



Universidad de Valladolid

Máster en Investigación Biomédica

“Estudios sobre el papel protector de Lipina-2 en la muerte celular provocada por la inhibición del proteasoma en macrófagos.”

Memoria del Trabajo Fin de Máster elaborada y presentada por:

Laura Valerio Núñez

Valladolid, septiembre 2021

Dirigido por:

Dra. M.^a Ángeles Balboa García

Dra. Clara Meana González

ÍNDICE

Abreviaturas:	2
Resumen/Abstract:	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Sistema inmune innato, inflamación y macrófagos.....	4
1.2. Las lipinas.....	4
1.2.1 Lipina-2.....	6
1.3 .El proteasoma	7
1.4. Transducción de señales inducida por LPS en macrófagos.	9
1.5. Hipótesis y objetivos	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1. Cultivo de líneas celulares.....	12
2.1.1. Línea celular IBMDM.....	12
2.1.2. Estímulos celulares e inhibidores	12
2.2. Obtención de homogeneizados celulares	13
2.3. Inmunodetección de proteínas	13
2.3.1. Valoración de la concentración de proteínas	13
2.3.2. Electroforesis desnaturizante y electrotransferencia de proteínas	13
2.3.3. Inmunodetección de proteínas	14
2.4. Citometría de Flujo	15
2.4.1. Análisis de muerte celular	15
2.4.2. Análisis de la producción de ROS	16
2.5 Análisis de la actividad metabólica por reducción de MTT.....	16
2.6. Detección de ARNm.....	17
2.6.1. Extracción de ARN.....	17
2.6.2. Retrotranscripción a cDNA	17
2.6.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR)	18
2.7. Análisis estadístico de los datos.....	18
3. RESULTADOS	19
3.1. La lipina-2 protege a los macrófagos de la muerte inducida por inhibición del proteasoma.....	19
3.2. La lipina-2 ayuda a mantener un mejor estado metabólico durante el tratamiento con MG132.....	20
3.3. La lipina-2 reduce la activación de la caspasa-3 durante el tratamiento con MG132.....	22
3.4. La lipina-2 tiene un efecto protector sobre la muerte macrofágica mediada por caspasas tras tratamiento con MG132.....	23
3.5. La respuesta integrada a estrés no participa en la muerte generada por tratamiento con MG132.....	24
3.6. La generación de ROS no participa en la inducción de muerte por tratamiento con MG132.....	24
3.7. El tratamiento con MG132 disminuye la exagerada inducción de Il6 que presentan los macrófagos carentes de lipina-2	25
4. DISCUSIÓN	27
5. CONCLUSIONES	28
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

Abreviaturas:

7-AAD: 7-aminoactinomicina D
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ARN: Ácido ribonucleico.
ARNm: ARN mensajero.
ATF6: Factor de transcripción activador 6 (Del inglés, Activating Transcription Factor 6)
BiP: Proteína inmunoglobulina de unión (del inglés, Binding immunoglobulin protein)
BSA: Álbmina sérica bovina (Del inglés, Bovine serum albumin).
DAG: Diacilglicerol.
DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño (del inglés, danger-associated molecular patterns)
DCFHDA: 2',7'-diclofluoresceína diacetato.
FBS: Suero fetal bovino (del inglés, Fetal Bovine Serum)
Fld: Distrofia de hígado graso (del inglés, fatty liver dystrophy).
GADPH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.
HRP: Peroxidasa de rábano (del inglés, horseradish peroxidase)
IBMDM: macrófago derivado de médula ósea inmortalizados (del inglés, Immortalized Bone marrow-derived macrophages).
IKK: Inhibidor de la quinasa NF- κ B (Del inglés, inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase)
I κ B: Proteína inhibidora de la cadena ligera kappa de las células B activadas
IL: interleuquina.
IP: Ioduro de propidio.
IRE1: (Del inglés, Inositol-Requiring Enzyme 1)
JNK: Quinasa c-Jun N-terminal (del inglés, c-Jun N-terminal kinase)
Lpin2^{-/-}: Knock out del gen *LPIN2*
LPS: Lipopolisacárido
MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MG132: Inhibidor específico del proteasoma
MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.
NF- κ B: Factor nuclear potenciador de la cadena kappa de las células B activadas (del inglés, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.)
NLRP3: Proteína 3 de la familia de NLR.
NOD: Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos.
NSL: Secuencia de localización nuclear.
PA: Fosfatidato o ácido fosfatídico (del inglés phosphatidic acid)
PAP-1: Actividad enzimática como fosfatasa de ácido fosfatídico.
PERK: proteína quinasa del RE activada por ARN de doble cadena
PGC-1 α : Proteína coactivadora de PPAR.
PPAR: Receptor activado por el proliferador de peroxisomas.
ROS: Especies reactivas de oxígeno.
RT-q-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés, real time quantitative PCR)
TAG: triacilglicerol.
TLRs: Receptores tipo toll
Ub: ubiquitina.
UPS: Sistema ubiquitina-proteasoma
wt: genotipo silvestre (del inglés, wild-type)

Resumen/Abstract:

La lipina-2 es una fosfatasa de ácido fosfatídico que participa en la ruta de síntesis de lípidos *de novo*. Mutaciones en el gen que la codifican, *LPIN2*, se asocian con el síndrome de Majeed, una enfermedad autoinflamatoria. Por lo que lipina-2, constituye un nexo entre el metabolismo lipídico y la respuesta inmune, ejerciendo una función antiinflamatoria. El proteasoma, complejo degradador de proteínas, tiene también un papel central en la activación inflamatoria de los macrófagos. Se sabe que los inhibidores del proteasoma disminuyen la síntesis de citoquinas proinflamatorias. En este trabajo se propone la inhibición del proteasoma en células Lipin-2^{-/-} para disminuir la respuesta exacerbada de citoquinas proinflamatorias que ocurre en el síndrome de Majeed. También se quiso comprobar el papel protector de lipina-2 en la pérdida de homeostasis que genera la inhibición del proteasoma. Para ello se utilizaron las líneas celulares de macrófagos IBMDM de ratón con genotipos wild-type y *Lpin2*^{-/-}, junto con el inhibidor específico del proteasoma. Los resultados indican que el empleo de inhibidores del proteasoma causa una pérdida de homeostasis mayor en las IBMDM *Lpin2*^{-/-}, respecto de las *wild-type*. Esta pérdida de homeostasis culmina en muerte celular por apoptosis. Por otro lado, el tratamiento con MG132 durante la activación con LPS provoca la disminución en la inducción de citoquinas inflamatorias como la IL-6 en ambos genotipos, siendo este efecto mucho más acusado en las células deficientes en lipina-2. Estos resultados permitirían plantear nuevos estudios para establecer si los inhibidores del proteasoma podrían ayudar en la mejora de los pacientes con síndrome de Majeed

Lipin-2 is a phosphatidic acid phosphatase involved in the *de novo* lipid synthesis pathway. Mutations in the gene that encodes it, *LPIN2*, are associated with Majeed syndrome, an autoinflammatory disease. Lipin-2 is therefore a link between lipid metabolism and the immune response, accomplishing an anti-inflammatory function. The proteasome, a protein degrading complex, also plays a central role in the inflammatory activation of macrophages. Proteasome inhibitors are known to decrease the synthesis of proinflammatory cytokines. In this work we propose proteasome inhibition in Lipin-2^{-/-} cells to decrease the exacerbated proinflammatory cytokine response that occurs in Majeed syndrome. We also wanted to test the protective role of lipin-2 in the loss of homeostasis caused by proteasome inhibition. Mouse IBMDM macrophage cell lines with wild-type and *Lpin2*^{-/-} genotypes were used together with the specific proteasome inhibitor. The results indicate that the use of proteasome inhibitors causes a greater loss of homeostasis in *Lpin2*^{-/-} IBMDM compared to wild-type. This loss of homeostasis culminates in cell death by apoptosis. On the other hand, treatment with MG132 during activation with LPS causes a decrease in the induction of inflammatory cytokines such as IL-6 in both genotypes, much more pronounced in lipin-2 deficient cells. These results would allow further studies to establish whether proteasome inhibitors could help in the improvement of patients with Majeed syndrome.

Palabras clave: Lipina-2, proteasoma, MG132, síndrome de Majeed, muerte celular, inflamación, macrófagos, IBMDM.

Key words: Lipin-2, proteasome, MG132, Majeed Syndrome, cell death, inflammation, macrophages, IBMDM.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema inmune innato, inflamación y macrófagos

El sistema inmune, cuya función es la defensa del huésped frente a la entrada de organismos patógenos, se subdivide en innato y adaptativo. El **sistema inmune innato** es el encargado de la respuesta rápida e inmediata frente a patógenos no específicos. Constituye la primera línea de defensa, y permite el desarrollo de la respuesta adaptativa.

Frente a ciertos estímulos, como una infección microbiana, daño tisular, estrés o una disfunción celular, este sistema inicia una respuesta fisiológica conocida como **inflamación**. Se trata de una respuesta que, de forma controlada, es beneficiosa, ya que elimina los microorganismos infecciosos, las células dañadas, y repara los tejidos afectados. No obstante, si la inflamación se cronifica, desencadena patologías conocidas como enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias, entre las que están la diabetes tipo 1, la artritis reumatoide o la aterosclerosis(1). Uno de los primeros signos de la inflamación, es la infiltración de macrófagos a los tejidos. Los **macrófagos** son células que viajan a través de la sangre en su forma precursora, los monocitos. Estos se originan en la médula ósea a partir de células madre hematopoyéticas. Viajan como componentes de la sangre para acabar infiltrándose en el tejido correspondiente. Allí se diferencian a macrófagos y realizarán la función inmune que les corresponda. Tienen diversas capacidades como la de migrar, fagocitar, actuar como células presentadoras de antígeno o producir citoquinas y quimiocinas. Los macrófagos son células muy plásticas que adaptan su actividad y metabolismo a las funciones inmunes necesarias en su entorno.(2)

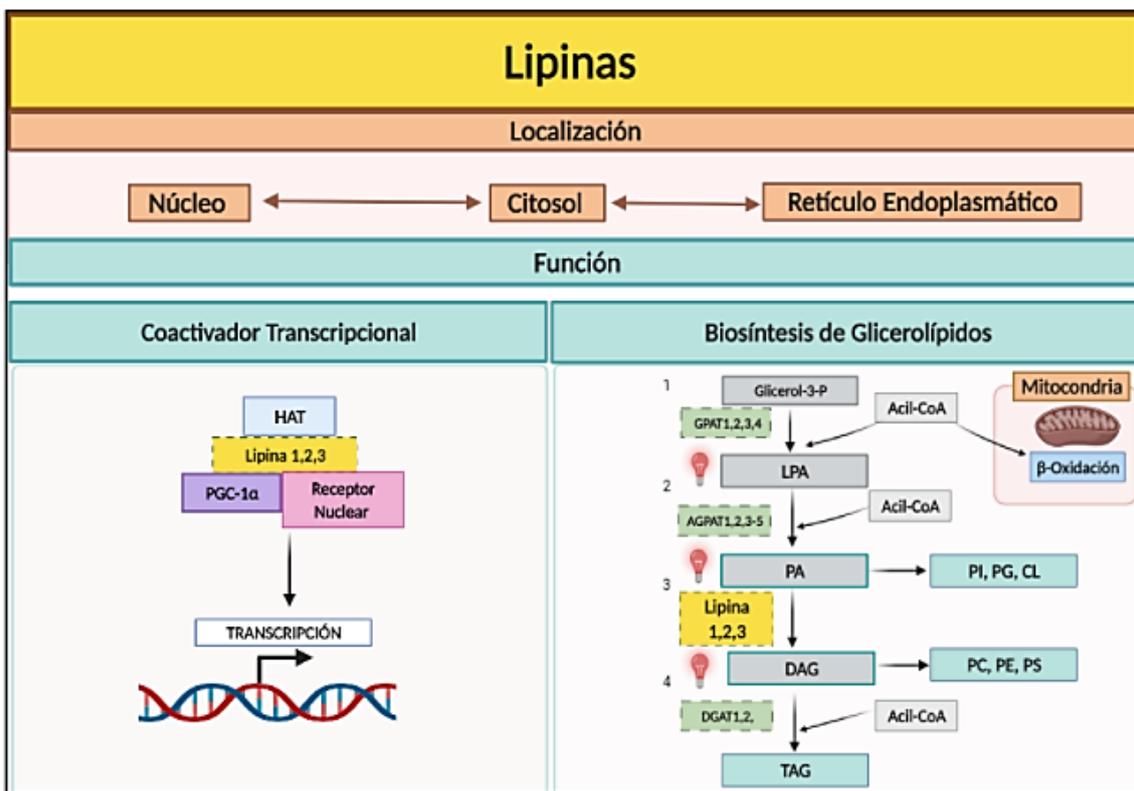
Los macrófagos pueden detectar, **metabolitos**, como los lípidos. Los lípidos tienen múltiples funciones. Además de ser los componentes principales de las membranas, y constituir la principal fuente de almacenamiento de energía, tienen la capacidad de producir señales intracelulares, así como de regular procesos de fagocitosis y de tráfico celular. Existen una serie de enzimas que modulan los niveles de los distintos lípidos. Entre ellas se encuentran las **lipinas**. Se trata de una familia proteica que se expresa en diversas células, incluyendo los macrófagos controlando los niveles de ciertos lípidos. Se profundizará sobre ellas en el apartado 1.2.

Otro componente importante en la regulación de los procesos inflamatorios es el **complejo enzimático del proteasoma**. Su función principal es la degradación de proteínas. Tiene otras funciones específicas del sistema inmune. Está implicado en el procesamiento antigénico y en la activación de ciertas rutas. Para los macrófagos es esencial el transporte y procesamiento proteico, ya que producen y transportan por la vía secretora, factores inmunes humorales. Perturbaciones en el transporte o procesamiento proteico provocan la acumulación de proteínas que causan daño celular, respuestas inmunes desequilibradas o la muerte celular. Pueden desencadenar a nivel sistémico procesos inflamatorios como el shock séptico, y enfermedades neurodegenerativas(3)(4) Se profundizará sobre él en el apartado 1.3.

1.2. Las lipinas

Las lipinas son una familia de enzimas cuyo gen fundador se descubrió por clonación posicional de un gen mutado de forma espontánea en una cepa de ratón de laboratorio. Esta mutación produce un fenotipo conocido como "*fld: fatty liver dystrophy*", y se

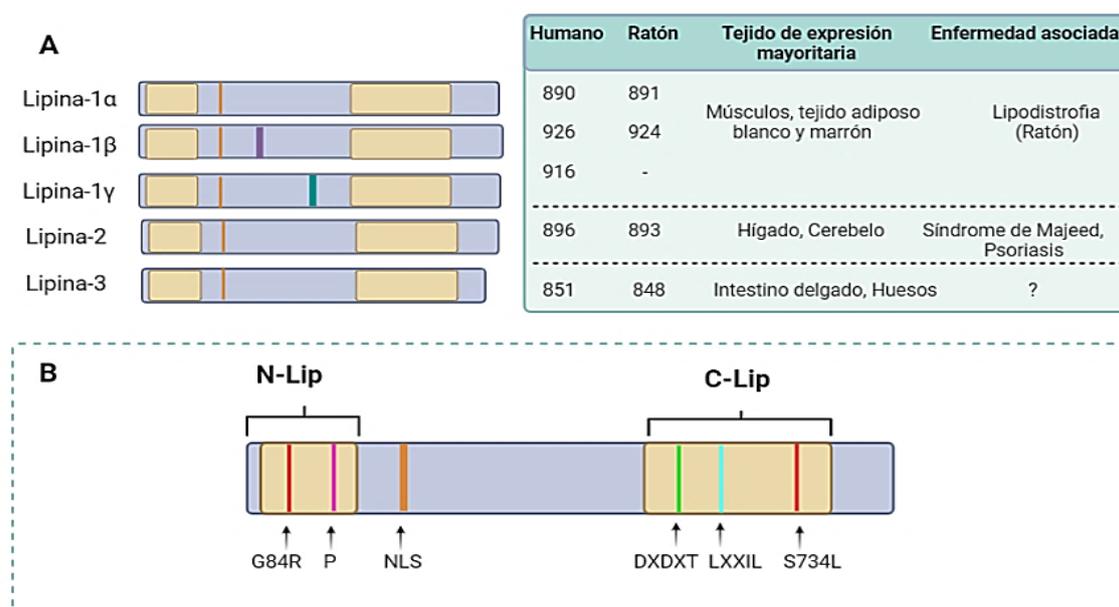
caracteriza por la ausencia de tejido adiposo maduro (lipodistrofia), resistencia a la insulina, susceptibilidad a padecer aterosclerosis y neuropatía periférica progresiva en adulto; así como por la presencia de hígado graso e hipertrigliceridemia temporal durante el periodo lactante. Estas afecciones se corresponden con la mutación del gen *Lpin1*. Por análisis de homología de secuencias se encontraron los genes *Lpin2* y *Lpin3* en mamíferos(5). Las lipinas son proteínas con una doble función (Figura 1). Presentan **actividad enzimática** como **fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP-1)** con especificidad por un solo sustrato, el **fosfatidato o ácido fosfatídico (PA)**. Como resultado de esta reacción dependiente de Mg^{2+} , se forma **diacilglicerol (DAG)**. El DAG puede metabolizarse a triacilglicerol, lípido de almacenamiento energético por excelencia. Además, el DAG puede actuar como segundo mensajero y es el precursor de fosfolípidos como la fosfatidilcolina o la fosfatidiletanolamina(5). Además de su actividad enzimática, la lipina-1 se ha descrito que puede actuar como un **coactivador transcripcional**, interactuando con $PPAR\alpha$, factor transcripcional activado por ligando, y con el coactivador transcripcional PGC-1 α , regulando genes implicados en el metabolismo energético(6).



Esquema 1. Esquema de las funciones de las lipinas dependiendo de su localización celular. Para llevar a cabo su actividad enzimática las lipinas necesitan translocar del citosol al retículo endoplasmático, donde pueden participar en la biosíntesis de glicerolípidos (Ruta de Kennedy). En el núcleo pueden actuar como coactivadores transcripcionales. Las bombillas rojas indican función en la señalización celular de la molécula adyacente. Modificado de Reue, K. et al. FEBS Lett.(2008)(6).

Los 3 genes que codifican para proteínas lipinas dan lugar a 5 isoformas distintas. El gen *Lpin1* se somete a un *splicing* alternativo del ARNm para generar dos isoformas: lipina-1 α y lipina-1 β , tanto en humano como en ratón. En el caso de los humanos, existe una tercera variante, lipina-1 γ , la última en ser identificada. Se sabe que tanto la lipina-2 como la lipina-3 comparten un 44-48% de similitud en la secuencia de aminoácidos con lipina-1(7). Existen ortólogos de la lipina en plantas, invertebrados y eucariotas unicelulares, lo que indica la importancia de la función que realizan para la célula.

En su secuencia, todas las lipinas poseen dos regiones altamente conservadas: el dominio **N-Lip** (N-terminal-lipin) y el dominio **C-Lip** (C-terminal-lipin), en el extremo amino y carboxiterminal respectivamente.(8) En el dominio C-Lip se sitúan el **motivo catalítico DXDXT** (donde X puede ser cualquier aminoácido) presente en la superfamilia de fosfatasas similares a la deshalogenasa de haloácidos y le confiere la actividad PAP. También en este dominio C-Lip se encuentra un **motivo de actividad transcripcional** α -helicoidal rico en leucina (**LXXIL**) que participa en la interacción con los factores de transcripción antes mencionados. Próximo al dominio N-terminal se encuentra una **secuencia de localización nuclear (NLS)** (**Figura 2**)(9).



Esquema 2. Familia de las lipinas. A) Isoformas de la proteína lipina. Se señalan en amarillo las regiones de aminoácidos más representativas, en naranja la señal de localización nuclear (NLS). En la tabla se muestra de izquierda a derecha: el número de residuos de aminoácidos para las versiones humana y de ratón de cada proteína. Se enumeran los tejidos con niveles prominentes de expresión de ARNm y las enfermedades conocidas resultantes de la mutación en los genes *Lpin1* de ratón y *LPIN2* de humano. B) Motivos funcionales conocidos y mutaciones patológicas en las proteínas lipinas. Los dominios N-LIP y C-LIP se conservan entre los miembros de la familia y en los ortólogos de las lipinas de todas las especies; NLS: señal de localización nuclear; G84R: mutación en *Lpin1* que causa lipodistrofia; P: residuo de serina 106, que se sabe que se fosforila en respuesta a la insulina; DXDXT: sitio activo de la enzima PAP1; LXXIL: dominio de interacción con el factor de transcripción; S734L: mutación en *LPIN2* que causa el síndrome de Majeed (6) Modificada de Reue, K. FEBS Lett. (2008) (6) y K, R. Curr. Opin. Lipidol. (2009) (10).

1.2.1. Lipina 2

La expresión y actividad de las lipinas está regulada de forma dinámica ante diversos estados metabólicos, teniendo cada lipina un patrón de expresión específico(11). La lipina-2 se expresa en prácticamente todos los tejidos. En hígado y cerebelo de ratón los niveles de expresión de *Lpin2* (niveles de mRNA), son significativamente elevados respecto a los de *Lpin1*(12). La Lipina-2 es la lipina más expresada en las **células del sistema inmune innato**, concretamente en los monocitos, ejerciendo una modulación de la respuesta inflamatoria (13). Se conoce que lipina-2 actúa como nexo entre el metabolismo lipídico y la inflamación mediada por ácidos grasos saturados(6) Hay evidencias de que lipina-2 regula la señalización celular macrofágica a través de los receptores tipo toll (TLRs). Se conoce que lipina-2 actúa como nexo entre el metabolismo lipídico y la inflamación mediada por ácidos grasos saturados(6).Este **papel antiinflamatorio protector** de la lipina-2 sería clave para tratar y controlar la inflamación de bajo grado relacionada con ácidos grasos que ocurren en la obesidad y

en trastornos metabólicos asociados. En macrófagos, la lipina-1 parece jugar un papel antagonico a lipina-2 durante la respuesta inflamatoria(13):(14):

- *Mutaciones en el gen LPIN2. Síndrome de Majeed*

Las **enfermedades autoinflamatorias** son aquellas que cursan con inflamación persistente en ausencia de activación de las células del sistema inmune adaptativo, lo cual las diferencia de las enfermedades autoinmunes. Concretamente, las enfermedades autoinflamatorias sistémicas cursan con episodios febriles recurrentes y una desregulación general de la inmunidad. Muchas de ellas derivan de anomalías genéticas que afectan a la codificación de proteínas que participan en la inflamación.(15)(16)

Las mutaciones autosómicas recesivas del gen *LPIN2*, situado en el brazo corto del cromosoma 18, causan una de estas enfermedades autoinflamatorias sistémicas, el **síndrome de Majeed**. Se han descrito varias mutaciones sin sentido en el gen *LPIN2*, que generan codones de STOP y una mutación de cambio de sentido (Ser734Leu) en el dominio C-LIP (Figura 2). También se ha localizado un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en la región UTR 3', relacionada con el riesgo de padecer diabetes y asociada a la distribución de la grasa corporal(17) .

Actualmente hay 24 individuos diagnosticados con el síndrome de Majeed. Presentan un fenotipo variado: fiebre recurrente, osteomielitis multifocal crónica recurrente, inflamación cutánea y anemia. No obstante, todos los pacientes analizados presentan marcadores proinflamatorios elevados en sangre, especialmente IL-1 β . Por esta razón se han venido utilizando bloqueantes de la IL-1 β como tratamiento paliativo, pero es necesario seguir investigando para encontrar un mejor tratamiento a esta enfermedad. Se ha descrito que la interrupción de la actividad de la lipina-2 potencia la diferenciación a macrófago M1, activa de forma aberrante el inflamasoma, y produce una sobreproducción de citoquinas(17). Por tanto, el fenotipo inflamatorio de los pacientes con síndrome de Majeed que sufren mutaciones en el gen *LPIN2*, avalan el papel de esta enzima en la regulación de la respuesta inflamatoria. (18,19)

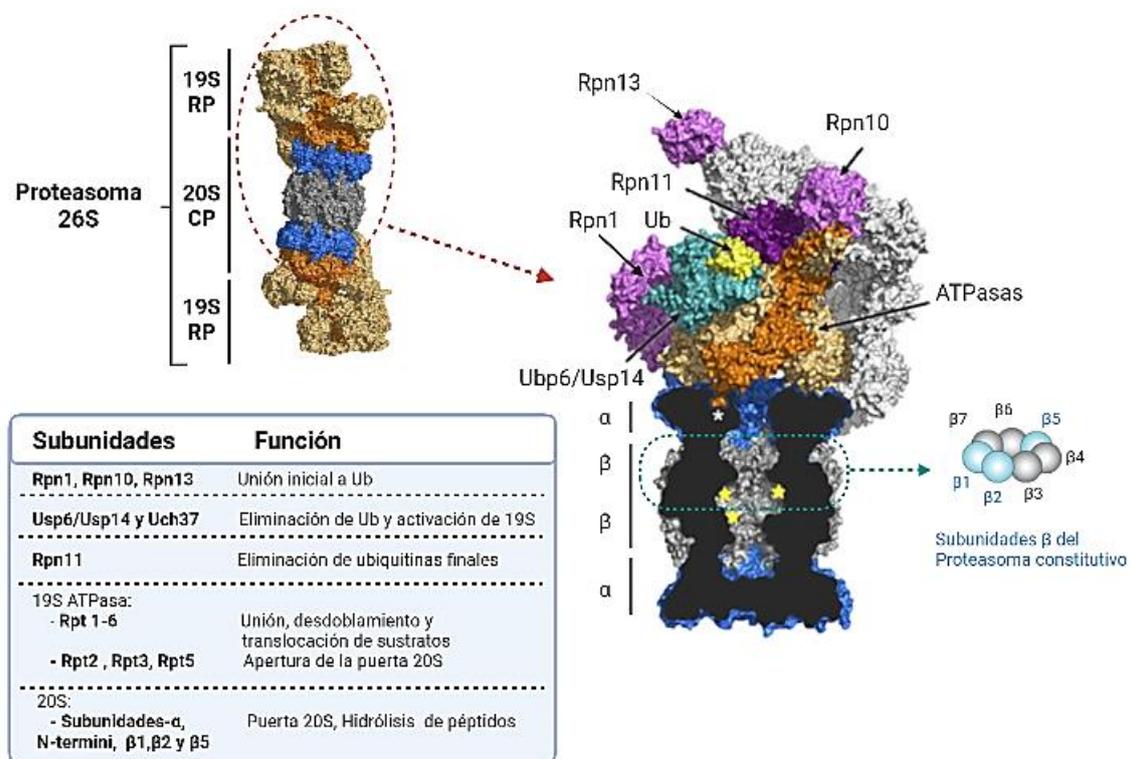
1.3. El proteasoma

Uno de los procesos fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis celular es la degradación proteica. Existen varias vías para la degradación de las proteínas: el **sistema ubiquitina-proteasoma (UPS)**; el sistema autofagia-lisosoma; y la hidrólisis de proteínas.(20) La degradación proteica es llevada a cabo en su mayoría (aprox. 80%) por el **proteasoma 26S** presente en citoplasma y núcleo en células de mamíferos. La característica principal que define la longevidad de la proteína es la exposición de regiones hidrofóbicas, como sucede durante un plegamiento incorrecto (21,22). El UPS actúa sobre las proteínas en dos pasos: en primer lugar, las proteínas se ubiquitinan, lo que les confiere una marca especial para ser degradadas. Este proceso se lleva a cabo por un conjunto de 3 proteínas: la proteína activadora de ubiquitina (E1), la proteína transportadora de ubiquitina (E2) y la ligasa (E3) (21). En segundo lugar, se produce la proteólisis dependiente de ATP en el complejo del proteasoma.(23)No obstante, no solo la ubiquitinización determina el destino de la proteína. Influyen múltiples mecanismos postranscripcionales, como la modificación por fosforilación. (21,22).

La actividad del proteasoma está modulada de diversas formas: niveles de expresión, localización intracelular (posee dominio NSL, para ser translocado al núcleo), o

modificaciones post-traduccionales. Se cree que los niveles de expresión de proteínas del proteasoma autoregulan la actividad del complejo (21).

El proteasoma 26S de mamíferos, está constituido por 2 subunidades 19S, y una subunidad 20S. La actividad catalítica la confiere la subunidad 20S. Forma un cilindro compuesto por 2 subunidades α en los extremos, y 2 β en el centro ($\alpha\beta\beta\alpha$). Cada una de las subunidades está constituida por homoheptameros que conforman un anillo. En su núcleo se encuentran las 3 subunidades de cada anillo β que confieren la actividad catalítica: la subunidad $\beta 5$ (PSMB5, actividad tipo quimotripsina), la subunidad $\beta 1$ (PSMB6, actividad tipo caspasa) y la subunidad $\beta 2$ (PSMB7, actividad similar a la tripsina). (21) Las subunidades 19S tienen función reguladora, pues se unen a las proteínas y las prepara para ser transferida a la subunidad catalítica. la ubiquitina es liberada para su reciclaje. Esta subunidad 19S está constituida por dos complejos: la tapa (Lid) y la base, compuestas por diversas proteínas, cuya localización y funciones se representan en la Figura 3.



Esquema 3. Estructura del Proteasoma 26S: la localización y funciones de sus distintas subunidades. Se muestra el proteasoma 26S, compuesto por dos subunidades 19S reguladoras, y una 20S catalítica. Se amplía una de las subunidades 19S y 20S para indicar su estructura con más detalle. Se muestra una tabla con todas las subunidades representadas en el esquema y sus funciones. Modificado de Thibaudeau, T et al. Pharmacol. Rev. (2019) (24).

A los módulos que componen el proteasoma, además de esta función proteolítica, se les atribuye una función reguladora de la expresión génica (transcripción, reparación del ADN, remodelado de la cromatina), una función reguladora de la muerte celular, así como la participación en la activación de los macrófagos y la respuesta inmune (25)(26).

Debido al relevante papel que el proteasoma tiene en la homeostasis celular, la desregulación de su función se relaciona con múltiples enfermedades neuronales, como la enfermedad de Alzheimer, autoinflamatorias y autoinmunes.(27)

1.4. Transducción de señales inducida por LPS en macrófagos.

De forma general, los macrófagos presentan 2 fenotipos opuestos: **M1, proinflamatorio o “clásicamente activado”**, y M2, antiinflamatorio. La activación clásica de los macrófagos al fenotipo M1 se lleva a cabo por los receptores **TLR** y receptores similares a NOD (NLR), de membrana y citosólico, respectivamente. Son los encargados de reconocer Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Se han descrito 10 receptores TLR distintos en el ser humano y 12 en ratón. De ellos me centraré en TLR4. TLR4 se activa por **LPS (lipopolisacárido)**, un componente de la pared celular en bacterias Gram negativas, que actúa como PAMP. puede asociarse a los co-receptores CD14 y CD11b/CD18.

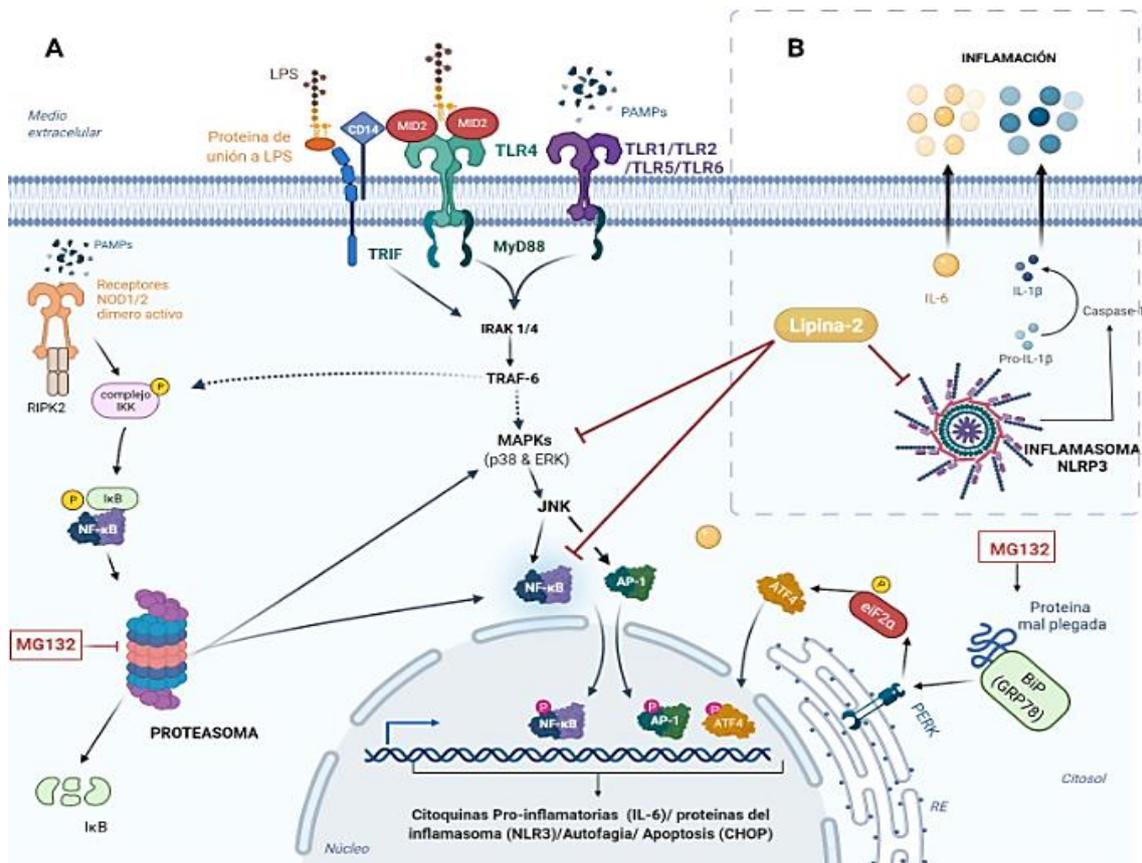
De forma general, las vías de transducción de señales inducidas por el LPS, permiten la activación de los macrófagos. El LPS se puede acoplar tanto a TLR4 como a la proteína de unión a LPS (LBP) para desencadenar la activación del complejo MYD88/TRAF/IRAK. Esto permite la activación de la vía de las MAPK, así como, de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B. Estos factores de transcripción inducen la expresión de **mediadores proinflamatorios** como IL-1 β , **IL-6** Y TNF- α .(28) También pueden generar agentes dañinos para las células cercanas, como **exceso de ROS**(29).

El **proteasoma** actúa como regulador central del proceso de inflamación. Controla la producción de mediadores inflamatorios por activación de ciertos factores de transcripción, como NF- κ B. NF- κ B son una familia de factores de transcripción compuesta por: p50, p52, Rel A (p65), c-Rel y Rel B. De forma basal, estas proteínas se encuentran en el citosol inactivadas por la familia proteica de las I κ B. La activación por LPS, provoca la fosforilación de las I κ B, permitiendo su degradación por el proteasoma y la liberación de las proteínas de NF- κ B activas, que viajan al núcleo para ejercer su acción. La desregulación de la activación de NF- κ B se ha asociado con el aumento de apoptosis a nivel celular, y con enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas a nivel sistémico(30).

EL proteasoma también participa en la fosforilación de las MAPKs, ERK1 y ERK2, inducida por la activación del receptor TLR4 por LPS(4), como se indica en el esquema 4. Además, se cree que el proteasoma puede unirse directamente al LPS, potenciando su actividad proteasa.

El uso de inhibidores del proteasoma, como MG132, disminuye la señalización a través del receptor TLR4 por LPS. Se sabe que los inhibidores del proteasoma disminuyen la producción de citoquinas, inhiben la activación de NF- κ B, e incrementan la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10. (31)(3) Por tanto, los inhibidores del proteasoma inhiben la activación proinflamatoria. Estos hechos otorgan al proteasoma un papel central en la activación inflamatoria de los macrófagos.

Gracias a trabajos anteriores del laboratorio se sabe que los macrófagos carentes de **lipina-2**, producen factores proinflamatorios como TNF- α , IL-6 y pro-IL-1 β de forma exacerbada, respecto a los macrófagos que expresan lipina-2. Además, los macrófagos sin lipina-2 son capaces de sobreactivar una compleja maquinaria proteica intracelular, el inflamasoma NLRP3, que se ensambla durante la respuesta inflamatoria para activar caspasa-1 y procesar la proIL-1 β , generando IL-1 β madura. (32)



Esquema 4. Modelo compilatorio del papel de proteasoma (A), su inhibidor MG132, y lipina-2 (B) en las rutas de señalización por activación de los receptores de PAMPs (LPS), y la respuesta proinflamatoria en el que se basa este trabajo. El LPS se une a CD14 y al complejo de los receptores Toll (TLR4), activando la vía de señalización que fosforila el complejo IKK, fosforilando a su vez el complejo que forman NF-κB y su inhibidor IκB. Esto también sucede por activación de los receptores de tipo NLR (NOD1/2). Esta fosforilación permite la proteólisis del complejo que forman NF-κB y sus proteínas inhibidoras. Además, permite la activación de las MAPKs y la transcripción de los genes dependientes de NF-κB y AP-1. El inhibidor MG132 provoca la acumulación de proteínas mal plegadas, que son detectadas por BiP. Este complejo es reconocido por el receptor PERK, así como por el resto de receptores de estrés de retículo, IRE1α, y ATF6 (no representados en el esquema). PERK fosforila eIF2α, inhibiendo la transcripción proteica y activando ATF4, que se transloca al núcleo y actúa como factor de transcripción. Por último, se representa el papel del Lipina-2 (B). Por un lado, inhibe la cascada de señalización de las MAPKs, y NF-κB y por otro, inhibe la activación del inflamasoma. Inspirado en la figura 3 de N, Q. et al. Immunol. Res.(2005) (33) .

El conjunto de ambos fenómenos (la participación de la lipina-2 y, la participación del proteasoma en la regulación de la respuesta inmune) abre un marco de investigación muy interesante para poder avanzar en el tratamiento de enfermedades relacionadas con procesos de inflamación exacerbados.

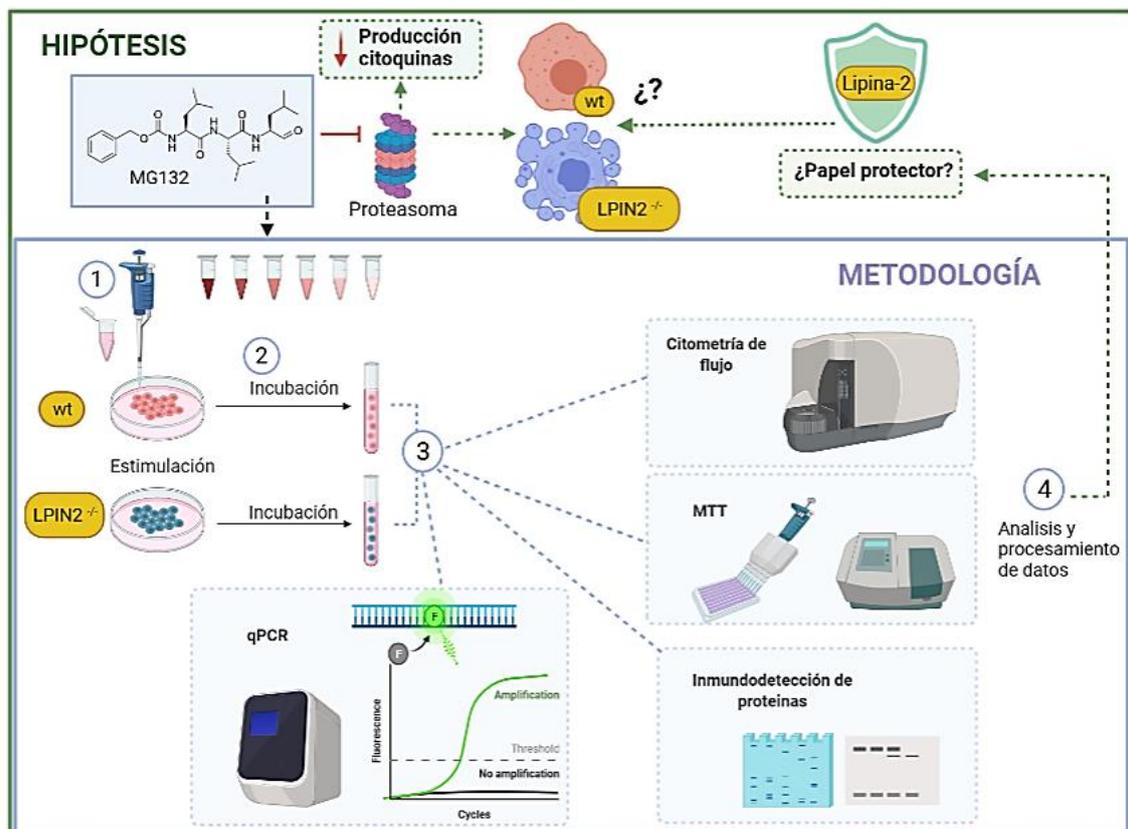
1.5. Hipótesis y objetivos

La **hipótesis** de este trabajo es que la lipina-2, debido a su papel antiinflamatorio tiene un papel protector frente a la pérdida de homeostasis que provoca la inhibición del proteasoma 26s en células eucariotas. Además, la inhibición del proteasoma podría ayudar a controlar las exacerbadas respuestas inflamatorias que ocurren en células sin lipina-2.

Por tanto, el **objetivo principal** de este trabajo es demostrar que la lipina-2 ejerce este papel protector frente a la muerte celular por inhibición del proteasoma en macrófagos. Se proponen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudiar si existen diferencias en muerte celular en macrófagos con y sin lipina-2 durante la inhibición del proteasoma.
2. Determinar el tipo de muerte celular que se produce.
3. Definir si existen procesos celulares como el estrés de ER que participen en la inducción de la muerte celular que se encuentre en las mencionadas condiciones.
4. Cuantificar la producción de ROS, sustancias que pueden participar en la inducción de muerte celular.
5. Estudiar si la inhibición del proteasoma disminuye la producción de citoquinas inflamatorias activando la respuesta inflamatoria con LPS, especialmente en células carentes de lipina-2.

Para ello se utilizaron macrófagos IBMDM wt y deficientes en LPIN2, y presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma MG132, a distintos tiempos y concentraciones.



Esquema 5. Esquema de trabajo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cultivo de líneas celulares y estímulos o tratamientos

2.1.1. Línea celular IBMDM

Es una línea celular de macrófagos de médula ósea inmortalizados obtenidos a partir de ratones macho C57BL/6J con genotipos *wildtype* y *Lpin2*^{-/-}. Estas células adherentes se cultivaron en medio RPMI 1640 siempre atemperado antes de su uso a 37°C en el baño termostático. El medio fue suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% (v/v), 100 U/ml penicilina + 100µg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina. A los medios así suplementados con suero se les denomina completos. Las células se cultivaron en flasks de tamaño mediano (75 cm²) con tapón con filtro (SPL Life Science). Se mantuvieron en incubador a 37 °C y atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂. Se utilizaron las células entre los pases 1-25.

Son células adherentes, es decir, que se adhieren a las paredes del recipiente que las contiene. Para realizar subcultivos o para experimentar es necesario despegarlas del recipiente, para lo que en este trabajo se utilizó la separación mecánica por raspado.

Estas células proliferaban duplicando su población cada 24h. se observa una acidificación más temprana del medio de cultivo y una proliferación ligeramente superior en las células *Lpin2*^{-/-}. Las células se mantenían a una confluencia nunca superior al 80%. Para mantener esas confluencias se realizan subcultivos, retirando el medio por volcado en un vaso de precipitados. A continuación, se añaden 5 mL de medio nuevo. Se procede al raspado y recogida en un tubo. Para el conteo celular se utilizó una cámara de *Neubauer*. Por último, se pasa el número de células deseado a un flask y se completa con medio hasta un volumen final de 20 mL.

2.1.2. Estímulos celulares e inhibidores

- **MG132** (MCE, MedChemExpress) Es un péptido aldehído sintético. Potente Inhibidor específico de la actividad quimi tripsina de la subunidad PSMB5 (β5) del proteasoma, una de sus subunidades catalíticas. Bloquea la actividad proteolítica del complejo 26S. Utilizado en concentraciones: 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 µM; a distintos tiempos: 1, 2, 3, 6, 9, 12, 21 h.
- **LPS**. Lipopolisacárido o endotoxinas (Sigma Aldrich) a una concentración de 100 ng/ml. El lipopolisacárido es un componente de la pared celular en bacterias Gram-negativas, que actúa como ligando del receptor TLR4. El lipopolisacárido participa en la inducción de la activación de los macrófagos al fenotipo proinflamatorio M1. El receptor TLR4 permite conectar a través de sus dominios TIR intracelulares, con distintas proteínas adaptadoras. Las proteínas adaptadoras activan vías de señalización que desencadenan la transcripción de citoquinas proinflamatorias como IL-6. (34)
- **Inhibidor de pan-caspasas irreversible Z-VAD-FMK** (APEX BIO). Es permeable a la célula. Se ha demostrado que Inhibe el procesamiento y consecuente activación de CPP32 (Caspasa 3), una de las proteínas determinantes en el proceso de muerte celular por apoptosis. Inhibe por tanto la inducción de la apoptosis. Utilizado a 10µM.

2.2. Obtención de homogeneizados celulares

Las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la degradación proteica. Las células se rasparon en su propio medio de cultivo y se traspasaron a un eppendorf. Se centrifugó durante 10 min. a 300 xg a 20 °C. Se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS antes de añadir el buffer de lisis. Se añadieron 100 µL del *buffer* o tampón de lisis por cada millón de células. Se utilizó el siguiente tampón de lisis celular para romper las membranas: 50 mM Tris-HCl a pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100 (v/v), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 5mM Na₄P₂O₇, 50 mM sodio β-glicerol fosfato, 270 mM sacarosa, al que se le añade, en el momento de lisis: 0,1 mM PMSF, PIC 1X, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF. El tampón incluye inhibidores de proteasas para evitar la degradación proteica, e inhibidores de fosfatasas para conserva la fosforilación. Se agita vigorosamente 10 s y se deja actuar el *buffer* en hielo durante 1h. Se centrifugó a 12000 xg a 4°C, 10 min y se recogió el sobrenadante en un Eppendorf. El lisado se mantuvo a -20°C hasta su uso.

2.3. Inmunodetección de proteínas

2.3.1. Valoración de la concentración de proteínas

A partir del lisado celular de cada condición, se necesita medir la concentración proteica inicial de cada muestra. Esto es necesario para carga la misma cantidad de proteína en cada muestra para realizar la electroforesis. La cuantificación se realiza mediante el **método Bradford** (35). Se basa en el cambio de absorbancia del colorante azul de Coomassie G250 (λ máx. de 470nm) tras unirse a las proteínas que actúan como reactivo del ensayo (λ máx. de 595nm). Mediante la medida de la absorbancia de la solución por espectrofotometría, podemos determinar la concentración de proteína. Requiere de la elaboración de una recta patrón o de calibrado a partir de medidas de absorbancia de concentraciones de BSA conocidas. Esta recta se basa en que la ecuación de Lambert-Bee se cumple en el intervalo de concentraciones en el que se trabaja, es decir, que la recta sea válida para interpolar en el gráfico el valor de absorbancia de la muestra para determinar los µg de proteína (35). Se utilizó el reactivo Bradford (*Protein assay Dye Reagent concentrate, Bio-Rad Laboratories*) según instrucciones del fabricante. Se realiza una dilución de la solución proteica en 800 µL de H₂O, al que se le añaden 200 µL de Reactivo Bradford. Se agita y se mide la absorbancia de la solución con un espectrofotómetro *BioPhotometer Plus (Eppendorf)* a una longitud de onda de 595 nm.

2.3.2. Electroforesis desnaturalizante y electrotransferencia de proteínas

Según el método descrito por Laemmli, se realizó una **electroforesis** en condiciones desnaturalizantes y reductoras (**SDS-PAGE**). Se utilizó un tampon de carga para desnaturalizar las proteínas. Este se deja actuar durante 5 min. a 95 °C para favorecer la desnaturalización. El tampón de carga o de Laemmli (5x) utilizado contiene: 156mM Tris-base, 50% glicerol (v/v), 10% SDS (p/v), 0,002% azul de bromofenol (p/v), 20% β-mercaptoetanol (v/v).

El detergente iónico SDS o dodecilsulfato sódico se utilizó para y separar las proteínas en monómeros. Rompe los enlaces de hidrógeno y recubre la cadena polipeptídica de cargas negativas. Esto permite la accesibilidad del anticuerpo a su sitio de unión.

El agente reductor β-mercaptoetanol rompe los puentes disulfuro, separando las subunidades de la proteína que estuvieran unidos por estos. La combinación del SDS Y β-mercaptoetanol permite la separación, haciendo que la movilidad sea proporcionalmente inversa al número de aminoácidos y que las proteínas migren según su tamaño, respectivamente.

El azul de bromofenol es un marcador del frente de avance durante la electroforesis. El glicerol aporta densidad para facilitar la carga en los pocillos.

Después, se lleva a cabo la electroforesis en cubetas MiniProtean™ (Bio-Rad laboratories) con tampón de electroforesis, utilizando geles de empaquetamiento al 4% de acrilamida/bis (37.5:1) al 30% (Bio-Rad laboratories) y geles de resolución al 10, 12 o 15% de acrilamida, dependiendo del tamaño de las proteínas de interés.

La electroforesis se lleva a cabo en cubetas MiniProtean™ (Bio-Rad laboratories) con tampón de electroforesis. La muestra desnaturalizada se carga en un gel compuesto por dos geles contiguos: uno separador, en la parte inferior, y uno concentrador, en la parte superior 4% de acrilamida/bis (37.5:1) al 30% (Bio-Rad laboratories). Esto permite que las muestras entren simultáneamente en el gel separador y que se formen bandas más definidas. La elaboración del gel separador se lleva a cabo utilizando distintos porcentajes de acrilamida-bis-acrilamida (8,10,12,15%) dependiendo inversamente del peso molecular de la proteína interés. Junto con las muestras se utilizaron estándares preteñidos de diferentes tamaños (*Thermo scientific*). La electroforesis se efectúa a 120V, durante un tiempo aproximado de entre 60-120 minutos en un tampón (running buffer): 25 mM Tris-base, 0,192M glicina, 1 g/L SDS.

Para la posterior detección de las proteínas, es necesario transferirlas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa, ya que este no es un soporte adecuado. Es lo que se conoce como **electrotransferencia o Western blot**. En este caso se utilizaron membranas de nitrocelulosa (GE HealthCare), y un sistema de transferencia en medio húmedo. Este método de transferencia, aunque es más lento es más eficiente que el semi seco.

Se monta el gel y la membrana en un cassette de transferencia, intercalado entre esponjas y papel absorbente. Este sistema genera un campo eléctrico que permite la migración de las proteínas (cargadas negativamente), hacia el polo positivo. Por tanto, al intercalarse la membrana entre el gel (polo negativo) y el polo positivo, las proteínas son transferidas a la membrana. Se sumergen en una cubeta con tampón de transferencia que debe ser enfriado a 4°C previo a su uso. El tampón de transferencia utilizado es Tris-glicina metanol: 25 mM Tris-base, 0,192 M glicina, 20% Metanol (v/v)). La transferencia se efectúa aplicando un amperaje constante de 300 mA, 90 min rodeando la cubeta de hielo para evitar sobrecalentamiento.

2.3.3. Inmunodetección de proteínas

Una vez inmovilizadas en la membrana, las proteínas son expuestas a anticuerpos específicos para unos epítomos antigénicos determinados. Brevemente se siguen los pasos: Bloqueo de membrana, incubación con el anticuerpo primario, lavado en PBS-*tween* 0,1%(v/v), incubación con el anticuerpo secundario conjugado con HRP(peroxidasa), detección quimioluminiscente de los anticuerpos. Se prepararon diluciones de los anticuerpos, según la tabla 1, en leche deslipidada al 5% (p/v), o al 5% BSA (p/v) en PBS hasta un volumen de 10 mL. Las incubaciones se realizaron 1h a temperatura ambiente o bien *over night* a 4°C, según indicaciones de la casa comercial. Los anticuerpos secundarios fueron incubados 1h a temperatura ambiente. Todas las incubaciones se realizaron en agitación. Para detectar la quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con peroxidadas de rábano (HRP), las membranas se incubaron en el reactivo ECL *western Blotting Substrate* (Pierce, Thermo Scientific) durante 1 min. El ECL es un sustrato quimioluminiscente que reacciona con la Peroxidasa HRP. La unión específica del anticuerpo secundario al primario permite su detección. La señal se detectó con películas autorradiográficas en una cámara oscura en el sistema Curix 60 (AGFA). La digitalización de la autorradiografía *Fuji-Medical X-Ray-Film* (Fujifilm) se

realizó mediante el escáner *GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad)* y el análisis de densitometría cuantitativa mediante el *software ImageJ*. Se referenció la densidad de cada banda con la densidad de una proteína constitutiva de referencia, en este caso β -Actina.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos de interés según protocolo de la casa comercial:

Anticuerpo	Tipo	Origen	Antígeno y PM	Dilución y bloqueo	Conjugado	Casa comercial
Anti-Caspasa 3	Primario Policlonal	Conejo	Caspasa 3 (17-19kDa) Procaspasa 3 (35 kDa)	1:1000 5% Leche	No	Cell signalling
Anti-eIF2	Primario Policlonal	Conejo	eIF2 α (38 kDa)	1:1000 5% Leche	No	Cell signalling
Anti-fosfo-eIF2	Primario Policlonal	Conejo	fosfo-eIF2 α (38 kDa)	1:1000 5% BSA	No	Cell signalling
Anti-p70S6 kinasa (49D7)	Primario monoclonal	Conejo	p70 (70-85 kDa)	1:1000 5% Leche	No	Cell signalling
Anti-Beta Actina Ac-15	Primario monoclonal	Ratón	Beta Actina (42 kDa)	1:1000 5% Leche	No	Sigma
Anti-IgG de conejo	Secundario	Burro	Fragmento F(ab') ₂ de IgG de conejo	1:5000	HRP	GE Healthcare
Anti Ig-G de ratón	Secundario	Oveja	Fragmento F(ab') ₂ de IgG de ratón	1:5000	HRP	GE Healthcare

Tabla 1. Listado de anticuerpos utilizados en Western blot.

Para detectar la quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), las membranas se incubaron en el reactivo ECL *western Blotting Substrate* (Pierce, Thermo Scientific) durante 1 min. El ECL es un sustrato quimioluminiscente que reacciona con la Peroxidasa HRP. La señal se detectó con películas autorradiográficas en una cámara oscura en el sistema Curix 60 (AGFA). La digitalización de la autorradiografía *Fuji-Medical X-Ray-Film* (Fujifilm) se realizó mediante el escáner *GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad)* y el análisis de densitometría cuantitativa mediante el *software ImageJ*. Se referenció la densidad de cada banda con la densidad de una proteína constitutiva de referencia, en este caso β -Actina.

2.4. Citometría de Flujo

2.4.1. Análisis de muerte celular

Un método de cuantificación objetivo y rápido para distinguir células que sufren procesos apoptóticos es combinar las sondas Anexina V-FITC junto con Ioduro de Propidio (IP) y medir fluorescencia mediante citometría de flujo.

El IP es un agente intercalante de ácidos nucleicos, impermeable a la membrana. Permite medir el nivel de permeabilización de la membrana, ya que solo se une y cuantifica la fluorescencia en aquellas células con la membrana plasmática al menos parcialmente desintegrada (células muertas o dañadas). Se detectó la fluorescencia por citometría de flujo en el Canal FL3.

Durante las primeras fases de la apoptosis, el fosfolípido de membrana fosfatidil serina (PS), se desplaza de la membrana interna a la externa dentro de la bicapa lipídica. La Anexina V se une a la PS expuesta de forma dependiente de Ca^{2+} . La anexina se

encuentra conjugada con el fluorocromo FITC, pudiendo medir fluorescencia por citometría de flujo en el canal FL1. La tinción con esta sonda precede a la pérdida de integridad de membrana correspondiente con procesos apoptóticos tardíos o necróticos. La combinación de Anexina junto con el colorante vital IP, permite identificar: Células vivas (Negativo para ambos), Células apoptóticas temprana (PI -, FITC-Anexina V +), Necróticas (PI +, FITC-Anexina V -), Apoptosis tardía/Necrosis (Doble positivas). Con esta técnica podemos medir la progresión desde células viables, inicio de apoptosis temprana y finalmente procesos finales de muerte.

Se utilizó Anexina V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Pharmingen™ 51-65874X, Bd Bioscience) según instrucciones del fabricante y el marcador catiónico Ioduro de propidio a 1 µg/ml (IP) (Sigma-Aldrich, P4170). Se preparó una mix que incluye el IP y la Anexina V-FITC en Binding buffer (Sigma B9796). Se retiró el medio y se añadieron 100 µL de la mix por tubo. Se dejó actuar 15-20 min. Las células se recogieron por raspado y se diluyeron en un volumen total de 300 µl para su posterior análisis por citometría de flujo, adquiriendo 30.000 células por condición.

2.4.2. Análisis de la producción de ROS

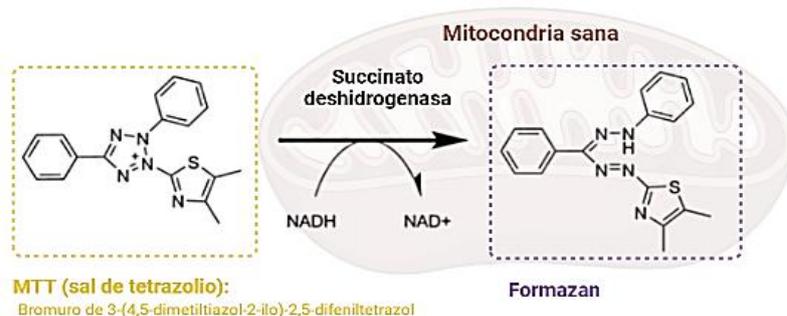
Se utilizó la sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich). Es una sonda permeable a la membrana celular. Permite la cuantificación de ROS en respuesta al metabolismo mitocondrial que es el productor fundamental de especies reactivas de oxígeno (ROS). El DCFH-DA al oxidarse convirtiéndose en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), emite fluorescencia. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia nos permite determinar una mayor producción de ROS. Las células se estimularon sin cambiar el medio (Completo), se recogieron por raspado. Durante la última media hora de tratamiento, se realizó una incubación con la sonda a una concentración 10 µM. Se analizó la fluorescencia con el citómetro de flujo detectando la fluorescencia a 505-545 nm (canal FL1).

En todos los experimentos de citometría se utilizó para medir el citómetro de flujo Galios™ (Beckman Coulter Life Sciences). Los datos se analizaron con el software Kaluza™.

2.5 Análisis de la actividad metabólica por reducción de MTT

Es un ensayo colorimétrico en el que la actividad de las enzimas oxidorreductasas (mitocondrias sanas) refleja el número de células viables. El ensayo colorimétrico de viabilidad con MTT se basa en la reducción de este compuesto por interacción con productos del metabolismo celular al compuesto formazán (Esquema 6). A mayor reducción del compuesto, más actividad metabólica y mayor número de células viables. La absorbancia medida a 590 nm es proporcional al número de células viables.

Se utilizó MTT Thiazol Blue Tetrazolium Bromide (Sigma M5655). Se cultivaron 7500 células en 100 µL por pocillo, en placas de 96 en un día antes de la estimulación. Al día siguiente se añadieron los estímulos pertinentes. Tras el tiempo de estimulación, se añadieron 20 µL por pocillo de MTT (Sigma) a 5 mg/ml en PBS. La solución de MTT se debe filtrar antes de ser añadida a las células. Como control se añadieron pocillos sin células, solo con MTT y su solvente. Se dejó incubar la solución de MTT durante 2,5h en el incubador 37°C, 5% CO₂.



Esquema 6. Reducción enzimática de la sal soluble y de color amarillo MTT a Formazán, insoluble y de color morado. Está catalizada por acción de las coenzimas resultantes de la actividad de las deshidrogenasas, presentes solo en mitocondrias sanas. Esencialmente por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. Esquema modificado de Präbst K et al. Methods Mol Biol. (2007)(36).

El formazán, producto de la reacción, forma unos cristales insolubles, que son disueltos, previa aspiración del medio, con un solvente compuesto por: 4mM HCl (Scharlau), 0.1% Nondet P-40 (NP40)(CALBIOCHEM) en isopropanol (150µL por pocillo). Se resuspendió para facilitar la solubilización de los cristales (20-30 repeticiones). Se mide la absorbancia de la placa a 590 nm y a 620 nm como control. Se debe medir en menos de 1h tras añadir el solvente. El 100% de la actividad metabólica es la absorbancia obtenida en células sin tratar. El resto de muestras, se han referido a esos valores de absorbancia, obteniendo el % de actividad metabólica.

2.6. Detección de ARNm

2.6.1. Extracción de ARN

Se realizó la extracción del ARN según las instrucciones de la casa comercial con TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific). Este compuesto es una solución monofásica de tiocianato de guanidina y fenol. Los ácidos nucleicos son insolubles en el fenol. Por otro lado, el isotiocianato de guanidina es un inhibidor de proteasas y agente desnaturante de proteínas. La mezcla de ambos compuestos permite separar la muestra en fases, y mantener en perfecto estado el ARN.

Se procedió resuspendiendo las células en 1 mL de TRIzol para **lisar** las células. Después se añadieron 200µL de cloroformo, se agita vigorosamente y se centrifuga a 12000 x g, 15 min, a 4°C para evitar la degradación. Se produce una **separación de fases**: la fase acuosa, la de nuestro interés porque contiene el ARN, ADN en la interfase y proteínas en la fase orgánica. Para **precipitar el ARN** se utilizan 500 µL de isopropanol y se repite el paso de centrifugación, 10 min. Se lava con etanol 70% en agua libre de nucleasas. Tras el lavado se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende en agua estéril libre de nucleasas. Se midió la concentración de ARN con el nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher scientific) a 260 nm. La pureza del RNA de la muestra se evalúa mediante la ratio 260/230, siendo aceptables valores por encima de 1,8, próximos a 2.

2.6.2. Retrotranscripción a ADNc

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN anteriormente aislado siguiendo el protocolo del fabricante utilizando el Kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Scientific). Como cebadores se utilizaron oligo(dT) pues permiten una mayor especificidad al unirse de forma muy específica a la cola de poli A del ARNm. La reacción se lleva a cabo a 43°C, 1h. Finalmente se inactiva la retrotranscriptasa a 92°C durante 5 min.

2.6.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-q-PCR)

El ADNc fue amplificado mediante PCR cuantitativa en tiempo real, que nos permite conocer si hay o no expresión de gen y a diferencia de la PCR convencional, nos permite cuantificar esa expresión. Se uso la mezcla comercial Brilliant III ultra-fast qPCR master mix (Agilent technologies) según protocolo de la marca, en un termociclador ABI7500 (Applied Biosystems). La reacción se lleva a cabo de un volumen final de 10 μ L como se indica en la tabla 2:

Reactivo	Volumen
H2O libre de nucleasas	Hasta 10 μ L
ADNc molde	20 ng
Oligonucleótido forward (500 nM)	0,5 μ L
Oligonucleótido reverse (500 nM)	0,5 μ L
Brilliant III Master mix qPCR	5 μ L

Tabla 2. Componente para reacción RT-qPCR del kit Brilliant III ultra-fast qPCR master mix (Agilent technologies).

Gen	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso
<i>Il6</i>	5' AAATTCGGTACACCTCGACGG 3'	5' GGAAGGTTTCAGGTTGTTTTCTGC 3'
<i>gapdh</i>	5' AGGTCGGTGTGAACGGATTTG3'	5' TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 3'

Tabla 3. Oligonucleótidos de genes de ratón utilizados para RT-q-PCR, adquiridos en MWG Biotech.

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

- a. Preincubación o desnaturalización inicial 95 °C, 3min.
- b. Amplificación (36 ciclos):
 - i. Desnaturalización 95 °C, 12s.
 - ii. Anillamiento 60 °C, 16s.*
 - iii. Extensión y recolección de datos 72 °C, 28s **
- c. Extensión final 72°, 1min.
- d. Curva de disociación (*melting curve*):
 - i. 95 °C, 15s.
 - ii. 60 °C, 1min.
 - iii. 95 °C 30s.
- e. Enfriamiento a 4° ∞.

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

** 1s a 72 °C es suficiente para amplificar fragmentos de 400 pb, por la alta procesividad de la DNA polimerasa utilizada.

Se tiene en cuenta el ciclo umbral o C_t (*cycle threshold*). En este ciclo la amplificación empieza a ser exponencial, es decir, sobrepasa un umbral que lo distingue del fondo o *background*. El análisis estadístico se hizo aplicando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (37).

2.7. Análisis estadístico de los datos.

Los datos que presenta el siguiente trabajo son resultados representativos de al menos tres experimentos distintos. Los datos se representan como la media \pm el error estándar. Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante el análisis estadístico *t de student* de dos colas con el software SigmaPlot 11.0. Se consideró estadísticamente significativo un p valor menor o igual que 0.05, es decir un nivel de confianza superior al 95%.

3. RESULTADOS

3.1. La lipina-2 protege a los macrófagos de la muerte inducida por inhibición del proteasoma

La inhibición del proteasoma afecta a múltiples funciones celulares, entre ellas la señalización durante los procesos de activación de la respuesta inmune innata. Sin el proteasoma activo, se interrumpen vías de señalización y se acumulan proteínas dañadas por procesos de oxidación, impidiendo el mantenimiento de la homeostasis celular, provocando finalmente la muerte de la célula (38).

Teniendo en cuenta el papel antiinflamatorio de la lipina-2 en macrófagos, se quiso estudiar si la expresión de esta enzima afectaba a la inducción de muerte celular desencadenada por inhibición del proteasoma en estas células. Para ello se eligió el inhibidor específico MG132 que bloquea la actividad proteolítica del complejo 26S del proteasoma, y se utilizaron macrófagos derivados de médula ósea de ratones salvajes ("wild type", wt) y deficientes en el gen *Lpin2* (*Lpin2*^{-/-}).

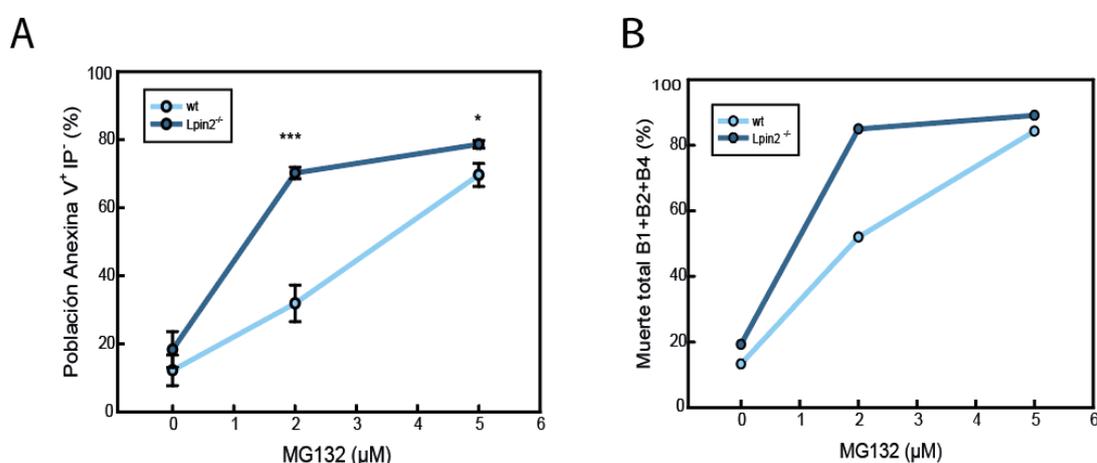


Figura 1. Efecto de lipina-2 en la viabilidad celular producida por tratamiento con MG132. Las IBMDMs fueron tratadas con MG132 a concentraciones 0, 2, 5 µM durante 24h. Posteriormente, las células fueron tratadas con Anexina V-FITC e IP y la fluorescencia fue analizada por citometría de flujo como se especifica en el apartado materiales y métodos. Se analizaron 30.000 eventos por condición. A) Representación del % de células Anexina V-FITC⁺ IP⁻ (apoptóticas) respecto a concentraciones de MG132 indicadas. B) Representación % de células totales no viables (suma de B1, B2 y B4 de figura complementaria 1. Consultar Anexo). Los datos representan porcentaje de intensidad de fluorescencia y suma de los porcentajes promedio de fluorescencia en B1, B2 y B4 de la figura complementaria 1, consultar anexo. Experimento representativo de 3. se utilizó porcentaje promedio de fluorescencia de Anexina, ± la desviación típica analiza por el software Kaluza, *p < 0,05, ***p < 0,001, por test t de Student.

Para cuantificar la muerte celular se analizaron dos tipos de muerte: muerte por apoptosis, donde las células mueren de forma programada y se produce la externalización de lípidos aniónicos como la fosfatidilserina; y muerte por necrosis, donde la célula experimenta daño en su membrana, permitiendo la entrada y salida de moléculas. Estos dos tipos de muerte pueden diferenciarse fácilmente mediante el marcaje celular con Anexina-V-FITC, que se une a lípidos aniónicos; y con IP, molécula fluorescente de bajo peso molecular que entra en las células cuya membrana está dañada, y se une a los ácidos nucleicos de la célula.

La presencia de estas moléculas en las células puede diferenciarse fácilmente en el citómetro de flujo porque cada una de ellas emiten fluorescencia diferente (FITC-fluorescencia verde e IP-fluorescencia roja). El análisis de los datos mostrados en la Figura complementaria 1^a (Anexo) se realizó mediante una representación conjunta de

las dos fluorescencias para cada condición celular, permitiendo discernir las células vivas (no teñidas, zona B3 de cada panel), de las células apoptóticas (positivas para Anexina-V-FITC, zona B1), de las células necróticas (positivas para IP, zona B4), y de las células en apoptosis tardía, cuya membrana plasmática puede terminar dañada y por tanto, permitir la entrada de IP (positivas para anexina-V-FITC e IP, zona B2). Los resultados muestran que en las células control (wt) el tratamiento con MG132 produce un desplazamiento de las poblaciones celulares desde de un marcaje doble negativo (células sanas) hacia un marcaje positivo para Anexina V (apoptosis) y la cantidad de células que sufre este desplazamiento depende de la dosis de MG132 utilizada, siendo 32% a 2 μ M y máxima (70%) a 5 μ M (Figuras complementaria 1A y B (anexo)). A partir de estas concentraciones de droga, las células están tan deterioradas (10 μ M, Figura complementaria B (Anexo)) que los análisis por citometría se desvirtúan y no se muestran. Los datos obtenidos muestran también la aparición de una pequeña población celular necrótica (14%, IP⁺) a 2 μ M MG132, que desaparece, en gran parte, a 5 μ M. Se observa también una pequeña población de células en apoptosis tardía a 2 mM MG132 (6%, dobles positivas), que aumenta con la dosis de inhibidor (10% a 5 μ M).

Curiosamente, el desplazamiento poblacional completo ocurre a dosis más bajas en las células sin lipina-2, siendo 70% positivas para Anexina-V a 2 μ M MG132 (Figura 1A y C). Este resultado indica una mayor vulnerabilidad al efecto del inhibidor del proteasoma que en las wt. Las células necróticas, sin embargo, disminuyen en este fenotipo (IP⁺, 6% a 2 μ M MG132).

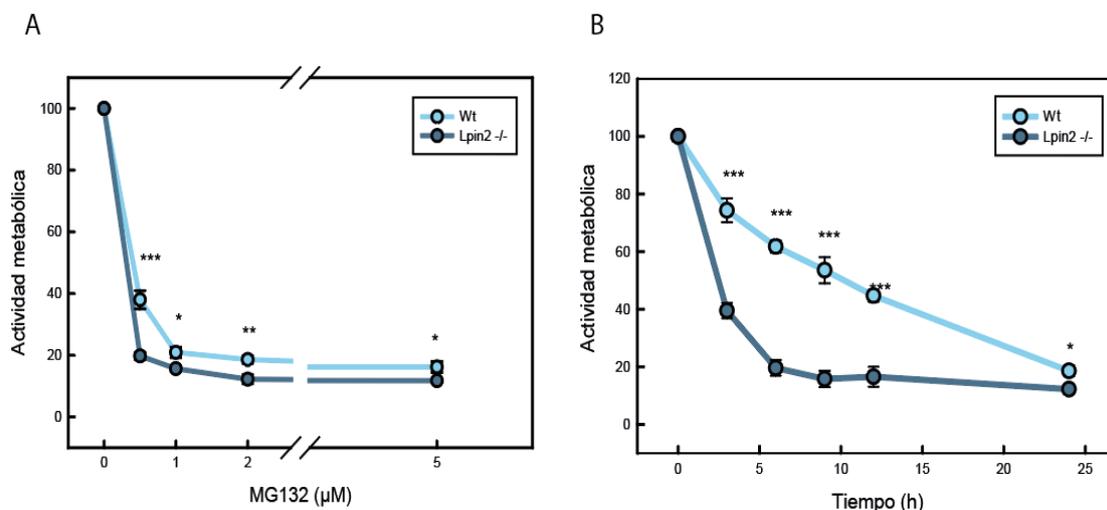
La Figura 1B representa la suma de los % de células con marcajes que indican muerte celular (B1+B2+B4 de la figura 1 complementaria (Anexo)). En ella se observa un aumento del porcentaje de células muertas dependiente de la concentración de MG132 utilizada para las células wt. El porcentaje de muerte es siempre mayor en las células sin lipina-2, y apenas se observa efecto en relación a la concentración de inhibidor porque a 2 μ M, la concentración menor en estos experimentos, el efecto es casi máximo. La Figura complementaria B (Anexo) muestra fotografías de microscopía óptica, donde se puede observar el cambio en la morfología celular y la disminución en el número de células que experimentan los cultivos a medida que aumenta la concentración del inhibidor MG132. Estos efectos son más acusados en las células Lpin2^{-/-}. Estos resultados indican que lipina-2 protege a los macrófagos del daño generado por la inhibición del proteasoma y la muerte asociada a este fenómeno.

3.2. La lipina-2 ayuda a mantener un mejor estado metabólico durante el tratamiento con MG132

Para confirmar los resultados obtenidos por citometría de flujo, y teniendo en cuenta que la muerte celular va acompañada de una disminución del metabolismo celular, se decidió analizar la actividad metabólica celular. Para ello se estudió la capacidad de las células para reducir el compuesto MTT, un ensayo de alta sensibilidad. Esta capacidad viene determinada por la cantidad de mitocondria activa, concretamente, de oxidorreductasas que utilizan NADPH, como la succinato deshidrogenasa mitocondrial. Por tanto, este ensayo es dependiente de la respiración mitocondrial, e indirectamente mide la capacidad energética celular, si bien otras enzimas localizadas en otros orgánulos, como el retículo endoplásmico, pueden también contribuir.

En estos experimentos se analizó el efecto de concentraciones crecientes de MG132 durante 24h de tratamiento celular, y el efecto de una única concentración de la droga (2 μ M, concentración en la que se había visto mayor diferencia entre los distintos genotipos celulares por citometría de flujo) a diferentes tiempos (Figuras 2A y B respectivamente); y se utilizaron macrófagos con y sin lipina-2. Los resultados derivados

de esta experimentación nos permitirían, además, confirmar la dosis de MG132 óptima para estudiar diferencias entre células que expresen o no lipina-2 y definir los tiempos más adecuados para futuros experimentos.



Figuras 2. Efecto del MG132 y la falta de lipin-2 en la actividad metabólica celular. A) Las IBMDMs fueron tratadas con las concentraciones de MG132 indicadas durante 24h y su actividad metabólica fue analizada por reducción del MTT. Los datos representan el porcentaje de actividad metabólica en cada tratamiento respecto a las células sin tratar. B) Se realizó el mismo ensayo utilizando una concentración 2 µM de MG132 a los tiempos representados en la figura. Las medidas se realizaron por sextuplicado en ambos experimentos. Los datos representan la media ± error estándar. * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001, por test t de Student.

En la figura 2 se representa el porcentaje de actividad metabólica obtenido. En ella se observa la disminución del porcentaje de actividad metabólica en función de la concentración de MG132, siendo muy acusada ya a la primera concentración utilizada de MG132 utilizada (0,5 µM) (Figura 2A), y máxima a partir de 2 µM en las células wt. Interesantemente, las células carentes de lipina-2 presentan una mayor disminución de la actividad metabólica a todas las concentraciones de MG132 ensayadas con respecto a las células control. Este efecto es especialmente significativo a una concentración de MG132 de 0,5 µM. Se observó también que el efecto del inhibidor MG132 (2 µM) sobre el metabolismo era dependiente del tiempo de tratamiento (Figura 2B). El metabolismo celular disminuyó de forma prácticamente lineal hasta las 24 horas en células wt. Las células deficientes en lipina-2 sufrieron una disminución de la actividad metabólica mucho más temprana, alcanzando el máximo de inhibición a partir de las 6 horas de tratamiento con MG132.

Los resultados mostrados en la Figura 2 indican que el metabolismo celular dependiente de las enzimas oxidoreductasas, esencialmente mitocondrial, disminuye en las células durante el tratamiento con MG132 de manera dependiente de la dosis y tiempo de tratamiento. Los datos también indican que la falta de lipina-2 disminuye la dosis y los tiempos a los que el inhibidor MG132 produce sus máximos efectos sobre el metabolismo. De estos datos podemos inferir que la viabilidad celular es significativamente mayor en las células wt que en las células deficientes en lipina-2, confirmando los datos de la Figura-1. Esto otorga a la Lipina-2 un papel protector de la actividad metabólica durante la inhibición del proteasoma.

3.3. La lipina-2 reduce la activación de la caspasa-3 durante el tratamiento con MG132

Se ha descrito que la inhibición de la actividad del proteasoma puede producir muerte celular por apoptosis(39). Nuestros datos de citometría también apuntan al desencadenamiento de procesos apoptóticos por acción de MG132 (Figura 1). Puesto que durante los procesos apoptóticos se produce la activación de la caspasa 3, se estudió a continuación si durante la muerte observada anteriormente por tratamiento con MG132 se producía el procesamiento y activación de esta caspasa. Para ello, se analizó por *immunoblot* la aparición de fragmentos de caspasa 3, que son los que portan la actividad proteolítica (17/19 kDa).

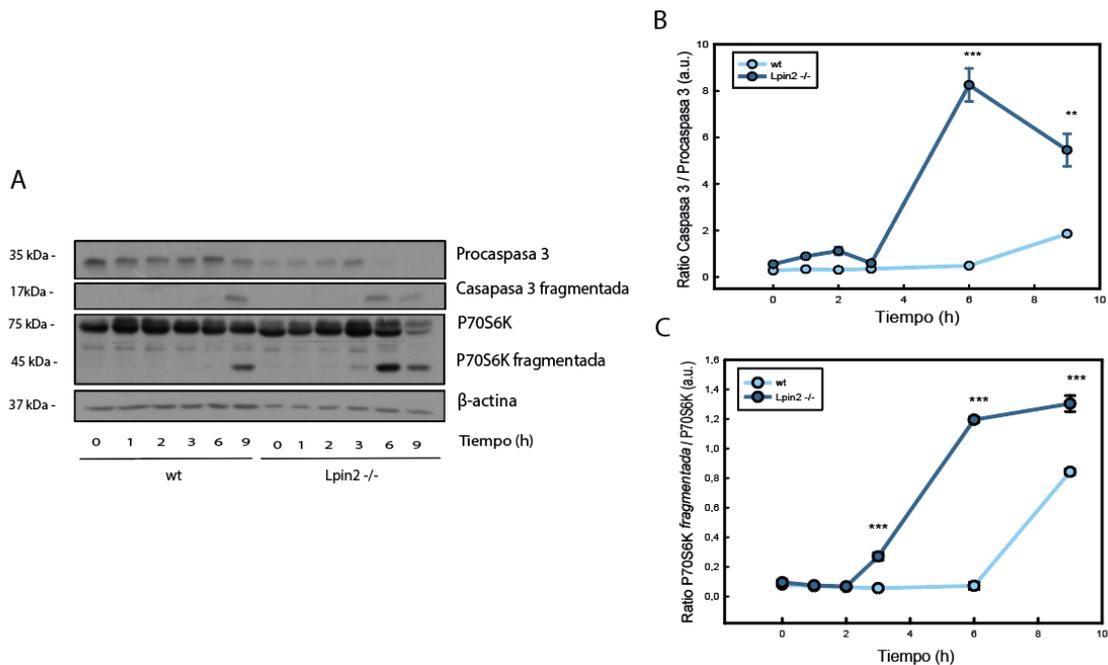


Figura 3. Participación de la lipina-2 en la activación la caspasa-3 durante la inhibición del proteasoma. A) Las células IBMDM fueron tratadas con 20μM MG132 a los tiempos indicados. Los lisados celulares fueron analizados por inmunoblot utilizando anticuerpos específicos frente a caspasa-3, p70S6K y β-actina (control de carga). B) Representación de las ratios de expresión de caspasa 3/Procaspasa 3 a los tiempos indicados. La intensidad de las bandas se analizó por ImageJ. C) Representación de los ratios de expresión de p70 fragmentada (45 kDa)/p70S6K (75kDa) a los tiempos indicados. La intensidad de las bandas (B y C) se analizó con el software ImageJ. Los datos representan la media ± error estándar de triplicados. * p< 0,05, ** p< 0,01, ***p< 0,001, por test t de Student.

Los resultados mostraron una clara disminución de la procaspasa 3 (forma inactiva) y aparición de fragmentos activos a partir de las 9h de tratamiento con el inhibidor MG132 en células wt (Figura 3A y B). Sin embargo, las células deficientes en lipina-2 sufren estos procesos de forma adelantada, procesando completamente la procaspasa 3 a partir de las 6 horas de tratamiento. Para demostrar que los fragmentos de caspasa-3 encontrados eran activos, se examinó la fragmentación de un conocido sustrato de caspasa-3, la kinasa de la proteína S6 ribosomal de 70 kDa (p70S6K)(40). La aparición de fragmentos de la p70S6K corresponde con la aparición de los fragmentos activos de caspasa-3 en los dos genotipos celulares analizados (Figura 3A y C). De nuevo se observó un adelantamiento de estos procesos en las células carentes de lipina-2 con respecto a las células wt. Curiosamente, en macrófagos deficientes en lipina-2 los fragmentos de p70S6K se observan ya a 3 horas de tratamiento con MG132, tiempo en el que aún no se detecta un claro procesamiento de la caspasa-3. Estos resultados confirman por un lado la inducción de la activación de caspasa-3 tras inhibición del

proteasoma, y por otro, la mayor predisposición de las células carentes de lipina-2 a permitir estos procesos.

3.4. La lipina-2 tiene un efecto protector sobre la muerte macrofágica mediada por caspasas tras tratamiento con MG132

Una vez demostrada la participación de la lipina-2 en procesos apoptóticos y activación de la caspasa-3, se quiso evaluar si la inhibición de esta proteasa protegía a los macrófagos de la muerte por apoptosis inducida por MG132, y si esto ocurriría de la misma manera en células que expresaran o no lipina-2. Para ello, se realizaron experimentos en presencia del inhibidor de pancaspasa Z-VAD-FMK, y se analizó la muerte celular por citometría de flujo como en la Figura 1.

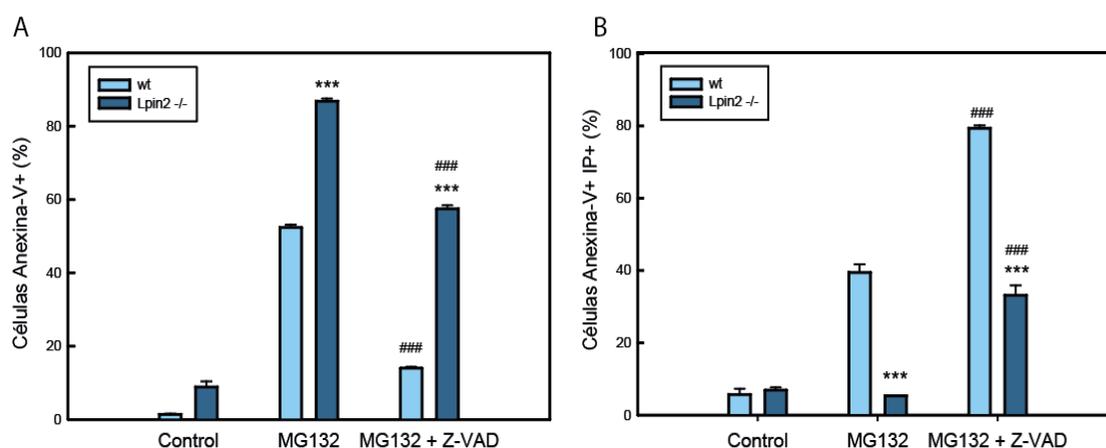


Figura 4. Efecto de Z-VAD-FMK en la muerte inducida por MG132 en macrófagos con y sin lipina-2. Las iBMDMs wt o deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}) fueron tratadas con 2 μ M de MG-132 en presencia o ausencia de 10 μ M Z-VAD-FMK durante 24 horas. Posteriormente fueron tratadas con Anexina-V-FITC e IP y la fluorescencia celular se analizó por citometría de flujo. A) Representa el porcentaje de células apoptóticas (células Anexina-V⁺). B) Representa el porcentaje de células que sufren apoptosis tardía (Anexina-V⁺ IP⁺). Experimento representativo con medidas por triplicado. Los datos representan la media \pm error estándar. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, por test t de Student comparando células wt y *Lpin2*^{-/-} en cada tratamiento. ### $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ diferencias entre células preincubadas o no con MG132 en cada genotipo, por test t de Student.

Los resultados mostrados en la Figura 4A indican que el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK reduce muy significativamente el porcentaje de macrófagos wt que entra en apoptosis tras tratamiento con MG132, siendo la disminución de la población Anexina-V⁺ del 38% en estas condiciones (MG132+Z-VAD-FMK). Sin embargo, el inhibidor de caspasas fue menos eficiente a la hora de disminuir la apoptosis sufrida por las células deficientes en lipina-2 (28% de reducción de la población Anexina-V⁺). En la figura 4B se observa un aumento del % de células en apoptosis tardía para ambos genotipos en presencia del inhibidor Z-VAD-FMK (40,38%, 30,56% respecto de las tratadas solo con MG132). En las células wt la muerte celular en presencia de MG132 está repartida entre apoptosis y apoptosis tardía (52,38% y 39,44%). Mientras que en las *Lpin2*^{-/-} prácticamente la totalidad es apoptosis (86,8%). Y en presencia del inhibidor Z-VAD-FMK las células wt son prácticamente en su totalidad (79,35%) apoptóticas tardías. Resulta curioso observar que el porcentaje de macrófagos apoptóticos (tratados con MG132) deficientes en lipina-2 tras inhibición de las caspasas es similar al de los macrófagos apoptóticos wt sin este tratamiento (57% y 52% respectivamente).

Por tanto, estos resultados confirman que gran parte de la muerte observada tras inhibición del proteasoma es debida a la acción de caspasas (muy posiblemente

caspara 3), y apuntan que la lipina-2 protege de este tipo de muerte, disminuyendo la activación de caspasas (caspara 3) y posiblemente impidiendo la activación de procesos paralelos que puedan también participar en este tipo de muerte.

3.5. La respuesta integrada a estrés no participa en la muerte generada por tratamiento con MG132

Se ha descrito que la inhibición del proteasoma puede generar apoptosis incrementando la respuesta integrada a estrés (41), resultando en un aumento de fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α (inhibiendo el inicio de la traducción)(42) e incrementando la acumulación de los factores de transcripción ATF4 y CHOP.(43) Estos eventos parecen cruciales en la activación de caspasas e inducción de apoptosis en otros sistemas celulares.

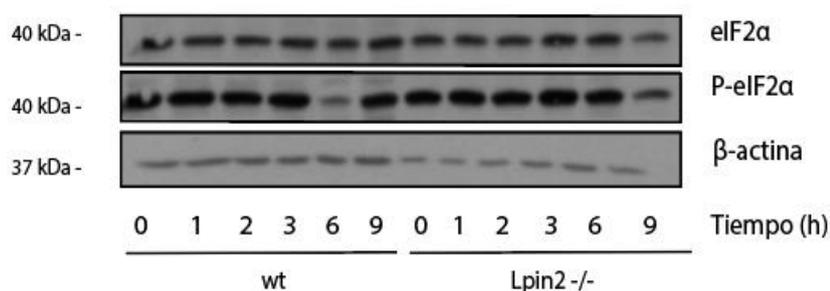


Figura 5. Efecto de MG132 en la fosforilación de eIF2 α en IBMDMs wt y deficientes en lipina-2. Las células iBMDM wt y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}) fueron tratadas con 20 μ M MG132 a los tiempos indicados. Los lisados celulares fueron analizados por *immunoblot* utilizando anticuerpos específicos frente a eIF2 α o su forma fosforilada (P-eIF2 α), y β -actina (control de carga).

Por tanto, se planteó el interrogante de si la respuesta a estrés podría estar implicada en la muerte por apoptosis que se estaba observando tras la inhibición del proteasoma en los macrófagos. Para testar esta posibilidad, se analizó por *immunoblot* la fosforilación de eIF2 α , no encontrándose incrementos de este fenómeno tras el tratamiento con MG132 en células wt o células deficientes en lipina-2 (Figura 5).

Se analizó también la posible acumulación de CHOP y ATF4 en estas circunstancias mediante *immunoblot*, utilizando anticuerpos específicos para estas proteínas. Consecuentemente a los datos presentados en la Figura 5, no se encontró indicios de que esto ocurriera en macrófagos (datos no mostrados). Por tanto, los macrófagos no parecen experimentar un aumento de la respuesta integrada a estrés tras la inhibición del proteasoma.

3.6. La generación de ROS no participa en la inducción de muerte por tratamiento con MG132

El exceso de la producción de ROS y defectos en la eliminación causan estrés oxidativo en la células (44). Para determinar si la producción de ROS participa en la muerte inducida por inhibición del proteasoma, se analizó en macrófagos la generación de estas moléculas mediante la utilización de la sonda DCFH-DA. Este compuesto penetra en las células y se vuelve fluorescente tras la interacción con especies reactivas de oxígeno, pudiéndose posteriormente analizar los niveles de fluorescencia por citometría de flujo.

En este tipo de aproximación experimental una mayor intensidad de fluorescencia se interpreta como una mayor producción de ROS.

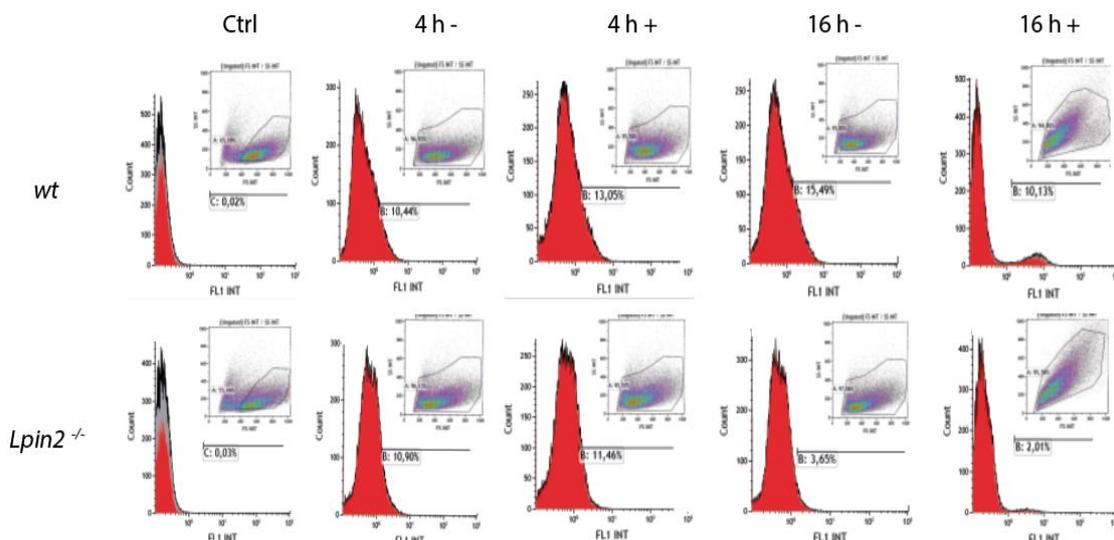


Figura 6. Efecto de la inhibición del proteasoma en la producción de ROS. Participación de la lipina-2. Las iBMDM wt y deficientes en lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}) fueron tratadas (+) o no (-) con 2μM MG132 durante los tiempos indicados (0, 4 y 16h). En la última media hora de incubación se añadió 10 μM DCFH-DA, y la fluorescencia se analizó por citometría de flujo. Los gráficos muestran en gris la fluorescencia de toda la población celular, y en rojo la de las células recogidas dentro del área indicada en el gráfico del margen superior derecho, donde se analizan las células por tamaño/complejidad. El cursor indica las células con fluorescencia proveniente de la sonda DCFH-DA. Se muestra un experimento representativo realizado por triplicado.

Los resultados se muestran en la Figura 6 y no indican un claro incremento de fluorescencia de la sonda DCFH-DA tras el tratamiento con MG132 en células wt o deficientes en lipina-2 a ningún tiempo estudiado. El funcionamiento del MG132 en estos experimentos queda demostrado por la evolución del tamaño/complejidad celular desde posiciones que indican viabilidad, hacia posiciones que indican muerte (gráficos superiores derechos), algo que especialmente apreciable a 16h de tratamiento, tanto en células wt, como en células deficientes en lipina-2. Estos resultados indican que la producción de ROS no es un factor determinante en la inducción de muerte en este modelo (inhibición del proteasoma), ni interviene en las diferencias observadas en cuanto a nivel de apoptosis entre células wt y células deficientes en lipina-2.

3.7. El tratamiento con MG132 disminuye la exagerada inducción de IL6 que presentan los macrófagos carentes de lipina-2

Desde hace décadas se conoce que el procesamiento proteico realizado por el proteasoma es importante durante los procesos inflamatorios desencadenados por el reconocimiento de moléculas derivadas de patógenos a través de receptores TLR (“*Toll-like receptors*”). Estos efectos han sido especialmente estudiados durante el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) presente en las paredes de las bacterias Gram-negativas por parte del TLR4 en las células inmunes^{4,5}. De hecho, el proteasoma participa en la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF-κB, y por ello la inhibición del proteasoma disminuye la generación de numerosas citoquinas inflamatorias cuya expresión es inducida por este factor de transcripción, como la IL-6^{4,5}. Debido a esto, tras estudiar el papel de la lipina-2 en la inducción de muerte durante la inhibición del proteasoma, se decidió estudiar si el proteasoma podría participar en la exacerbada inflamación que se produce en los macrófagos deficientes en lipina-2. Para

ello se estudió la expresión del mRNA de *Il6* por qPCR en macrófagos activados con LPS, tratados o no con MG132.

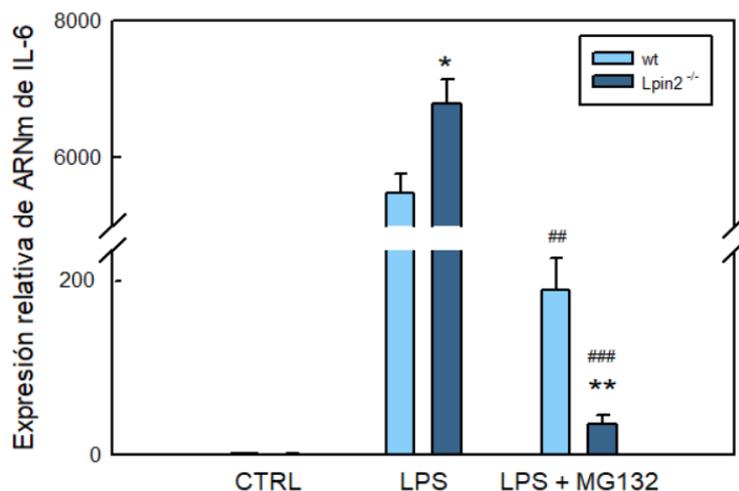


Figura 7. Efecto de la inhibición del proteasoma en la expresión de *Il6* en células que expresan o no lipina-2. Las células iBMDMs con (wt) o sin lipina-2 (*Lpin2*^{-/-}), fueron pre incubadas con 2 μ M MG-132 durante 30 min y posteriormente tratadas con 100 ng/ml LPS durante 3 h. La expresión del mRNA de *Il6* fue analizado por PCR cuantitativa utilizando *Gapdh* como gen de referencia. Se realizó el experimento en triplicados. Los datos se representan como la media \pm error estándar. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, diferencias entre células wt y Lpin2^{-/-} en cada tratamiento, por test *t* de Student. ## $<0,01$, ### $p < 0,001$ diferencias entre células preincubadas o no preincubadas con MG132 en cada genotipo, por test *t* de student.

Se realizó la media de los Ct de las muestras. A continuación, se resta el valor promedio de Ct del gen de interés, *il6*, menos el gen de referencia, *Gadph* (Δ Ct). Se normaliza cada muestra respecto del calibrador, que es el promedio de Ct del grupo control ($\Delta\Delta$ Ct). En este experimento se tomó como calibrador las muestras sin inhibidor de ambos genotipos. Por último se calculan los niveles de expresión elevando 2 a la anterior diferencia ($2^{-\Delta\Delta$ Ct})(37)

Los resultados mostrados en la Figura 7 indican un incremento en los niveles del mRNA de *Il6* en macrófagos carentes de lipin-2 respecto a los macrófagos wt tras tratamiento con LPS, confirmando resultados anteriores del laboratorio.(32) Curiosamente, el tratamiento con el inhibidor MG132 produjo una importante disminución de los niveles de expresión de la citoquina en ambos genotipos celulares, siendo significativamente inferiores en las células deficientes en lipina-2. Estos datos muestran que en ausencia de lipina-2 hay una producción exacerbada de IL-6 por activación con LPS. No obstante, estos niveles disminuyen respecto del wt en presencia del inhibidor del proteasoma MG32. Para la correcta producción de IL-6 es necesario la presencia de lipina-2 y la actividad de un proteasoma funcional.

4. DISCUSIÓN

Las mutaciones que causan el síndrome de Majeed afectan a *LPIN2*, un gen que codifica para una enzima del metabolismo lipídico, lipina-2. Sin embargo, este síndrome es una enfermedad autoinflamatoria, donde los macrófagos tienen un papel fundamental. Por tanto, lipina-2 debe ejercer importantes funciones durante las respuestas inflamatorias y en la activación de los macrófagos. Actualmente los pacientes con Síndrome de Majeed son tratados con moléculas que inhiben al receptor de la IL-1 β o que bloquean esta citoquina. Estos tratamientos son muy caros puesto que se basan en anticuerpos monoclonales bloqueantes. Debido a esto, es necesario investigar para proponer alternativas terapéuticas para estos pacientes. Los inhibidores del proteasoma se han probado como herramienta para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Esto es debido a que durante los procesos inflamatorios hay un aumento de expresión y actividad del proteasoma.(45) Por ello, en este estudio se quiso comprobar cómo la inhibición del proteasoma afectaba a la viabilidad celular. También se midió la expresión de citoquinas proinflamatorias en macrófagos carentes de lipina-2, fenotipo que presentan los pacientes con síndrome de Majeed.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias en la viabilidad celular, dependiendo de que las células expresaran o no lipina-2, y se caracterizaron diversos parámetros que podían ser causantes de estas variaciones en la viabilidad (ROS, respuesta integrada a estrés, actividad caspasas...). Además, se investigó como influía esta inhibición del proteasoma en la producción de la citoquina IL-6, una citoquina importante durante los procesos inflamatorios pero que puede resultar dañina si se produce en exceso, algo que también ocurre en los pacientes con Síndrome de Majeed.

En este estudio se ha descrito que la inhibición de la actividad de proteasoma con MG132 produce un incremento de la vulnerabilidad a la muerte celular en las células deficientes en lipin-2. Se conoce que la inhibición del proteasoma aumenta la inducción de procesos apoptóticos. (46). En concordancia con esto, mis resultados muestran que la activación de caspasa-3, enzima inductora de apoptosis, juega un papel determinante en la muerte celular inducida por inhibición del proteasoma en las células IBMDMs. En presencia de lipina-2, son necesarios tratamientos con MG132 más prolongados para provocar los mismos niveles de activación de caspasa que en ausencia de lipina-2. Utilizando inhibidores de la proteína caspasa-3, se observó un fenómeno muy curioso. Las células lipin2^{-/-} seguían sufriendo procesos apoptóticos tempranos inducidos por MG132. Esto puede deberse a la activación de otros procesos (enzimas diferentes de las caspasas) que culminen en apoptosis y para los que lipina-2 es protectora. Se relaciona al inhibidor Z-VAD-FMK con potenciar la síntesis de HSP70 y la apoptosis por choque térmico. También se conoce que puede inducir la muerte celular por procesos no apoptóticos en macrófagos(47,48) .

A lo largo del estudio se comprobó que los porcentajes de viabilidad se correspondían con la cantidad de mitocondria metabólicamente activa, utilizando el ensayo de MTT. Estos resultados indican que lipina-2 protege de la disminución de la actividad metabólica mitocondrial causada por la inhibición del proteasoma.

Se determinó que la respuesta integrada a estrés por activación de la vía PERK, no era uno de los desencadenantes de la apoptosis. No obstante, sería interesante medir la expresión de proteínas BiP, que se une a proteínas mal plegadas o de otras proteínas de estrés de retículo como IRE1 α o XBP1S.

También se observó que las diferencias en la viabilidad entre ambos genotipos no se debían a una producción de ROS diferencial. Además, la producción de ROS no parece

ser un factor determinante en la inducción de apoptosis para nuestro modelo. Existen dudas fundadas sobre la utilidad de estos ensayos en los que se emplea la sonda DCFH-DA. Esta sonda parece ser retenida por la célula sólo si la membrana celular está intacta. En los histogramas de tamaño/complejidad de estos experimentos se ha observado que las células tratadas con MG132 no son viables, y consiguientemente, y de acuerdo con el resto de los experimentos, la membrana de las células esté dañada. En estas condiciones, la sonda no sería retenida en las células y, por tanto, la cuantificación de ROS no se está realizando en las mejores condiciones. En los resultados de este trabajo se ha visto afectada la actividad metabólica mitocondrial por acción del MG132, por lo que sería interesante probar con otra sonda que detecte específicamente ROS mitocondriales como mitoSOX, junto con un marcador de viabilidad como 7-AAD, para determinar el ROS que producen las células vivas. También se podría utilizar microscopía de fluorescencia en sustitución de la citometría.

Otros de los procesos asociados a la inhibición del proteasoma es la autofagia(45). Por lo que la detección de LC3 por inmunofluorescencia sería interesante en futuros estudios.

Estudios recientes han demostrado que lipina-2 es degradada por el proteasoma durante la respuesta inflamatoria, lo que permite un aumento de la producción de citoquinas, como IL-6(49). Mis datos demuestran, en congruencia con los anteriores, que la ausencia de lipina-2 provoca una producción exacerbada de IL-6 durante la activación con LPS. Durante la inhibición del proteasoma por MG132, la producción de citoquinas disminuye en ausencia de lipina-2. Este resultado podría indicarnos una dependencia mayor de las células sin lipina-2 al correcto funcionamiento del proteasoma para producir IL-6.

Los resultados presentados abren la puerta a futuros estudios que permitan elucidar si los inhibidores del proteasoma podrían usarse como alternativa a los bloqueantes de IL-1b y sus receptores en el tratamiento del síndrome de Majeed.

5. CONCLUSIONES

1. Lipina-2 protege a los macrófagos del daño generado por la inhibición del proteasoma y la muerte asociada a este proceso. Esta muerte se produce principalmente por apoptosis.
2. Lipina-2 ayuda a mantener un mejor estado metabólico celular durante el daño sufrido por tratamiento con MG132.
3. La ausencia de lipina-2 aumenta la actividad de caspasa-3 durante la inhibición MG132. Los procesos apoptóticos parecen seguir produciéndose por mecanismos no dilucidados en células *Lpin2^{-/-}* tratadas con inhibidores de caspasas.
4. La respuesta a estrés de retículo o la producción de ROS no parecen ser responsables de la muerte generada por inhibición del proteasoma en macrófagos.
5. Las células sin lipina-2 son más dependientes del proteasoma para la producción de la citoquina IL-6 inducida por LPS.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19 [cited 2021 Aug 20];140(6):871–82. Available from: <http://www.cell.com/article/S0092867410001820/fulltext>
2. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 Aug 26];233(9):6425–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.26429>
3. Qureshi N, Vogel SN, Van Way C, Papasian CJ, Qureshi AA, Morrison DC. The proteasome. *Immunol Res* 2005 313 [Internet]. 2005 [cited 2021 Aug 20];31(3):243–60. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1385/IR:31:3:243>
4. Çetin G, Klafack S, Studencka-Turski M, Krüger E, Ebstein F. The Ubiquitin–Proteasome System in Immune Cells. *Biomol* 2021, Vol 11, Page 60 [Internet]. 2021 Jan 5 [cited 2021 Aug 20];11(1):60. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/1/60/htm>
5. Kok BPC, Venkatraman G, Capatos D, Brindley DN. Unlike Two Peas in a Pod: Lipid Phosphate Phosphatases and Phosphatidate Phosphatases. *Chem Rev* [Internet]. 2012 Oct 10 [cited 2021 Aug 21];112(10):5121–46. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr200433m>
6. Reue K, Zhang P. The lipin protein family: dual roles in lipid biosynthesis and gene expression. *FEBS Lett* [Internet]. 2008 Jan 9 [cited 2021 Aug 21];582(1):90. Available from: [/pmc/articles/PMC2848953/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19369868/)
7. Khalil MB, Blais A, Figeys D, Yao Z. Lipin - The bridge between hepatic glycerolipid biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2010 Dec;1801(12):1249–59.
8. Kok BPC, Venkatraman G, Capatos D, Brindley DN. Unlike two peas in a pod: Lipid phosphate phosphatases and phosphatidate phosphatases. *Chem Rev*. 2012;112(10):5121–46.
9. Bou Khalil M, Blais A, Figeys D, Yao Z. Lipin — The bridge between hepatic glycerolipid biosynthesis and lipoprotein metabolism. *BBA - Mol Cell Biol Lipids*. 2010;1801:1249–59.
10. K R. The lipin family: mutations and metabolism. *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2009 Jun [cited 2021 Aug 21];20(3):165–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19369868/>
11. DN B. Intracellular translocation of phosphatidate phosphohydrolase and its possible role in the control of glycerolipid synthesis. *Prog Lipid Res* [Internet]. 1984 [cited 2021 Aug 21];23(3):115–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6100459/>
12. Donkor J, Sariahmetoglu M, Dewald J, Brindley DN, Reue K. Three Mammalian Lipins Act as Phosphatidate Phosphatases with Distinct Tissue Expression Patterns *. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Feb 9 [cited 2021 Aug 22];282(6):3450–7. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925819336774/fulltext>
13. MA B, N de P, C M, J B. The role of lipins in innate immunity and inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2021 Aug 20];1864(10):1328–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31220616/>
14. LS C, JR D, LG F, P T, SG Y, K R. Lipins, lipinopathies, and the modulation of cellular lipid storage and signaling. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2013 Jul [cited 2021 Aug 20];52(3):305–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23603613/>
15. Aróstegui JI. Enfermedades autoinflamatorias sistémicas hereditarias. *Reumatol Clínica* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2021 Aug 22];7(1):45–50. Available from: <http://www.reumatologiaclinica.org/es-enfermedades-autoinflamatorias-sistemicas-hereditarias-articulo-S1699258X10000975>
16. Masters SL, Anna Simon, Ivona Aksentijevich, Kastner DL. Horror Autoinflammaticus: The Molecular Pathophysiology of Autoinflammatory Disease*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141627> [Internet]. 2009 Mar 20 [cited 2021 Aug 22];27:621–68. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141627>
17. PJ F, H E-S. Majeed Syndrome: A Review of the Clinical, Genetic and Immunologic Features. *Biomolecules* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2021 Aug 21];11(3):1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33670882/>
18. Ferguson PJ, Chen S, Tayeh MK, Ochoa L, Leal SM, Pelet A, et al. Homozygous mutations in LPIN2 are responsible for the syndrome of chronic recurrent multifocal osteomyelitis and congenital dyserythropoietic anaemia (Majeed syndrome). *J Med Genet* [Internet]. 2005 Jul [cited 2021 Jun 20];42(7):551–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15994876/>
19. Aulchenko YS, Pullen J, Kloosterman WP, Yazdanpanah M, Hofman A, Vaessen N, et al. LPIN2 Is Associated With Type 2 Diabetes, Glucose Metabolism, and Body Composition. *Diabetes* [Internet]. 2007 Dec 1 [cited 2021 Aug 21];56(12):3020–6. Available from: <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/56/12/3020>
20. Y W, WD L. Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 21];1206:527–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31777002/>
21. GA C, AL G. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* [Internet]. 2017 May 18 [cited 2021 Aug 21];169(5):792–806. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28525752/>
22. A L Goldberg and, Dice JF. Intracellular Protein Degradation in Mammalian and Bacterial Cells. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.43.070174.004155> [Internet]. 2003 Nov 28 [cited 2021 Aug 21];43:835–69. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.43.070174.004155>
23. Burcoglu J, Zhao L, Enenkel C. Nuclear Import of Yeast Proteasomes. *Cells* 2015, Vol 4, Pages 387-405 [Internet]. 2015 Aug 7 [cited 2021 Aug 21];4(3):387–405. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/4/3/387/htm>
24. Thibaudeau TA, Smith DM. A practical review of proteasome pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2019 Apr

- 1;71(2):170–97.
25. K T. The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles. *Keio J Med* [Internet]. 2013 Mar [cited 2021 Aug 21];62(1):1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563787/>
 26. Konstantinova IM, Tsimokha AS, Mittenberg AG. Role of Proteasomes in Cellular Regulation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2008 Jan 1;267:59–124.
 27. K T. The proteasome: from basic mechanisms to emerging roles. *Keio J Med* [Internet]. 2013 Mar [cited 2021 Aug 22];62(1):1–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563787/>
 28. Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:2391–402.
 29. Shapiro H, Lutaty A, Ariel A. Macrophages, Meta-Inflammation, and Immuno-Metabolism. *Sci World J* [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 20];11:2509. Available from: </pmc/articles/PMC3253544/>
 30. MS H, S G. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2021 Aug 23];26(3):203–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22302935/>
 31. Qureshi N, Morrison DC, Reis J. PROTEASOME PROTEASE MEDIATED REGULATION OF CYTOKINE INDUCTION AND INFLAMMATION. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2012 Nov [cited 2021 Aug 11];1823(11):2087. Available from: </pmc/articles/PMC3465503/>
 32. Lordén G, Sanjuán-García I, de Pablo N, Meana C, Alvarez-Miguel I, Pérez-García MT, et al. Lipin-2 regulates NLRP3 inflammasome by affecting P2X7 receptor activation. *J Exp Med* [Internet]. 2016 Dec 28;214(2):511–28. Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20161452>
 33. N Q, SN V, C VW, CJ P, AA Q, DC M. The proteasome: a central regulator of inflammation and macrophage function. *Immunol Res* [Internet]. 2005 [cited 2021 Aug 23];31(3):243–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15888915/>
 34. Vaure C, Liu Y. A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Front Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Aug 26];5(JUL). Available from: </pmc/articles/PMC4090903/>
 35. NJ K. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* [Internet]. 1994 [cited 2021 Aug 6];32:9–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7951753/>
 36. K P, H E, S R, H H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Aug 21];1601:1–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28470513/>
 37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001 Dec 1;25(4):402–8.
 38. Verbrugge SE, Scheper RJ, Lems WF, Gruijil TD de, Jansen G. Proteasome inhibitors as experimental therapeutics of autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2015 Jan 28 [cited 2021 Aug 19];17(1). Available from: </pmc/articles/PMC4308859/>
 39. Grimm LM, Osborne BA. Apoptosis and the Proteasome. 1999;
 40. Dhar R, Persaud SD, Mireles JR, Basu A. Proteolytic cleavage of p70 ribosomal S6 kinase by caspase-3 during DNA damage-induced apoptosis. *Biochemistry* [Internet]. 2009 Feb 24 [cited 2021 Aug 10];48(7):1474. Available from: </pmc/articles/PMC2701466/>
 41. HY J, RC W. Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2alpha) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. *J Biol Chem* [Internet]. 2005 Apr 8 [cited 2021 Aug 19];280(14):14189–202. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15684420/>
 42. Clemens MJ. Initiation Factor e1F2a. Phosphorylation in Stress Responses and Apoptosis. *Prog Mol Subcell Biol*. 2001;27.
 43. HS P, Y J do, CR H, HJ W, YH K. Proteasome inhibitor MG132-induced apoptosis via ER stress-mediated apoptotic pathway and its potentiation by protein tyrosine kinase p56lck in human Jurkat T cells. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2021 Aug 19];82(9):1110–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21819973/>
 44. Shehat MG, Tigno-Aranjuez J. Flow cytometric measurement of ROS production in macrophages in response to Fc γ R cross-linking. *J Vis Exp*. 2019 Mar 1;2019(145).
 45. N A, H B, A S, P B. Cellular Responses to Proteasome Inhibition: Molecular Mechanisms and Beyond. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jul 2 [cited 2021 Aug 25];20(14). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31295808/>
 46. LM G, BA O. Apoptosis and the proteasome. *Results Probl Cell Differ* [Internet]. 1999 [cited 2021 Aug 19];23:209–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9950035/>
 47. W M, DM S, AG H, GR DM. z-VAD-fmk-induced non-apoptotic cell death of macrophages: possibilities and limitations for atherosclerotic plaque stabilization. *Autophagy* [Internet]. 2006 [cited 2021 Sep 2];2(4):312–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16874073/>
 48. IY M, MG P, MV S, EV M. Caspase inhibitor Z-VAD-FMK potentiates heat shock-induced apoptosis and HSP70 synthesis in macrophages. *Bull Exp Biol Med* [Internet]. 2004 Sep [cited 2021 Sep 2];138(3):230–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15665909/>
 49. Watahiki A, Shimizu K, Hoshikawa S, Chiba M, Kitamura H, Egusa H, et al. Lipin-2 degradation elicits a proinflammatory gene signature in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Apr 2;524(2):477–83.

ANEXO

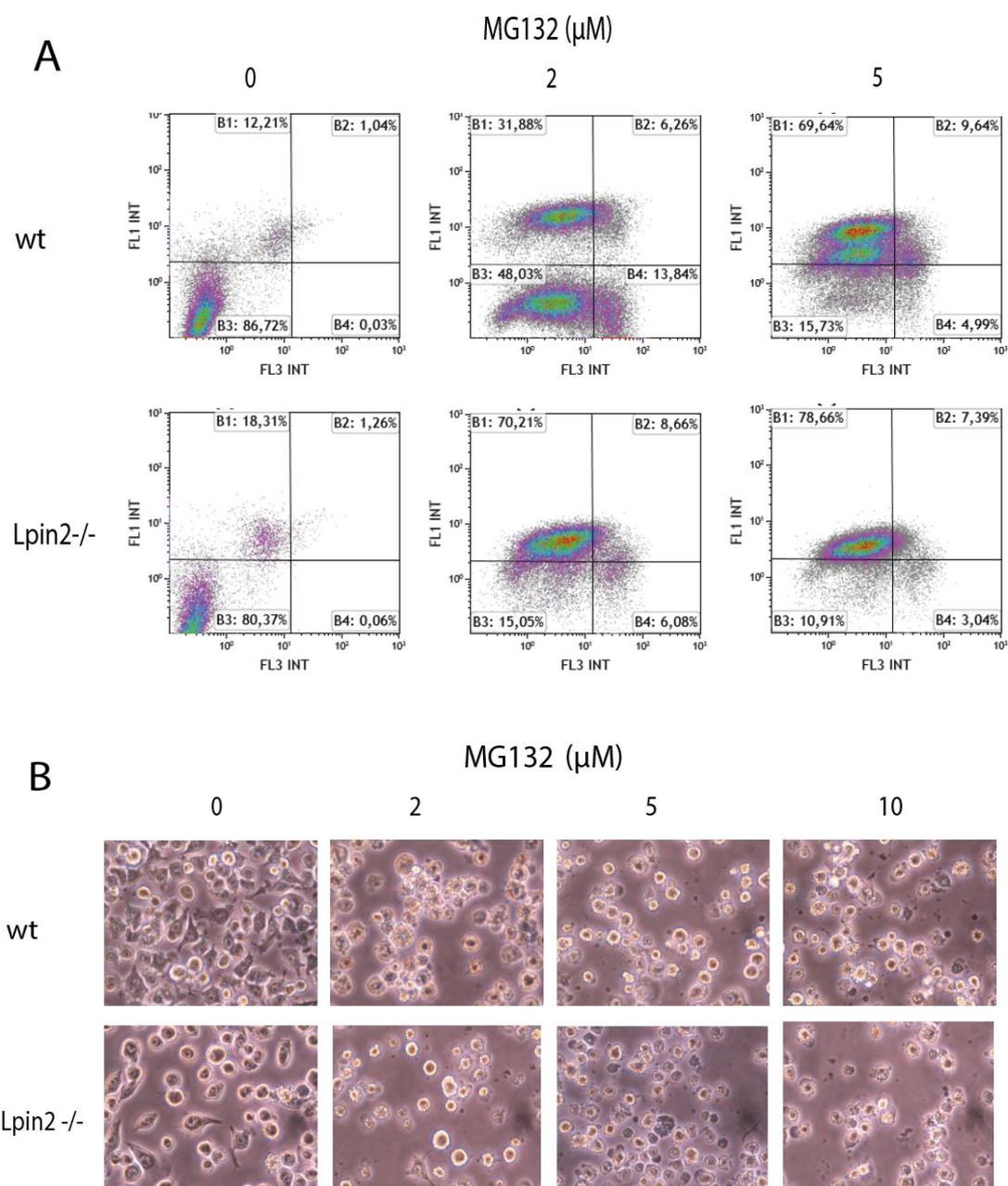


Figura complementaria 1. Células IBMDMs tratadas con 0,2,5 y 10 μM de MG132. A) Representación conjunta de las dos fluorescencias para cada condición celular obtenidas por citometría de flujo. FITC-Anexina V (FL1), Ioduro Propidio (FL3). B) Microfotografías representativas tomadas con microscopio óptico a 40x aumentos.