

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER



Universidad de Valladolid

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

**Estudio de distintas mutaciones de PSTPIP1
relacionadas con enfermedades autoinflamatorias**

JORGE MONDÉJAR DURÁN

TUTORES: Yolanda Bayón Prieto

Andrés Alonso García

CURSO 2020-2021

Índice

Abreviaturas	2
Resumen	4
Introducción	5
Sistema inmune	5
Inflamasoma	6
Inflamasoma NLRP3.....	6
Inflamasoma de Pirina.....	7
Enfermedades autoinflamatorias	7
Síndrome PAPA	9
PSTPIP1	10
Objetivos	11
Materiales y métodos	12
Materiales	12
Soluciones y tampones.....	12
Plásmidos	12
Métodos	13
Tratamiento de cristales con poly-L-Lisina	13
Cultivo celular	13
Transfección	13
Fijación	13
Tinción de los núcleos y montaje	13
Microscopía confocal.....	14
Complementación de fluorescencia Bimolecular BiFC.....	14
Citometría de flujo.....	15
Análisis estadístico	15
Resultados	16
Determinación de la dosis de plásmido para transfección en células HEK293	16
Localización celular de PSTPIP1 y pirina	16
Localización subcelular del mutante 4Q-PSTPIP1 y de su interacción con otras proteínas	16
Efecto de distintas mutaciones de PSTPIP1 en la localización de heterodímeros	18
Localización de los mutantes de PSTPIP1 al homodimerizar	19
Discusión	22
Conclusiones	23
Bibliografía	24

Abreviaturas

Abreviatura	Definición
ABL	Abelson tirosina kinasa
AIM2	<i>Protein absent in melanoma 2</i>
ASC	Proteína tipo speck asociada a apoptosis
ATP	Adenosín trifosfato
BiFC	Complementación de Fluorescencia Bimolecular
BNBS	Secuencia flexible de Gly y Ser
CAPS	Síndromes periódicos asociados con criopirina
CARD	Dominio de activación y reclutamiento de caspasa
CINCA	<i>Chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome</i>
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DIRA	Deficiencia del antagonista del receptor de la IL-1
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EGFP	Proteína fluorescente verde
F-BAR	<i>Extended FCH domain</i>
FBSi	Suero bovino fetal inactivado
FCAS	Urticaria familiar por frío
FMF	Fiebre mediterránea familiar
HA	Hemaglutinina
HEBS	Solución salina tamponada HEPES
HEK 293	Células embrionarias humanas de riñón
HEPES	Ácido 4- (2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
HIDS	Síndrome de hiperinmunoglobulinemia D con fiebre periódica
IL	Interleuquina
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
LYP	Fosfatasa de tirosina linfoide
MCS	Sitio múltiple de clonaje
Na₂HPO₄	Fosfato disódico
NBD	Dominio de unión a nucleótidos
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>

NLRC4	<i>NLR family CARD domain-containing protein 4</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
NOD	Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
NOMID	<i>Neonatal onset multi-inflammatory disease</i>
OFP	Proteína fluorescente naranja
PAID	PSTPIP1-associated inflammatory diseases
PAMI	<i>PSTPIP1-associated myeloid-related proteinemia inflammatory syndrome</i>
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAPA	Artritis piógena con pioderma gangrenoso y acné
PAPASH	Artritis piógena, acné, PG e hidradenitis supurativa
PASH	PG, acné e hidradenitis supurativa
PBS	Tampón fosfato salino
PG	Pioderma gangrenoso
PKN-1/2	<i>Serine/threonine-protein kinase N1 and 2</i>
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PSTPIP1	<i>Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1</i>
PTPN12	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12</i>
PTPN18	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 18</i>
PYD	Dominio pirina
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SH3	<i>Src homology 3 domain</i>
TARPS	Síndrome TARP
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
WASP	Proteína del síndrome Wiskott-Aldrich
YFP	Proteína fluorescente amarilla

Resumen

PSTPIP1 es una proteína adaptadora que participa en la regulación de la activación, proliferación y migración de los linfocitos T, y en la iniciación de la respuesta inflamatoria mediante la producción de IL-1 β . Mutaciones en esta proteína generan las enfermedades PAPA y PAMI, incluidas dentro de las denominadas PAIDs. En la actualidad no se dispone de un tratamiento efectivo para este tipo de enfermedades, por lo que nuestro objetivo en este trabajo es comprender mejor el comportamiento de las mutaciones de PSTPIP1 en la interacción con proteínas relevantes del sistema inmune y consigo misma, así como la localización subcelular de los mutantes. Se ha detectado mediante BiFC una pérdida parcial de la localización nativa de distintos mutantes de PSTPIP1, así como una disminución significativa de la interacción de algunos mutantes tanto con la fosfatasa LYP como en la formación de homo y heterodímeros.

Abstract

PSTPIP1 is an adaptor protein involved in the regulation of T-lymphocyte activation, proliferation and migration, and in the initiation of the inflammatory response through the production of IL-1 β . Mutations in this protein cause the diseases PAPA and PAMI, included in the group known as PAIDs. Currently, there is no effective treatment for these diseases, so our aim in this work is to better understand the behavior of PSTPIP1 mutations in the interaction with relevant proteins of the immune system and with itself, as well as the subcellular localization of the mutants. A partial loss of native localization of different PSTPIP1 mutants has been detected by BiFC, as well as a significant decrease in the interaction of some mutants with LYP phosphatase and in the formation of homo- and heterodimers.

Introducción

Sistema inmune

El sistema inmune es el conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas (1) cuya función es defender el cuerpo humano identificando y eliminando infecciones causadas por bacterias, hongos, virus u otros microorganismos patógenos (2, 3, 4). Para realizar esta función, el sistema inmune tiene que ser capaz de discriminar todas aquellas moléculas propias del organismo de las extrañas (2), y para ello posee tres líneas principales de defensa (Figura 1). La primera línea está formada por la piel y las mucosas que impiden la entrada de la mayoría de microorganismos (5). La segunda y la tercera línea son defensas internas que actúan contra los microorganismos que consiguen entrar al organismo. La segunda línea está compuesta por fagocitos y citoquinas que se encuentran debajo de la piel y actúan de manera rápida y, la tercera, consta de anticuerpos y linfocitos B y T que actúan de forma lenta generando memoria inmunológica (6).

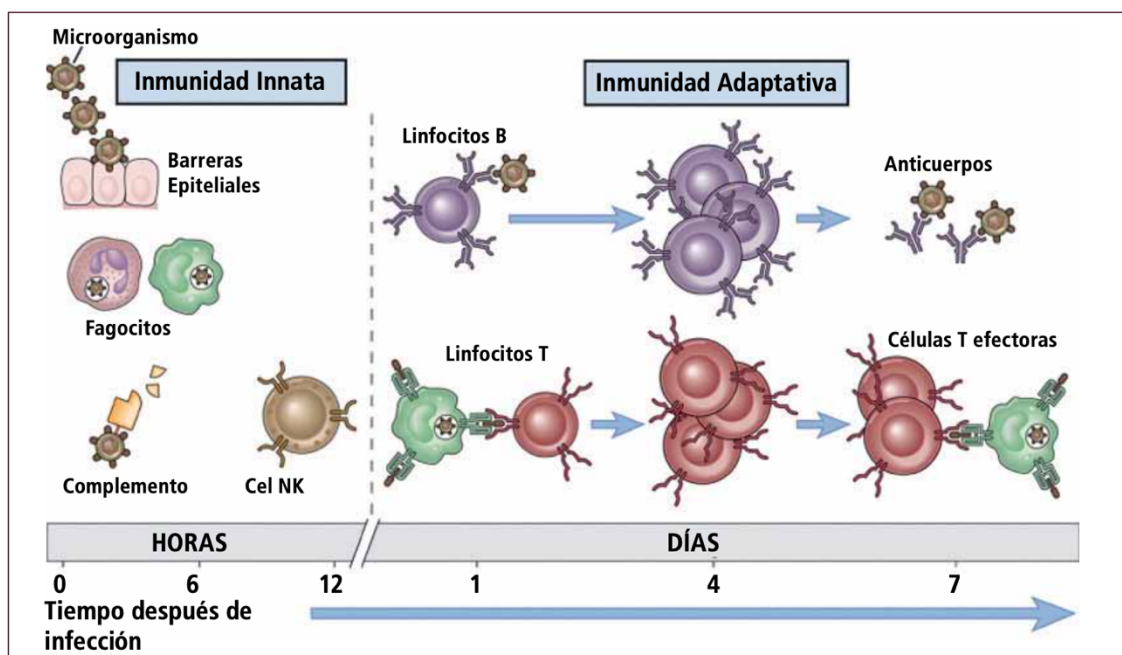


Figura 1. Esquema de los diferentes componentes del sistema inmune (7).

Tras el reconocimiento de un patógeno u organismo extraño se desencadena la respuesta inmune, que se inicia con la respuesta inmune innata (8) y, con el transcurso del tiempo, se activa la respuesta inmune adaptativa (9).

La inmunidad innata se inicia con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en los microorganismos (10) mediante su unión a receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (11) y utiliza distintos mecanismos, como la fagocitosis, la secreción de proteínas solubles que activan el sistema del complemento y el reclutamiento de células NK para eliminarlos (2). Los principales tipos de PRR son los receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo Toll (TLR) y receptores de Lectina tipo C, los cuales reconocen moléculas de ácidos nucleicos y moléculas de la superficie de patógenos como los glicanos. El reconocimiento de los microorganismos patógenos induce la producción de citoquinas, que da lugar a la respuesta inflamatoria para eliminar el patógeno, incluso eliminando la célula infectada (12).

Inflamasoma

Los inflamasomas son complejos multiproteicos que se ensamblan en respuesta a la infección celular, el estrés celular o el daño tisular. Los inflamasomas proporcionan plataformas de señalización para la activación de la caspasa-1, que a su vez desencadena la muerte celular lítica, denominada piroptosis, y la maduración y secreción de las interleucinas (IL), IL-1 β e IL-18, que coordinan las respuestas inflamatorias protectoras del huésped (13). La caspasa-1 activada por el inflamasoma hidroliza la Gasdermina D separando el dominio C-terminal que bloquea al dominio N-terminal, el cual oligomeriza para formar un poro en la membrana (14), por el que se libera el contenido celular (DAMPs y citoquinas pro-inflamatorias) (15) que dispara la respuesta inflamatoria. Los inflamasomas canónicos (Figura 2) están formados por varias subunidades denominadas sensores, adaptadores y efectores, que se ensamblan de forma jerárquica (16). Hay dos clases principales de proteínas sensoras, por un lado están los receptores de tipo NOD (NLRs) que contienen un dominio de unión a nucleótidos (NBD) y repeticiones ricas en leucina (LRR) y , tales como NLRP3 (*NLR family pyrin domain containing 3*) o NLRC4 (*NLR family CARD domain-containing protein 4*), y los receptores de la familia de AIM2 (*absent in melanoma 2*) (17). Otra proteína, de una familia diferente, capaz de formar un inflamasoma, es la Pirina. Los sensores reclutan el adaptador ASC (*apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain*) y este se une a la proteína efectora casapasa-1.

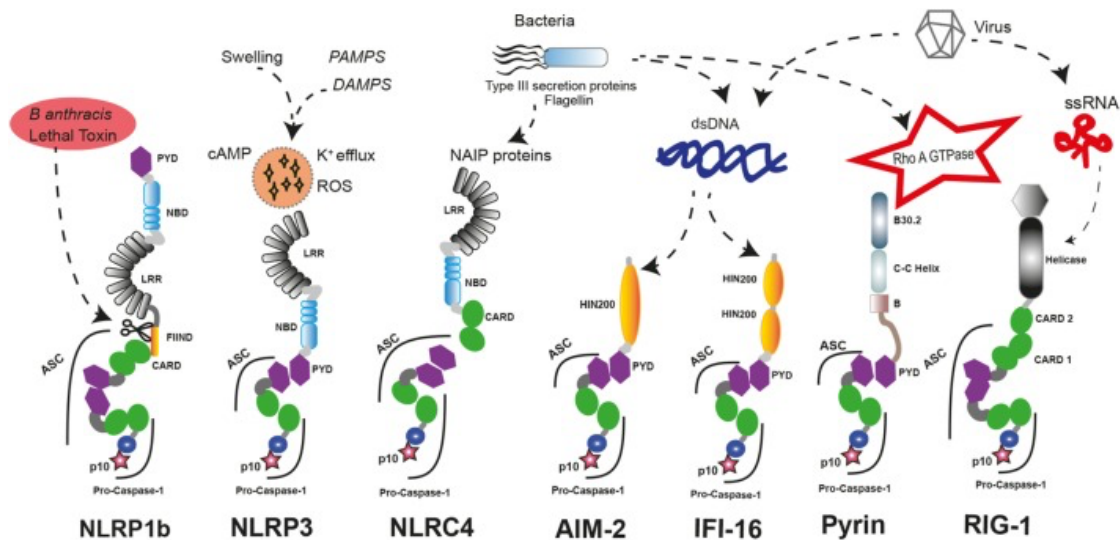


Figura 2. Esquema de los mecanismos de activación y sensores de los diferentes tipos de inflamasomas. (18)

Inflamasoma NLRP3

Es el primer inflamasoma que se asoció a enfermedades autoinflamatorias hereditarias y el mejor caracterizado hasta la fecha (19). NLRP3 presenta en su extremo N-terminal un dominio pirina (PYD), que interacciona con el dominio PYD de la proteína adaptadora ASC; un dominio NOD y un dominio LRR en el extremo C-terminal, responsable de reconocer el PAMP/DAMP. El adaptador ASC, se une a la procaspasa-1 a través de su dominio CARD (dominio de activación y reclutamiento de caspasa).

El inflamasoma de NLRP3 se activa por PAMPs y DAMPs como lipopolisacárido (LPS), RNA bacteriano, ROS (especies reactivas de oxígeno), Ca²⁺, corrientes de K⁺, ATP, cristales de urato (11) y citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y IL-18 (20).

Las mutaciones en NLRP3 originan enfermedades autoinflamatorias hereditarias llamadas síndromes periódicos asociados con criopirina (CAPS) en las que se produce la activación del inflamasoma y la secreción de IL-1 β (21). Estas enfermedades se caracterizan por erupciones cutáneas y episodios de fiebre (22).

Inflamasoma de Pirina

La particularidad del inflamasoma de pirina es que no detecta directamente DAMPs/PAMPs. Su activación viene dada por la inactivación de la RhoA-GTPasa inducida por toxinas de algunas bacterias como *Clostridium difficile*, *Vibrio parahemolyticus*, *Histophilus somni* y *Clostridium botulinum* (23). En ausencia de infección, RhoA inicia una vía de señalización donde activa las quinasas PKN-1/2 (*Serine/threonine-protein kinase N1 and 2*) (24), que fosforilan dinámicamente a la pirina en las serinas 208 y 242. Como consecuencia, la pirina fosforilada interactúa con las proteínas chaperonas de la familia 14-3-3 que secuestran la pirina, bloqueando así su capacidad de formar un inflamasoma activo.

Las toxinas producidas por las bacterias antes mencionadas producen modificaciones covalentes como glicosilación, adenilación o ADP-ribosilación en la región *Switch I* de las GTPasas de la familia Rho, impidiendo su interacción con las quinasas PKN-1/2, lo que disminuye su actividad y, por tanto, el nivel de fosforilación de la pirina. Como consecuencia, la pirina se libera de las proteínas 14-3-3 y es capaz de formar un inflamasoma activo (25) (Figura 3).

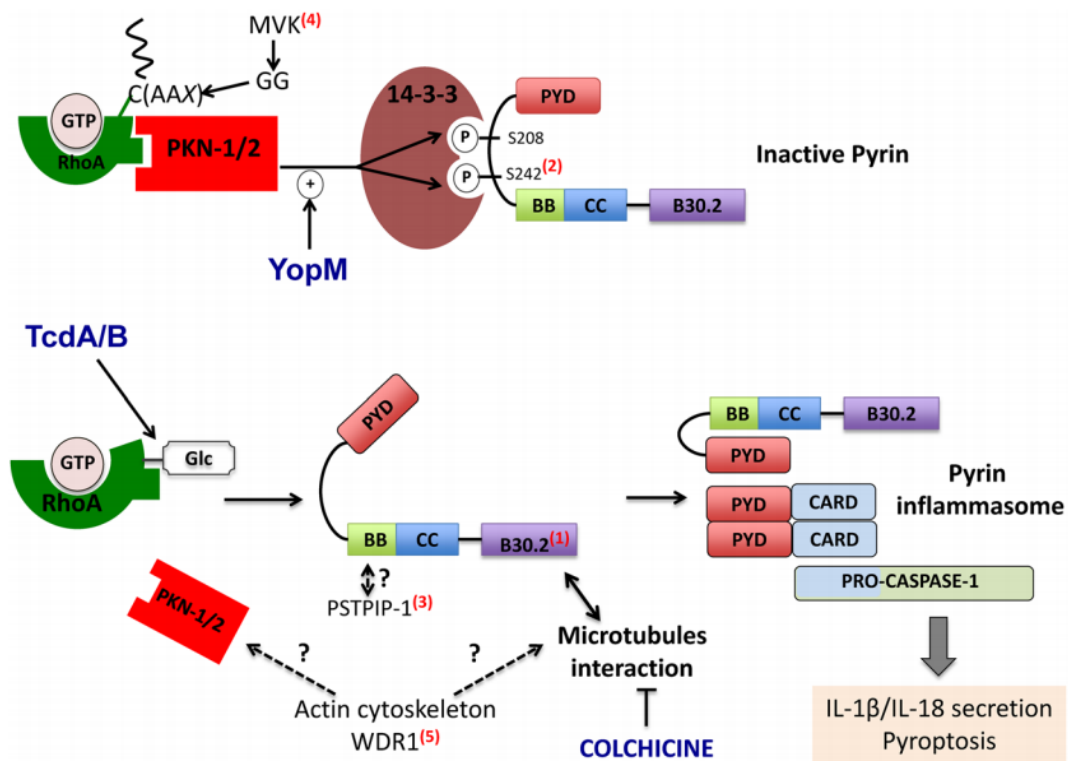


Figura 3. Regulación de la activación del inflamasoma de pirina y síndromes autoinflamatorios asociados a la pirina. [1] FMF, [2] PAAND, [3] PAPA, [4] MKD, [5] PFIT (25).

Enfermedades autoinflamatorias

Las enfermedades autoinflamatorias son un grupo de condiciones clínicas distintas de las autoinmunes, que se caracterizan por episodios inflamatorios recurrentes en ausencia de infección o daño celular. Las enfermedades autoinflamatorias están determinadas por una desregulación de la inmunidad innata, sin implicación de la inmunidad específica (linfocitos T autorreactivos y autoanticuerpos) (26). La desregulación del sistema inmune innato desencadena una reacción inflamatoria desproporcionada que daña al propio huésped. Se caracterizan por la presencia de

dolor muscular, fatiga, fiebre e inflamación en ausencia de anticuerpos o linfocitos T específicos de antígeno (27). Existen gran cantidad de enfermedades genéticas que presentan un fenotipo autoinflamatorio (Tabla 1).

<i>Enfermedad</i>	<i>Gen</i>	<i>Proteína</i>
Enfermedades monogénicas		
Síndromes hereditarios con fiebre periódica		
FMF	MEFV (16q13)	Pirina
TARPS	TNFRSF1A (12q13)	TNFRSF1A
HIDS	MVK (12q24)	Mevalonato quinasa
Síndromes autoinflamatorios persistentes		
Síndromes periódicos asociados a criopirina (CAPS)		
Síndrome de Muckle-Wells	CIAS/NALP3 (1q44)	Criopirina
FCAS		
NOMID		
CINCA		
Síndrome con lesiones granulomatosas en la piel		
Síndrome de Blau	NOD2	NOD2
Síndromes con erupciones cutáneas pustulosas		
DIRA	ILRN	IL-Ra
Síndrome de Majeed	LPIN2 (18p)	
PAPA	CD2BP1 (15q24)	PSTPIP1
PAAND	MEFV (16q13)	Pirina
Enfermedades poligénicas		
Enfermedad de Behçet	HLA, IL23R, IL-10, ERAP1	
Enfermedad de Crohn	NOD2, ILR3	

Tabla 1. Clasificación de las distintas enfermedades autoinflamatorias según el gen que provoca el fenotipo enfermo.

En este trabajo nos centraremos en el síndrome PAPA (artritis piógena con pioderma gangrenoso y acné), que está asociado a mutaciones en la proteína PSTPIP1.

Síndrome PAPA

El PAPA es un síndrome autoinflamatorio autosómico dominante ocasionado por mutaciones en el gen *PSTPIP1* que fue descrito por primera vez en 1997 (28) con manifestaciones cutáneas y articulares (Figura 4). Otros síndromes autoinflamatorios causados por mutaciones en el gen *PSTPIP1* o caracterizados por hallazgos clínicos que se superponen con los encontrados en el síndrome PAPA se han incluido recientemente en el grupo de trastornos del espectro PAPA como *PSTPIP1-associated myeloid-related proteinemia inflammatory syndrome* (PAMI), PASH (PG, acné e hidradenitis supurativa) o PAPASH (artritis piógena, acné, PG e hidradenitis supurativa) (29). Estas enfermedades se agrupan bajo la denominación de *PSTPIP1-associated inflammatory diseases* (PAID). Desde un punto de vista fisiopatológico, todas estas afecciones comparten mecanismos comunes que consisten en una sobreactivación del sistema inmunológico innato que conduce a una mayor producción de la familia de las interleucinas IL-1 e inflamación cutánea "estéril" rica en neutrófilos (30). En los pacientes con PAPA, las primeras mutaciones identificadas que se han encontrado en el gen que codifica *PSTPIP1* son A230T y E250K.

A pesar de haber identificado su etiología y conocer parte del desarrollo de esta enfermedad, el tratamiento sigue siendo complejo e incompleto. En sus inicios, el primer abordaje fue el uso de corticoides, que a largo plazo produce demasiados efectos secundarios no deseados, por lo que se cambió la estrategia hacia fármacos que bloquean la producción de IL-1 β y TNF α . El anticuerpo monoclonal infliximab (anti-TNF α) ha mostrado buenos resultados en el manejo de los síntomas a excepción del acné quístico, pues no bloquea completamente la citoquina (31). Como bloqueante de IL-1 β se utiliza el fármaco anakinra, agonista de su receptor, empleado para el tratamiento de la artritis reumatoide y la fiebre mediterránea familiar (32). Ninguno de estos tratamientos se ha mostrado efectivo en la totalidad de los pacientes tratados, por lo que la búsqueda de nuevas terapias más efectivas sigue siendo el principal reto para el mundo científico.



Figura 4. Características clínicas del síndrome de PAPA. Destrucción autoinmune de las articulaciones (artritis) en la imagen de la derecha y lesiones en la piel (pioderma gangrenoso) en la izquierda (31).

PSTPIP1

PSTPIP1 se encuentra codificada en el genoma humano por el gen *PSTPIP1*, localizado en el brazo largo del cromosoma 15. Es una proteína adaptadora que participa en la regulación de la activación, proliferación y migración de los linfocitos T (33), aparte de la organización del citoesqueleto y la producción de IL-1 β (34). La estructura de esta proteína alberga dos dominios diferentes, un dominio F-BAR en el extremo amino y un dominio SH3 en el carboxilo, ambos unidos entre sí por una región intrínsecamente desordenada (Figura 5).

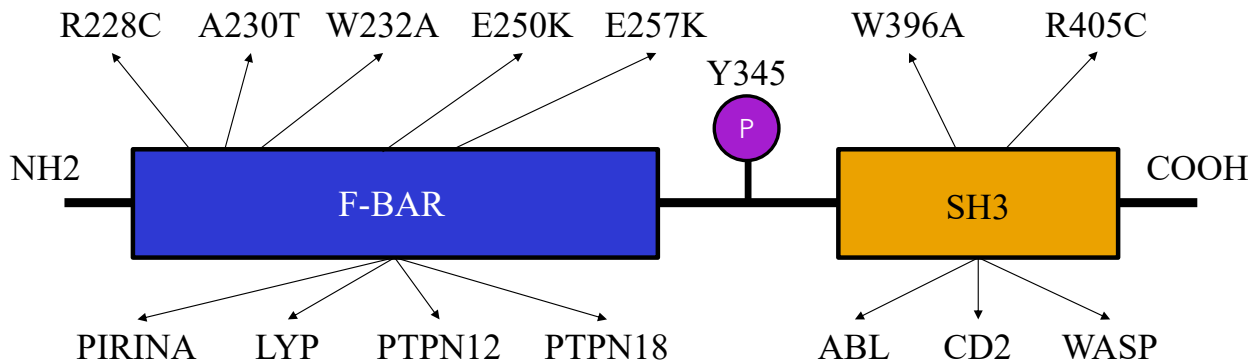


Figura 5. Estructura de *PSTPIP1* con sus dos dominios: F-BAR (azul) y SH3 (naranja). En la parte inferior aparecen las proteínas con las que se ha descrito interacción, indicándose el dominio con el que interactúan. En la parte superior se indican varias mutaciones estudiadas en este trabajo.

Esta proteína se encuentra de manera natural en forma de dímeros, pues nada más ser sintetizada en el ribosoma interacciona con otra proteína igual. Además, de manera fisiológica se encuentra interaccionando por el dominio F-BAR con la monocapa interna de la membrana plasmática.

PSTPIP1 es capaz de interactuar con otras proteínas importantes en la señalización del sistema inmune, como por ejemplo LYP (fosfatasa de tirosina involucrada en enfermedades autoinmunes como la artritis o el lupus), pirina (cuyas mutaciones causan la enfermedad autoinflamatoria Fiebre Mediterránea Familiar), ABL (kinasa de tirosina involucrada en varios cánceres hematopoyéticos) y WASP (cuyas mutaciones originan la enfermedad de Wiskott–Aldrich), lo cual sugiere que *PSTPIP1* podría ser un adaptador clave en la regulación de la respuesta inmune (35)(36).

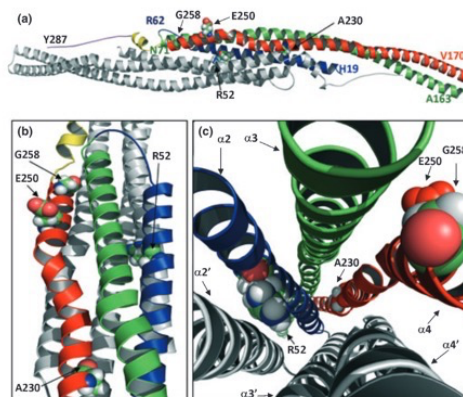


Figura 6. Modelo tridimensional predicho del dominio F-BAR de la proteína *PSTPIP1* en el cual se encuentran localizadas las mutaciones puntuales generadoras de enfermedad, principalmente las localizadas en los aminoácidos A230 y E250 (37).

Las mutaciones más frecuentes que dan lugar al síndrome PAPA son A230T y E250Q, las cuales modifican la interacción con las proteínas LYP, PTPN12, PTPN18 y pirina (Figuras 5 y 6). PSTPIP1, mediante su interacción con pirina, regula la formación del inflamasoma de pirina. Estas mutaciones conducen a una hiperfosforilación de PSTPIP1 (por la disminución de su interacción con PTPN12), incrementando su interacción con la pirina (37), lo que conlleva un aumento en la producción de IL-1 β a través del inflamasoma (38). La mutación A230T se encuentra en una región interna del dominio F-BAR, mientras que la mutación E250K se encuentra en una región lateral del dominio F-BAR, la cual es causante del síndrome PAMI. Además, existen otras mutaciones descritas de las que algunas se desconoce si inducen patología o no (39). Nuestro trabajo se centrará en el estudio de varias mutaciones puntuales (Figura 5) situadas en distintos dominios de PSTPIP1 y asociadas a enfermedades autoinflamatorias (39).

Objetivos

En la actualidad, no se dispone de un tratamiento efectivo para las enfermedades autoinflamatorias asociadas a PSTPIP1. Tampoco se conoce qué relación existe entre las mutaciones de PSTPIP1 y la enfermedad que producen. De la misma manera, se desconoce la función fisiológica de PSTPIP1 en el sistema inmune. Por ello, en este proyecto pretendemos estudiar cómo afectan las mutaciones de PSTPIP1 a su interacción con otras proteínas, lo cual nos ayudaría a entender cómo las mutaciones en PSTPIP1 conducen a enfermedades autoinflamatorias. En concreto, en este trabajo pretendemos analizar cómo afectan las mutaciones de PSTPIP1 a su interacción consigo mismo y con proteínas relevantes en el sistema inmune. Por lo tanto, nos proponemos los siguientes objetivos:

1. Determinar la localización celular del homodímero PSTPIP1.
2. Determinar la interacción de PSTPIP1 tanto en su forma silvestre como los distintos mutantes generadores de enfermedad con las proteínas del sistema inmune LYP, Pirina, ABL y WASP y observar la localización celular de estas interacciones.
3. Determinar la localización celular de los mutantes de PSTPIP1 tanto en la formación de homo-dímeros como heterodímeros con la forma silvestre.
4. Determinar cuantitativamente la formación de homodímeros de los mutantes de PSTPIP1, así como la interacción de PSTPIP1 con LYP y con los mutantes de PSTPIP1.

Materiales y métodos

Materiales

Soluciones y tampones

- Tampón fosfato salino (PBS) con pH 7,4.
 - NaCl (Scharlab) 136 mM
 - KCl (Merck) 2,7 mM
 - Na₂HPO₄ (Scharlab) 8 mM
 - KH₂PO₄ (Merk) 1,5 mM

- Tampón de transfección HEBS 2x pH 7,05
 - HEPES (Sigma) 50 mM
 - NaCl (Scharlab) 140 mM
 - Na₂HPO₄ · 2 H₂O (Scharlab) 1,5 mM

Plásmidos

Utilizando el vector de expresión pEF1/V5 se han generado múltiples plásmidos que contienen las secuencias de las proteínas de interés. Este vector contiene un sitio de clonaje múltiple (MCS) en el que se ha introducido, además de la proteína de interés (PSTPIP1 salvaje o mutante, pirina, LYP, ABL o WASP), un epítipo (3xHA), una secuencia de 16 aminoácidos de serina y glicina, que aporta flexibilidad a la proteína (secuencia BNBS) y un fragmento de la proteína fluorescente Venus (N155 o C155).

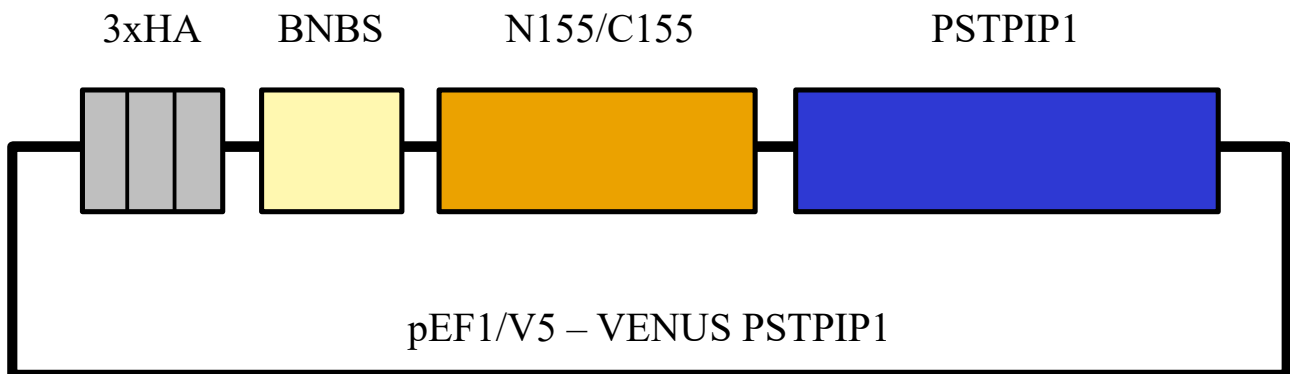


Figura 7. Esquema del plásmido utilizado para transfectar las células en los ensayos de BiFC.

Métodos

Tratamiento de cristales con poly-L-Lisina

Se utilizaron cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro (Knittel, GE) como soporte para las células, los cuales se recubrieron con 100 μ L de una solución de Poli-L-Lisina 0,01% (Sigma-Aldrich ST. Lois, MO, USA) diluida 1:10 con Agua MiliQ durante 10 minutos para facilitar la adherencia. A continuación, los cristales se lavaron con 100 μ L de agua MiliQ durante 10 minutos y, tras retirar el agua, se dejaron secar al aire. Este proceso se realiza en condiciones de esterilidad (40).

Cultivo celular

Como modelo de estudio se utilizó la línea celular adherente HEK293, procedente de células embrionarias de riñón, por su fácil mantenimiento y su alta eficiencia de transfección. Se crecieron en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal inactivado (FBSi), 1% de L-Glutamina y 100 U/mL de Penicilina-Estreptomicina, a 37°C y una saturación de CO₂ del 5%.

En placas de 35 mm, en un volumen total de 2 mL, se sembraron $2,5 \times 10^5$ células sobre los cristales tratados con Poly-L-lisina para los experimentos de microscopía confocal y $5,0 \times 10^5$ células por pocillo para los experimentos de citometría de flujo.

Transfección

Para introducir el ADN purificado en las células eucariotas HEK 293 se utilizó el método químico de transfección mediante fosfato cálcico. Esta técnica se lleva a cabo combinando una solución de ADN y CaCl₂ con una solución HEBS, la cual contiene fosfato disódico (Na₂HPO₄), produciendo precipitados de fosfato cálcico. El fosfato cálcico tiene la capacidad de unirse a la superficie celular e introducirse mediante endocitosis en el interior celular.

El protocolo de esta técnica se inició dos horas antes de la transfección con el cambio de medio de cultivo (DMEM completo). Después de este tiempo, se mezcló 1 μ g de ADN plasmídico con 100 μ L de dilución 1:10 de CaCl₂ 2,5M (Merk). Posteriormente, se añadieron gota a gota 100 μ L de HEBS x2, burbujeando la mezcla y dejando incubar 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añadió gota a gota en el pocillo correspondiente y se incubó a 37°C y 5 % de CO₂ durante 24 horas.

Fijación

Para realizar los experimentos de análisis de imagen, tras 24h de transfección, las células sembradas sobre los cristales se lavaron con PBS y se fijaron con 30 μ L de paraformaldehído 4% (Merck, GE) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se retiró el paraformaldehído y se lavaron las células con PBS.

Tinción de los núcleos y montaje

Como marcador nuclear fluorescente se utilizó 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI). Una vez fijadas las células en los cristales, se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con 30 μ L de DAPI 1 μ g/ μ L (Sigma-Aldrich ST. Louis, MO, USA) en dilución 1:1000. Seguidamente, se retiró el DAPI y se lavó con PBS. Para montar los cristales sobre los portaobjetos, se añadieron 5 μ L de medio de montaje (Gelvatol) al portaobjetos y se depositó el cubreobjetos con las células sobre el medio de montaje, dejándolo secar hasta el día siguiente.

Microscopía confocal

Una vez montadas las muestras, se captaron imágenes de estas con el microscopio confocal LEICA TCS SP5, con los láseres WLL (White light laser) y 405 Diode. La selección de las muestras se realizó con una resolución de 512x512 para no dañar la preparación. Para la captura de las imágenes se utilizó el objetivo de aceite de inversión 63X y la captura final de la muestra se realizó con una resolución de 1024x1024 y profundidad de 8 bits por píxel, utilizando el programa LAS AF LITE. Se utilizaron los filtros correspondientes a los canales cromáticos: azul (340-380 nm) y verde (450-490 nm) para observar correctamente los núcleos celulares y la localización de la interacción de proteínas de interés.

Para el procesamiento de las imágenes obtenidas se utilizó el programa de tratamiento de imagen Fiji-ImageJ en su versión 2.1.0/1.53c.

Complementación de fluorescencia Bimolecular BiFC

La técnica de complementación de fluorescencia bimolecular (BiFC) es un método que permite la visualización de interacciones directas de proteínas en su entorno celular normal en células vivas. Se basa en la capacidad de complementación de dos fragmentos (amino terminal y carboxilo terminal) de una proteína fluorescente, para formar finalmente el fluoróforo completo (41).

Es aplicable a la visualización de las interacciones en estado estable de complejos formados entre prácticamente cualquier combinación de proteínas en una amplia variedad de tipos de células y organismos, pudiendo detectar niveles comparables a los basales.

La BiFC consiste en la formación de un complejo fluorescente que se da en el momento en que dos fragmentos sin fluorescencia de un fluoróforo se fusionan en el espacio por interacción entre dos proteínas que se han combinado con estos fragmentos (Figura 8). La formación del complejo fluorescente empieza con la interacción entre las proteínas fusionadas a los fragmentos de la proteína fluorescente (Complejo I). La asociación entre ambos fragmentos fluorescentes tarda más en darse, produciendo un complejo intermedio de plegamiento (Complejo II), que tras la maduración termina generando la fluorescencia (Complejo III).

En nuestro ensayo utilizamos la proteína fluorescente Venus, variante de la YFP (*yellow fluorescent protein*), dividida en dos fragmentos, el extremo amino N155 (aminoácidos 1-154 de Venus) y el extremo carboxilo C155 (aminoácidos 155- 239 de Venus). Estos fragmentos estaban fusionados con las proteínas de interés contenidas en los plásmidos utilizados de forma que, tras su transfección en células HEK 293, se pudo visualizar por microscopía confocal si se producía interacción entre las dos proteínas estudiadas.

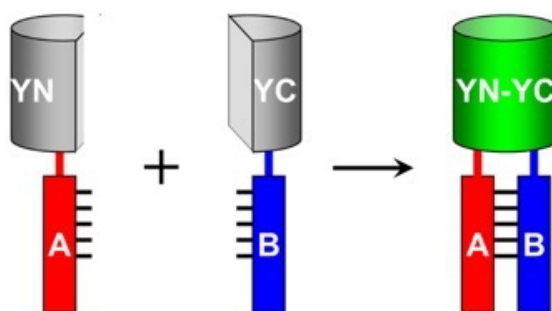


Figura 8. Esquema del funcionamiento de la técnica de BiFC (42). A partir de dos plásmidos que expresan cada uno un fragmento de la proteína fluorescente Venus, cuando dos proteínas unidas a estos fragmentos interactúan, se completa la estructura de Venus y emite señal fluorescente.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica biofísica utilizada para el recuento y clasificación de células suspendidas en una solución salina según sus características morfológicas. Las células son analizadas a medida que pasan los diferentes láseres del aparato, lo que nos permite conocer información sobre las distintas poblaciones celulares.

La citometría de flujo en este trabajo ha sido utilizada para medir la intensidad de fluorescencia emitida por el fluorocromo Venus unido a las proteínas de interés cuando es excitado con el láser con la longitud de onda adecuada. Tras 24 horas de transfección, las muestras se prepararon justo antes de realizar el análisis en el citómetro. Para ello, se desechó el medio de cultivo y se lavaron las células con 800 µl de PBS. Se resuspendieron bien las células usando la pipeta y se depositó la suspensión en tubos de citometría.

Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios, el cual tiene un láser de argón que utiliza una longitud de onda de excitación de 488 nm y 4 colectores de detección: FL1 (525 nm), FL2 (575 nm), FL3 (620 nm) y FL4 (675 nm).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el ensayo de citometría de flujo fueron analizados mediante una prueba de igualdad de varianzas (Prueba de Levene) aparte de una comparación de medias Mann-Whitney de muestras independientes con intervalo de confianza del 95%.

Resultados

Determinación de la dosis de plásmido para transfección en células HEK293

Se añadieron distintas cantidades de plásmido en placas de 35mm con HEK293, siguiendo el protocolo explicado en el apartado de materiales y métodos, con el fin de evaluar la cantidad mínima de plásmido que producía el mayor porcentaje de transfección. Se probaron las dosis de 0.1; 0.2; 0.5; 1 y 2 μg de plásmido, tanto con el plásmido PSTPIP1-EGFP, como con PYRIN-EGFP. La menor dosis que alcanzaba la mayor relación dosis/porcentaje de transfección era de 1 μg por pocillo (datos no mostrados).

Localización celular de PSTPIP1 y pirina

Tras establecer la dosis adecuada de plásmido, se transfectaron las células HEK293 con los plásmidos PSTPIP1-EGFP; PYRIN-EGFP y EGFP sola para determinar la localización celular de ambas proteínas (Figura 9). Los ensayos de microscopía confocal mostraron la localización de PSTPIP1 en la membrana plasmática, a lo largo de todo el perímetro celular; y la localización citosólica de la pirina. La proteína EGFP se expresaba en toda la célula, incluido el núcleo.

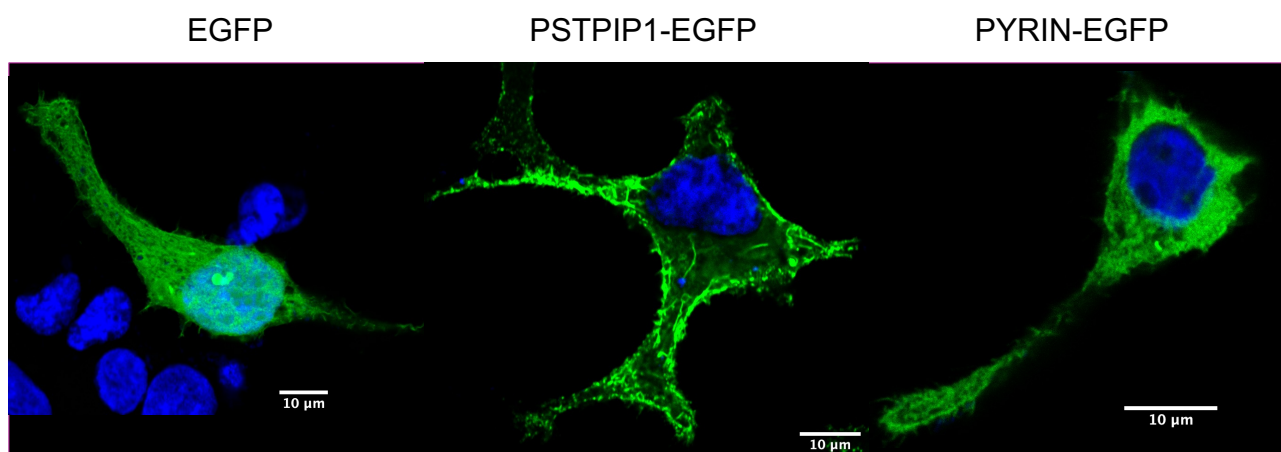


Figura 9. Localización subcelular de las proteínas EGFP (izquierda), PSTPIP1-EGFP (centro) y Pirina-EGFP (derecha).

Localización subcelular del mutante 4Q-PSTPIP1 y de su interacción con otras proteínas

El mutante 4Q posee cuatro mutaciones por cambio de base en aminoácidos que se encuentran en la superficie cóncava del dominio F-BAR de PSTPIP1: R62Q, K63Q, R116Q y K117Q. Se realizaron estas mutaciones para verificar que estos aminoácidos participan en la interacción de PSTPIP1 con la membrana plasmática. En primer lugar, se observó la localización de la proteína 4Q mediante BiFC, transfectando el plásmido que expresa N155-PSTPIP1 junto al plásmido C155-PSTPIP1; C155-LYP; C155-Pirina y C155-WASP respectivamente para determinar donde se produce la interacción entre estas proteínas. Se compararon estos resultados con los obtenidos usando N155-4Q con las mismas proteínas unidas al fragmento C155 (Figura 10). Se advirtió que la localización del mutante 4Q cuando oligomeriza con PSTPIP1 silvestre cambia al citosol. En cuanto a la interacción con LYP, pirina y WASP, se observó que el mutante 4Q mantiene su interacción con estas proteínas, que ahora se distribuían de manera uniforme por el citoplasma, perdiendo su localización nativa junto a la membrana.

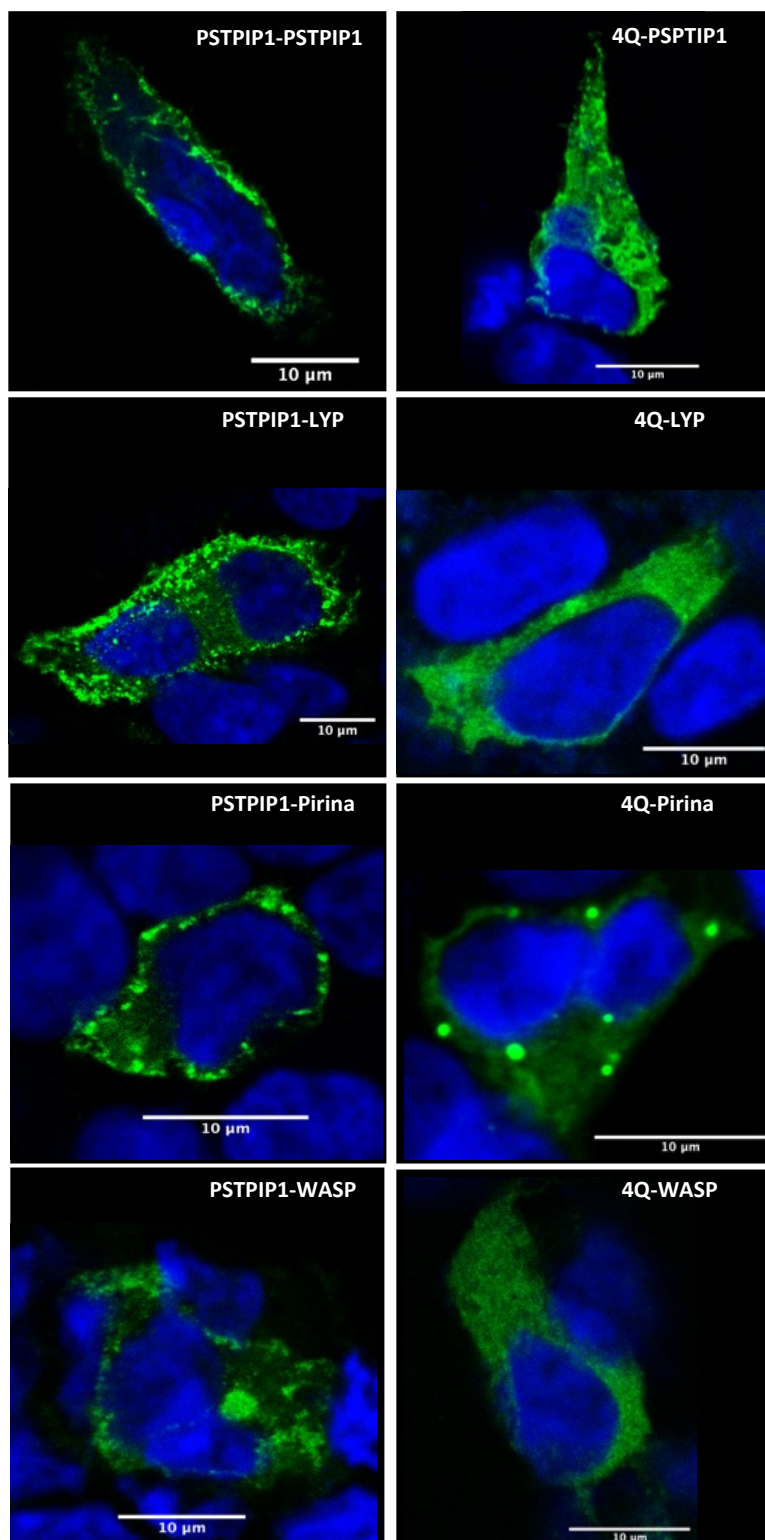


Figura 10. Localización subcelular mediante BiFC de la proteína PSTPIP1 silvestre (columna izquierda) con respecto al mutante 4Q-PSTPIP1 (columna derecha) al interactuar con las proteínas PSTPIP1, LYP, pirina y WASP.

Efecto de distintas mutaciones de PSTPIP1 en la localización de heterodímeros

Una vez examinada la localización celular de PSTPIP1, se analizó el comportamiento de los mutantes generadores de enfermedad. Para ello, mediante un ensayo de BiFC al igual que en el caso anterior, se transfectaron plásmidos que expresan N155-PSTPIP1 en su forma nativa junto otro plásmido que expresa el fragmento C155 unido a los distintos mutantes de interés: R228C, A230T, W232A, E250K, E257K, W396A y R405C y así analizar la formación de heterodímeros. Los mutantes (Figura 11) A230T (c), W232A (d) y W396A (g) no ven alterada su localización celular al interactuar con la forma nativa, colocándose junto a la membrana al igual que el control (a). Los mutantes R228C (b), E250K (e) y E257K (f) en cambio, se distribuyen también por el citoplasma celular, aunque no pierden del todo su localización en la membrana. El mutante R405C (h), situado en el dominio SH3, tiene un comportamiento similar al mutante E250K, pues parte se mantiene rodeando la membrana plasmática, y parte se localiza en el citosol.

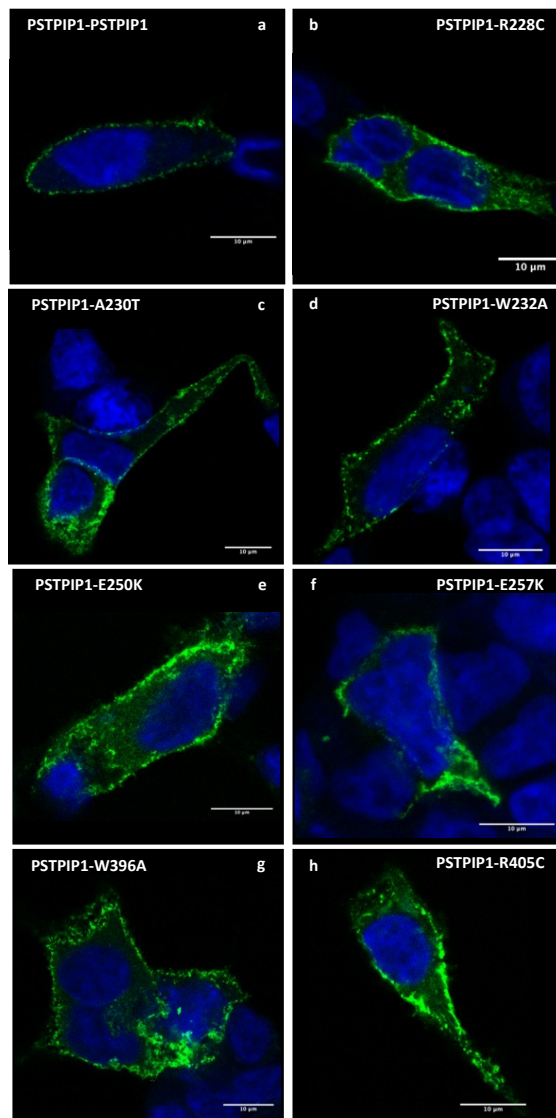


Figura 11. Efecto de distintas mutaciones de PSTPIP1 en la localización subcelular de los hetero-oligómeros mediante BiFC. a) control N155-PSTPIP1 con C155-PSTPIP1; b) N155-PSTPIP1 con C155-R228C; c) N155-PSTPIP1 con C155-W232A; d) N155-PSTPIP1 con C155-A230T; e) N155-PSTPIP1 con C155-E250K; f) N155-PSTPIP1 con C155-E257K; g) N155-PSTPIP1 con C155-W396A; h) N155-PSTPIP1 con C155-R405C.

Localización de los mutantes de PSTPIP1 al homodimerizar

A continuación, analizamos la localización de homodímeros para determinar si la localización subcelular de PSTPIP1 se veía afectada. Para ello se realizó otro ensayo de BiFC con los plásmidos que expresaban los mutantes R228C, A230T, W232A, E250K, E257K, W396A y R405C con el fragmento N155 y C155 de la proteína fluorescente Venus. En todos los casos se detectó la homodimerización de estos mutantes excepto con la mutación A230T, a pesar de intentarlo en varias ocasiones.

El comportamiento de los mutantes es similar al que se produce en la heterodimerización de estos mutantes con la proteína silvestre (Figura 12). Sin embargo, los mutantes que antes no veían su localización alterada: W232A (c) y W396A (f), siguen mostrando su localización en la membrana plasmática como lo hace la proteína silvestre (a) pero con una ligera señal en el citoplasma. En cuanto a los mutantes R228C (b), E250K (c) y E257K (e), el homodímero sigue apareciendo en la membrana, pero de una manera menos marcada, difundiéndose a través del citosol. Finalmente, el mutante R405C (g) aparece formando fibras de oligómeros a lo largo de todo el interior celular.

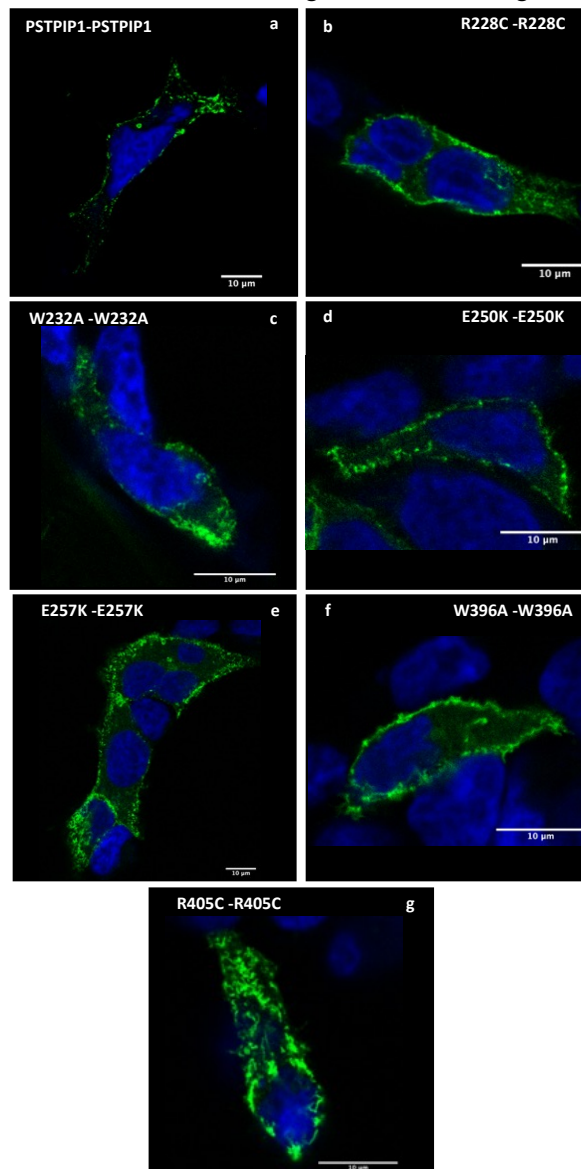


Figura 12. Efecto de distintas mutaciones de PSTPIP1 en la localización subcelular de los homo-oligómeros mediante BiFC. a) control N155-PSTPIP1 con C155-PSTPIP1; b) N155- R228C con C155-R228C; c) N155- W232A con C155- W232A; d) N155-E250K con C155- E250K; e) N155-E257K con C155- E257K; f) N155- W396A con C155- W396A; g) N155-R405C con C155-R405C.

Cuantificación de la interacción de los mutantes de PSTPIP1 con otras proteínas mediante BiFC detectada por citometría de flujo

Para cuantificar la interacción de PSTPIP1 con otras proteínas se llevaron a cabo ensayos de citometría de flujo, siguiendo el protocolo especificado en el apartado de Métodos. Primeramente, se realizó un ensayo para ver la interacción de PSTPIP1 y los distintos mutantes analizados en este trabajo (R228C, A230T, W232A, E250K, E257K, W396A y R405C) unidos al fragmento C155 de Venus, con LYP unida al fragmento N155 de Venus. Como control negativo se tomó la fluorescencia emitida por la interacción entre C155-PSTPIP1 y el fragmento N155 de Venus. Para seleccionar la población transfectada, las muestras se transfectaron con un plásmido que expresa la proteína fluorescente naranja (OFP). Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa en la interacción de los mutantes R228C, W232A, E250K y E257K con LYP. El resto de mutaciones estudiadas, sin embargo, no afectaron a la interacción con LYP. (Figura 13).

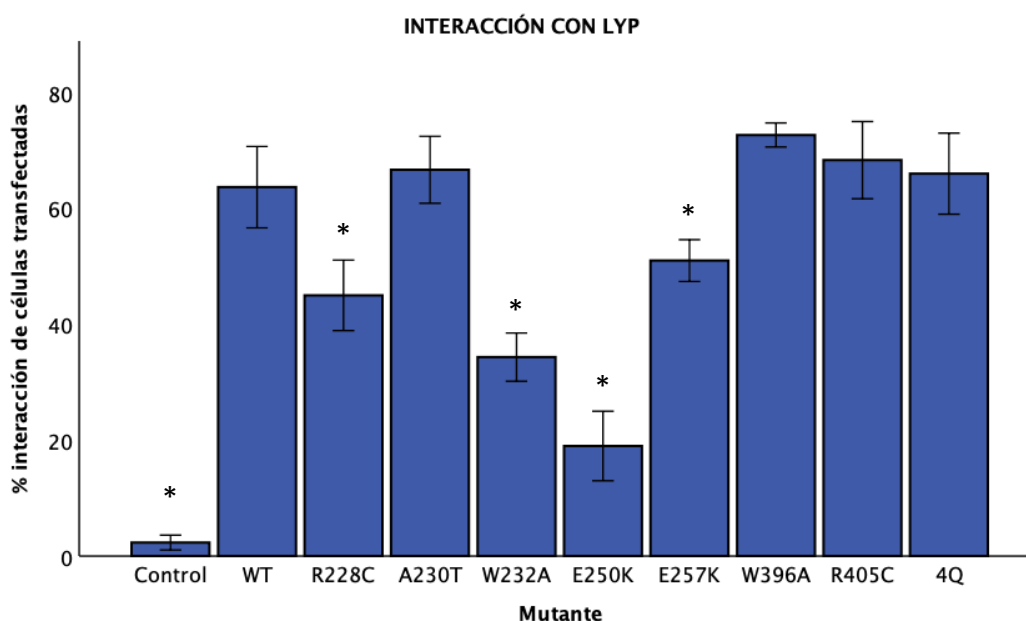


Figura 13. Efecto de distintas mutaciones de PSTPIP1 en la interacción con LYP. Histograma con los resultados obtenidos de la interacción de los distintos mutantes de PSTPIP1 con LYP ($n=3$). Los resultados se expresan como el porcentaje de células de la población transfectada (OFP) que producían señal mediante BiFC. Barras de error: \pm desviación estándar; (*) : $p < \alpha = 0.05$ respecto a la condición WT, la proteína PSTPIP1 silvestre mediante la prueba de Mann-Whitney.

Posteriormente se realizaron los ensayos de citometría para analizar cuantitativamente como afectan las mutaciones de PSTPIP1 a la hetero- y homo-oligomerización. Al igual que en el apartado anterior, se transfectó OFP para identificar las células transfectadas y se estudió por BiFC la interacción de N155-PSTPIP1 silvestre con C155 unido a los distintos mutantes de PSTPIP1 estudiados (Figura 14 histograma verde). Asimismo, se estudió la interacción de los mutantes de PSTPIP1 unidos al fragmento N155 de Venus con los mismos mutantes unidos al fragmento C155 (Figura 14 histograma rojo).

Se aprecia una bajada muy drástica tanto en la hetero- como en la homo-oligomerización en el caso de los mutantes A230T y W232A. En el mutante E250K la disminución en la interacción es menos evidente, aunque sigue siendo significativa sobre todo en la homodimerización. En cuanto a los demás mutantes, no se observan alteraciones en la formación de dímeros.

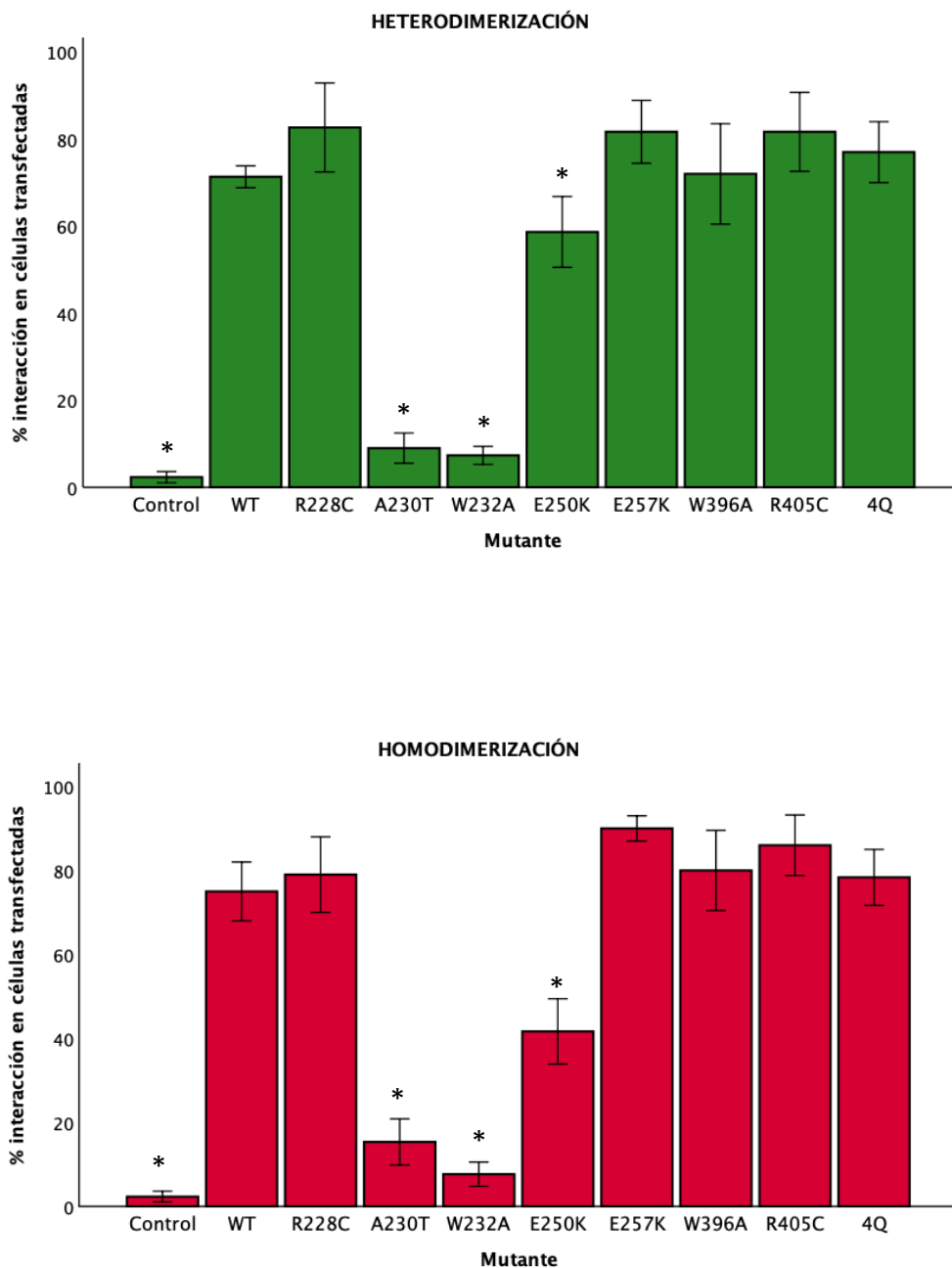


Figura 14. Efecto de distintas mutaciones de PSTPIP1 en su dimerización.

En verde se muestra el histograma con los resultados obtenidos de la interacción de los distintos mutantes de PSTPIP1 con PSTPIP1 silvestre (heterodimerización) (n=3). En rojo se muestra el histograma con los resultados obtenidos de la interacción de los distintos mutantes de PSTPIP1 consigo mismos (homodimerización) (n=3). Los resultados se expresan como el porcentaje de células de la población transfectada (OPF) que producían señal mediante BiFC. Barras de error: +/- desviación estándar; (*) : $p < \alpha = 0.05$ respecto a la condición WT, la proteína PSTPIP1 silvestre mediante la prueba de Mann-Whitney.

Discusión

Las enfermedades autoinflamatorias son ocasionadas por una desregulación en la inmunidad innata, la cual desencadena un proceso inflamatorio exacerbado que daña al propio paciente (26). Nuestro trabajo se ha centrado en el estudio de algunas mutaciones en la proteína PSTPIP1 que causan las enfermedades PAPA y PAMI, incluidas dentro de las denominadas PAIDs. La etiología de todo este grupo de síndromes inflamatorios se debe a mutaciones en la proteína adaptadora del sistema inmune, PSTPIP1, la cual participa en la regulación de la activación, proliferación y migración de los linfocitos T, además de en la organización del citoesqueleto y en la producción de IL-1 β (33). Se ha propuesto que las mutaciones A230T, E250Q y E250K, que se localizan en el dominio F-BAR, producen una disminución de su interacción con la fosfatasa PTPN12, que conduce a su hiperfosforilación, lo cual conlleva un incremento de su interacción con la pirina, desencadenando el ensamblaje del inflamasoma y, en consecuencia, un aumento en la producción de IL-1 β y la activación del proceso inflamatorio (38).

A pesar de haber identificado su etiología y conocer parte del desarrollo de esta enfermedad, no se dispone de un tratamiento efectivo para esta enfermedad, pues no está clara aún la relación entre las mutaciones de PSTPIP1 y las enfermedades que producen. El estudio de las interacciones de los mutantes de PSTPIP1 tanto con ellos mismos como con otras proteínas del sistema inmune (LYP, pirina, WASP) puede tener gran utilidad para entender por qué las alteraciones en PSTPIP1 conducen a enfermedades autoinflamatorias.

La técnica usada para estudiar estas interacciones, la BiFC, nos permite la visualización de interacciones directas de proteínas en su entorno celular normal en células vivas (42). En nuestro ensayo utilizamos la proteína fluorescente Venus, dividida en dos fragmentos, el extremo amino N155 (aminoácidos 1-154 de Venus) y el extremo carboxilo C155 (aminoácidos 155-239 de Venus). Estos fragmentos se fusionan con las proteínas de interés contenidas en los plásmidos utilizados de forma que, tras su transfección en células HEK293, se puede visualizar por microscopía confocal y citometría de flujo si se produce interacción entre las dos proteínas estudiadas.

Previamente a los estudios de interacción se analizó la localización de PSTPIP1 silvestre y pirina usando EGFP como reportero para determinar alteraciones de localización en los estudios posteriores. PSTPIP1 se encuentra interaccionando con la membrana plasmática mediante la parte cóncava por interacciones electrostáticas, mientras que la pirina se encuentra distribuida por el citosol. Además, observamos que PSTPIP1 oligomeriza formando tubulaciones cuando se sobreexpresa.

Las mutaciones R62Q, K63Q, R116Q y K117Q en PSTPIP1(4Q-PSTPIP1) producen un cambio en la localización de PSTPIP1, que se distribuye por el citosol en lugar de esta asociada a la membrana plasmática. De acuerdo con la estructura de otros dominios F-BAR, estos aminoácidos se encontrarían en la parte cóncava de la proteína que interacciona con la monocapa interna de la membrana plasmática (36). Aunque la proteína pierde su capacidad de interacción con la membrana con estas mutaciones, no pierde su capacidad de interacción con las proteínas LYP, pirina y WASP. De la misma manera, tampoco pierde su capacidad de formar heterodímeros con la proteína silvestre, por lo que se puede inferir que la región de interacción de PSTPIP1 con la membrana plasmática no participa en la interacción con las proteínas estudiadas.

En cuanto al ensayo de heterodimerización, los mutantes no provocan una pérdida completa en la localización del heterodímero de la proteína nativa, aunque los mutantes A230T, E250K y R405C producen una mayor presencia en el citosol de la proteína. El ensayo de homodimerización ofrece resultados similares a los del ensayo de heterodimerización. Lo más destacable es la imposibilidad de detectar la formación de homodímeros con la mutación A230T. Por tanto, los mutantes analizados no producen un cambio completo en la localización subcelular, como sí ocurre con el mutante 4Q.

Para cuantificar la interacción de las proteínas estudiadas se realizaron ensayos de citometría de flujo. Los mutantes R228C, W232A, E250K y E257K reducen la interacción con LYP. Esto nos muestra que esa región del dominio F-BAR es clave en la interacción con esta proteína, pues alteraciones en esta región dificultan la interacción de PSTPIP1 con LYP. Asimismo, los datos de citometría indican que la capacidad de dimerización también se ve afectada por las mutaciones. Se puede observar que los mutantes A230T, W232A y E250K forman menos dímeros, por lo que esta región es importante para la interacción de PSTPIP1 consigo misma.

Cabe destacar el mutante W232A, el cual no se ha encontrado en ningún paciente con PAIDs, se descubrió mutando PSTPIP1 para identificar la región de interacción con la fosfatasa PTPN18 (43). Se comporta de la misma manera que el mutante A230T, el cual sí genera enfermedad. Por otro lado, el mutante W396A se generó debido a que el Triptófano³⁹⁶ es clave en la interacción de dominios SH3 con motivos ricos en prolina, una región muy conservada en dominios SH3 de diferentes proteínas (44), para analizarse su comportamiento en las interacciones que hemos estudiado, pero tampoco hay datos acerca de si esta mutación produce o no enfermedad.

En resumen, las mutaciones estudiadas afectan en distinta medida a la interacción de PSTPIP1 consigo misma y con LYP. Esas diferencias podrían ayudar a entender cómo se originan las enfermedades autoinflamatorias por mutaciones en esta proteína.

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. PSTPIP1 se localiza en la periferia celular junto a la membrana plasmática.
2. Pirina se localizan en el citosol.
3. Las mutaciones R62Q, K63Q, R116Q y K117Q en PSTPIP1(4Q-PSTPIP1) cambian la localización de PSTPIP1 al citosol.
4. Los heterodímeros en los que participan los mutantes A230T, E250K y R405C de PSTPIP1 aumentan ligeramente la localización en el citosol.
5. Los mutantes R228C, W232A, E250K y E257K reducen la interacción con LYP.
6. Los mutantes A230T y W232A disminuyen apreciablemente la oligomerización tanto de heterodímeros como de homodímeros.

Bibliografía

1. Alam R. A brief review of the immune system. *Prim Care - Clin Off Pract*. 1998 Dec 1;25(4):727–38.
2. *Inmunología de José Ramón Regueiro González* | Editorial Médica Panamericana [Internet]. [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://www.medicapanamericana.com/es/libro/inmunologia-regueiro>
3. Tomar N, De RK. A Brief Outline of the Immune System. In: De RK, Tomar N, editors. *Immunoinformatics*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 3–12.
4. El sistema inmunológico: comentarios de interés básico [Internet]. [cited 2021 Jun 1]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892003000200006
5. Quaresma JAS. Organization of the skin immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases. Vol. 32, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 2019.
6. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb 1;125(2 SUPPL. 2):S24–32.
7. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2012 Jul 1;23(4):446–57.
8. Robertson M. Innate immunity. Vol. 8, *Current Biology*. Current Biology Ltd; 1998.
9. Natoli G, Ostuni R. Adaptation and memory in immune responses. Vol. 20, *Nature Immunology*. Nature Publishing Group; 2019. p. 783–92.
10. Nguyen TA, Pang KC, Masters SL. Intercellular communication for innate immunity. *Mol Immunol*. 2017 Jun 1;86:16–22.
11. Peñaranda-Parada É, Spinel-Bejarano N, Restrepo JF, Rondón-Herrera F, Millán A, Gamarra AI. *Enfermedades Autoinflamatorias*. Vol. 17, *Revista Colombiana de Reumatología*. Asocion Colombiana de Reumatología; 2010. p. 86–95.
12. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Vol. 357, *Lancet*. Elsevier B.V.; 2001. p. 1777–89.
13. Chen KW, Schroder K. Antimicrobial functions of inflammasomes. Vol. 16, *Current Opinion in Microbiology*. *Curr Opin Microbiol*; 2013. p. 311–8.
14. Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*. 2016;535.
15. Gong W, Shi Y, Ren J. Research progresses of molecular mechanism of pyroptosis and its related diseases. Vol. 225, *Immunobiology*. Elsevier GmbH; 2020. p. 151884.
16. Wang L, Sharif H, Vora SM, Zheng Y, Wu H. Structures and functions of the inflammasome engine. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Jun 1;147(6):2021–9.
17. Heilig R, Broz P. Function and mechanism of the pyrin inflammasome. Vol. 48, *European Journal of Immunology*. Wiley-VCH Verlag; 2018. p. 230–8.
18. de Torre-Minguela C, del Castillo PM, Pelegrín P. The NLRP3 and pyrin inflammasomes: Implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. *Front Immunol*. 2017;8(JAN).
19. Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*. 2016;213(6):617–29.
20. Hernández JC, Urcuqui S. Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *Iatreia*. 2012;25(4):380–90.
21. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2013. p. 397–411.
22. Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. Vol. 213, *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press; 2016. p. 617–29.
23. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature*. 2014 Sep 11;513(7517):237–41.
24. Park YH, Wood G, Kastner DL, Chae JJ. Pyrin inflammasome activation and RhoA signaling in the autoinflammatory diseases FMF and HIDS. *Nat Immunol*. 2016 Jul 19;17(8):914–21.
25. Jamilloux Y, Magnotti F, Belot A, Henry T. The pyrin inflammasome: from sensing RhoA GTPases-inhibiting toxins to triggering autoinflammatory syndromes. 2018;76:20.
26. Ciccarelli F, Martinis M, Ginaldi L. An Update on Autoinflammatory Diseases. *Curr Med Chem*. 2013 Dec 27;21(3):261–9.
27. Wise CA, Gillum JD, Seidman CE, Lindor NM, Veile R, Bashiardes S, et al. Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTP PEST and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory disorder. *Hum Mol Genet*. 2002 Apr 15;11(8):961–9.
28. Lindor NM, Arsenaault TM, Solomon H, Seidman CE, McEvoy MT. A new autosomal dominant

- disorder of pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne: PAPA syndrome. *Mayo Clin Proc.* 1997;72(7):611–5.
29. Genovese G, Moltrasio C, Garcovich S, Marzano A V. PAPA spectrum disorders. Vol. 155, *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia*. Edizioni Minerva Medica; 2020. p. 542–50.
 30. Cugno M, Borghi A, Marzano A V. PAPA, PASH and PAPASH Syndromes: Pathophysiology, Presentation and Treatment. Vol. 18, *American Journal of Clinical Dermatology*. Springer International Publishing; 2017. p. 555–62.
 31. J. Smith E, Allantaz F, Bennett L, Zhang D, Gao X, Wood G, et al. Clinical, Molecular, and Genetic Characteristics of PAPA Syndrome: A Review. *Curr Genomics*. 2010 Dec 19;11(7):519–27.
 32. Dierselhuis MP, Frenkel J, Wulffraat NM, Boelens JJ. Anakinra for flares of pyogenic arthritis in PAPA syndrome [5]. Vol. 44, *Rheumatology*. *Rheumatology (Oxford)*; 2005. p. 406–8.
 33. Janssen WJM, Grobarova V, Leleux J, Jongeneel L, van Gijn M, van Montfrans JM, et al. Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1 (PSTPIP1) controls immune synapse stability in human T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Dec 1;142(6):1947–55.
 34. Cugno M, Borghi A, Angelo •, Marzano V. PAPA, PASH and PAPASH Syndromes: Pathophysiology, Presentation and Treatment. *Am J Clin Dermatol*. 2017;18.
 35. Cong F, Spencer S, Côté JF, Wu Y, Tremblay ML, Lasky LA, et al. Cytoskeletal protein PSTPIP1 directs the PEST-type protein tyrosine phosphatase to the c-Abl kinase to mediate Abl dephosphorylation. *Mol Cell*. 2000 Dec 1;6(6):1413–23.
 36. Snider CE, Wan Mohamad Noor WNI, Nguyen NTH, Gould KL, Suetsugu S. The state of F-BAR domains as membrane-bound oligomeric platforms. *Trends Cell Biol*. 2021;1–12.
 37. Nesterovitch AB, Hoffman MD, Simon M, Petukhov PA, Tharp MD, Glant TT. Mutations in the PSTPIP1 gene and aberrant splicing variants in patients with pyoderma gangrenosum.
 38. Marcos T, Ruiz-Martín V, De La Puerta ML, Trinidad AG, Rodríguez MDC, De La Fuente MA, et al. Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 1 inhibition of T-cell receptor signaling depends on its SH3 domain. *FEBS J*. 2014;281(17):3844–54.
 39. Infevers - Tabular list [Internet]. [cited 2021 Jun 9]. Available from: <https://infevers.umai-montpellier.fr/web/search.php?n=5>
 40. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Preparation of slides and coverslips for microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*. 2008 May 1;3(5):pdb.prot4988.
 41. Kodama Y, Hu CD. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. Vol. 53, *BioTechniques*. *Biotechniques*; 2012. p. 285–98.
 42. Kerppola TK. Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: Characteristics of protein fragment complementation. *Chem Soc Rev*. 2009 Sep 21;38(10):2876–86.
 43. Dowbenko D, Spencer S, Quan C, Lasky LA. Identification of a novel polyproline recognition site in the cytoskeletal associated protein, proline serine threonine phosphatase interacting protein. Vol. 273, *Journal of Biological Chemistry*. 1998. p. 989–96.
 44. Roberts JM, Tarafdar S, Joseph RE, Andreotti AH, Smithgall TE, Engen JR, et al. Dynamics of the Tec-family tyrosine kinase SH3 domains. *PROTEIN Sci*. 2016;25:852–64.