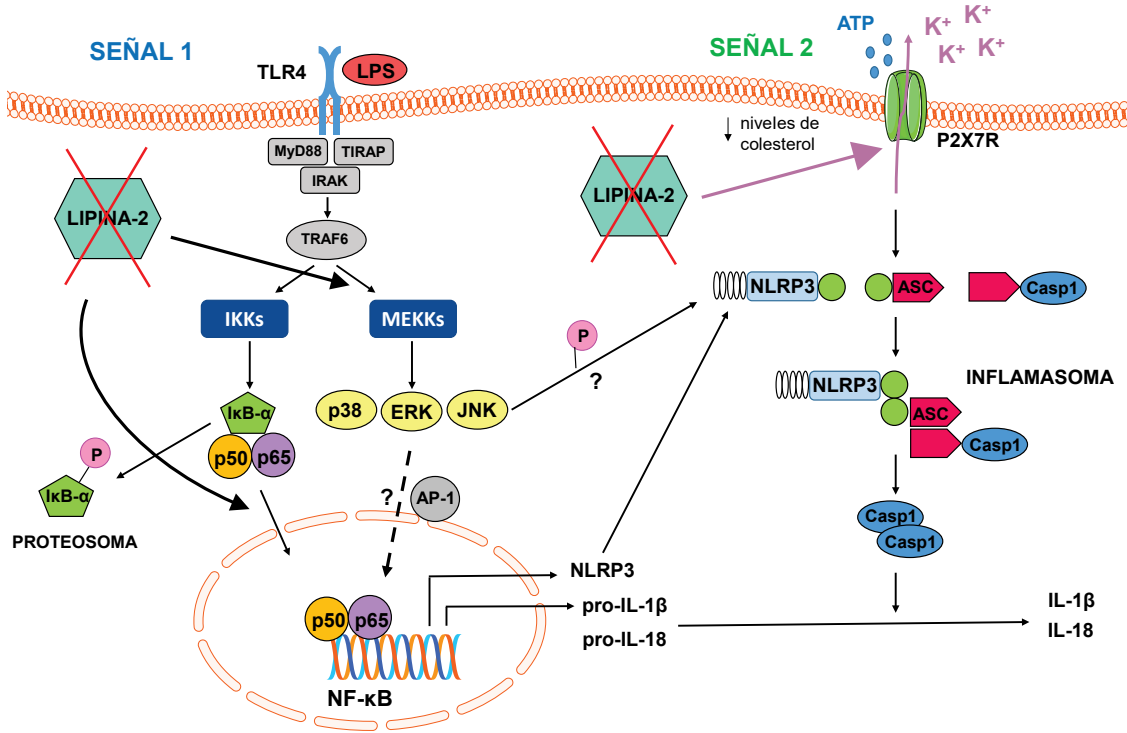
La activación del “inflammasoma no canónico” por LPS intracelular ha sido descrita recientemente, y los mecanismos por los que ocurre aún no están totalmente explorados (46, 346). Se ha descrito que a través de este inflammasoma, el LPS intracelular puede desencadenar piroptosis de forma directa e indirecta. La vía directa ocurriría a través de la unión del LPS a la caspasa-11 activándola (347), y la caspasa-11 activa sería la responsable de producir la muerte celular. Pero la caspasa-11 también puede producir piroptosis de forma indirecta a través de la activación de caspasa-1 por el inflammasoma NLRP3 canónico (46). Por tanto, durante la activación del “inflammasoma no canónico”, el tratamiento exclusivo con LPS es suficiente para desencadenar la producción de pro-IL-1 $\beta$  y su maduración. Dado que el ácido palmítico difiere de la mayoría de activadores del inflammasoma NLRP3 en que puede desencadenar tanto la primera como la segunda señal de activación (345), es posible que la generación de IL-1 $\beta$  madura tras estimulación con este ácido graso se produzca de forma análoga a la activación del “inflammasoma no canónico” por LPS intracelular. Sorprendentemente, en este trabajo se ha observado que durante la activación del inflammasoma NLRP3 por ácido palmítico, las respuestas en ausencia de lipina-2 son distintas en macrófagos humanos y BMDM (Figura 71 y Figura 73). Diferencias en la activación del “inflammasoma no canónico” entre ambos tipos celulares, como una activación defectuosa de

caspasa-11 o algún otro mecanismo aún desconocido en BMDM carentes de lipina-2, podría explicar ese comportamiento diferencial. De confirmarse esta hipótesis, la respuesta diferencial de producción de IL-1 $\beta$  entre macrófagos humanos y BMDM en ausencia de lipina-2 podría proporcionar pistas para explicar, al menos en parte, los episodios de inflamación asociados con mutaciones en lipina-2 que ocurren en pacientes con síndrome de Majeed (235, 238) y que no desarrollan los animales *Lpin2*<sup>-/-</sup> (230).

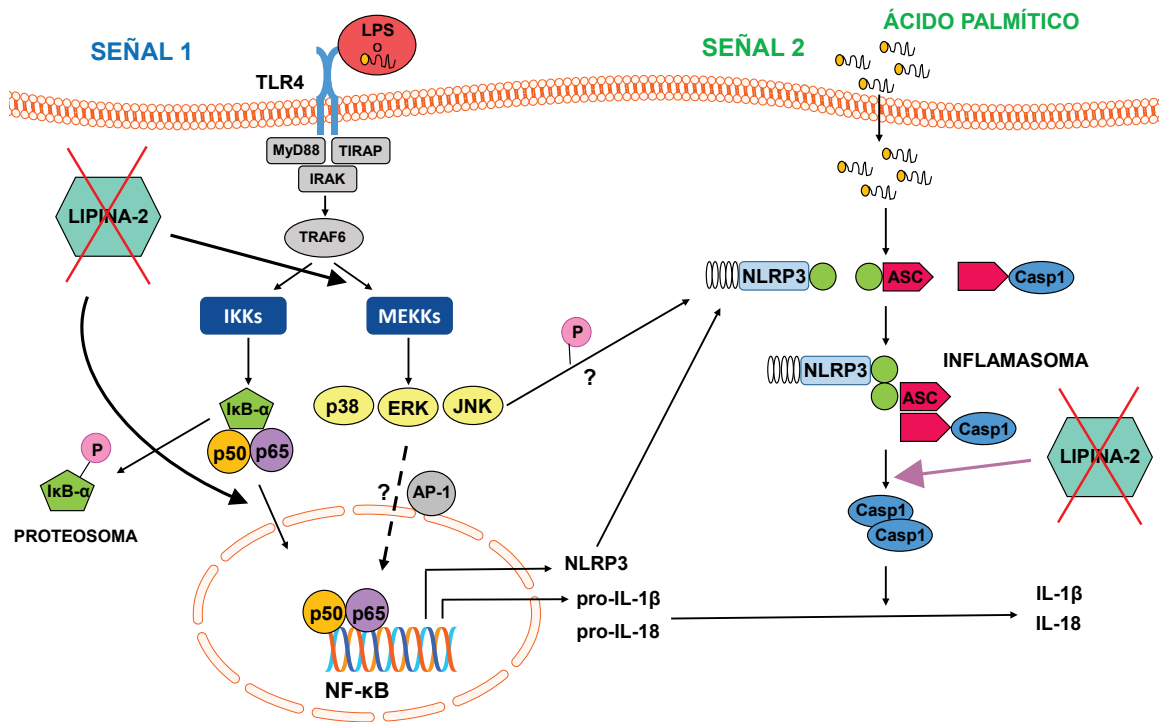
Diferentes ensayos han demostrado que pacientes con psoriasis que presentan obesidad son más difíciles de tratar que los pacientes no obesos. Además, tras la pérdida de peso, los pacientes con psoriasis se recuperan parcialmente mientras que si aumentan de peso, sus síntomas empeoran (348, 349). Manteniendo esta línea de pensamiento, y sabiendo que la lipina-2 tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria inducida por ácido palmítico (231), es fácil especular que niveles elevados de ácidos grasos saturados libres podrían desencadenar el estado inflamatorio que presentan los pacientes con síndrome de Majeed. Otra hipótesis, además de las mencionadas anteriormente, que explicaría por qué este síndrome aparece durante las primeras semanas de vida, es que se desarrolle durante el periodo de lactancia por una mayor exposición a ácidos grasos en los bebés. El origen de dicho aumento podría radicar en la leche materna, leche muy rica en lípidos y que constituye la principal fuente de alimentación de los recién nacidos. Como consecuencia, se desencadenaría una mayor activación del inflamasoma NLRP3 y señalización vía TLR4 en ausencia de lipina-2, dando lugar a los niveles elevados de IL-1 $\beta$  y posiblemente otras citoquinas proinflamatorias, que serían responsables de mantener la inflamación y desencadenar el cuadro clínico observado.

En espera de nuevos datos que desvelen los mecanismos y la etiología de este síndrome, los resultados obtenidos apuntan a la lipina-2 como un participante clave en la regulación de la activación clásica del inflamasoma NLRP3 en macrófagos, tanto por activación con LPS y ATP como por activación con LPS y/o ácido palmítico. Si una hiperactivación del inflamasoma NLRP3 está implicada en la aparición del síndrome de Majeed, las estrategias terapéuticas que directamente bloqueen su activación y no sólo la acción de la IL-1 $\beta$  (tratamiento actual), serían más efectivas, ya que este inflamasoma no sólo induce la maduración de IL-1 $\beta$ , sino también otras respuestas celulares como muerte celular y maduración de IL-18.

Se incluye un esquema representativo de estos descubrimientos en las Figura 79 y Figura 80.



**Figura 79. Posible modelo de activación del inflamasoma NLRP3 por LPS y ATP en macrófagos carentes de lipina-2.** La ausencia de lipina-2 aumenta la señalización vía TLR4 por activación con LPS o ácido palmítico, desencadenando una mayor activación de MAPK y de NF-κB, con la consecuente mayor expresión de pro-IL-1β y NLRP3. El tratamiento de las células con ATP como estímulo activador del inflamasoma NLRP3, produce una hiperactivación del receptor P2X7, posiblemente debido a los bajos niveles de colesterol que presentan estas células. La hiperactivación de P2X7 desencadena un mayor ensamblaje del inflamasoma NLRP3, culminando en una mayor activación de caspasa-1 que cataliza la conversión de pro-IL-1β y pro-IL-18 a sus formas activas. Este hecho junto a una mayor señalización por LPS produce una mayor liberación de citoquinas, causantes probablemente de la mayor respuesta inflamatoria observada por mutaciones en el gen de la lipina-2.



**Figura 80. Posible modelo de activación del inflammasoma NLRP3 por LPS y ácido palmítico en macrófagos humanos carentes de lipina-2.** La ausencia de lipina-2 aumenta la señalización vía TLR4 por activación con LPS o ácido palmítico, desencadenando una mayor activación de MAPK y de NF-κB, con la consecuente mayor expresión de pro-IL-1β y NLRP3. El tratamiento de las células con ácido palmítico como estímulo activador del inflammasoma NLRP3 desencadena una mayor activación de caspasa-1. La mayor activación de caspasa-1 junto a la mayor producción de pro-IL1-β incrementan la liberación de citoquinas proinflamatorias en células sin lipina-2 activadas con LPS y ácido palmítico.



## ***VI. CONCLUSIONS***

---





---

Regarding the principal objective, the study of the role of lipin-2 in inflammasome activation, the obtained results led to the following conclusions:

1. Lipin-2 modulates NLRP3 inflammasome activation by LPS and ATP in mouse and human macrophages, as its depletion increases IL-1 $\beta$  and IL-18 production.
2. Lipin-2 depletion increases TLR4 signaling by LPS, leading to the overactivation of MAPKs and NF- $\kappa$ B, augmenting proinflammatory cytokine levels, in mouse and human macrophages.
3. Lipin-2 interferes with inflammasome priming as its depletion increases pro-IL-1 $\beta$  and NLRP3 levels by LPS, in mouse and human macrophages.
4. Lipin-2 regulates the second signal in NLRP3 inflammasome activation through P2X7 receptors. Application of ATP dramatically increases currents through P2X7R, leading to a pore dilated state and a prolonged drop in intracellular K<sup>+</sup> levels when lipin-2 is absent, promoting the assembly of the inflammasome.
5. Lipin-2 deficient macrophages exhibit higher ASC oligomerization, greater activation of caspase-1 and enhanced membrane permeabilization after exposure to LPS and ATP treatments.
6. Overactivation of NLRP3 inflammasome in cells lacking lipin-2 is independent of ROS production, but it depends on cellular cholesterol levels, which were found to be lower in lipin-2 deficient macrophages.
7. Restored cellular cholesterol levels in cells lacking lipin-2 reduce NLRP3 inflammasome activation with LPS and ATP, producing a profound inhibition of responses mediated by P2X7 receptors, such as ASC oligomerization, caspase-1 activity and IL-1 $\beta$  production.
8. Absence of lipin-2 promotes NLRP3 inflammasome overactivation *in vivo*, in a mouse model of septic shock. Intraperitoneal injection of LPS increases proinflammatory cytokine levels in serum, as well as in the liver and spleen of the animals, and the responses are higher in *Lpin2*<sup>-/-</sup> than in *wt* mice.

9. Lipin-2 modulates metabolic inflammasome activation in RAW 264.7 and human macrophages, but not in primary murine cells.
  
10. Palmitic acid used as a priming signal triggers overactivation of NF- $\kappa$ B and increases pro-IL-1 $\beta$  expression. If used as a second signal, palmitic acid exacerbates IL-1 $\beta$  production in a caspase-1 dependent manner.

## ***VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Medzhitov, R. and C. A. Janeway Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296: 298-300.
2. Medzhitov, R. and C. A. Janeway Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4-9.
3. Janeway, C. A., Jr. 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* 13: 11-16.
4. Seong, S. Y. and P. Matzinger. 2004. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 469-478.
5. Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305.
6. Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-435.
7. Chen, G. Y. and G. Nunez. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 826-837.
8. Takeuchi, O. and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805-820.
9. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5: 730-737.
10. Andrejeva, J., K. S. Childs, D. F. Young, T. S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn, and R. E. Randall. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 17264-17269.
11. Anderson, K. V., L. Bokla, and C. Nusslein-Volhard. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42: 791-798.
12. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1: 135-145.

13. Nguyen, M. T., S. Favelyukis, A. K. Nguyen, D. Reichart, P. A. Scott, A. Jenn, R. Liu-Bryan, C. K. Glass, J. G. Neels, and J. M. Olefsky. 2007. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 282: 35279-35292.
14. Jimenez-Dalmaroni, M. J., M. E. Gerswhin, and I. E. Adamopoulos. 2015. The critical role of toll-like receptors - From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun. Rev.*
15. Jeong, E. and J. Y. Lee. 2011. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med. J.* 52: 379-392.
16. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
17. Nishida, E. and Y. Gotoh. 1993. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* 18: 128-131.
18. Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis. 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med. (Berl)* 74: 589-607.
19. Dong, C., R. J. Davis, and R. A. Flavell. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 55-72.
20. Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11: 115-122.
21. Kanakaraj, P., P. H. Schafer, D. E. Cavender, Y. Wu, K. Ngo, P. F. Grealish, S. A. Wadsworth, P. A. Peterson, J. J. Siekierka, C. A. Harris, and W. P. Fung-Leung. 1998. Interleukin (IL)-1 receptor-associated kinase (IRAK) requirement for optimal induction of multiple IL-1 signaling pathways and IL-6 production. *J. Exp. Med.* 187: 2073-2079.
22. Adler, V., A. Polotskaya, F. Wagner, and A. S. Kraft. 1992. Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J. Biol. Chem.* 267: 17001-17005.
23. Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki, and J. R. Woodgett. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353: 670-674.

24. Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260.
25. Hayden, M. S. and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18: 2195-2224.
26. Hayden, M. S. and S. Ghosh. 2011. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res.* 21: 223-244.
27. Karin, M. and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 621-663.
28. Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F. R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S. C. Sun, and M. Karin. 2001. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293: 1495-1499.
29. Dejardin, E., N. M. Drain, M. Delhase, E. Haas, Y. Cao, C. Makris, Z. W. Li, M. Karin, C. F. Ware, and D. R. Green. 2002. The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* 17: 525-535.
30. Bonizzi, G., M. Bebien, D. C. Otero, K. E. Johnson-Vroom, Y. Cao, D. Vu, A. G. Jegga, B. J. Aronow, G. Ghosh, R. C. Rickert, and M. Karin. 2004. Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J.* 23: 4202-4210.
31. Claudio, E., K. Brown, S. Park, H. Wang, and U. Siebenlist. 2002. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat. Immunol.* 3: 958-965.
32. Martinon, F. and J. Tschopp. 2005. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 26: 447-454.
33. Kufer, T. A., J. H. Fritz, and D. J. Philpott. 2005. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol.* 13: 381-388.
34. Martinon, F., A. Mayor, and J. Tschopp. 2009. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 229-265.
35. Inohara, Chamaillard, C. McDonald, and G. Nunez. 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* 74: 355-383.
36. Eisenbarth, S. C., A. Williams, O. R. Colegio, H. Meng, T. Strowig, A. Rongvaux, J. Henao-Mejia, C. A. Thaiss, S. Joly, D. G. Gonzalez, L. Xu, L. A. Zenewicz, A. M. Haberman, E. Elinav,

S. H. Kleinstein, F. S. Sutterwala, and R. A. Flavell. 2012. NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells. *Nature* 484: 510-513.

37. Mariathasan, S. 2007. ASC, Ipaf and Cryopyrin/Nalp3: bona fide intracellular adapters of the caspase-1 inflammasome. *Microbes Infect.* 9: 664-671.

38. Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M. F. McDermott, P. N. Hawkins, and J. Tschopp. 2004. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* 20: 319-325.

39. Khare, S., A. Dorfleutner, N. B. Bryan, C. Yun, A. D. Radian, L. de Almeida, Y. Rojanasakul, and C. Stehlik. 2012. An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. *Immunity* 36: 464-476.

40. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* 10: 417-426.

41. Sutterwala, F. S., L. A. Mijares, L. Li, Y. Ogura, B. I. Kazmierczak, and R. A. Flavell. 2007. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *J. Exp. Med.* 204: 3235-3245.

42. Burckstummer, T., C. Baumann, S. Bluml, E. Dixit, G. Durnberger, H. Jahn, M. Planyavsky, M. Bilban, J. Colinge, K. L. Bennett, and G. Superti-Furga. 2009. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat. Immunol.* 10: 266-272.

43. Fernandes-Alnemri, T., J. W. Yu, P. Datta, J. Wu, and E. S. Alnemri. 2009. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 458: 509-513.

44. Hornung, V., A. Ablasser, M. Charrel-Dennis, F. Bauernfeind, G. Horvath, D. R. Caffrey, E. Latz, and K. A. Fitzgerald. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458: 514-518.

45. Lamkanfi, M. and V. M. Dixit. 2012. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28: 137-161.

46. Kayagaki, N., S. Warming, M. Lamkanfi, L. Vande Walle, S. Louie, J. Dong, K. Newton, Y. Qu, J. Liu, S. Heldens, J. Zhang, W. P. Lee, M. Roose-Girma, and V. M. Dixit. 2011. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479: 117-121.



47. Stutz, A., D. T. Golenbock, and E. Latz. 2009. Inflammasomes: too big to miss. *J. Clin. Invest.* 119: 3502-3511.
48. Eitel, J., N. Suttorp, and B. Opitz. 2011. Innate immune recognition and inflammasome activation in *listeria monocytogenes* infection. *Front. Microbiol.* 1: 149.
49. Duncan, J. A., D. T. Bergstralh, Y. Wang, S. B. Willingham, Z. Ye, A. G. Zimmermann, and J. P. Ting. 2007. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 8041-8046.
50. Petrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, and J. Tschopp. 2007. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* 14: 1583-1589.
51. Manji, G. A., L. Wang, B. J. Geddes, M. Brown, S. Merriam, A. Al-Garawi, S. Mak, J. M. Lora, M. Briskin, M. Jurman, J. Cao, P. S. DiStefano, and J. Bertin. 2002. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 277: 11570-11575.
52. Fernandes-Alnemri, T., J. Wu, J. W. Yu, P. Datta, B. Miller, W. Jankowski, S. Rosenberg, J. Zhang, and E. S. Alnemri. 2007. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ.* 14: 1590-1604.
53. Cookson, B. T. and M. A. Brennan. 2001. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 9: 113-114.
54. Gavrilin, M. A., D. H. Abdelaziz, M. Mostafa, B. A. Abdulrahman, J. Grandhi, A. Akhter, A. Abu Khweek, D. F. Aubert, M. A. Valvano, M. D. Wewers, and A. O. Amer. 2012. Activation of the pyrin inflammasome by intracellular *Burkholderia cenocepacia*. *J. Immunol.* 188: 3469-3477.
55. Bauernfeind, F. G., G. Horvath, A. Stutz, E. S. Alnemri, K. MacDonald, D. Speert, T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, B. G. Monks, K. A. Fitzgerald, V. Hornung, and E. Latz. 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* 183: 787-791.
56. Franchi, L., T. Eigenbrod, and G. Nunez. 2009. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J. Immunol.* 183: 792-796.

57. Dinarello, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 519-550.
58. Lin, K. M., W. Hu, T. D. Troutman, M. Jennings, T. Brewer, X. Li, S. Nanda, P. Cohen, J. A. Thomas, and C. Pasare. 2014. IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 775-780.
59. Ghonime, M. G., O. R. Shamaa, S. Das, R. A. Eldomany, T. Fernandes-Alnemri, E. S. Alnemri, M. A. Gavrilin, and M. D. Wewers. 2014. Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function. *J. Immunol.* 192: 3881-3888.
60. Hara, H., K. Tsuchiya, I. Kawamura, R. Fang, E. Hernandez-Cuellar, Y. Shen, J. Mizuguchi, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, and M. Mitsuyama. 2013. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat. Immunol.* 14: 1247-1255.
61. Py, B. F., M. S. Kim, H. Vakifahmetoglu-Norberg, and J. Yuan. 2013. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol. Cell* 49: 331-338.
62. Rodgers, M. A., J. W. Bowman, H. Fujita, N. Orazio, M. Shi, Q. Liang, R. Amatya, T. J. Kelly, K. Iwai, J. Ting, and J. U. Jung. 2014. The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J. Exp. Med.* 211: 1333-1347.
63. Pearce, E. L. and E. J. Pearce. 2013. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 38: 633-643.
64. McGettrick, A. F. and L. A. O'Neill. 2013. How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation. *J. Biol. Chem.* 288: 22893-22898.
65. Lamkanfi, M. and V. M. Dixit. 2014. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157: 1013-1022.
66. Muruve, D. A., V. Petrilli, A. K. Zaiss, L. R. White, S. A. Clark, P. J. Ross, R. J. Parks, and J. Tschopp. 2008. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 452: 103-107.
67. Duncan, J. A., X. Gao, M. T. Huang, B. P. O'Connor, C. E. Thomas, S. B. Willingham, D. T. Bergstralh, G. A. Jarvis, P. F. Sparling, and J. P. Ting. 2009. *Neisseria gonorrhoeae*

activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J. Immunol.* 182: 6460-6469.

68. Koo, I. C., C. Wang, S. Raghavan, J. H. Morisaki, J. S. Cox, and E. J. Brown. 2008. ESX-1-dependent cytolysis in lysosome secretion and inflammasome activation during mycobacterial infection. *Cell. Microbiol.* 10: 1866-1878.

69. Munoz-Planillo, R., L. Franchi, L. S. Miller, and G. Nunez. 2009. A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. *J. Immunol.* 183: 3942-3948.

70. Kanneganti, T. D., M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, J. Whitfield, L. Franchi, Z. F. Taraporewala, D. Miller, J. T. Patton, N. Inohara, and G. Nunez. 2006. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* 281: 36560-36568.

71. Thomas, P. G., P. Dash, J. R. Aldridge Jr, A. H. Ellebedy, C. Reynolds, A. J. Funk, W. J. Martin, M. Lamkanfi, R. J. Webby, K. L. Boyd, P. C. Doherty, and T. D. Kanneganti. 2009. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. *Immunity* 30: 566-575.

72. Gross, O., H. Poeck, M. Bscheider, C. Dostert, N. Hanneschlager, S. Endres, G. Hartmann, A. Tardivel, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, A. Mocsai, J. Tschopp, and J. Ruland. 2009. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459: 433-436.

73. van de Veerdonk, F. L., L. A. Joosten, I. Devesa, H. M. Mora-Montes, T. D. Kanneganti, C. A. Dinarello, J. W. van der Meer, N. A. Gow, B. J. Kullberg, and M. G. Netea. 2009. Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1beta production by the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 199: 1087-1096.

74. Hise, A. G., J. Tomalka, S. Ganesan, K. Patel, B. A. Hall, G. D. Brown, and K. A. Fitzgerald. 2009. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell. Host Microbe* 5: 487-497.

75. Gurcel, L., L. Abrami, S. Girardin, J. Tschopp, and F. G. van der Goot. 2006. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell* 126: 1135-1145.

76. Mariathasan, S., D. S. Weiss, K. Newton, J. McBride, K. O'Rourke, M. Roose-Girma, W. P. Lee, Y. Weinrauch, D. M. Monack, and V. M. Dixit. 2006. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440: 228-232.
77. Pelegrin, P. and A. Surprenant. 2007. Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 282: 2386-2394.
78. Pelegrin, P. and A. Surprenant. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25: 5071-5082.
79. Locovei, S., E. Scemes, F. Qiu, D. C. Spray, and G. Dahl. 2007. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett.* 581: 483-488.
80. Locovei, S., J. Wang, and G. Dahl. 2006. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett.* 580: 239-244.
81. McCarty, D. J. 1974. Crystal deposition joint disease. *Annu. Rev. Med.* 25: 279-288.
82. Martinon, F., V. Petrilli, A. Mayor, A. Tardivel, and J. Tschopp. 2006. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440: 237-241.
83. Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung, and E. Latz. 2010. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464: 1357-1361.
84. Hornung, V., F. Bauernfeind, A. Halle, E. O. Samstad, H. Kono, K. L. Rock, K. A. Fitzgerald, and E. Latz. 2008. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9: 847-856.
85. Dostert, C., V. Petrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman, and J. Tschopp. 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320: 674-677.
86. Cassel, S. L., S. C. Eisenbarth, S. S. Iyer, J. J. Sadler, O. R. Colegio, L. A. Tephly, A. B. Carter, P. B. Rothman, R. A. Flavell, and F. S. Sutterwala. 2008. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 9035-9040.

87. Feldmeyer, L., M. Keller, G. Niklaus, D. Hohl, S. Werner, and H. D. Beer. 2007. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr. Biol.* 17: 1140-1145.
88. Kool, M., V. Petrilli, T. De Smedt, A. Rolaz, H. Hammad, M. van Nimwegen, I. M. Bergen, R. Castillo, B. N. Lambrecht, and J. Tschopp. 2008. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol.* 181: 3755-3759.
89. Li, H., S. B. Willingham, J. P. Ting, and F. Re. 2008. Cutting edge: inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J. Immunol.* 181: 17-21.
90. Eisenbarth, S. C., O. R. Colegio, W. O'Connor, F. S. Sutterwala, and R. A. Flavell. 2008. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453: 1122-1126.
91. Franchi, L. and G. Nunez. 2008. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1beta secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur. J. Immunol.* 38: 2085-2089.
92. Halle, A., V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore, and D. T. Golenbock. 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* 9: 857-865.
93. Henao-Mejia, J., E. Elinav, T. Strowig, and R. A. Flavell. 2012. Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nat. Immunol.* 13: 321-324.
94. Munoz-Planillo, R., P. Kuffa, G. Martinez-Colon, B. L. Smith, T. M. Rajendiran, and G. Nunez. 2013. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 38: 1142-1153.
95. Perregaux, D. and C. A. Gabel. 1994. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J. Biol. Chem.* 269: 15195-15203.
96. Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, Y. G. Kim, G. Chen, J. H. Park, L. Franchi, P. Vandenabeele, and G. Nunez. 2007. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* 26: 433-443.

97. Qu, Y., S. Misaghi, K. Newton, L. L. Gilmour, S. Louie, J. E. Cupp, G. R. Dubyak, D. Hackos, and V. M. Dixit. 2011. Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *J. Immunol.* 186: 6553-6561.
98. Wang, H., Y. Xing, L. Mao, Y. Luo, L. Kang, and G. Meng. 2013. Pannexin-1 influences peritoneal cavity cell population but is not involved in NLRP3 inflammasome activation. *Protein Cell.* 4: 259-265.
99. Cruz, C. M., A. Rinna, H. J. Forman, A. L. Ventura, P. M. Persechini, and D. M. Ojcius. 2007. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* 282: 2871-2879.
100. Zhou, R., A. S. Yazdi, P. Menu, and J. Tschopp. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469: 221-225.
101. Misawa, T., M. Takahama, T. Kozaki, H. Lee, J. Zou, T. Saitoh, and S. Akira. 2013. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 14: 454-460.
102. Zhong, Z., Y. Zhai, S. Liang, Y. Mori, R. Han, F. S. Sutterwala, and L. Qiao. 2013. TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* 4: 1611.
103. Murakami, T., J. Ockinger, J. Yu, V. Byles, A. McColl, A. M. Hofer, and T. Horng. 2012. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 11282-11287.
104. Nakahira, K., J. A. Haspel, V. A. Rathinam, S. J. Lee, T. Dolinay, H. C. Lam, J. A. Englert, M. Rabinovitch, M. Cernadas, H. P. Kim, K. A. Fitzgerald, S. W. Ryter, and A. M. Choi. 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 12: 222-230.
105. Shimada, K., T. R. Crother, J. Karlin, J. Dagvadorj, N. Chiba, S. Chen, V. K. Ramanujan, A. J. Wolf, L. Vergnes, D. M. Ojcius, A. Rentsendorj, M. Vargas, C. Guerrero, Y. Wang, K. A. Fitzgerald, D. M. Underhill, T. Town, and M. Arditi. 2012. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36: 401-414.
106. Iyer, S. S., Q. He, J. R. Janczy, E. I. Elliott, Z. Zhong, A. K. Olivier, J. J. Sadler, V. Knepper-Adrian, R. Han, L. Qiao, S. C. Eisenbarth, W. M. Nauseef, S. L. Cassel, and F. S. Sutterwala. 2013. Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity* 39: 311-323.

107. Hernandez-Cuellar, E., K. Tsuchiya, H. Hara, R. Fang, S. Sakai, I. Kawamura, S. Akira, and M. Mitsuyama. 2012. Cutting edge: nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.* 189: 5113-5117.
108. Lupfer, C., P. G. Thomas, P. K. Anand, P. Vogel, S. Milasta, J. Martinez, G. Huang, M. Green, M. Kundu, H. Chi, R. J. Xavier, D. R. Green, M. Lamkanfi, C. A. Dinarello, P. C. Doherty, and T. D. Kanneganti. 2013. Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection. *Nat. Immunol.* 14: 480-488.
109. Ichinohe, T., T. Yamazaki, T. Koshiba, and Y. Yanagi. 2013. Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 17963-17968.
110. Subramanian, N., K. Natarajan, M. R. Clatworthy, Z. Wang, and R. N. Germain. 2013. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 153: 348-361.
111. Guo, H., J. B. Callaway, and J. P. Ting. 2015. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* 21: 677-687.
112. Haag, F., S. Adriouch, A. Brass, C. Jung, S. Moller, F. Scheuplein, P. Bannas, M. Seman, and F. Koch-Nolte. 2007. Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signal.* 3: 71-81.
113. Eckle, T., L. Fullbier, M. Wehrmann, J. Khoury, M. Mittelbronn, J. Ibla, P. Rosenberger, and H. K. Eltzschig. 2007. Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. *J. Immunol.* 178: 8127-8137.
114. Pellegatti, P., S. Falzoni, G. Donvito, I. Lemaire, and F. Di Virgilio. 2011. P2X7 receptor drives osteoclast fusion by increasing the extracellular adenosine concentration. *FASEB J.* 25: 1264-1274.
115. Li, A., J. Banerjee, C. T. Leung, K. Peterson-Yantorno, W. D. Stamer, and M. M. Civan. 2011. Mechanisms of ATP release, the enabling step in purinergic dynamics. *Cell. Physiol. Biochem.* 28: 1135-1144.
116. Bruzzone, R., M. T. Barbe, N. J. Jakob, and H. Monyer. 2005. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Neurochem.* 92: 1033-1043.

117. Scemes, E., S. O. Suadicani, G. Dahl, and D. C. Spray. 2007. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron. Glia Biol.* 3: 199-208.
118. Bao, L., S. Locovei, and G. Dahl. 2004. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.* 572: 65-68.
119. North, R. A. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82: 1013-1067.
120. Surprenant, A. and R. A. North. 2009. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 71: 333-359.
121. Wiley, J. S., R. Sluyter, B. J. Gu, L. Stokes, and S. J. Fuller. 2011. The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens* 78: 321-332.
122. Sutterwala, F. S., Y. Ogura, M. Szczepanik, M. Lara-Tejero, G. S. Lichtenberger, E. P. Grant, J. Bertin, A. J. Coyle, J. E. Galan, P. W. Askenase, and R. A. Flavell. 2006. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24: 317-327.
123. Kanneganti, T. D., N. Ozoren, M. Body-Malapel, A. Amer, J. H. Park, L. Franchi, J. Whitfield, W. Barchet, M. Colonna, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E. P. Grant, S. Akira, and G. Nunez. 2006. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440: 233-236.
124. Kanneganti, T. D., M. Lamkanfi, and G. Nunez. 2007. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* 27: 549-559.
125. Bartlett, R., J. J. Yerbury, and R. Sluyter. 2013. P2X7 receptor activation induces reactive oxygen species formation and cell death in murine EOC13 microglia. *Mediators Inflamm.* 2013: 271813.
126. Mariathasan, S., K. Newton, D. M. Monack, D. Vucic, D. M. French, W. P. Lee, M. Roose-Girma, S. Erickson, and V. M. Dixit. 2004. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 430: 213-218.
127. Yamamoto, M., K. Yaginuma, H. Tsutsui, J. Sagara, X. Guan, E. Seki, K. Yasuda, M. Yamamoto, S. Akira, K. Nakanishi, T. Noda, and S. Taniguchi. 2004. ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes Cells* 9: 1055-1067.



128. Franchi, L., T. D. Kanneganti, G. R. Dubyak, and G. Nunez. 2007. Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K<sup>+</sup> for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J. Biol. Chem.* 282: 18810-18818.
129. Deplano, S., H. T. Cook, R. Russell, L. Franchi, S. Schneiter, G. Bhangal, R. J. Unwin, C. D. Pusey, F. W. Tam, and J. Behmoaras. 2013. P2X7 receptor-mediated Nlrp3-inflammasome activation is a genetic determinant of macrophage-dependent crescentic glomerulonephritis. *J. Leukoc. Biol.* 93: 127-134.
130. Zhao, J., H. Wang, C. Dai, H. Wang, H. Zhang, Y. Huang, S. Wang, F. Gaskin, N. Yang, and S. M. Fu. 2013. P2X7 blockade attenuates murine lupus nephritis by inhibiting activation of the NLRP3/ASC/caspase 1 pathway. *Arthritis Rheum.* 65: 3176-3185.
131. Gidlof, O., J. G. Smith, O. Melander, H. Lovkvist, B. Hedblad, G. Engstrom, P. Nilsson, J. Carlson, G. Berglund, S. Olsson, K. Jood, C. Jern, B. Norrving, A. Lindgren, and D. Erlinge. 2012. A common missense variant in the ATP receptor P2X7 is associated with reduced risk of cardiovascular events. *PLoS One* 7: e37491.
132. Allsopp, R. C., U. Lalo, and R. J. Evans. 2010. Lipid raft association and cholesterol sensitivity of P2X1-4 receptors for ATP: chimeras and point mutants identify intracellular amino-terminal residues involved in lipid regulation of P2X1 receptors. *J. Biol. Chem.* 285: 32770-32777.
133. Gonnord, P., C. Delarasse, R. Auger, K. Benihoud, M. Prigent, M. H. Cuif, C. Lamaze, and J. M. Kanellopoulos. 2009. Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts. *FASEB J.* 23: 795-805.
134. Robinson, L. E. and R. D. Murrell-Lagnado. 2013. The trafficking and targeting of P2X receptors. *Front. Cell. Neurosci.* 7: 233.
135. Lingwood, D. and K. Simons. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327: 46-50.
136. Pike, L. J. 2004. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem. J.* 378: 281-292.
137. Fessler, M. B. and J. S. Parks. 2011. Intracellular lipid flux and membrane microdomains as organizing principles in inflammatory cell signaling. *J. Immunol.* 187: 1529-1535.
138. Garcia-Marcos, M., E. Perez-Andres, S. Tandel, U. Fontanils, A. Kumps, E. Kabre, A. Gomez-Munoz, A. Marino, J. P. Dehaye, and S. Pochet. 2006. Coupling of two pools of P2X7

receptors to distinct intracellular signaling pathways in rat submandibular gland. *J. Lipid Res.* 47: 705-714.

139. Raymond, M. N. and H. Le Stunff. 2006. Involvement of de novo ceramide biosynthesis in macrophage death induced by activation of ATP-sensitive P2X7 receptor. *FEBS Lett.* 580: 131-136.

140. Lepine, S., H. Le Stunff, B. Lakatos, J. C. Sulpice, and F. Giraud. 2006. ATP-induced apoptosis of thymocytes is mediated by activation of P2 X 7 receptor and involves de novo ceramide synthesis and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 73-82.

141. Bowie, R. V., S. Donatello, C. Lyes, M. B. Owens, I. S. Babina, L. Hudson, S. V. Walsh, D. P. O'Donoghue, S. Amu, S. P. Barry, P. G. Fallon, and A. M. Hopkins. 2012. Lipid rafts are disrupted in mildly inflamed intestinal microenvironments without overt disruption of the epithelial barrier. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302: G781-93.

142. Levitan, I., Y. Fang, A. Rosenhouse-Dantsker, and V. Romanenko. 2010. Cholesterol and ion channels. *Subcell. Biochem.* 51: 509-549.

143. Robinson, L. E., M. Shridar, P. Smith, and R. D. Murrell-Lagnado. 2014. Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *J. Biol. Chem.* 289: 31983-31994.

144. Wen, H., D. Gris, Y. Lei, S. Jha, L. Zhang, M. T. Huang, W. J. Brickey, and J. P. Ting. 2011. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* 12: 408-415.

145. Vandanmagsar, B., Y. H. Youm, A. Ravussin, J. E. Galgani, K. Stadler, R. L. Mynatt, E. Ravussin, J. M. Stephens, and V. D. Dixit. 2011. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* 17: 179-188.

146. Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91.

147. Boden, G. 2002. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5: 545-549.

148. Shi, H., M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin, and J. S. Flier. 2006. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116: 3015-3025.

149. Boyden, E. D. and W. F. Dietrich. 2006. Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat. Genet.* 38: 240-244.
150. Fink, S. L., T. Bergsbaken, and B. T. Cookson. 2008. Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 4312-4317.
151. Wickliffe, K. E., S. H. Leppla, and M. Moayeri. 2008. Anthrax lethal toxin-induced inflammasome formation and caspase-1 activation are late events dependent on ion fluxes and the proteasome. *Cell. Microbiol.* 10: 332-343.
152. Van Opdenbosch, N., P. Gurung, L. Vande Walle, A. Fossoul, T. D. Kanneganti, and M. Lamkanfi. 2014. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat. Commun.* 5: 3209.
153. Amer, A., L. Franchi, T. D. Kanneganti, M. Body-Malapel, N. Ozoren, G. Brady, S. Meshinchi, R. Jagirdar, A. Gewirtz, S. Akira, and G. Nunez. 2006. Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J. Biol. Chem.* 281: 35217-35223.
154. Miao, E. A., C. M. Alpuche-Aranda, M. Dors, A. E. Clark, M. W. Bader, S. I. Miller, and A. Aderem. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat. Immunol.* 7: 569-575.
155. Miao, E. A., D. P. Mao, N. Yudkovsky, R. Bonneau, C. G. Lorang, S. E. Warren, I. A. Leaf, and A. Aderem. 2010. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 3076-3080.
156. Broz, P., J. von Moltke, J. W. Jones, R. E. Vance, and D. M. Monack. 2010. Differential requirement for Caspase-1 autoproteolysis in pathogen-induced cell death and cytokine processing. *Cell. Host Microbe* 8: 471-483.
157. Alnemri, E. S. 2010. Sensing cytoplasmic danger signals by the inflammasome. *J. Clin. Immunol.* 30: 512-519.
158. Kanneganti, T. D. 2010. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 688-698.
159. Chen, Y., M. R. Smith, K. Thirumalai, and A. Zychlinsky. 1996. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J.* 15: 3853-3860.

160. Hilbi, H., J. E. Moss, D. Hersh, Y. Chen, J. Arondel, S. Banerjee, R. A. Flavell, J. Yuan, P. J. Sansonetti, and A. Zychlinsky. 1998. Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J. Biol. Chem.* 273: 32895-32900.
161. Jones, J. W., N. Kayagaki, P. Broz, T. Henry, K. Newton, K. O'Rourke, S. Chan, J. Dong, Y. Qu, M. Roose-Girma, V. M. Dixit, and D. M. Monack. 2010. Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of Francisella tularensis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 9771-9776.
162. Lamkanfi, M. and V. M. Dixit. 2010. Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell. Host Microbe* 8: 44-54.
163. Miao, E. A., I. A. Leaf, P. M. Treuting, D. P. Mao, M. Dors, A. Sarkar, S. E. Warren, M. D. Wewers, and A. Aderem. 2010. Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat. Immunol.* 11: 1136-1142.
164. Terra, J. K., C. K. Cote, B. France, A. L. Jenkins, J. A. Bozue, S. L. Welkos, S. M. LeVine, and K. A. Bradley. 2010. Cutting edge: resistance to Bacillus anthracis infection mediated by a lethal toxin sensitive allele of Nalp1b/Nlrp1b. *J. Immunol.* 184: 17-20.
165. Edgeworth, J. D., J. Spencer, A. Phalipon, G. E. Griffin, and P. J. Sansonetti. 2002. Cytotoxicity and interleukin-1beta processing following Shigella flexneri infection of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 32: 1464-1471.
166. Bergsbaken, T., S. L. Fink, and B. T. Cookson. 2009. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 99-109.
167. Vanden Berghe, T., N. Vanlangenakker, E. Parthoens, W. Deckers, M. Devos, N. Festjens, C. J. Guerin, U. T. Brunk, W. Declercq, and P. Vandenabeele. 2010. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 17: 922-930.
168. Lamkanfi, M. and V. M. Dixit. 2009. IL-33 raises alarm. *Immunity* 31: 5-7.
169. Fink, S. L. and B. T. Cookson. 2006. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* 8: 1812-1825.
170. Brennan, M. A. and B. T. Cookson. 2000. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol. Microbiol.* 38: 31-40.

171. Miao, E. A., J. V. Rajan, and A. Aderem. 2011. Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunol. Rev.* 243: 206-214.
172. Lamkanfi, M., T. D. Kanneganti, P. Van Damme, T. Vanden Berghe, I. Vanoverberghe, J. Vandekerckhove, P. Vandenabeele, K. Gevaert, and G. Nunez. 2008. Targeted peptidecentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Mol. Cell. Proteomics* 7: 2350-2363.
173. Monack, D. M., B. Raupach, A. E. Hromockyj, and S. Falkow. 1996. Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 9833-9838.
174. Zychlinsky, A., M. C. Prevost, and P. J. Sansonetti. 1992. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358: 167-169.
175. Watson, P. R., A. V. Gautier, S. M. Paulin, A. P. Bland, P. W. Jones, and T. S. Wallis. 2000. Salmonella enterica serovars Typhimurium and Dublin can lyse macrophages by a mechanism distinct from apoptosis. *Infect. Immun.* 68: 3744-3747.
176. Jesenberger, V., K. J. Procyk, J. Yuan, S. Reipert, and M. Baccarini. 2000. Salmonella-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 192: 1035-1046.
177. Li, P., H. Allen, S. Banerjee, S. Franklin, L. Herzog, C. Johnston, J. McDowell, M. Paskind, L. Rodman, and J. Salfeld. 1995. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* 80: 401-411.
178. Kuida, K., J. A. Lippke, G. Ku, M. W. Harding, D. J. Livingston, M. S. Su, and R. A. Flavell. 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267: 2000-2003.
179. Ehrlich, P. 1910. Studies in immunity.
180. McDermott, M. F., I. Aksentijevich, J. Galon, E. M. McDermott, B. W. Ogunkolade, M. Centola, E. Mansfield, M. Gadina, L. Karenko, T. Pettersson, J. McCarthy, D. M. Frucht, M. Aringer, Y. Torosyan, A. M. Teppo, M. Wilson, H. M. Karaarslan, Y. Wan, I. Todd, G. Wood, R. Schlimgen, T. R. Kumarajeewa, S. M. Cooper, J. P. Vella, C. I. Amos, J. Mulley, K. A. Quane, M. G. Molloy, A. Ranki, R. J. Powell, G. A. Hitman, J. J. O'Shea, and D. L. Kastner. 1999. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell* 97: 133-144.

181. Hoffman, H. M., J. L. Mueller, D. H. Broide, A. A. Wanderer, and R. D. Kolodner. 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat. Genet.* 29: 301-305.
182. Dode, C., N. Le Du, L. Cuisset, F. Letourneur, J. M. Berthelot, G. Vaudour, A. Meyrier, R. A. Watts, D. G. Scott, A. Nicholls, B. Granel, C. Frances, F. Garcier, P. Edery, S. Boulinguez, J. P. Domergues, M. Delpech, and G. Grateau. 2002. New mutations of CIAS1 that are responsible for Muckle-Wells syndrome and familial cold urticaria: a novel mutation underlies both syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 1498-1506.
183. Feldmann, J., A. M. Prieur, P. Quartier, P. Berquin, S. Certain, E. Cortis, D. Teillac-Hamel, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2002. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 198-203.
184. Dowds, T. A., J. Masumoto, L. Zhu, N. Inohara, and G. Nunez. 2004. Cryopyrin-induced interleukin 1beta secretion in monocytic cells: enhanced activity of disease-associated mutants and requirement for ASC. *J. Biol. Chem.* 279: 21924-21928.
185. Goldbach-Mansky, R., N. J. Dailey, S. W. Canna, A. Gelabert, J. Jones, B. I. Rubin, H. J. Kim, C. Brewer, C. Zalewski, E. Wiggs, S. Hill, M. L. Turner, B. I. Karp, I. Aksentijevich, F. Pucino, S. R. Penzak, M. H. Haverkamp, L. Stein, B. S. Adams, T. L. Moore, R. C. Fuhlbrigge, B. Shaham, J. N. Jarvis, K. O'Neil, R. K. Vehe, L. O. Beitz, G. Gardner, W. P. Hannan, R. W. Warren, W. Horn, J. L. Cole, S. M. Paul, P. N. Hawkins, T. H. Pham, C. Snyder, R. A. Wesley, S. C. Hoffmann, S. M. Holland, J. A. Butman, and D. L. Kastner. 2006. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N. Engl. J. Med.* 355: 581-592.
186. Hawkins, P. N., H. J. Lachmann, and M. F. McDermott. 2003. Interleukin-1-receptor antagonist in the Muckle-Wells syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348: 2583-2584.
187. Hoffman, H. M. 2009. Therapy of autoinflammatory syndromes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124: 1129-38; quiz 1139-40.
188. Lachmann, H. J., I. Kone-Paut, J. B. Kuemmerle-Deschner, K. S. Leslie, E. Hachulla, P. Quartier, X. Gitton, A. Widmer, N. Patel, P. N. Hawkins, and Canakinumab in CAPS Study Group. 2009. Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *N. Engl. J. Med.* 360: 2416-2425.

189. Ozen, S. and Y. Bilginer. 2014. A clinical guide to autoinflammatory diseases: familial Mediterranean fever and next-of-kin. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10: 135-147.
190. Jin, Y., S. A. Birlea, P. R. Fain, and R. A. Spritz. 2007. Genetic variations in NALP1 are associated with generalized vitiligo in a Romanian population. *J. Invest. Dermatol.* 127: 2558-2562.
191. Jin, Y., C. M. Mailloux, K. Gowan, S. L. Riccardi, G. LaBerge, D. C. Bennett, P. R. Fain, and R. A. Spritz. 2007. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 356: 1216-1225.
192. Langner, C. A., E. H. Birkenmeier, O. Ben-Zeev, M. C. Schotz, H. O. Sweet, M. T. Davisson, and J. I. Gordon. 1989. The fatty liver dystrophy (fld) mutation. A new mutant mouse with a developmental abnormality in triglyceride metabolism and associated tissue-specific defects in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities. *J. Biol. Chem.* 264: 7994-8003.
193. Reue, K., P. Xu, X. P. Wang, and B. G. Slavin. 2000. Adipose tissue deficiency, glucose intolerance, and increased atherosclerosis result from mutation in the mouse fatty liver dystrophy (fld) gene. *J. Lipid Res.* 41: 1067-1076.
194. Nadra, K., A. S. de Preux Charles, J. J. Medard, W. T. Hendriks, G. S. Han, S. Gres, G. M. Carman, J. S. Saulnier-Blache, M. H. Verheijen, and R. Chrast. 2008. Phosphatidic acid mediates demyelination in Lpin1 mutant mice. *Genes Dev.* 22: 1647-1661.
195. Donkor, J., M. Sariahmetoglu, J. Dewald, D. N. Brindley, and K. Reue. 2007. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J. Biol. Chem.* 282: 3450-3457.
196. Peterfy, M., J. Phan, P. Xu, and K. Reue. 2001. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat. Genet.* 27: 121-124.
197. Peterfy, M., J. Phan, and K. Reue. 2005. Alternatively spliced lipin isoforms exhibit distinct expression pattern, subcellular localization, and role in adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 280: 32883-32889.
198. Croce, M. A., J. C. Eagon, L. L. LaRiviere, K. M. Korenblat, S. Klein, and B. N. Finck. 2007. Hepatic lipin 1beta expression is diminished in insulin-resistant obese subjects and is reactivated by marked weight loss. *Diabetes* 56: 2395-2399.

199. Han, G. S. and G. M. Carman. 2010. Characterization of the human LPIN1-encoded phosphatidate phosphatase isoforms. *J. Biol. Chem.* 285: 14628-14638.
200. Reue, K. and D. N. Brindley. 2008. Thematic Review Series: Glycerolipids. Multiple roles for lipins/phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 49: 2493-2503.
201. Ren, H., L. Federico, H. Huang, M. Sunkara, T. Drennan, M. A. Frohman, S. S. Smyth, and A. J. Morris. 2010. A phosphatidic acid binding/nuclear localization motif determines lipin1 function in lipid metabolism and adipogenesis. *Mol. Biol. Cell* 21: 3171-3181.
202. Finck, B. N., M. C. Gropler, Z. Chen, T. C. Leone, M. A. Croce, T. E. Harris, J. C. Lawrence Jr, and D. P. Kelly. 2006. Lipin 1 is an inducible amplifier of the hepatic PGC-1alpha/PPARalpha regulatory pathway. *Cell. Metab.* 4: 199-210.
203. Bou Khalil, M., A. Blais, D. Figeys, and Z. Yao. 2010. Lipin - The bridge between hepatic glycerolipid biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 1249-1259.
204. KENNEDY, E. P. 1953. Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 201: 399-412.
205. KENNEDY, E. P. 1957. Biosynthesis of phospholipides. *Fed. Proc.* 16: 847-853.
206. Hubscher, G., D. N. Brindley, M. E. Smith, and B. Sedgwick. 1967. Stimulation of biosynthesis of glyceride. *Nature* 216: 449-453.
207. Johnston, J. M., G. A. Rao, P. A. Lowe, and B. E. Schwarz. 1967. The nature of the stimulatory role of the supernatant fraction on triglyceride synthesis by the alpha-Glycerophosphate pathway. *Lipids* 2: 14-20.
208. Jamal, Z., A. Martin, A. Gomez-Munoz, and D. N. Brindley. 1991. Plasma membrane fractions from rat liver contain a phosphatidate phosphohydrolase distinct from that in the endoplasmic reticulum and cytosol. *J. Biol. Chem.* 266: 2988-2996.
209. Cascales, C., E. H. Mangiapane, and D. N. Brindley. 1984. Oleic acid promotes the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to particulate fractions of isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 219: 911-916.



210. Johnston, J. M., F. Paultauf, C. M. Schiller, and L. D. Schultz. 1970. The utilization of the alpha-glycerophosphate and monoglyceride pathways for phosphatidyl choline biosynthesis in the intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 218: 124-133.
211. Brindley, D. N. and C. Pilquil. 2009. Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J. Lipid Res.* 50 Suppl: S225-30.
212. Han, G. S., W. I. Wu, and G. M. Carman. 2006. The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J. Biol. Chem.* 281: 9210-9218.
213. Takeuchi, K. and K. Reue. 2009. Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296: E1195-209.
214. Brindley, D. N., C. Pilquil, M. Sariahmetoglu, and K. Reue. 2009. Phosphatidate degradation: phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 956-961.
215. Liu, G. H., J. Qu, A. E. Carmack, H. B. Kim, C. Chen, H. Ren, A. J. Morris, B. N. Finck, and T. E. Harris. 2010. Lipin proteins form homo- and hetero-oligomers. *Biochem. J.* 432: 65-76.
216. Martin, A., P. Hales, and D. N. Brindley. 1987. A rapid assay for measuring the activity and the Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> requirements of phosphatidate phosphohydrolase in cytosolic and microsomal fractions of rat liver. *Biochem. J.* 245: 347-355.
217. Brindley, D. N. 1984. Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. *Prog. Lipid Res.* 23: 115-133.
218. Nanjundan, M. and F. Possmayer. 2003. Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284: L1-23.
219. Peterson, T. R., S. S. Sengupta, T. E. Harris, A. E. Carmack, S. A. Kang, E. Balderas, D. A. Guertin, K. L. Madden, A. E. Carpenter, B. N. Finck, and D. M. Sabatini. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* 146: 408-420.
220. Harris, T. E., T. A. Huffman, A. Chi, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, A. Kumar, and J. C. Lawrence Jr. 2007. Insulin controls subcellular localization and multisite phosphorylation of the phosphatidic acid phosphatase, lipin 1. *J. Biol. Chem.* 282: 277-286.

221. Carman, G. M. and G. S. Han. 2006. Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 31: 694-699.
222. Koonin, E. V. and R. L. Tatusov. 1994. Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *J. Mol. Biol.* 244: 125-132.
223. Donkor, J., P. Zhang, S. Wong, L. O'Loughlin, J. Dewald, B. P. Kok, D. N. Brindley, and K. Reue. 2009. A conserved serine residue is required for the phosphatidate phosphatase activity but not the transcriptional coactivator functions of lipin-1 and lipin-2. *J. Biol. Chem.* 284: 29968-29978.
224. Gropler, M. C., T. E. Harris, A. M. Hall, N. E. Wolins, R. W. Gross, X. Han, Z. Chen, and B. N. Finck. 2009. Lipin 2 is a liver-enriched phosphatidate phosphohydrolase enzyme that is dynamically regulated by fasting and obesity in mice. *J. Biol. Chem.* 284: 6763-6772.
225. Grimsey, N., G. S. Han, L. O'Hara, J. J. Rochford, G. M. Carman, and S. Siniosoglou. 2008. Temporal and spatial regulation of the phosphatidate phosphatases lipin 1 and 2. *J. Biol. Chem.* 283: 29166-29174.
226. Meana, C., L. Pena, G. Lorden, E. Esquinas, C. Guijas, M. Valdearcos, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2014. Lipin-1 integrates lipid synthesis with proinflammatory responses during TLR activation in macrophages. *J. Immunol.* 193: 4614-4622.
227. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gomez, C. Guijas, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2011. Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J. Immunol.* 186: 6004-6013.
228. Csaki, L. S., J. R. Dwyer, L. G. Fong, P. Tontonoz, S. G. Young, and K. Reue. 2013. Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling. *Prog. Lipid Res.* 52: 305-316.
229. Ryu, D., W. Y. Seo, Y. S. Yoon, Y. N. Kim, S. S. Kim, H. J. Kim, T. S. Park, C. S. Choi, and S. H. Koo. 2011. Endoplasmic reticulum stress promotes LIPIN2-dependent hepatic insulin resistance. *Diabetes* 60: 1072-1081.
230. Dwyer, J. R., J. Donkor, P. Zhang, L. S. Csaki, L. Vergnes, J. M. Lee, J. Dewald, D. N. Brindley, E. Atti, S. Tetradis, Y. Yoshinaga, P. J. De Jong, L. G. Fong, S. G. Young, and K. Reue. 2012. Mouse lipin-1 and lipin-2 cooperate to maintain glycerolipid homeostasis in liver and aging cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: E2486-95.

231. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Pena, L. Gil-de-Gomez, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2012. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J. Biol. Chem.* 287: 10894-10904.
232. Aulchenko, Y. S., J. Pullen, W. P. Kloosterman, M. Yazdanpanah, A. Hofman, N. Vaessen, P. J. Snijders, D. Zubakov, I. Mackay, M. Olavesen, B. Sidhu, V. E. Smith, A. Carey, E. Berezikov, A. G. Uitterlinden, R. H. Plasterk, B. A. Oostra, and C. M. van Duijn. 2007. LPIN2 is associated with type 2 diabetes, glucose metabolism, and body composition. *Diabetes* 56: 3020-3026.
233. Aulchenko, Y. S., N. Vaessen, P. Heutink, J. Pullen, P. J. Snijders, A. Hofman, L. A. Sandkuijl, J. J. Houwing-Duistermaat, M. Edwards, S. Bennett, B. A. Oostra, and C. M. van Duijn. 2003. A genome-wide search for genes involved in type 2 diabetes in a recently genetically isolated population from the Netherlands. *Diabetes* 52: 3001-3004.
234. Parker, A., J. Meyer, S. Lewitzky, J. S. Rennich, G. Chan, J. D. Thomas, M. Orholm, M. Lehtovirta, C. Forsblom, A. Hyrkko, M. Carlsson, C. Lindgren, and L. C. Groop. 2001. A gene conferring susceptibility to type 2 diabetes in conjunction with obesity is located on chromosome 18p11. *Diabetes* 50: 675-680.
235. Milhavel, F., L. Cuisset, H. M. Hoffman, R. Slim, H. El-Shanti, I. Aksentijevich, S. Lesage, H. Waterham, C. Wise, C. Sarrauste de Menthiere, and I. Touitou. 2008. The infevers autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions. *Hum. Mutat.* 29: 803-808.
236. Reue, K. 2009. The lipin family: mutations and metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 20: 165-170.
237. Ferguson, P. J., S. Chen, M. K. Tayeh, L. Ochoa, S. M. Leal, A. Pelet, A. Munnich, S. Lyonnet, H. A. Majeed, and H. El-Shanti. 2005. Homozygous mutations in LPIN2 are responsible for the syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia (Majeed syndrome). *J. Med. Genet.* 42: 551-557.
238. Majeed, H. A., M. Al-Tarawna, H. El-Shanti, B. Kamel, and F. Al-Khalaileh. 2001. The syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia. Report of a new family and a review. *Eur. J. Pediatr.* 160: 705-710.
239. El-Shanti, H. and P. Ferguson. 1993. Majeed Syndrome. In *GeneReviews(R)*, R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean, T. D. Bird, C.

T. Fong, H. C. Mefford, R. J. H. Smith, and K. Stephens eds. University of Washington, Seattle, Seattle (WA).

240. Majeed, H. A., M. Kalaawi, D. Mohanty, A. S. Teebi, M. F. Tunjekar, F. al-Gharbawy, S. A. Majeed, and A. H. al-Gazzar. 1989. Congenital dyserythropoietic anemia and chronic recurrent multifocal osteomyelitis in three related children and the association with Sweet syndrome in two siblings. *J. Pediatr.* 115: 730-734.

241. Majeed, H. and H. El-Shanti. 2008. Majeed Syndrome. GeneReviewsed.R. Pagon, T. Bird, C. Dolan, and K. Stephens eds. University of Washington, Seattle,

242. Al-Mosawi, Z. S., K. K. Al-Saad, R. Ijadi-Maghsoodi, H. I. El-Shanti, and P. J. Ferguson. 2007. A splice site mutation confirms the role of LPIN2 in Majeed syndrome. *Arthritis Rheum.* 56: 960-964.

243. Fakas, S., Y. Qiu, J. L. Dixon, G. S. Han, K. V. Ruggles, J. Garbarino, S. L. Sturley, and G. M. Carman. 2011. Phosphatidate phosphatase activity plays key role in protection against fatty acid-induced toxicity in yeast. *J. Biol. Chem.* 286: 29074-29085.

244. Herlin, T., B. Fiirgaard, M. Bjerre, G. Kerndrup, H. Hasle, X. Bing, and P. J. Ferguson. 2013. Efficacy of anti-IL-1 treatment in Majeed syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* 72: 410-413.

245. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1: 263-273.

246. Gersuk, G. M., L. W. Razai, and K. A. Marr. 2008. Methods of in vitro macrophage maturation confer variable inflammatory responses in association with altered expression of cell surface dectin-1. *J. Immunol. Methods* 329: 157-166.

247. Fernandez, N., S. Alonso, I. Valera, A. G. Vigo, M. Renedo, L. Barbolla, and M. S. Crespo. 2005. Mannose-containing molecular patterns are strong inducers of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human macrophages. *J. Immunol.* 174: 8154-8162.

248. Chuang, S. Y., C. H. Yang, C. C. Chou, Y. P. Chiang, T. H. Chuang, and L. C. Hsu. 2013. TLR-induced PAI-2 expression suppresses IL-1beta processing via increasing autophagy and NLRP3 degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 16079-16084.

249. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
250. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
251. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24: 145-149.
252. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
253. Katsnelson, M. A., L. G. Rucker, H. M. Russo, and G. R. Dubyak. 2015. K<sup>+</sup> efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca<sup>2+</sup> signaling. *J. Immunol.* 194: 3937-3952.
254. Listenberger, L. L., D. S. Ory, and J. E. Schaffer. 2001. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 276: 14890-14895.
255. ZLATAKIS, A., B. ZAK, and A. J. BOYLE. 1953. A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J. Lab. Clin. Med.* 41: 486-492.
256. BLIGH, E. G. and W. J. DYER. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
257. Abu, E. O. and I. Oluwatowoju. 2009. Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 80: 189-194.
258. Thurnhofer, S. and W. Vetter. 2005. A gas chromatography/electron ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8896-8903.
259. Nelson, D. E., A. E. Ihekweba, M. Elliott, J. R. Johnson, C. A. Gibney, B. E. Foreman, G. Nelson, V. See, C. A. Horton, D. G. Spiller, S. W. Edwards, H. P. McDowell, J. F. Unitt, E. Sullivan, R. Grimley, N. Benson, D. Broomhead, D. B. Kell, and M. R. White. 2004. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 306: 704-708.

260. Strowig, T., J. Henao-Mejia, E. Elinav, and R. Flavell. 2012. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481: 278-286.
261. Kim, H. Y., S. J. Kim, and S. M. Lee. 2015. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in Kupffer cells in hepatic ischemia/reperfusion. *FEBS J.* 282: 259-270.
262. Wang, Y., Y. Wu, J. Chen, S. Zhao, and H. Li. 2013. Pirfenidone attenuates cardiac fibrosis in a mouse model of TAC-induced left ventricular remodeling by suppressing NLRP3 inflammasome formation. *Cardiology* 126: 1-11.
263. Jenne, C. N. and P. Kubers. 2013. Immune surveillance by the liver. *Nat. Immunol.* 14: 996-1006.
264. Racanelli, V. and B. Rehermann. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43: S54-62.
265. Valdearcos, M. 2011. Regulación de la respuesta inflamatoria inducida por ácidos grasos en macrófagos: papel de la lipina-2. *Tesis Doctoral, Universidad De Valladolid*
266. Ali, S. R., A. M. Timmer, S. Bilgrami, E. J. Park, L. Eckmann, V. Nizet, and M. Karin. 2011. Anthrax toxin induces macrophage death by p38 MAPK inhibition but leads to inflammasome activation via ATP leakage. *Immunity* 35: 34-44.
267. Garbati, M. R., L. E. Hays, W. Keeble, J. E. Yates, R. K. Rathbun, and G. C. Bagby. 2013. FANCA and FANCC modulate TLR and p38 MAPK-dependent expression of IL-1beta in macrophages. *Blood* 122: 3197-3205.
268. Yu, J. W., A. Farias, I. Hwang, T. Fernandes-Alnemri, and E. S. Alnemri. 2013. Ribotoxic stress through p38 mitogen-activated protein kinase activates in vitro the human pyrin inflammasome. *J. Biol. Chem.* 288: 11378-11383.
269. Broz, P., K. Newton, M. Lamkanfi, S. Mariathasan, V. M. Dixit, and D. M. Monack. 2010. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella. *J. Exp. Med.* 207: 1745-1755.
270. Johnson, C. A., M. A. Balboa, J. Balsinde, and E. A. Dennis. 1999. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidate phosphohydrolase in human amnionic WISH cells. *J. Biol. Chem.* 274: 27689-27693.

271. Grkovich, A., A. Armando, O. Quehenberger, and E. A. Dennis. 2009. TLR-4 mediated group IVA phospholipase A(2) activation is phosphatidic acid phosphohydrolase 1 and protein kinase C dependent. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 975-982.
272. Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7: 2135-2148.
273. Serkkola, E. and M. Hurme. 1993. Synergism between protein-kinase C and cAMP-dependent pathways in the expression of the interleukin-1 beta gene is mediated via the activator-protein-1 (AP-1) enhancer activity. *Eur. J. Biochem.* 213: 243-249.
274. Chuang, Y. T., Y. C. Lin, K. H. Lin, T. F. Chou, W. C. Kuo, K. T. Yang, P. R. Wu, R. H. Chen, A. Kimchi, and M. Z. Lai. 2011. Tumor suppressor death-associated protein kinase is required for full IL-1beta production. *Blood* 117: 960-970.
275. Qu, Y., S. Misaghi, A. Izrael-Tomasevic, K. Newton, L. L. Gilmour, M. Lamkanfi, S. Louie, N. Kayagaki, J. Liu, L. Komuves, J. E. Cupp, D. Arnott, D. Monack, and V. M. Dixit. 2012. Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. *Nature* 490: 539-542.
276. Lu, B., T. Nakamura, K. Inouye, J. Li, Y. Tang, P. Lundback, S. I. Valdes-Ferrer, P. S. Olofsson, T. Kalb, J. Roth, Y. Zou, H. Erlandsson-Harris, H. Yang, J. P. Ting, H. Wang, U. Andersson, D. J. Antoine, S. S. Chavan, G. S. Hotamisligil, and K. J. Tracey. 2012. Novel role of PKR in inflammasome activation and HMGB1 release. *Nature* 488: 670-674.
277. Baldassare, J. J., Y. Bi, and C. J. Bellone. 1999. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. *J. Immunol.* 162: 5367-5373.
278. Godambe, S. A., D. D. Chaplin, T. Takova, L. M. Read, and C. J. Bellone. 1995. A novel cis-acting element required for lipopolysaccharide-induced transcription of the murine interleukin-1 beta gene. *Mol. Cell. Biol.* 15: 112-119.
279. Basak, C., S. K. Pathak, A. Bhattacharyya, D. Mandal, S. Pathak, and M. Kundu. 2005. NF-kappaB- and C/EBPbeta-driven interleukin-1beta gene expression and PAK1-mediated caspase-1 activation play essential roles in interleukin-1beta release from Helicobacter pylori lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* 280: 4279-4288.
280. Hayden, M. S. and S. Ghosh. 2012. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 26: 203-234.

281. Urban, M. B. and P. A. Baeuerle. 1990. The 65-kD subunit of NF-kappa B is a receptor for I kappa B and a modulator of DNA-binding specificity. *Genes Dev.* 4: 1975-1984.
282. Haskill, S., A. A. Beg, S. M. Tompkins, J. S. Morris, A. D. Yurochko, A. Sampson-Johannes, K. Mondal, P. Ralph, and A. S. Baldwin Jr. 1991. Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity. *Cell* 65: 1281-1289.
283. Kerr, L. D., J. Inoue, N. Davis, E. Link, P. A. Baeuerle, H. R. Bose Jr, and I. M. Verma. 1991. The rel-associated pp40 protein prevents DNA binding of Rel and NF-kappa B: relationship with I kappa B beta and regulation by phosphorylation. *Genes Dev.* 5: 1464-1476.
284. Nolan, G. P., S. Ghosh, H. C. Liou, P. Tempst, and D. Baltimore. 1991. DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. *Cell* 64: 961-969.
285. Hoffmann, A., A. Levchenko, M. L. Scott, and D. Baltimore. 2002. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298: 1241-1245.
286. Weil, R., C. Laurent-Winter, and A. Israel. 1997. Regulation of IkappaBbeta degradation. Similarities to and differences from IkappaBalpha. *J. Biol. Chem.* 272: 9942-9949.
287. Thompson, J. E., R. J. Phillips, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S. Ghosh. 1995. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 80: 573-582.
288. Suyang, H., R. Phillips, I. Douglas, and S. Ghosh. 1996. Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* 16: 5444-5449.
289. Whiteside, S. T., J. C. Epinat, N. R. Rice, and A. Israel. 1997. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *EMBO J.* 16: 1413-1426.
290. Shirane, M., S. Hatakeyama, K. Hattori, K. Nakayama, and K. Nakayama. 1999. Common pathway for the ubiquitination of IkappaBalpha, IkappaBbeta, and IkappaBepsilon mediated by the F-box protein FWD1. *J. Biol. Chem.* 274: 28169-28174.



291. Juliana, C., T. Fernandes-Alnemri, S. Kang, A. Farias, F. Qin, and E. S. Alnemri. 2012. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J. Biol. Chem.* 287: 36617-36622.
292. Hua, K. F., J. C. Chou, S. M. Ka, Y. L. Tasi, A. Chen, S. H. Wu, H. W. Chiu, W. T. Wong, Y. F. Wang, C. L. Tsai, C. L. Ho, and C. H. Lin. 2015. Cyclooxygenase-2 regulates NLRP3 inflammasome-derived IL-1beta production. *J. Cell. Physiol.* 230: 863-874.
293. Anderson, J. P., J. L. Mueller, A. Misaghi, S. Anderson, M. Sivagnanam, R. D. Kolodner, and H. M. Hoffman. 2008. Initial description of the human NLRP3 promoter. *Genes Immun.* 9: 721-726.
294. Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North, and G. Buell. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272: 735-738.
295. Yan, Z., S. Li, Z. Liang, M. Tomic, and S. S. Stojilkovic. 2008. The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J. Gen. Physiol.* 132: 563-573.
296. Browne, L. E., V. Compan, L. Bragg, and R. A. North. 2013. P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J. Neurosci.* 33: 3557-3566.
297. Baroja-Mazo, A., F. Martin-Sanchez, A. I. Gomez, C. M. Martinez, J. Amores-Iniesta, V. Compan, M. Barbera-Cremades, J. Yague, E. Ruiz-Ortiz, J. Anton, S. Bujan, I. Couillin, D. Brough, J. I. Arostegui, and P. Pelegrin. 2014. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nat. Immunol.* 15: 738-748.
298. Lu, A., V. G. Magupalli, J. Ruan, Q. Yin, M. K. Atianand, M. R. Vos, G. F. Schroder, K. A. Fitzgerald, H. Wu, and E. H. Egelman. 2014. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 156: 1193-1206.
299. Nunez, M. T. and J. Glass. 1982. Reconstitution of the transferrin receptor in lipid vesicles. Effect of cholesterol on the binding of transferrin. *Biochemistry* 21: 4139-4143.
300. Parpal, S., M. Karlsson, H. Thorn, and P. Stralfors. 2001. Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J. Biol. Chem.* 276: 9670-9678.

301. Roepstorff, K., P. Thomsen, K. Sandvig, and B. van Deurs. 2002. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. *J. Biol. Chem.* 277: 18954-18960.
302. Heron, D. S., M. Shinitzky, M. Hershkowitz, and D. Samuel. 1980. Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77: 7463-7467.
303. Klein, U., G. Gimpl, and F. Fahrenholz. 1995. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34: 13784-13793.
304. Scanlon, S. M., D. C. Williams, and P. Schloss. 2001. Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. *Biochemistry* 40: 10507-10513.
305. Pang, L., M. Graziano, and S. Wang. 1999. Membrane cholesterol modulates galanin-GalR2 interaction. *Biochemistry* 38: 12003-12011.
306. Goldstein, J. L. and M. S. Brown. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430.
307. Istvan, E. S. and J. Deisenhofer. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 292: 1160-1164.
308. Shirwany, N. A. and M. H. Zou. 2014. AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 19: 447-474.
309. Lu, M. and J. Y. Shyy. 2006. Sterol regulatory element-binding protein 1 is negatively modulated by PKA phosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 290: C1477-86.
310. Inoue, J. and R. Sato. 2013. New insights into the activation of sterol regulatory element-binding proteins by proteolytic processing. *Biomol. Concepts* 4: 417-423.
311. Amemiya-Kudo, M., H. Shimano, A. H. Hasty, N. Yahagi, T. Yoshikawa, T. Matsuzaka, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, J. Osuga, K. Harada, T. Gotoda, R. Sato, S. Kimura, S. Ishibashi, and N. Yamada. 2002. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J. Lipid Res.* 43: 1220-1235.

312. Horton, J. D., N. A. Shah, J. A. Warrington, N. N. Anderson, S. W. Park, M. S. Brown, and J. L. Goldstein. 2003. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 12027-12032.
313. Yang, C., J. G. McDonald, A. Patel, Y. Zhang, M. Umetani, F. Xu, E. J. Westover, D. F. Covey, D. J. Mangelsdorf, J. C. Cohen, and H. H. Hobbs. 2006. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.* 281: 27816-27826.
314. Costet, P., Y. Luo, N. Wang, and A. R. Tall. 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 28240-28245.
315. Yvan-Charvet, L., N. Wang, and A. R. Tall. 2010. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 139-143.
316. Huang, F. C. 2011. Plasma membrane cholesterol plays a critical role in the Salmonella-induced anti-inflammatory response in intestinal epithelial cells. *Cell. Immunol.* 271: 480-487.
317. Hashimoto, M., S. Hossain, Y. Tanabe, and O. Shido. 2005. Effects of aging on the relation of adenylyl purine release with plasma membrane fluidity of arterial endothelial cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 73: 475-483.
318. Solana, R., R. Tarazona, I. Gayoso, O. Lesur, G. Dupuis, and T. Fulop. 2012. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin. Immunol.* 24: 331-341.
319. Michel, A. D. and E. Fonfria. 2007. Agonist potency at P2X7 receptors is modulated by structurally diverse lipids. *Br. J. Pharmacol.* 152: 523-537.
320. Bechara, C. and C. V. Robinson. 2015. Different modes of lipid binding to membrane proteins probed by mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 137: 5240-5247.
321. Mao, K., S. Chen, M. Chen, Y. Ma, Y. Wang, B. Huang, Z. He, Y. Zeng, Y. Hu, S. Sun, J. Li, X. Wu, X. Wang, W. Strober, C. Chen, G. Meng, and B. Sun. 2013. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res.* 23: 201-212.

322. Coll, R. C., A. A. Robertson, J. J. Chae, S. C. Higgins, R. Munoz-Planillo, M. C. Inerra, I. Vetter, L. S. Dungan, B. G. Monks, A. Stutz, D. E. Croker, M. S. Butler, M. Haneklaus, C. E. Sutton, G. Nunez, E. Latz, D. L. Kastner, K. H. Mills, S. L. Masters, K. Schroder, M. A. Cooper, and L. A. O'Neill. 2015. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat. Med.* 21: 248-255.
323. Goraca, A., H. Huk-Kolega, P. Kleniewska, A. Piechota-Polanczyk, and B. Skibska. 2013. Effects of lipoic acid on spleen oxidative stress after LPS administration. *Pharmacol. Rep.* 65: 179-186.
324. Hanschmann, E. M., J. R. Godoy, C. Berndt, C. Hudemann, and C. H. Lillig. 2013. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins--molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 19: 1539-1605.
325. Alter, S. J., J. S. Bennett, K. Koranyi, A. Kreppel, and R. Simon. 2015. Common childhood viral infections. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health. Care.* 45: 21-53.
326. Dinulos, J. G. 2015. What's new with common, uncommon and rare rashes in childhood. *Curr. Opin. Pediatr.* 27: 261-266.
327. Gern, J. E. 2009. Rhinovirus and the initiation of asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9: 73-78.
328. Richer, M. J., D. Fang, I. Shanina, and M. S. Horwitz. 2006. Toll-like receptor 4-induced cytokine production circumvents protection conferred by TGF-beta in coxsackievirus-mediated autoimmune myocarditis. *Clin. Immunol.* 121: 339-349.
329. Triantafilou, K. and M. Triantafilou. 2004. Coxsackievirus B4-induced cytokine production in pancreatic cells is mediated through toll-like receptor 4. *J. Virol.* 78: 11313-11320.
330. Abe, T. and G. N. Barber. 2014. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-kappaB activation through TBK1. *J. Virol.* 88: 5328-5341.
331. Shin, M. S., Y. Kang, N. Lee, E. R. Wahl, S. H. Kim, K. S. Kang, R. Lazova, and I. Kang. 2013. Self double-stranded (ds)DNA induces IL-1beta production from human monocytes by activating NLRP3 inflammasome in the presence of anti-dsDNA antibodies. *J. Immunol.* 190: 1407-1415.

332. Bakaysa, S. L., J. A. Potter, M. Hoang, C. S. Han, S. Guller, E. R. Norwitz, and V. M. Abrahams. 2014. Single- and double-stranded viral RNA generate distinct cytokine and antiviral responses in human fetal membranes. *Mol. Hum. Reprod.* 20: 701-708.
333. Watanabe, H., O. Gaide, V. Petrilli, F. Martinon, E. Contassot, S. Roques, J. A. Kummer, J. Tschoop, and L. E. French. 2007. Activation of the IL-1beta-processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 127: 1956-1963.
334. Salzer, S., S. Kresse, Y. Hirai, S. Koglin, M. Reinholz, T. Ruzicka, and J. Schaubert. 2014. Cathelicidin peptide LL-37 increases UVB-triggered inflammasome activation: possible implications for rosacea. *J. Dermatol. Sci.* 76: 173-179.
335. Maier, N. K., D. Crown, J. Liu, S. H. Leppla, and M. Moayeri. 2014. Arsenic trioxide and other arsenical compounds inhibit the NLRP1, NLRP3, and NAIP5/NLRC4 inflammasomes. *J. Immunol.* 192: 763-770.
336. Lopez-Castejon, G. and P. Pelegrin. 2012. Current status of inflammasome blockers as anti-inflammatory drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* 21: 995-1007.
337. Ye, J. and O. P. McGuinness. 2013. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304: E466-77.
338. Chan, J. M., E. B. Rimm, G. A. Colditz, M. J. Stampfer, and W. C. Willett. 1994. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 17: 961-969.
339. Lumeng, C. N., J. L. Bodzin, and A. R. Saltiel. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 117: 175-184.
340. Olefsky, J. M. and C. K. Glass. 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72: 219-246.
341. Yan, Y., W. Jiang, T. Spinetti, A. Tardivel, R. Castillo, C. Bourquin, G. Guarda, Z. Tian, J. Tschoop, and R. Zhou. 2013. Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* 38: 1154-1163.
342. Wen, H., J. P. Ting, and L. A. O'Neill. 2012. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nat. Immunol.* 13: 352-357.

343. Stienstra, R., C. J. Tack, T. D. Kanneganti, L. A. Joosten, and M. G. Netea. 2012. The inflammasome puts obesity in the danger zone. *Cell. Metab.* 15: 10-18.
344. NEEL, J. V. 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am. J. Hum. Genet.* 14: 353-362.
345. L'homme, L., N. Esser, L. Riva, A. Scheen, N. Paquot, J. Piette, and S. Legrand-Poels. 2013. Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages. *J. Lipid Res.* 54: 2998-3008.
346. Kayagaki, N., M. T. Wong, I. B. Stowe, S. R. Ramani, L. C. Gonzalez, S. Akashi-Takamura, K. Miyake, J. Zhang, W. P. Lee, A. Muszynski, L. S. Forsberg, R. W. Carlson, and V. M. Dixit. 2013. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science* 341: 1246-1249.
347. Shi, J., Y. Zhao, Y. Wang, W. Gao, J. Ding, P. Li, L. Hu, and F. Shao. 2014. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514: 187-192.
348. Davidovici, B. B., N. Sattar, J. Prinz, L. Puig, P. Emery, J. N. Barker, P. van de Kerkhof, M. Stahle, F. O. Nestle, G. Girolomoni, and J. G. Krueger. 2010. Psoriasis and systemic inflammatory diseases: potential mechanistic links between skin disease and co-morbid conditions. *J. Invest. Dermatol.* 130: 1785-1796.
349. Bremmer, S., A. S. Van Voorhees, S. Hsu, N. J. Korman, M. G. Lebwohl, M. Young, B. F. Bebo Jr, A. Blauvelt, and National Psoriasis Foundation. 2010. Obesity and psoriasis: from the Medical Board of the National Psoriasis Foundation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 63: 1058-1069.