

Cuando los lípidos no son tan malos: regulación del inflamasoma por lipina-2

María A. Balboa

*Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),
47003 Valladolid, Spain,*

January 23, 2017

El sistema inmune innato supone la primera línea de defensa frente a patógenos. Para ello, células como los macrófagos disponen de múltiples receptores que les permiten distinguir lo propio de lo ajeno y montar una respuesta inflamatoria capaz de contener las infecciones y reparar el daño producido. Estos receptores pueden localizarse en la membrana celular, como los TLRs, entre los que destaca el TLR4 capaz de reconocer moléculas como el LPS. Pero también se conocen receptores intracelulares entre los que se encuentran miembros de la propia familia de TLRs y otros receptores como RIG que reconocen ácidos nucleicos, y además receptores de la familia NOD-like (NLRs) capaces de reconocer múltiples efectores. Interesantemente, algunos de estos receptores tienen una función muy distinta a todos los anteriores mencionados, ya que no desencadenan cascadas de señalización encaminadas a la activación de receptores nucleares y cambios en la expresión génica celular, sino que producen complejos citosólicos multiprotéicos, conocidos como inflamasomas, encargados de proteolizar poderosas interleuquinas proinflamatorias, como es el caso de la Il-1b y IL-18. (Slide 2 – Pattern Recognition Receptors) (Slide 3 – Inflammasomes).

Transcripción del seminario impartido el lunes 23 de enero de 2017 en el Instituto de Investigación Sanitaria de Palma, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca. (Slide 1 – Title).

Durante los últimos 10 años se ha venido investigando muy activamente sobre estas maquinarias moleculares y gracias a ello hoy sabemos que juegan un importante papel durante las respuestas inmunes frente a patógenos y también en el desarrollo de enfermedades inflamatorias (Slide 4 – Proteins That Form Inflammasomes). Se conocen hasta el momento 5 receptores distintos con capacidad de formar inflamasomas, 3 de la familia de los NLRs (Nod-like receptors), AIM2 (absent in melanoma 2) y pirina. Cada uno de ellos reconoce y se activa por diferentes ligandos.

(Slide 5 – Inflammasome Structure). Estructuralmente los inflamasomas están formados por una proteína “plataforma” (proteína de anclaje), que son las que dan nombre al inflamasoma completo, una proteína adaptadora, que no es obligada para todos los inflamasomas, y una proteína efectora con función proteolítica.

Las proteínas plataforma están formadas por tres dominios: un dominio C-terminal rico en leucinas (LRR), responsable de la detección de ligandos (que actúa por tanto de receptor del inflamasoma), un dominio central conocido como NACHT que permite la oligomerización dependiente de ATP, y un dominio N-terminal de unión a otras proteínas y que puede ser PYD (pyrin domain), como ocurre para NLRP1 y NLRP3, o CARD (caspase recruitment domain) como ocurre para NLRC4. En el caso de que el NLR contenga un dominio CARD, éste podrá reclutar directamente la proteasa efectora sin necesidad de una proteína adaptadora, como es el caso del inflamasoma NLRC4.

Si el NLR contiene un dominio PYD, reclutará una proteína adaptadora, la proteína ASC, que a su vez se unirá a una proteasa de la familia de las caspasas, la 1 es la más estudiada, a través del dominio CARD. Una vez

que el inflamasoma se ha ensamblado, la procaspasa-1 se autocataliza (posiblemente), liberándose una caspasa activa del complejo.

(Slide 6 – NLRP3 activators) El inflamasoma NLRP3 parece ser el más promiscuo de los inflamasomas conocidos ya que se activa por múltiples moléculas efectoras, provenientes de patógenos como bacterias (o sus toxinas, ej, nigericina), virus, hongos, etc, provenientes de las células dañadas o bajo estrés (DAMPs), entre las que destaca el ATP, los cristales de urato monosódico presentes en pacientes con gota, los cristales de colesterol que se acumulan durante lesiones ateroscleróticas o agregados peptídicos como la proteína β -amiloide presente en pacientes con Alzheimer. El inflamasoma NLRP3 también reconoce contaminantes atmosféricos asociados con enfermedades inflamatorias como el asbesto/amnianto, la sílice o la luz UV. El alumbre potásico, un adjuvante utilizado en la síntesis de vacunas, también es capaz de activarlo.

(Slide 7 – NLRP3 inflammasome activation) La activación del inflamasoma NLRP3 es compleja y requiere de dos señales secuenciales: una primera señal, que es necesaria para aumentar la producción de NLRP3 y para producir pro-IL-1b, ya que esta no se expresa de forma basal, y una segunda señal, desencadenada por los activadores que he mencionado previamente y que será la encargada de promover el ensamblaje y la activación propiamente dicha del inflamasoma.

La primera señal ocurre a través de diferentes receptores como por ejemplo TLR4 tras activación con LPS; pero también puede ocurrir a través del receptor de TNF-a o del receptor de IL-1, siempre y cuando se desencadene la activación de NF-kB con el consiguiente aumento de expresión de Nlrp3 y proIL1b. En la célula, la pro-IL-18 ya se expresa de forma constitutiva.

(Durante esta primera señal, para facilitar y aumentar la posterior activación del inflamasoma también tienen lugar otras modificaciones post-traduccionales como son la fosforilación de ASC o la desubiquitinación de NLRP3). La procaspasa-1 se expresa de forma constitutiva en macrófagos. Una vez que las células expresan pro-IL1b, y ASC y NLRP3 en su estado más funcional, es necesaria una segunda señal que promueva el cambio de conformación del NLRP3 y el posterior ensamblaje del inflamasoma. Dada la gran diversidad de agentes capaces de activar NLRP3, es improbable que todos actúen uniéndose directamente a él. Tras intensos debates se han establecido tres modelos para explicar esta activación.

El primer modelo señala la salida de potasio de la célula, con la consiguiente bajada en su concentración intracelular como mecanismo principal que activa NLRP3. Este modelo se describió para estímulos como el ATP, que tras activar receptores purinérgicos favorecen la salida de potasio a través de estos canales o para las toxinas formadoras de poros, que dan lugar a una salida del ión directamente de la célula (nigericina).

El segundo modelo propuesto apunta al daño mitocondrial como principal activador del NLRP3, ya que todos los activadores testados hasta la fecha inducen la formación de ROS. Pero la participación de la mitocondria en este proceso va más allá, ya que también se ha descrito que la presencia de ADNmit y del PL cardiolipina en el citosol, así como una traslocación de NLRP3 a la mitocondria contribuyen a la activación del inflamasoma. Además se ha descrito un tercer modelo de activación para definir como partículas que son fagocitadas por la célula, como MSU o cristales de colesterol, activan el inflamasoma. En este caso, la internalización de estos compuestos conduce en la célula a la desestabilización lisosomal, dando lugar a la liberación de catepsinas lisosomales al citosol. Una detallada reevaluación de estos mecanismos ha demostrado que todas ellas terminan reduciendo el K^+ intracelular, y por tanto, esto sería lo que detecta el NLRP3. Sin embargo se desconoce si lo hace directamente, o hay un paso intermedio no conocido. Una vez ensamblado, la procaspasa-1 se autocataliza y se libera su forma activa, conduciendo a la maduración de proIL1b y proIL18, que una vez maduras serán liberadas al exterior de la célula. Y además se podrá generar un proceso de muerte conocido como piroptosis que parece estar mediado por Gasdermina D.

(Slide 8 – Consequences of inflammasome dysregulation) Por lo dicho hasta el momento podemos concluir que los inflammasomas son maquinarias importantes para eliminar patógenos y por tanto, necesarios en el mantenimiento de la salud. De hecho, los patógenos tienen sistemas que inhiben su funcionamiento para evitar su eliminación. Sin embargo, un aumento de su actividad podría ser perjudicial. Por ello existen inhibidores endógenos que los regulan. Si éstos fallan se produce inflamación crónica y la base para el desarrollo de enfermedades autoinflamatorias. También relacionado con cáncer and autoimmune, metabolic and neurodegenerative diseases.

(Slide 9 – Autoinflammatory vs autoimmune diseases) Las enfermedades autoinflamatorias se desencadenan por elevadas concentraciones de IL-1 β y no TNF α , más propio de las enfermedades autoinmunes. Las células disfuncionales inmunes son los macrófagos o monocitos, frente a la disfuncionalidad del sistema inmune adaptativo (cel. T y B) de las enf. autoinmunes. Y no hay autoanticuerpos como en las segundas.

Se generan por mutaciones en genes que codifican para proteínas relacionadas con el inflammasoma, y suelen ser enfermedades raras monogénicas hereditarias, que en clínica se manifiestan por la aparición de brotes recurrentes de fiebre e inflamación sistémica sin causa aparente, dolor en las articulaciones y erupciones cutáneas. Mientras que el origen de las enfermedades autoinmunes es poligénico y tienen numerosos y diferentes síntomas, los desencadenantes suelen ser señales endógenas de peligro, mientras que el desencadenante de las segundas es la pérdida de tolerancia.

Por su naturaleza las terapias que funcionan son aquellas que bloquean la acción de la IL-1 β frente a las que bloquean el TNF- α en las segundas.

(Slide 10 – Systemic autoinflammatory diseases) Según la alianza de enfermedades autoinflamatorias (que se dedica a promover el conocimiento en torno a estas enfermedades para un buen diagnóstico y tratamiento de los pacientes), se han descrito alrededor de 26 enfermedades, agrupadas según el gen mutado o el tipo de manifestación clínica.

De todas ellas, a nosotros nos llamó la atención una conocida como Síndrome de Majeed que aparece por mutaciones en el gen *Lpin2* que codifica para la proteína lipina-2, una proteína del metabolismo lipídico perteneciente a una familia en la que nosotros hemos estado trabajando.....

(Slide 11 – Roles of Lipins) Estas proteínas son enzimas que catalizan la defosforilación de ácido fosfatídico para producir DAG controlando la concentración celular de dos importantes lípidos. El DAG, por su lado servirá a su vez de sustrato para la generación de lípidos de almacenamiento como el TAG. Junto con el PA forma parte de las rutas de generación de fosfolípidos de membrana.

Por último, pero no menos importante, son segundos mensajeros intracelulares porque se unen a proteínas señalizadoras cambiando su localización y/o su función.

Por todo ello, la actividad PAP de las lipinas controlan las rutas de formación de lípidos y el contenido celular de importantes lípidos señalizadores.

(Slide 12 – De novo Lipid Synthesis) De todas las enzimas que forman parte de la síntesis de novo lipídica, las lipinas son especiales porque su actividad no depende únicamente de su disponibilidad de sustrato, sino también de su translocación a retículo, donde están localizadas el resto de las enzimas de la ruta. Por ello suponen un paso clave en la generación de lípidos de novo. La actividad PAP (lipina) ha sido la última en ser identificada molecularmente, debido a su dificultad para ser purificada.

(Slide 13 – The Lipin Family). Nuestro laboratorio está enfocado en el estudio de la familia de proteínas conocidas como lipinas, y su papel en el macrófago. Hasta la fecha se han descrito 5 proteínas.....

Up to date 5 proteins are known that are encoded by three different genes due to the fact that lipin1 gene may suffer Alternative splicing generating lipin1a, b and g isoforms, being lipin1g present only in humans. These proteins have a very similar protein structure. They have two conserved domains during evolution: the N-LIP in their n-terminal part, and the C-LIP in their c-terminal end, where the catalytic and transcriptional coactivator motives are located. They also have a nuclear localization signal in the N-terminal part.

(Slide 14 – Mutaciones homocigóticas en LPIN2 dan lugar al Síndrome de Majeed) La lipina-2, al igual que los otros dos miembros de esta familia, la lipina-1 y la lipina-3, posee dos regiones altamente conservadas a lo largo de la evolución: el dominio N-LIP en el extremo N-terminal, cerca del cuál se encuentra la secuencia NLS de localización nuclear y el dominio C-LIP, en el extremo C-terminal. En este dominio C-LIP es donde se sitúan los dos motivos funcionales de la proteína: el motivo DXDXT, responsable de la actividad PAP de la enzima, y el motivo LXXIL que es el que le confiere a la proteína su función como coactivador transcripcional.

En la secuencia del gen de la lipina-2 se han descrito varias mutaciones. En color negro aparecen las diferentes mutaciones que se han asociado a psoriasis, aunque las consecuencias funcionales de dichas mutaciones aún se desconocen. En color rojo, se representan las diferentes mutaciones que se han encontrado en este gen y que originan el síndrome de Majeed. 4 de ellas son mutaciones que implican deleciones o inserciones de pb que dan lugar a un cambio en el marco de lectura originando proteínas truncadas no funcionales. La cuarta mutación, es una mutación puntual en la que cambia la Serina 734, altamente conservada, por una leucina, eliminando la actividad PAP pero no su habilidad para asociarse a membranas o actuar como coactivador. Esto es importante porque sugiere que pérdida de la actividad PAP de la lipina-2 es suficiente para causar el síndrome de Majeed.

Este síndrome, al igual que otras enfermedades autoinflamatorias se caracteriza por la presencia en sus pacientes de fiebre recurrente, osteomielitis multifocal recurrente crónica, que son lesiones inflamatorias estériles en los extremos de los huesos largos, anemia diseritropoyética, que implica un defecto en la síntesis de glóbulos rojos, y psoriasis.

(Slide 15 – Therapies Against Il-1b Produce Clinical Improvement of Majeed Syndrome Patients) Este síndrome, es una enfermedad muy rara, que puede aparecer a las pocas semanas de nacer (pacientes pediátricos), y descrita solamente en algunas familias de diferentes puntos de Asia donde es normal el matrimonio entre familiares cercanos. Por ello, los estudios en humanos están muy limitados. Los tratamientos con corticosteroides o terapias anti-TNFa son ineficaces, tal y como se muestra en los niveles de citoquinas proinflamatorias en suero. Sin embargo, el tratamiento con anticuerpos bloqueantes del receptor de IL-1, como Anakinra o anticuerpos anti Il-1b, Canakinumab, disminuyen los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias y además mejoran los signos clínicos como la osteomielitis. Estos datos, desvelados en el año 2013, apoyaban muy fuertemente la idea de que la IL-1b juega un papel primordial en el desarrollo de la enfermedad. Pero, se desconocían los posibles mecanismos moleculares por los que esto pudiera ocurrir. Por tanto, nos planteamos estudiar si la lipina-2 podría estar controlando la producción de IL-1b a través del inflamasoma.

(Slide 16 – Experimental Setting) Puesto que el inflamasoma más conocido y estudiado es el NLRP3, nuestra propuesta experimental inicial fue activar de forma clásica este inflamasoma en macrófagos procedentes de distintas fuentes.

(Slide 17 – Reduced Lipin-2 Expression Increases IL-1b Production) Lo primero que hicimos fue silenciar la lipina-2 en células RAW 264.7 estimularlos y analizar la expresión de IL-1b con ELISAs específicos en los sobrenadantes celulares. Los resultados nos indicaron que sólo el tratamiento con LPS/ATP (1ª y 2ª señal de activación del inflamasoma NLRP3) produce la liberación de Il-1b de las células (mientras que el LPS o el ATP solos no). Y lo que es más importante, las células con niveles reducidos de lipina-2, generan más IL-1b que las células control (transfectadas con siRNA control). Posteriormente hicimos lo mismo con macrófagos humanos

diferenciados in vitro de monocitos de sangre periférica silenciados por nucleofección. Obteniendo el mismo resultado. Para caracterizar mejor este hallazgo se utilizaron también BMDMs procedentes de ratones wt y deficientes en lipina-2, encontrando que el fenotipo (producción de Il-1b) es mucho más llamativo. En estas células se analizó también la presencia de Il-1b madura en los sobrenadantes celulares por WB (para comprobar que lo que detectaba el ELISA era realmente la proteína IL-1b madura). Por tanto estos resultados apuntaban a que efectivamente la lipina-2 intervenía de alguna forma en la regulación de la producción de Il-1b.

(Slide 18 – IL-1b production depends on the inflammasome NLRP3) Nuestra siguiente pregunta fue si el inflammasoma NLRP3 podría estar dando cuenta de la producción de IL-1b en este sistema. Para contestarla usamos BMDMs procedentes de animales KO para NLRP3, ASC, y Casp1, y en ellos silenciamos la lipina2. Tras activación clásica del inflammasoma observamos que la producción de Il-1b en este sistema dependía totalmente de la expresión de cualquiera de los componentes del inflammasoma NLRP3: el receptor, la proteína adaptadora o la proteasa, independientemente de la expresión de lipina-2, o no. Los datos sugieren que la sobreproducción de IL-1b en células deficientes en lipina-2 depende del inflammasoma NLRP3.

(Slide 19 – Lipin-2 reduces LPS signaling) Afecta la lipina-2 a la primera señal de activación del inflammasoma, es decir a la producción de pro-IL1b? Para contestar esta pregunta evaluamos primero la generación de TNFa que depende exclusivamente de la señalización intracelular a través de TLR4. En BMDMs encontramos que tanto el mRNA que codifica para TNFa como la citoquina liberada al medio extracelular es significativamente mayor en las células deficientes en lipina-2. Y lo mismo encontramos para el mensajero de Il-1b y la pro-IL1b analizada por WB en lisados celulares. Estos mismos efectos fueron encontrados en macrófagos humanos, tanto para TNFa como para el mensajero de Il-1b.

(Slide 20 – Lipin-2 decreases NLRP3 induced expression) Se ha descrito que el receptor del inflammasoma NLRP3 puede upregular su expresión durante la fase de priming (primera señal). Nosotros observamos que concorde a un aumento de señalización en células deficientes en lipin-2, NLRP3 incrementa su expresión en estas células con respecto a las células control. Por tanto, la primera señal de activación del inflammasoma está afectada por la falta de lipina-2. Para verificarlo decidimos estudiar algunas rutas de señalización de TLR4 como la fosforilación de MAPKs.

(Slide 21 – TLR4 Signal Transduction) El análisis por inmunoblot de la fosforilación de ERK, JNK y p38 usando anticuerpos específicos de las formas fosforiladas mostró que todas ellas tienen mayores niveles de fosforilación en células deficientes en lipina-2, especialmente tras 30 min de estimulación.

(Slide 22 – Lipin-2 affects MAPK activation during TLR4 signaling) A continuación investigamos el impacto de estas quinasas en la producción del mensajero de Il-1b mediante el uso de inhibidores específicos....

(Slide 23 – MAPKs participate in the over production of IL-1b in the absence of lipin-2)... *Next, the impact of these kinases on Il1b mRNA production was evaluated by using specific inhibitors. Inhibition of p38 (SB203580) completely abolished Il1b mRNA upregulation independently of the level of lipin-2, while JNK inhibition (SP600125) completely blocked the overproduction of the cytokine generated by lipin-2-deficient cells. Similarly, ERK inhibition (PD98059) had a modest but significant effect on Il1b mRNA generated in BMDMs from Lpin2^{-/-} animals, but not in wt animals. As expected from the mRNA expression data, when cells were treated with p38 inhibitor before the priming step, IL-1b release was strongly inhibited in both cellular phenotypes, abrogating the overproduction observed in lipin-2-deficient cells. ERK and JNK inhibitors reduced the overproduction generated in BMDMs from Lpin2^{-/-} animals under these conditions...* Por tanto, la lipina-2 controla la señalización durante la fase de priming de activación del inflammasoma a través de la activación de las MAPKs.

(Slide 24 – Lipin-2 controls inflammasome activation) To investigate the role of lipin-2 in inflammasome activation, we took advantage of the fact that pro-IL-18 is also processed by activated caspase-1 but its

expression is constitutive in cells (Gu et al., 1997). Our results showed that there was an increased production of IL-18 in Lpin2^{-/-} BMDMs and lipin-2-deficient human macrophages compared with control cells, while the levels of mRNA for IL18/IL18 did not change (Fig. 3A and B). Of note, just ATP, without priming, was sufficient to produce mature IL-18, and the absence of lipin-2 further increased this production, indicating an overactivation of the inflammasome under these circumstances.

(Slide 25 – Speck (inflammasome) formation during macrophage activation) *Oligomerization of ASC promoted by activation of the NLRP3 inflammasome is an upstream event during inflammasome assembly.* Experimentalmente esto puede estudiarse por microscopía en muestras teñidas con anticuerpos específicos contra ASC y un anticuerpo secundario fluorescente y observando la condensación de las moléculas de ASC en un único punto (el inflammasoma, cada célula produce sólo uno). Es frecuente encontrarlos alrededor de la célula a punto de romperse, o junto a los núcleos en células ya rotas.

(Slide 26 – Lipin-2 deficient cells have more and bigger ASC specks) En nuestras manos se observa así.....donde parece que los inflammasomas son mayores en células deficientes en lipina-2. Contabilizando el número de estos en nuestras preparaciones encontramos además que estas células producen más inflammasomas (más células los producen).

(Slide 27 – Lipin-2 deficient cells have an enhanced ASC oligomerization) La oligomerización de ASC puede también ser estudiada por WB. En presencia de un crosslinker como el DSS se observan oligómeros de ASC en la fracción insoluble... *Analysis of ASC oligomers performed by disuccinimidyl suberate (DSS) crosslinking showed that BMDMs from Lpin2^{-/-} mice had increased ASC oligomerization than control cells after inflammasome activation. Then, lipin-2 decreases ASC oligomerization and inflammasome assembly.*

(Slide 28 – Lipin-2 controls caspase-1 activation) Si esto es así deberíamos ver una mayor activación de caspasa-1... *We also found that BMDMs from Lpin2^{-/-} animals had an increased release of mature caspase-1 after inflammasome activation compared to control cells. Analysis of intracellular caspase-1 activity demonstrated that cells with reduced levels of lipin-2 were more prone to activate caspase-1.* Utilizando un inhibidor fluorescente que sólo se une a caspasa activa.

(Slide 29 – Caspase-1 mediates IL-1 β production) *To further demonstrate that caspase-1 is responsible for IL-1 β processing, the general inhibitor of caspases ZVAD as well as the specific inhibitor for caspase-1, YVAD, were used. Both of them effectively blocked the generation of IL-1 β without affecting TNF- α generation in BMDMs from Lpin2^{-/-} and wt animals, as well as in human macrophages.* Lo hicimos por su posible utilización translacional. Todos estos experimentos nos indican que la lipina-2 controla la activación de caspasa-1.

(Slide 30 – Pyroptosis increases in lipin-2 deficient macrophages) Ya mencioné en la introducción que la activación de la caspasa-1 puede producir una forma de muerte conocida como piroptosis... *This cell death mode shares features with both apoptosis and necrosis. Pores of 1–2 nm appear in the plasma membrane of pyroptotic macrophages at early time. As during necrosis, this results in cytoplasmic swelling (hinchamiento, aumento), osmotic lysis, and release of the intracellular content into the extracellular milieu. The fact that caspase-1 activation is linked with the production of mature IL-1 β and IL-18 renders pyroptosis an inherently proinflammatory cell death mode. Unlike necrosis but similar to apoptosis, nuclear condensation and oligonucleosomal DNA fragmentation are observed during pyroptosis. Although caspase-1 activity is required, pyroptosis occurs independently of IL-1 β and IL-18.*

Para estudiar si la lipina-2 contribuye al desencadenamiento de piroptosis se utilizaron dos aproximaciones experimentales distintas: una la salida de LDH y otra la entrada de moléculas fluorescentes como el IP. As a consequence of caspase-1 activation, macrophages deficient in lipin-2 had increased pyroptosis levels after LPS plus ATP treatment, as shown by LDH release (Fig. 3G). Analysis of propidium iodide (PI) incorporation confirmed that lipin-2 deficient cells were more permeable than wt cells after inflammasome activation (Fig.

3H). Altogether, these experiments demonstrate that lipin-2 controls caspase-1 activation and pyroptosis development during classical inflammasome activation. Todos estos experimentos demuestran que la señal del inflammasoma, activación per se de éste, está regulada por la lipina-2.

(Slide 31 – NLRP3 has multiple activators) Puesto que el inflammasoma NLRP3 tiene múltiples activadores como comentamos al inicio, nos preguntamos si la lipina-2 afectaría la activación del inflammasoma con todos ellos o sólo con algunos. Para contestar decidimos utilizar nigericina que es una toxina bacteriana muy potente en activación del inflammasoma, urato monosódico que es otra señal de peligro endógena, y alumbre, un adyuvante de vacunas....como señal ambiental.

(Slide 32 – Only ATP enhances IL-1b production in lipin-2-deficient cells) Analizando las respuestas a estos tratamientos encontramos que únicamente el tratamiento con ATP incrementaba la producción de IL-1b en células deficientes en lipina-2, tanto en líneas silenciadas como BMDMs de ratones KO. Indicando que tan sólo el efecto producido por el ATP está controlado por lipina-2. Por lo tanto, lo siguiente que hicimos fue estudiar cómo la lipina-2 influye en la activación del receptor P2X7.

(Slide 33 – P2X7 receptor activation) Este receptor de la familia de receptores purinérgicos se caracteriza por reconocer altas concentraciones de ATP extracelular (mM), como una señal de peligro. Actúa como un canal no selectivo de cationes cuya activación abre un poro que permite la entrada de Na^+ y Ca^{+2} y la salida de K^+ . Por tanto, altas concentraciones de ATP promueven la disminución de K^+ por la acción de este receptor, que activa el inflammasoma. Sin embargo, si la exposición al agonista es muy prolongada el receptor P2Xp sufre un proceso de sensibilización, generándose la dilatación del poro y mayores corrientes iónicas, haciéndose permeable a cationes grandes de alrededor de 800-900 Da. Como este proceso puede ser dañino para la célula, el funcionamiento del receptor P2X7 tiene que estar muy regulado, y de hecho se sabe que su activación depende de su entorno lipídico.

(Slide 34 – Patch clamp measurements of P2X7 receptor currents) Para estudiar las corrientes debidas al receptor P2X7 se realizaron experimentos de patch clamp en configuración de célula completa. Esta técnica nos permite conocer las corrientes iónicas de entrada y salida tanto en reposo como en condiciones de estimulación tras aplicar rampas de voltaje de -120 a 100 mV durante 1s cada 5 s.

(Slide 35 – Lipin-2-deficient cells have enhanced P2X7-dependent currents) En las gráficas superiores están representadas corrientes representativas de células wt y células deficientes en lipina-2 en estado de reposo y durante la activación con ATP, en ausencia o presencia de NMDG un cation grande que sustituye al sodio en el medio. En estas gráficas se ha corregido la amplitud de corriente por el tamaño celular por lo que se representa la densidad de corriente. En ellas se observan diferencias importantes en estas corrientes entre los dos fenotipos celulares. Representando estos datos con respecto al tiempo, observamos que el ATP promueve corrientes de entrada y salida de cationes y que estas corrientes son mayores en las células deficientes en lipina-2. Por otro lado, en presencia de NMDG, las corrientes de entrada se reducen en las células wt, pero no en las células sin lipina-2.

(Slide 36 – Inward and upward currents density through P2X7R are increased in lipin-2-deficient macrophages) Representando la densidad de corriente media de todas las células analizadas, observamos que las células sin lipina-2 tienen corriente mayores de entrada y salida. Y esto ocurre tanto en BMDMs como en células RAW 264.7 silenciadas. Esto es compatible con la formación de un poro más amplio tras activación en estas células.

(Slide 37 – P2X7R time off (closure) is increased in lipin-2-deficient macrophages) En esta técnica también se puede analizar el tiempo que el receptor tarda en abrirse completamente (ton) y en cerrarse (toff). Haciendo estos cálculos observamos que mientras el tiempo medio de apertura no varía entre los dos fenotipos, el tiempo de cierre aumenta significativamente tanto en las corrientes de entrada como en las de salida. Por tanto, las células deficientes en lipina tardan más tiempo en cerrar el poro y por tanto tienen más tiempo para perder K^+ .

(Slide 38 – P2X7R activation induces a higher permeability in lipin-2-deficient cells) También examinamos la apertura del poro P2X7 analizando la entrada de bromuro de etidio mediante microscopia confocal. Los resultados indican que las células deficientes en lipina-2 experimentan una mayor entrada de esta molécula fluorescente tras tratamiento con ATP.

(Slide 39 – K⁺ levels are implicated in inflammasome activation) Para confirmar que los aumentos de las corrientes de salida en los experimentos de patch clamp implicaban una mayor bajada de la concentración de K⁺ intracelular en las células deficientes en lipina-2, se analizó la concentración del ión mediante espectroscopia de emisión óptica. Observando que la activación con ATP produce una importante bajada de concentración intracelular que se recupera a partir de los 4 minutos de activación. En todos los puntos medidos, excepto durante la bajada, la concentración intracelular de K⁺ fué menor en las células deficientes en lipina-2 lo que concuerda muy bien con los datos encontrados por patch clamp que indican un mayor flujo iónico. Son estas diferencias las que están generando las diferencias encontradas de activación del inflammasoma y en producción de IL-1b? Para averiguarlo manipulamos las concentraciones extracelulares de k⁺ y estudiamos su efecto en la producción de IL-1b. A 45 mM de K⁺ extracelular (donde la caída intracelular se inhibe), se inhibe la producción de IL-1b, comparando con la concentración fisiológica de 5 mM, y deja de haber diferencias significativas entre los dos tipos celulares. Sin embargo, en ausencia de k⁺ extracelular que favorece la salida del ion, se produce más IL-1b en los dos fenotipos aunque sigue produciendo más las células deficientes en lipina.

(Slide 40 – Mechanism for P2X7R overstimulation in the absence of lipin-2) Hasta aquí hemos descrito que la lipina-2 controla la activación del inflammasoma NLRP3 limitando la activación del receptor P2X7 y por tanto la caída de los niveles de K⁺ durante la activación por ATP. Pero, cual es el mecanismo por el que esto ocurre?

(Slide 41 – Literature...) Tiramos de bibliografía.

(Slide 42 – Cholesterol esters in human macrophages) Jugábamos con ventaja. Ya habíamos hecho parte de lipidómica en macrófagos humanos deficientes en lipina-2 y sabíamos que tenían niveles de colesterol esterificado reducido.

(Slide 43 – Cholesterol levels are lower in lipin2-deficient cells) Analizando colesterol total en las células observamos que la falta de lipina favorecía la reducción de los niveles de colesterol.

(Slide 44 – Cholesterol restores P2X7 receptor activated currents in lipin-2-deficient cells) Por tanto nos planteamos recuperar los niveles de colesterol en esas células y estudiar sus efectos sobre la activación del receptor P2X7. Para ello utilizamos colesterol unido a b-ciclodextrina que lo hace soluble y disponible para la célula. Como se puede ver en esta gráfica este tratamiento recupera los niveles de colesterol de las células sin lipina-2.

(Slide 45 – Cholesterol restores P2X7 receptor activated currents in lipin-2-deficient cells) Con este tipo de aproximación estudiamos las corrientes iónicas por patch clamp, observando que las células incubadas con colesterol, y en especial las deficientes en lipina-2, disminuyen las corrientes iónicas tras estimulación con ATP. Algo que puede observarse mejor en esta representación de la media de intensidad de corriente en todas las células analizadas. Estos resultados son compatibles con una disminución de la apertura del poro P2X7 en las células deficientes en lipina-2.

(Slide 46 – Cholesterol reduces P2X7R toff during activation in lipin-2-deficient cells) Del mismo modo el tiempo de cierre del poro P2X7 disminuyó en las células sin lipina-2 tras tratamiento con colesterol, lo que era así tanto para las corrientes de entrada como para las corrientes de salida.

(Slide 47 – Cholesterol restores ASC oligomerization and caspase-1 activation in the absence of lipin-2) Podría el restablecimiento de los niveles de colesterol en las células carentes de lipina-2 restablecer el funcionamiento del inflammasoma? Estudiando la formación de specks, vimos que el tratamiento con colesterol disminuía a

niveles control la formación de specks de ASC, así como la activación de la caspasa-1 analizado por citometría de flujo.

(Slide 48 – *Cholesterol decreases IL-1b production in lipin-2-deficient cells*) Y por último analizamos el efecto del colesterol sobre la producción de IL-1b, encontrando que éste disminuye los niveles de la citoquina especialmente en las células sin lipina-2.

(Slide 49 – *What do we know about systemic inflammation in animals?*) Según estos datos, la lipina-2 controlando de alguna forma que aún no conocemos la cantidad de colesterol celular controla la formación de IL-1b a través del inflamasoma NLRP3. Tod esto in vitro. ¿Como trasladamos todo esto a modelos in vivo? Sobre todo cuando sabemos que los ratones no recapitulan los síntomas de los pacientes con síndrome de Majeed (no sufren de fiebres recurrentes, ni presentan niveles altos de citoquinas en sangre). Podemos ver estos efectos en ratones KO para lipina-2? Podemos ayudar mediante...

(Slide 50 – *Lipin-2 attenuates systemic inflammation*) La inyección intraperitoneal de altas dosis de LPS promueve la activación del inflamasoma en animales. Haciendo esto observamos incrementos en suero de IL1b y IL-18 (activación del inflamasoma) así como TNFa (señalización TLR4). Los animales carentes de lipina-2 tienen muy incrementados estos niveles, especialmente los debidos a la activación del inflamasoma.

(Slide 51 – *Lipin-2 attenuates proinflammatory activation in liver*) Qué ocurre en tejidos? Especialmente los más afectados por el tratamiento con LPS como hígado. Por PCRq hemos visto incrementos en la expresión de muchas genes proinflamatorios incluidos IL1b, el IL1R y NLRP3.

(Slide 52 – *Lipin-2 attenuates proinflammatory activation in spleen*) En bazo, observamos.....y curiosamente una bajada de la expresión de IL-10.

(Slide 53 – *Lipin-2 effects on TLR4 signaling and inflammasome activation*) Por tanto, los animales carentes de lipina-2 tiene mayor facilidad para desarrollar inflamaciones sistémicas, dependientes posiblemente de la activación del inflamasoma, si se dan las condiciones apropiadas. Por tanto, ayudados, los ratones carentes de lipin-2 recapitulan la inflamación sistémica que ocurre en pacientes.

(Slide 54 – *Lipin-2 protects animals against exacerbated inflammation*) En conclusión... la lipina-2 protege a los animales de una inflamación sistémica exacerbada.

(Slide 55 – *Acknowledgements*). Agradecimientos y despedida. Fuentes de financiación.

REFERENCES

1. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Gil-de-Gómez, C. Guijas, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2011. Subcellular localization and role of lipin-1 in human macrophages. *J. Immunol.* 186: 6004–6013.
2. Valdearcos, M., E. Esquinas, C. Meana, L. Peña, L. Gil-de-Gómez, J. Balsinde., and M. A. Balboa. 2012. Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J. Biol. Chem.* 287: 10894–10904.
3. Meana, C., L. Peña, G. Lordén, E. Esquinas, C. Guijas, M. Valdearcos, J. Balsinde., and M. A. Balboa. 2014. Lipin-1 integrates lipid synthesis with proinflammatory responses during TLR activation in macrophages. *J. Immunol.* 193: 4614–4622.
4. Balboa, M. A., J. Balsinde, and E. A. Dennis. 1998. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in arachidonic acid mobilization in human amnionic WISH cells. *J. Biol. Chem.* 273: 7684-7690.

5. Johnson, C. A., M. A. Balboa, J. Balsinde, and E. A. Dennis. 1999. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidate phosphohydrolase in human amnionic WISH cells. *J. Biol. Chem.* 274: 27689–27693.
6. Gubern, A., J. Casas, M. Barceló-Torns, D. Barneda, X. de la Rosa, R. Masgrau, F. Picatoste, J. Balsinde, M.A Balboa, and E. Claro. 2008. Group IVA phospholipase A₂ is necessary for the biogenesis of lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 283: 27369–27382.
7. Gubern, A., M. Barceló-Torns, J. Casas, D. Barneda, R. Masgrau, F. Picatoste, J. Balsinde, M.A. Balboa, and E. Claro. 2009. Lipid droplet biogenesis induced by stress involves triacylglycerol synthesis that depends on group VIA phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 284: 5697–5708.
8. Gubern, A., M. Barceló-Torns, D. Barneda, J.M. López, R. Masgrau, F. Picatoste, C.E. Chalfant, J. Balsinde, M.A Balboa, and E. Claro. 2009. JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* 284: 32359–32369.
9. Guijas, C., G. Pérez-Chacón, A. M. Astudillo, J. M. Rubio, L. Gil-de-Gómez, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A₂-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *J. Lipid Res.* 53: 2343–2354.
10. Guijas, C., J. P. Rodríguez, J. M. Rubio, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2014. Phospholipase A₂ regulation of lipid droplet formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1841: 1661–1671.
11. Guijas, C., C. Meana, A. M. Astudillo, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2016. Foamy monocytes are enriched in cis-7-hexadecenoic fatty acid (16:1n-9), a possible biomarker for early detection of cardiovascular disease. *Cell Chem. Biol.* 23: 689–699.
12. Pérez-Chacón, G., A. M. Astudillo, D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2009. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A₂ and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791: 1103–1113.
13. Astudillo, A. M., D. Balgoma, M. A. Balboa, and J. Balsinde. 2012. Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1821: 249–256.
14. Peña, L., C. Meana, A. M. Astudillo, G. Lordén, M. Valdearcos, H. Sato, M. Murakami, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2016. Critical role for cytosolic group IVA phospholipase A₂ in early adipocyte differentiation and obesity. *Biochim. Biophys. Acta* 1861: 1083–1095.
15. Pindado, J., J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2007. TLR3-dependent induction of nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophage-like cells via a cytosolic phospholipase 2/cyclooxygenase-2 pathway. *J. Immunol.* 179: 4821–4828.
16. Casas, J., M. Valdearcos, J. Pindado, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2010. The cationic cluster of group IVA phospholipase A₂ (Lys488/Lys541/Lys543/Lys544) is involved in translocation of the enzyme to phagosomes in human macrophages. *J. Lipid Res.* 51: 388–399.
17. Casas, J., C. Meana, E. Esquinas, M. Valdearcos, J. Pindado, J. Balsinde, and M. A. Balboa. 2009. Requirement of JNK-mediated phosphorylation for translocation of group IVA phospholipase A₂ to phagosomes in human macrophages. *J. Immunol.* 183: 2767–2774.
18. Casas, J., M.A. Gijón, A.G. Vigo, M.S. Crespo, J. Balsinde, and M.A. Balboa. 2006. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate anchors cytosolic group IVA phospholipase A₂ to perinuclear membranes and decreases its calcium requirement for translocation in live cells. *Mol. Biol. Cell* 17: 155-162.
19. Casas, J., M.A. Gijón, A.G. Vigo, M.S. Crespo, J. Balsinde, and M.A. Balboa. 2006. Overexpression of cytosolic group IVA phospholipase A₂ protects cells from calcium-dependent death. *J. Biol. Chem.* 281: 6106–6116.