



ESTUDIO DEL INFLAMASOMA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN

(STUDY OF INFLAMMASOME IN LUNG CANCER CELLS)

Trabajo Fin de Máster

Nuria Jurado Luque

Director: Juan Carlos Acosta Cobacho

Codirectora: Andrea Quintanilla Cavia

Junio 2022

Máster Interuniversitario en Biomedicina y Biología Molecular

Facultad de Medicina
Universidad de Cantabria; Universidad del País
Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Índice

ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	5
¿Qué es el inflamasoma?	5
Rutas de activación del inflamasoma	6
Funciones de los componentes del inflamasoma	7
Caspasas	7
ASC	7
Piroptosis	8
Gasderminas:	9
Relación entre el inflamasoma y el cáncer	10
La senescencia celular	10
OBJETIVOS	11
MATERIAL Y METODOS	12
Cultivos celulares	12
Western Blot	13
Detección de la oligomerización de caspasa-4 y ASC	20
RT-qPCR	21
Ensayo de senescencia en la línea celular A549	23
Ensayo de diferenciación e inducción del inflamasoma en las THP-1	24
Determinación de contenido celular por tinción de cristal violeta (0.5%) en cultivos de células adherentes	25
Ensayo de Beta-galostidasa asociada a senescencia	26
RESULTADOS	27
1. La diferenciación de células THP-1 a macrófago con PMA potencia la activación del inflamasoma con Nigericina	27

A) Diferenciación de THP-1 a macrófagos con PMA.....	27
Poner a punto la diferenciación y la inducción del inflamasoma en las THP-1 es el objetivo de este ensayo ya que se usará de control con respecto a las células en las que no se conoce el comportamiento de su inflamasoma.	
B) Ensayo de la activación del inflamasoma en THP-1 diferenciadas.....	30
2. La senescencia celular inducida por diversos agentes terapéuticos en células de cáncer de pulmón A549 induce la expresión de diversos componentes de la ruta del inflamasoma y la piroptosis.	
A) Puesta a punto de un sistema de inducción de senescencia por agentes terapéuticos.	36
B) Análisis de la expresión de componentes del inflamasoma en la senescencia inducida por terapia en A549.	41
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	45

Índice de Figuras

Figura 1 – esquema del inflamasoma (Practical guide inflammasomes, Invivoen intocus).....	6
Figura 2 -La activación de la caspasa 1 o la caspasa 11 puede provocar piroptosis.	8
Figura 3 - muestra que se produce cuando se forma el poro en la membrana.....	9
Figura 4 - Durante la piroptosis, NINJ1)(Pandey et al., 2021)	10
Figura 5-características de células senescentes (Calcinto et al, 2019)	11
Figura 6 -el tratamiento De células THP-1 con PMA induce diferenciación a macrófagos y con a Nigericina induce muerte.	28
Figura 7 -el tratamiento de células THP-1en diferentes condiciones con PMA y/o Nigericina induce diferencias en la expresión mRNA de la familia de las gasderminas y NINJ1.	29
Figura 8 -el tratamiento de células THP-1en diferentes condiciones con PMA y/o Nigericina induce diferencias en la expresión mRNA en componentes del inflamasoma.....	30
Figura 9 -En la membrana de PVDF con una mayor concentración de proteína se observa el GDMD cleave, proteína de bajo peso molecular.	31
Figura 10 -células HPNE-tert ER:RAS con y sin tamoxifeno	32

Figura 11 -el tratamiento De células THP-1 con PMA y Nigericina induce expresión de casp-4 e IL1	34
Figura 12 – inducción de GSDMD con PMA en THP-1... ..	34
Figura 13 -cultivo celular de las THP-1 con las diferentes condiciones	35
Figura 14 a) -cross linking THP-1 y HPNE-tert ER:RAS incubado con el anticuerpo de caspasa-4 b) cross linking THP-1 incubado con el anticuerpo de ASC. Las TH.	36
Figura 15 -el tratamiento de las células A549con Palbociclib, nutlin-3 y etopósido inducen cambios morfológicos y reducción del contenido celular..	38
Figura 16 - el tratamiento de las células A549con Palbociclib, nutlin-3 y etopósido inducen cambios morfológicos y reducción del contenido celular.	39
Figura 17 --el tratamiento de las células con Palbociclib, nutlin-3 y etopósido induce diferencias en la proliferación celular. Escáner del cristal violeta en el ensayo senescencia en A549	40
Figura 18 -tinción de beta-gal en las células A549 con tratamiento para la inducción de senescencia.....	41
Figura 19 -la expresión de GSDME y NINJ-1 en las tres vías de inducción del inflammasoma se ve aumentada con respecto a las demás GSDM. Expresión de mRNA por RT- qPCR de la familia de las gasderminas en las diferentes condiciones de A549.....	42
Figura 20 -la expresión de Casp-4; IL1B;GSDMD; se ve aumentada su expresión por Palbociclib a diferencia de GDMEy NINJ-1 que se ve aumentada su expresión por Nutlin-3a.....	43

Índice de Tablas

Tabla 1 – Anticuerpos Primarios.....	16
Tabla 2 - Anticuerpos Secundarios	16
Tabla 3 - ejemplo para calcular volúmenes de muestras para el Western Blot	18
Tabla 4 - ejemplo de plantilla para cargar la placa de PCR	22
Tabla 5 - referencias de oligos usados	22
Tabla 6 - compuestos usados para la inducción de senescencia.....	23
Tabla 7 - compuestos usados en THP-1	24
Tabla 8 – preparación del cristal violeta al 0.5%	26
Tabla 9 -valores para la densidad celular mediada por espectrometría.	40

ABSTRACT

The inflammasome is a cytosolic multiprotein complex system defending the cell against external attacks or aberrations of its own. Inflammasomes are molecular platforms activating the pro-inflammatory caspases (caspase-1, -4 and -5) which induce a cascading activation of different routes that ends in the activation of the interleukin-1 pathway, or the rupture of the cell membrane producing inflammatory dying by pyroptosis. This proptosis is mediated by a family of proteins called gasdermins (GSDM), where the best known is GSDMD. GSDMD is cleaved into its two units by the proinflammatory caspases, and its N-terminal fragment forms lytic pores in the cell membrane. We aim to study the inflammasome and pyroptosis as a therapeutic target in cancer. To do this, we study the expression of the components of the inflammasome and their alteration in lung cancer cells. first, we set up controls of the pathway in THP-1 cells, which are cells of the immune system known to respond to distinct inflammasome activating stimuli. Second, we assessed the expression of the components inflammasome and pyroptotic pathways caspase 1; caspase 4; IL1B; GDMD; GSDME and NINJ1 in lung cancer cell lines at protein and mRNA level. Finally, we studied if activation of cellular senescence in lung cancer cells with different drugs used in the clinic modulate the inflammasome pathway. Our overall aim is to understand the spectrum of alterations of the pathways activating inflammasomes and pyroptosis in cancer cells which could lead to the identification of a therapeutic target for the clinic.

INTRODUCCIÓN

¿Qué es el inflammasoma?

Un conjunto de proteínas citosólicas que dan lugar a un complejo de proteínas multimericas, definen el concepto de inflammasoma. Las caspasas inflamatorias, son proteasas, esenciales en la actividad de la cascada de reacciones, desencadenando un mecanismo de defensa del huésped (célula) contra agentes infecciosos y daño celular (Man & Kanneganti, 2015). La activación de este complejo y el desarrollo de la cascada se inician mediante los receptores de patrones de reconocimiento (PRR) (Fang et al.,). La activación del inflammasoma puede desencadenar todo el proceso de respuesta inflamatoria pudiendo desencadenar un proceso de muerte celular programada, a través de un proceso llamado piroptosis.

Rutas de activación del inflamasoma

Según las diferentes bibliografías se pueden clasificar los inflamasomas en canónicos y no canónicos. El inflamasoma canónico son dependientes de los diferentes PRR que responden a (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daños (DAMPs). Por el contrario, el inflamasoma no canónico hace referencia a los que se activan por la señal de lipopolisacáridos(LPS) intracelulares.

Los inflamasomas canónicos están definidos por los PRR de la familia AIM2NLR, como NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12 y NLRC4 que activan la caspasa-1. El inflamasoma no canónico está definido por relación con caspasa-11 en el ratón, siendo su homólogo en humanos caspasa-4 y -5(Ys, 2020), que actúa como receptor de LPS y proteasa efectora.(figura 1)

Los PRR pueden inducir, la oligomerización de una proteína llamada ASC, que es una proteína adaptadora, la cual la caracteriza un dominio de reclutamiento de caspasa. ASC conecta NLR con pro-caspasa 1, esta acción no siempre es necesaria.(Kelley et al., 2019)(figura 2).

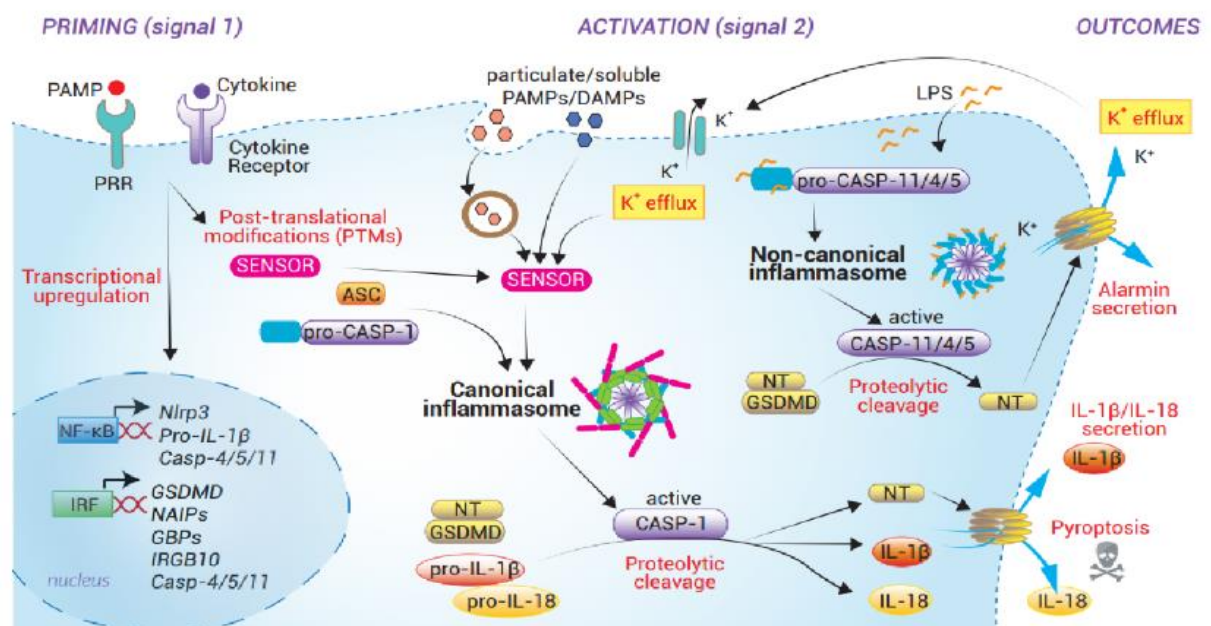


Figura 1 – esquema del inflamasoma (Practical guide inflammasomes, Invivoen intocus)

Funciones de los componentes del inflamasoma

Como ya se comentó anteriormente, el inflamasoma es un conjunto mutliproteico, en el que cada componente tiene una función para que todo el andamio pueda funcionar. Estas funciones se conocen en mayor o menor media, aún queda por conocer la red completa y las relaciones entre todos los nexos.

Caspasas

Las caspasas son una familia de cisteína proteasas intracelulares. Cuando se encuentra en estado activo, desencadenan la activación de citoquinas, como es la IL-1 β (Benaoudia et al., 2019).

Caspasa-1

Caspasa-1 (CASP-1) se sintetiza como un zimógeno pro-caspasa1 inactivo compuesto por un dominio CARD N-terminal y dos subunidades catalíticas, p20 y p10, la subunidad CARD N-terminal es la que tiene actividad enzimática, con capacidad de procesar las citoquinas proinflamatorias(IL-1 β e IL-18) inactivas a su forma activa (Franchi et al., 2009). El mismo efecto tiene sobre gasdermin D (GSDMD)

Caspasa-4:

Caspasas-4 y -5 (CASP-4/5) en humanos y caspasa-11 (CASP-11) en los ratones. Son moléculas que al igual que CASP-1 se sintetiza en su forma inactiva. El efector que tiene la capacidad de escindirla y activarla es LPS. Una vez se encuentra en su forma biológica activa, tiene la capacidad de activar a GSDMD.

ASC

ASC también es conocido como PYCARD, es una proteína adaptadora con un dominio PYD (dominio de pirina) y un dominio CARD(Dominio de reclutamiento de caspasa). Esta proteína adaptadora permite el ensamblaje entre PRR y pro-caspasa-1. Esto ocurre en el inflamasoma no canónico, que esta mediado por caspasa-4. ASC no es siempre necesario para el desarrollo de la activad del inflamasoma.

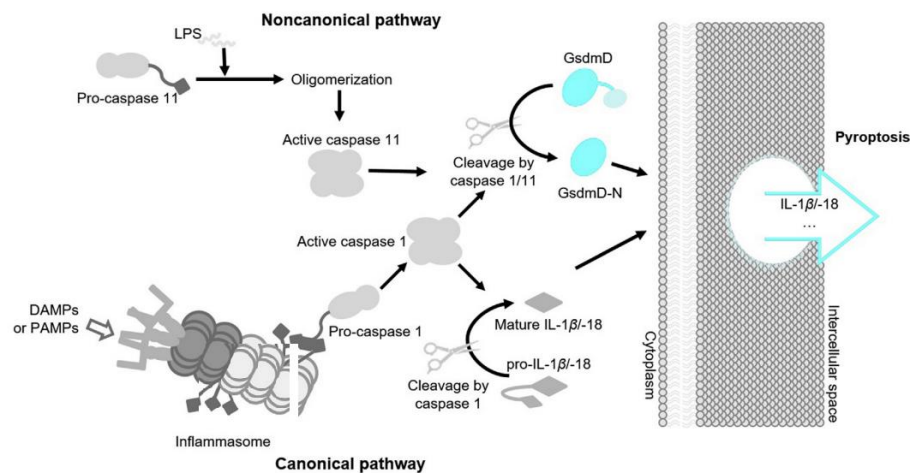


Figura 2 -La activación de la caspasa 1 o la caspasa 11 puede provocar piroptosis. La pro-caspasa 11 es activada directamente por LPS, lo que conduce a la caspasa 11 activada que escinde GsdmD. La pro-caspasa 1 es activada por el dominio de reclutamiento CARD después de la activación del receptor y la formación del inflammasoma. Caspasa 1 puede activar GsdmD e IL-1 β /IL-18 (Be et al., 2021).

Para poder continuar hablando de los componentes del inflammasoma, es importante que el concepto de piroptosis se conozca bien, ya que la familia de las gasderminas está directamente relacionada con él.

Piroptosis

La piroptosis es una muerte celular programada, provocada por una cascada de señalizaciones que tienen un efecto inflamatorio. Este efecto se traduce en ruptura de la membrana celular y consecuentemente del equilibrio iónico y osmótico que había en ella. Con la ruptura de esta membrana se provocará una salida y entrada de iones junto con otras sustancias que finalizarán en una muerte celular. Entre sustancias proinflamatorias que se liberan tenemos IL1 β , IL-18, ATP y HMGB1, que inducen respuestas inflamatorias (Xia et al., 2019).

Se sabe recientemente que la piroptosis está mediada por una familia de proteínas llamadas gasderminas (GSDM) (Li et al., 2021; X et al., 2021), estas se activan mediante una escisión mediada por las diferentes caspasas que tiene a su GSDM diana. Con esta escisión liberará el dominio gasdermina-N amino-terminal y gasdermina-C carboxi-terminal. El fragmento N-terminal de GSDM se une a los fosfolípidos de la membrana celular donde formarán los poros que llevarán a la muerte de la célula (figura 3)

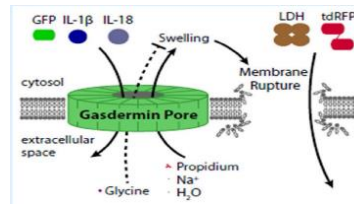


Figura 3 - muestra que se produce cuando se forma el poro en la membrana(Sun et al., 2021)

Gasderminas:

Las GSDM fueron identificadas recientemente, como ya se ha estado comentando con anterioridad, como las mediadoras de la piroptosis inflamatoria, formando poros en la membrana celular, que liberan citoquinas proinflamatorias y alarminas, dañando el equilibrio de la célula y consecuentemente desencadenando su muerte(X et al., 2021).

La familia GSDM incluye gasdermina A (GSDMA), gasdermina B (GSDMB), gasdermina C (GSDMC), gasdermina D (GSDMD), gasdermina E (GSDME) y DFNB59(Li et al., 2021; X et al., 2021).

En los últimos años, los estudios han concluido la vía canónica y no canónica del inflamasoma finalizan en la activación del evento de piroptosis y que en ambos casos está asociada a GSDMD. La activación de caspasas a través de cualquiera de las vías conduce a la escisión de GSDMD, que libera el dominio efector N-terminal de GSDMD e inicia la piroptosis. Recientemente en los estudios de Wan(Wang et al., 2017) se sugirió la implicación de otra GSDM, GSDME. En estos estudios pudieron comprobar que los fármacos quimioterapéuticos pueden inducir piroptosis a través de la escisión de caspasa-3 de GSDME (Li et al., 2021; Wang et al., 2017).

Estudios muy recientes hacen referencia a la proteína Ninjurin-1 (NINJ1) , como proteína que controla la piroptosis en una etapa tardía Según este estudio, NINJ1 es necesaria para conseguir la ruptura de la membrana plasmática después de la formación de poros de GSDMD.

NINJ1 es una proteína de superficie de adhesión transmembranal celular. En estudios se ha observado que Ninj1 se encuentra sobre expresada en el cáncer humano, pero no está claro cuál es el efecto que genera en la tumorigénesis. Los estudios indican que Ninj1 está regulada transcripcionalmente por p53 y puede ser inducido por el daño al ADN de forma dependiente de p53(Cho et al., 2013).

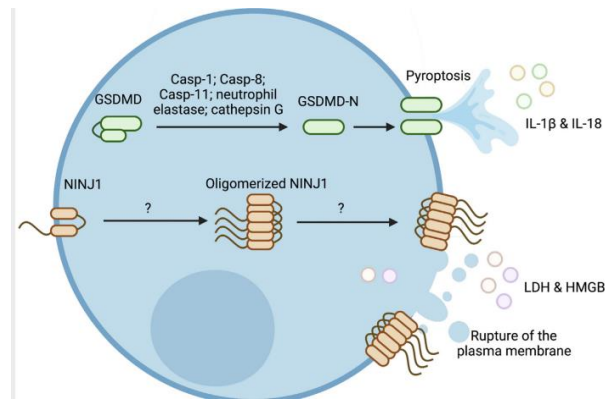


Figura 4 - Durante la piroptosis, NINJ1 sufre oligomerización, lo que lleva a la ruptura de la membrana plasmática en las etapas finales de la piroptosis. La ruptura de la membrana plasmática media la liberación de proteínas citosólicas más grandes, como la lactato deshidrogenasa (LDH) y la caja del grupo de alta movilidad (HMGB)(Pandey et al., 2021)

Relación entre el inflamasoma y el cáncer.

Se puede determinar una relación entre el inflamasoma y las células cancerígenas, ya que la inflamación se considera como un biomarcador en el desarrollo y evolución del cáncer(Sharma & Kanneganti, 2021). Varios estudios sugieren que en cáncer, el inflamasoma se caracteriza por niveles elevados de IL-1 β e IL18, activación de la señalización NF- κ B, aumento del estrés oxidativo mitocondrial, y activación del proceso autofágico(Zhiyu et al., 2016).

Los efectos de la piroptosis sobre las células cancerígenas varían entre los diferentes tipos de tejidos y las diferencias genéticas que hay en la diversidad celular que hay en ellos. La relación entre piroptosis y cáncer es ambiguo, ya que por un lado, la piroptosis puede inhibir la aparición y el desarrollo de tumores, pero, por otro lado, como la muerte proinflamatoria, puede formar un microambiente adecuado para el crecimiento de células tumorales y, por lo tanto, promover el crecimiento tumoral(Xia et al., 2019)

La senescencia celular

La senescencia es un estado celular que consistente en la detención del ciclo celular, con un fenotipo secretor, un metabolismo alterado y daños a nivel molecular que puede ser desencadenado por diferentes mecanismos de respuesta a estrés celular (Fernández-Duran et al., 2022). Las células senescentes producen y secretan factores solubles e insolubles, incluyendo citoquinas, quimiocinas, proteasas y factores de crecimiento, conocidos como el fenotipo secretor

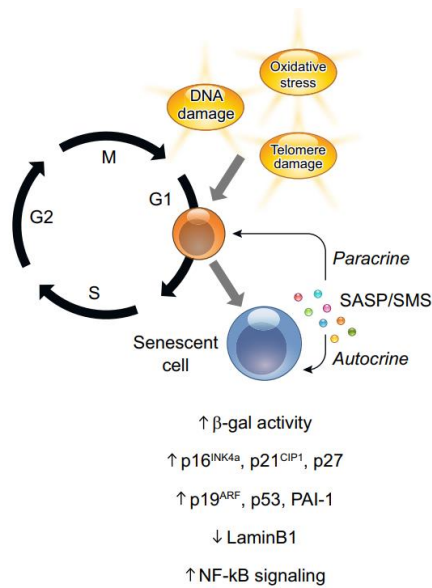


Figura 5-características de células senescentes (Calcinto et al, 2019)

asociado a la senescencia (SASP) y la señalización de la interleucina-1 (IL-1) es una de sus vías críticas de señalización.

Hay datos bibliográficos que indican una relación cercana entre PRRs y la senescencia celular (Fernández-Duran et al., 2022; Wang et al., 2017). Estos estudios previos han demostrado que la senescencia celular se ve influenciada por una respuesta de estrés por la activación de caspasa-4 mediada por LPS. Este evento depende de la caspasa-4, GDMD y del supresor de tumores p53. Además, observaron que el inflamasoma no canónico de caspasa-4 se induce y ensambla en respuesta a la señalización RAS oncogénica durante la

senescencia inducida por oncogenes (OIS), y que es un regulador del SASP y del ciclo celular en este proceso (Fernández-Duran et al., 2022).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la expresión de los diferentes componentes del inflamasoma en un panel de líneas celulares de cáncer de pulmón como punto de inicio para tratar de establecer la manipulación de dichos componentes para inducir piroptosis como estrategia en terapias contra el cáncer.

Para establecer controles, pusimos en marcha de una serie de experimentos en líneas celulares de macrófagos del sistema inmune (THP1) descritas previamente, que poseen activas rutas del inflamasoma, y que por lo tanto se usaran de control para el estudio de líneas celulares cancerígenas. De esta forma, nos aseguramos que los resultados obtenidos en las líneas celulares en estudio son fiables y concluyentes.

Por tanto, los objetivos específicos son:

- 1) Poner a punto controles de la activación del inflamasoma en las células THP-1:

- estudiar la expresión de las caspasas (en este caso caspasa 4 y caspasa 1) en la línea celular de THP-1 en diferentes condiciones.
 - estudiar la expresión de las proteínas diana del inflammasoma y piroptóticas (gasderminas) (especialmente GSDMD y GSDME) en la línea celular de THP-1 en diferentes condiciones.
 - Correlación entre expresión de las caspasas y de las GSDM y NINJ1.
- 2) Determinado la relación de la senescencia con la activación del inflammasoma en células de cáncer de pulmón A549 inducidas a senescencia con diferentes tratamientos.

MATERIAL Y METODOS

Cultivos celulares

Las dos líneas celulares usadas en este proyecto han sido las A549 y las THP-1.

La línea célula A549 según el certificado de la casa comercial ATCC, son células epiteliales de carcinoma de pulmón de humano y crecen en adhesión.

El modo de cultivarlas es en medio DMEN Sigma (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucosa), contiene 4500mg/L glucosa; L-glutamina y bicarbonato sódico, no contiene piruvato sódico líquido. Este medio lo suplementamos con un 10 % de suero fetal bovino (FBS Gibco); 500 uL de ciproxina que se encuentra a una concentración de 2mg/ml y 5ml de antibiótico que se encuentra a 100x de Gibco.

La línea celular de las THP-1 según el certificado de ATTC son monocitos aislados de sangre periférica procedente de paciente humano con leucemia, estas crecen en suspensión.

El modo de cultivarlas y mantenerlas en crecimiento en el laboratorio es en medio RPMI y suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS Gibco); 500 uL de ciproxina que se encuentra a una concentración de 2mg/ml y 5ml de antibiótico que se encuentra concentrado a 100x de Gibco.

Para realizar subcultivo lo hacemos de dos formas diferentes:

Para las células A549 aspiramos el medio y le hacemos un lavado con PBS, como son células adherentes hay que levantarlas para ello se le añade 1.5ml de tripsina Gibco y se pone en el incubador por dos minutos, después desactivamos y recogemos las células con 6ml de su medio

y lo centrifugamos a 1200rpm durante 3 minutos, así obtenemos un pellet al cual le aspiramos el sobrenadante y lo resuspendemos en 1ml de su medio. Previamente hemos preparado las nuevas placas con 10ml de medio fresco y le añadimos la parte correspondiente de la suspensión celular según la dilución que queramos obtener.

Para las células THP-1 al ser células en suspensión obviamos el paso con tripsina y tan solo tenemos que recoger las células su medio en un tubo de 15ml y de ahí resuspendemos suavemente para que no precipiten las células y se las añadimos a las nuevas placas con medio fresco para tenerlas en la dilución que queremos obtener. Por ejemplo, si queremos una dilución 1:2 ponemos en la placa 5ml de medio fresco y 5ml del medio con células.

Otras células que han sido usada en este proyecto para tenerlas como control son hTert- HPNE.

Según ATTC son una línea hTERT-HPNE desarrolladas a partir del conducto pancreático humano por transducción con un vector de expresión retroviral (pBABEpuro) que contiene el gen hTERT. Las células infectadas se volvieron positivas para la telomerasa, no envejecieron y seguían proliferando después de más de 150 duplicaciones.

Las células hTERT-HPNE se infectaron con los vectores retrovirales pLNC-ER:RAS y pLXS-ER:Stop, para inducir el gen RAS. Estas células las nombraremos en el texto como células ER:Ras y ER:Stop, respectivamente.

La translocación de RAS al núcleo se indujo mediante la adición de 4OHT (Sigma) (tamoxifeno) que promueven la senescencia inducida por oncogenes (OIS)

Western Blot

Es una técnica basada en detectar proteínas mediante una electroforesis en gel, separándose las proteínas en función de su tamaño, tras ser transferida una membrana absorbente, se incuba dicha membrana con un anticuerpo específico a la proteína problema. Esta es detectada por un método de quimioluminiscencia.

Materiales necesarios para el procedimiento:

1. Buffer de lisis (Ripa en total 50ml que se han alicuatado y congelado):

- 1.5mL de NaCl 5M
- 2.5 mL tris pH 6.8
- 0.25gr Na DOC
- 500uL Np40
- 500uL SDS al 10%
- miliQ hasta 50mL

2. Buffer running:

Es Tris-glicina SDS running buffer, de la casa comercial novex y lo tenemos al 10x (referencia LC2675), lo tenemos que usar al 1x.

3. Buffer de transferencia

Según la membrana que usemos, PDVF o nitrocelulosa, para la transferencia necesitaremos un buffer u otro.

Para las membranas de PDVF usamos buffer con 20% de MeOH:

- 700mL de agua destilada
- 200mL de MeOH
- 100Ml tris glicina pH sin ajustar.

Para las membranas de nitrocelulosa usamos el buffer con 10% de MeOH:

- 800mL de agua destilada
- 100mL de MeOH
- 100Ml tris glicina pH sin ajustar.

buffer de carga :

Usamos laemmlí SDS buffer que se encuentra al 6x y es de la casa comercial Alfa Aesar (referencia 361337)

Geles:

Son de la casa comercial invitrogen y hemos usado novex 10-20% TrisGlicina 1.0mm x 12 pocillos (referencia XP10202BOX). Estos geles hay que tenerlos en la cámara de frío a 4°C.

las membranas usadas son de PDVF y de nitrocelulosa. Las de PDVF las hemos usado para poder detectar las proteínas de bajo peso molecular y las de nitrocelulosa para las de mayor peso molecular.

TBS:

- 950mL de agua miliQ
- 20mL
- 30mL

TTBS:

- 950mL de agua miliQ
- 20mL
- 30mL
- 500uL de Tween

-

Preparación del bloqueo:

Ponemos leche al 5% en TBS

Preparación anticuerpo primario:

Ponemos 1%BSA en TTBS con la concentración de anticuerpo primario, según la tabla1

Preparación anticuerpo secundario:

Ponemos 1%BSA en TTBS con la concentración de anticuerpo secundario, según la tabla 2

Tabla 1 – Anticuerpos Primarios

Anticuerpos primarios	Referencia	Concentración usada
IL1B- mousse	Mab201 R&d sistem	1:1000
Caspasa-1	D7F1O cell signaling	1:1000
Caspasa-4- mouse	Sc-56056	1:1000
GSDMD full length	E8g3f cell signaling	1:1000
GSDME	Ab215191 abcam	1:500
ASC	Sc-74562	1:1000
ACTINA HRP	A3854 Cell signaling	1:80000

Tabla 2 - Anticuerpos Secundarios

	Referencia	concentración
Mousse	A2554-1ml sigma	1:10000
Rabbit	7074s Cell signaling	1:10000

Procedimiento:

1. Primero se activa el sonicador al menos media hora antes de que se vaya a usar, se prepara a 4°C y 10 ciclos a 30" on 30" off y también preparamos la centrifuga a 4°C y 14000rpm.
2. Se prepara el buffer de lisis RIPA, normalmente 3-5 millones de células/muestra se lisan en 150uL de buffer, si el pellet que obtenemos es de menor cantidad se lisarán en menos volumen, ya que de lo contrario las proteínas estarán muy diluidas y habrá error en la determinación de la concentración.
3. Al buffer RIPA le añadimos mix de inhibidores de fosfatasa y proteasa que se encuentra concentrado al 100X.
4. Se ponen los pellets de las células en hielo que pueden ser recién colectados o los podíamos tener almacenados a -80°C. Resuspendemos la muestra en el volumen

necesario del buffer RIPA, se dejan 7 minutos en el hielo y se vuelven a resuspender manteniéndolas otros 7 min en hielo.

5. Transcurrido el tiempo llevamos las muestras en el sonicador tal y como se dice en el punto 1.
6. Centrifugar a 4°C durante 20 minutos a 14000rpm.
7. Una vez centrifugadas las células se recoge el sobrenadante y se pasan a tubos nuevos y bien rotulados.
8. Para determinar la concentración de proteína se hace por la técnica de Bradford (si no se hace el mismo día las muestras se deben de congelar a -80°C).

Determinación de la concentración de proteínas por Bradford:

- Se prepara una solución de buffer de cuantificación de proteína a 1:5, que en nuestro caso es de la casa comercial Bio-Rad(referencia 132716)
- se preparan los 8 eppendof para la curva patrón y los tubos que necesitemos para las muestras.
- A cada eppendof se le añade 400uL de la solución 1:5
- A los eppendof correspondientes para la curva patrón se le añade 2 uL de la concentración de estándar que le corresponda, que son concentraciones conocidas (al primero no se le añade nada, ya que será el blanco)
- A los eppendof de las muestras también se le añade 2 uL de su muestra correspondiente.
- Se agita en el voltex y si alguna de las muestras es de un color azul más intenso que el del estándar más concentrado se hace una dilución 1:2 hasta que este colorimétricamente se vea que está en el rango.
- Se pone por duplicado en una placa de 96 pocillos y se hace una lectura colorimétrica a 595nm.
- En una plantilla de Excel que previamente hemos generado ponemos los datos obtenidos para poder obtener la curva patrón y los valores obtenidos, y así poder determinar que concentración de proteína tenemos en cada muestra.

Una vez conocida la concentración de proteína total en nuestras muestras, podremos preparar para cargar la cantidad que se necesita para poder hacer la electroforesis , suele ser entre 50-80 microgramos de proteína. Para ello usamos una tabla de Excel que nos hemos generado para poder

tener que volumen de cada componente necesitamos para la cantidad de proteína que necesitamos, tal que:

Tabla 3 - ejemplo para calcular volúmenes de muestras para el Western Blot

	[muestra ori ug/ul]	[muestra ul] 60 ul]	buffer lisis 60 ul]	laemmli 6x 6	Volumen final (ul) 40
muestra 1	4,76	12,6	20,7	6,7	40
muestra 2	5,2	11,5	21,8	6,7	40
muestra 3	4,1	14,6	18,7	6,7	40
muestra 4	2,44	24,6	8,7	6,7	40
muestra 5	4,52	13,3	20,1	6,7	40
muestra 6	2,92	20,5	12,8	6,7	40
muestra 7	1,32	45,5	-12,1	6,7	40
muestra 8	1,53	39,2	-5,9	6,7	40
muestra 9	2,44	24,6	8,7	6,7	40

Por lo que de una forma rápida y sencilla podremos preparar las muestras para cargarlas en el gel. Una vez tenemos las muestras preparadas las incubamos a 95° durante 5 minutos.

Mientras tenemos las muestras incubamos las muestras, vamos colocando el gel en la cubeta y colocando el running buffer para realizar la electroforesis, que es colocar las muestras en el gel y conectarlas a una corriente continua para que las proteínas se vayan separando según su peso molecular, con lo que podremos conocer el peso molecular de las proteínas, ya que en uno de los pocillos se pone un marcador molecular del cual se conocen los pesos moleculares de las bandas. En nuestro caso hemos usado el marcador molecular de la casa comercial BioLABS y con referencia P7712S.

Una vez tenemos las muestras listas y la cubeta preparada se cargan las muestras una por pocillo, poniendo en el primer pocillo un marcador de peso molecular.

En nuestro caso la dejamos correr a 100 v hasta que tanto el marcador como las muestras hayan salido de los pocillos correspondientes (aproximadamente 15 min). Después pararemos la electroforesis y subiremos el voltaje a 150v, con lo que irá más rápido la separación de proteínas. Dejamos la corriente conectada hasta que el frente de las proteínas se encuentre abajo del gel, es muy importante que paremos la electroforesis antes de que el frente se salga del gel pues podríamos perder nuestras proteínas de interés.

Ahora se pasa a la fase de transferencia, en este momento necesitamos transferir las proteínas que están separadas en el gel a la membrana de nitrocelulosa o de PDVF.

En ambas membranas el procedimiento es igual, pero en las membranas de PDVF tenemos un paso previo, que es impregna la membrana con metanol para activarla y después lavar con agua. Los siguientes pasos son iguales para las dos membranas (aunque como se dijo previamente cada una tiene un buffer ligeramente diferente).

Es una técnica tipo sándwich donde en la parte del medio tenemos la membrana y el gel, en las dos caras exteriores tenemos papel de filtro y en los extremos unas esponjas y todo esto se encuentra encapsulado en una estructura rígida que ira dentro de la cubeta. Toda ira previamente impregnada en su buffer.

En esta cubeta pondremos el buffer de transferencia y la tapa de la cubeta ira a una fuente de alimentación donde la tendremos a 400mA durante no más de una hora, para que las proteínas se puedan transferir desde el gel a la membrana correspondiente. Es muy importante que no esté en la corriente eléctrica más de una hora, pues podríamos perder las proteínas, si nuestra proteína de interés es de muy bajo peso molecular es necesario que este menos de una hora.

Una vez tenemos las proteínas en la membrana hay que poder identificar específicamente la que nos interesa, para ello se usa técnicas de inmunodetección que se basan en el reconocimiento específico y la fuerte afinidad de unión entre un antígeno y un anticuerpo específico. Generalmente se utiliza un "sándwich" o ensayo indirecto: el anticuerpo específico (policlonal o monoclonal) se une a la proteína y posteriormente un segundo anticuerpo localiza la posición del complejo antígeno-anticuerpo. El anticuerpo secundario suele estar marcado enzimáticamente.

Una etapa preliminar es la de bloqueo de sitios inespecíficos en la membrana. Un bloqueo eficiente es esencial para minimizar la unión no específica de los anticuerpos y así mejorar la relación señal específica/ruido. Se suelen usar distintas proteínas (leche, BSA, suero de caballo.) y detergentes (Tween20), teniendo en cuenta siempre la compatibilidad del agente bloqueante y el método de detección. En nuestro caso hemos usado leche al 5% en TBS. Lo dejamos en la membrana en agitación durante una hora.

Después lavamos rápidamente con TTBS y colocamos el anticuerpo primario a la concentración requerida (ver tabla 1), lo dejamos hasta el día siguiente en la cámara fría a 4°C en agitación

Finalizado el periodo de incubación del anticuerpo primario, hacemos 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y pondremos el anticuerpo secundario durante 45 minutos.

Los anticuerpos secundarios generalmente son especie-específicos, es decir, reconocen anticuerpos originados de especies específicas: ratón, conejo, rata...También se puede usar fragmentos de

anticuerpo F(ab')₂ obtenidos por digestión del anticuerpo purificado con pepsina dando una molécula de inmunoglobulina sin la región Fc. Esto resulta útil para reducir la unión no específica de la porción Fc.

Finalmente se realiza otros 3 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS y ya estará listo para el revelado.

Para la detección, el anticuerpo secundario suele estar unido a una enzima, generalmente fosfatasa alcalina o peroxidasa. Actualmente el más generalizado, y el que hemos usado, es el sistema de detección por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) en el que el anticuerpo secundario está conjugado con la peroxidasa. En la reacción se obtiene una emisión de luz que es posible registrar en una película de autorradiografía.

Detección de la oligomerización de caspasa-4 y ASC

Con este ensayo se pretende saber si las proteínas del inflammasoma oligomerizaban con caspasa-4 y/o con ASC. Esto se puede observar en un Western Blot como un retraso en la migración de la proteína Casp-4 y/o ASC., por lo que se apreciara en las bandas de un mayor peso molecular a las que les corresponde.

Para este Western Blot que vamos a realizar, lo que cambia es la diferencia de lisar el pellet celular. Para ello usaremos el siguiente protocolo:

Pellet fresco de HPNE-tert ER:STOP; ER:RAS ;THP-1 PMA+/ Nigericina – y THP-1 PMA+/ Nigericina+ que se resuspenden en 0.5 ml de ice-cold buffer A (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5; 10 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 320 mM sucrose), se lisan haciéndolo pasar por una aguja de 25 10 veces y se centrifuga durante 8 min a 1.800 g a 4 °C. At . en este punto, 30 uL del lisado lo mantenemos como input control. El sobrenadante remante lo diluimos con 1 volumen CHAPS buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5; 5 mM MgCl₂; 0.5 mM EGTA; 0.1 mM PMSF; 564 0.1% CHAPS) y se centrifugo durante 8 min a 5,000 x g. el sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 50 uL of CHAPS buffer que contenía 4 mM de disuccinimidyl suberate (DSS) durante 30 minutos a temperatura ambiente para el cross-link de las proteínas. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 8 min at 5,000 x g a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 60 uL de buffer de carga (laemmli). Las muestras fueron calentadas por 2 min a 90 °C y 18 uL de este cross-linked pellet fue cargado en un gel 4-12% pre-cast Novex Tris-Glicina gel (Invitrogen).

El resto del proceso para la inmunodetección de caspasa-4 y ASC fue como el procedimiento de Western Blot.

RT-qPCR

La reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es una herramienta para el análisis y la cuantificación de la expresión génica. En qPCR, se utiliza un sistema de colorante reportero (SYBR-green) que se intercala con la región de interés de la muestra original, ya sea DNA o RNA(cDNA) y detecta la amplificación de la muestra.

Para poder realizar la qPCR primero debemos de obtener el RNA de los pellets obtenidos de nuestro cultivo celular, para ello:

Para lisar las células y homogenizar el lisado hemos usado QIAshredder (Qiagen) tal y como indica el fabricante, se puede seguir las instrucciones con la referencia 79654

el ARN se extrajimos utilizando el Kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) siguiendo todos los pasos de la casa comercial, se pueden ver con la referencia 79654

Una vez tenemos el ARN necesitamos determinar la concentración de RNA total que tenemos por muestra con el Nanodrop.

Teniendo ya la concentración de ARN lo hemos transformado en cDNA utilizando qScript cDNA Supermix, de la marca Bio-Rad, con la referencia 1708891 hemos seguido las instrucciones de uso.

Ya tenemos el cDNA para poder realizar la qPCR, para ello debemos seguir el siguiente protocolo:

Preparamos diferentes mix según los oligos de interés (ver tabla 1), los usados en estos ensayos. El que siempre vamos a necesitar es el de actina, pues es con el que se va a normalizar nuestra qPCR.

Cada mix contiene imprimación delantera de 200nM, imprimación inversa de 200nM del oligo, 1x SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) y agua destilada sin DNasa/RNasa. Prepararemos el volumen de mix según el número de muestras que tengamos, normalmente necesitamos 30 uL de mix por muestra. Para ello nos generamos primero una hoja de Excel con la tabla de volúmenes que necesitamos para que nos sea más fácil poder realizarlo. Por último, le damos un vortex y los mantenemos en la cubeta con hielo.

Tenemos que preparar tantos eppendorf como numero de muestras y de primer tengamos(ver tabla 5). Se pone primero 2 uL de la muestra (cDNA) en el fondo del tubo de microcentrífuga y añadimos 30uL de un mix. Ejemplo en la tabla 4

Tabla 4 - ejemplo de plantilla para cargar la placa de PCR

	Primer A	Primer B	Primer C
Muestra 1	Eppendorf 1 ^a	Eppendorf 1B	Eppendorf 1C
Muestra 2	Eppendorf 2 ^a	Eppendorf 2B	Eppendorf 2C
Muestra 3	Eppendorf 3 ^a	Eppendorf 3B	Eppendorf 3C

Antes de poner en la placa homogenizamos el tubo de microcentrífuga con el voltex.

Colocamos la placa en una gradilla isotérmica. Cada muestra ira por duplicado (lo recomendable es por triplicado), por lo que ponemos 15uL en el fondo del pocillo.

Tal y como hemos decidido colocar nuestras muestras en el pocillo tenemos que configurarla en programa *Step One Plus Real-Time PCR system de Applied Biosystem*

Tabla 5 - referencias de oligos usados

NOMBRE	SECUENCIA FW (5'-3')	SECUENCIA RV (5'-3')
ACTINA	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
CASPASA-1	ATAAACCTAGGATGGCCGA	AATAACTCGAGTTAATGTCCTGGGAAGAGGTAG
IL1B	TGCACGCTCCGGGACTCACA	CATGGAGAACACCACTTGT
CASPASA-4	AAGCTCATCCGAATATGGAG	ATTCTTCACATGAGGACAAAGC
NINJ HUM	CAGCTTCGCCTTCTATGTGC	CGAAGGCCGTGATGAAGATG
GSDMD	GCTGAGTGTGGACCCTAACA	CTTCCACCTCCTTCTGTGTCT
GSDMC	CTCTGTGGACCATGGATGCT	AGCCTCTGTCACACGTAC
GSDMB	CAGGGTTCCACCACCATCAGAA	GATGGCCCTGAAGAGATCTGG
GSDMA	AGACCACCCATTCTGAAGG	CCATCAGCTGTCTCACTCGA
GSDME	CCCCTGGTCTTTCGAGAGTT	AGCTGTTGGGCTCA

Ensayo de senescencia en la línea celular A549

Hemos querido desencadenar el estado senescente en las células A549 para poder estudiar el estado de su inflamasoma. Para ello inducimos senescencia por tres vías diferentes con tres compuestos que se describen en la tabla 6.

Tabla 6 - compuestos usados para la inducción de senescencia

Compuesto	Referencia	Acción
Palbociclib	chalbiochem 341205	Es un selectivo inhibidor de quinasas CDK4/6
Nutlin-3	chalbiochem 444143	es una pequeña molécula inhibidora de MDM2, la cual tiene como diana p53.
Etopósido	PD0332991	es un agente químico que actúa dañando el DNA

Para poder realizar el ensayo necesitábamos cuatro placas con A549 al 70% de confluencia aproximadamente y en cada una de ellas pusimos una condición:

Condición de control: pusimos DMSO, ya que es con lo que se disuelve el resto de compuestos

Condición con Palbociclib: lo pusimos a una concentración 10 μ M

Condición con Nutlin-3: lo pusimos a una concentración 10 μ M

Condición con Etopósido: lo pusimos a una concentración 100 μ M

El ensayo estuvo durante 7 días. Se le cambiaba el medio y se le añadía compuesto nuevo cada dos días, excepto para la condición de etopósido que a los dos días se le retiró el compuesto y no se le volvió a añadir, ya que es un compuesto muy tóxico y reducía muy considerablemente la confluencia celular.

Después de estos 7 días se recogían los pellets celulares y se guardaban a -80°C, estos se podían usar para ensayos de Western Blot o para qPCR.

Ensayo de diferenciación e inducción del inflamasoma en las THP-1

Con este ensayo queremos comprobar cómo la diferenciación a macrófago influye en la activación del inflamasoma.

Para la diferenciación de THP-1 a macrófagos hemos usado como estímulo Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)(Baxter et al., 2020). Y para la inducción del inflamasoma hemos usado Nigericina.

Tabla 7 - compuestos usados en THP-1

Compuesto	Referencia	Acción
PMA	524400	Diferenciación a macrófagos
Nigericina	481990	Inducción del inflamasoma

Para la diferenciación a macrófagos pondremos en la placa con la línea celular THP-1 al 100% de confluencia PMA a una concentración 100ng/ml durante 16 horas.

Y para la inducción del inflamasoma se pondrá Nigericina a 20uM durante 3 horas.

En el ensayo teníamos cuatro condiciones:

PMA-/NIGERICINA-: Esta condición es la usada como control, pues no lleva ni PMA Nigericina. se le puso la misma cantidad de DMSO que las PMA+ llevaban del mismo y después se le añadió el mismo volumen de etanol que las Nigericina+ llevaban de este.

PMA-/NIGERICINA+: tenía DMSO en vez PMA y Nigericina

PMA+/NIGERICINA-: PMA a la concentración indicada pero luego no se añadió Nigericina sino etanol

PMA+/NIGERICINA+: esta condición llevaba tanto PMA como Nigericina.

La forma de proceder al añadir los compuestos fue:

Añadir el volumen requerido para la concentración de 100ng/ml de PMA o en su defecto el mismo volumen de DMSO deja en el incubador por 16 horas. Posteriormente añadirles a las placas Nigericina+ el volumen que requería para tener la concentración final de 20uM o el mismo volumen de etanol a las que son Nigericina- dejar en el incubador durante 3 horas.

Se obtiene los pellets celulares rotulándolos correctamente. Estos se usarán en fresco o se almacenan a -80°C

Determinación de contenido celular por tinción de cristal violeta (0.5%) en cultivos de células adherentes

Con el colorante cristal violeta se detecta el contenido celular. El cristal violeta interactúa con el ADN, que es proporcional al número de célula. Las células que sufren muerte pierden su adherencia por lo que el proceso de tinción se pierde en esta población, reduciendo la cantidad de tinción que será cuantificada.

El cultivo celular con el tratamiento se realiza en placas de 6 pocillos y una vez finalizado el tratamiento se comienza con la preparación de la tinción de cristal violeta.

Para la tinción previamente necesitamos fijar las células, para ello hay que retirar el medio y lavar los pocillos con PBS. Una vez están lavados se añade 1mL de glutaraldehído al 1% , este paso es muy importante realizarlo en campana, y se deja incubando 20 minutos.

Posteriormente a la incubación, desechamos el glutaraldehído en un contenedor especial y lavamos con agua los pocillos, una vez descartada el agua añadimos 1mL del cristal violeta (tabla 8) y lo incubamos en agitación a temperatura ambiente.

Una vez acabe el periodo de incubación se lava cuatro veces con agua y se deja secar hacia abajo sobre un papel de filtro 24 horas.

Previamente a desteñir la placa, la escaneamos para tener constancia de ella. Una vez escaneada la desteñimos con ácido acético al 1% y la dejamos incubando durante una hora a temperatura ambiente en balanceo.

Recogemos en la disolución del ácido acético con el cristal violeta y ponemos en una placa de 96 pocillos 180uL por triplicado y medimos su absorbancia a 595nm. A la absorbancia del control le daremos valor 1 y el resto condiciones ira normalizado al control.

Tabla 8 – preparación del cristal violeta al 0.5%

Disolución para tinción con cristal violeta (0.5%)	
Cristal violeta	0.25g
Agua destilada	40mL
Metanol	10mL

Ensayo de Beta-galactosidasa asociada a senescencia.

La beta galactosidasa es una enzima hidrolasa que escinde los residuos de galactosil terminal ligados a beta de los gangliósidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos. La beta galactosidasa es una enzima esencial en el cuerpo humano. Las células senescentes muestran una expresión asociada a la senescencia de la actividad de la beta galactosidasa.

Soluciones usadas para la realización de la tinción:

Solución de glutaraldehído(almacenar en oscuridad):

0.5% glutaraldehído en PBS

Solución PBS/ MgCl₂:

1x PBS

1mM MgCl₂ (203.3g/mol) = 102mg en 500mL

Ajustar el pH6

X-gal solución de tinción(almacenar a 4°C):

9.3mL PBS/ MgCl₂

0.5mL 20X KC

500ul 20x X-Gal

20X KC(50mL)(almacenar en oscuridad):

100mM= 0.82g K₃FE(CN)₆ (329.24g/mol)

100mM= 1.05g K₄FE(CN)₆*3H₂O (329.24g/mol)

25mL PBS

20x X-Gal

20mg/mL X-gal

Procedimiento:

Primero se lavan dos veces las células con PBS. Seguidamente se fijan las células con la solución de glutaraldehído, dejándolas incubar no más de 10 minutos.

Después de la incubación se lavan las células dos veces con PBS/ MgCl₂.

Una vez tenemos las células lavadas se añaden 2mL de X-gal solución de tinción por pocillo.

Incubamos la placa a 37°C por 24 horas en oscuridad, transcurrido este tiempo lavaremos las células con PBS dos veces. Dejándolas con PBS para realizar las fotos o almacenarlas a 4°C.

RESULTADOS

1. La diferenciación de células THP-1 a macrófago con PMA potencia la activación del inflamasoma con Nigericina.

En los siguientes ensayos hemos usado las THP-1, ya que han sido usadas extensivamente para estudios del inflamasoma, con objeto de poner a punto nuestros ensayos y poderlas usar como control en los experimentos con las líneas celulares en las que queremos conocer cómo se encuentra el estado del inflamasoma. Con los siguientes ensayos queremos verificar que podemos activar el inflamasoma en células THP-1 al diferenciarlas a macrófagos con PMA y tratarlas con un conocido inductor del inflamasoma como es la Nigericina.

A) Diferenciación de THP-1 a macrófagos con PMA

Poner a punto la diferenciación y la inducción del inflamasoma en las THP-1 es el objetivo de este ensayo ya que se usará de control con respecto a las células en las que no se conoce el comportamiento de su inflamasoma.

Por ello se ha realizado un ensayo en las THP-1 con PMA y Nigericina en diferentes condiciones, para comprobar cómo influye el PMA y la Nigericina en la expresión del inflamasoma.

Las células que han sido tratadas con PMA(6c y 6d) comienzan a tener una morfología diferente a las que no están tratadas(6a y 6b), pues estas se están diferenciando hacia macrófagos, también se observó que comenzaban a ser más adherentes. Las tratadas con Nigericina (6b y 6d) tienen una menor confluencia celular, ya que la Nigericina es tóxica y cuanto más tiempo dejamos las células expuestas a este compuesto mayor muerte celular provoca, por ello la dejamos actuar 3 horas. En el tratamiento con PMA y Nigericina (6d) ya hay un porcentaje muy elevado de muerte celular. Por lo que podemos indicar que el PMA tiene un efecto en cambios morfológicos en las THP-1 y la Nigericina también tiene efecto en la actividad celular

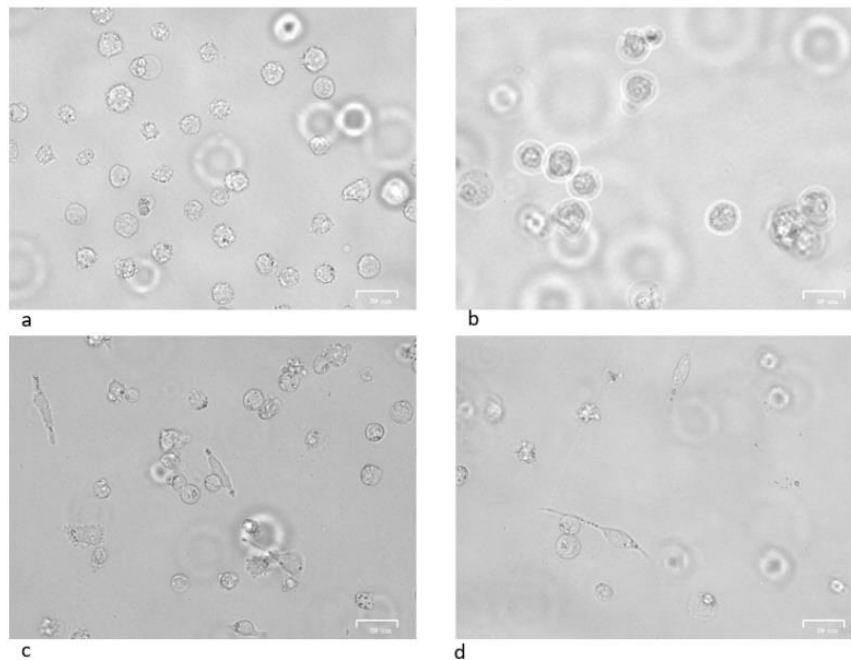


Figura 6 -el tratamiento De células THP-1 con PMA induce diferenciación a macrófagos y con a Nigericina induce muerte. a) células sin tratar con PMA ni Nigericina. b) sin PMA/ con Nigericina. c) tratadas con PMA y sin Nigericina. d) tratadas con PMA y con Nigericina. Las imágenes muestran imágenes representativas de dichos cultivos, y las barras de escala representan 100 μm.

Para estudiar la expresión de los componentes del inflamasoma en todas las condiciones a la que expusimos las THP-1, hicimos un panel con la expresión de mRNA, cuantificada por RT-qPCR, de la familia de las gasderminas y de NINJ en las células THP-1 tratadas con PMA y/o Nigericina para determinar la expresión de cada una de ellas (Figura 7). Este ensayo nos indicó que los genes con mayor expresión en las cuatro condiciones en las que se hicieron los ensayos fueron GSMD; GSDME y NINJ-1.

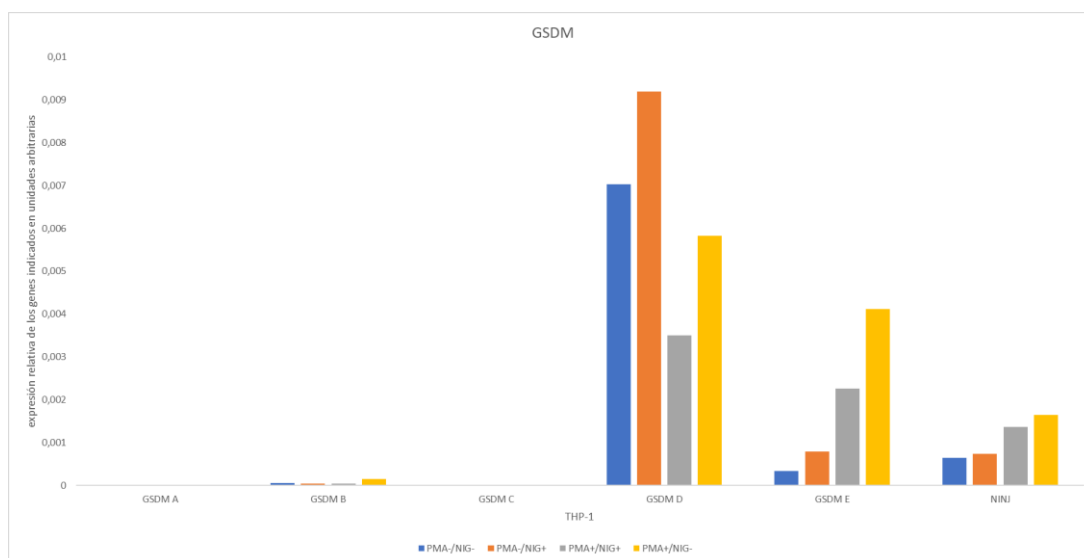


Figura 7 -el tratamiento de células THP-1 en diferentes condiciones con PMA y/o Nigericina induce diferencias en la expresión mRNA de la familia de las gasderminas y NINJ1. Panel de la expresión de las GSDM por RT- qPCR. Una única replica, por lo que no hay barras de error. Expresión relativa de los genes indicados en unidades arbitrarias

En el estudio de la expresión de mRNA para conocer cómo se encontraban los genes que están implicados en las vías de activación del inflamasoma en THP-1, nos hemos centrado en observar Caspasa 1; Caspasa 4; ILB; y según los resultados de la figura 7 también hemos realizados ensayos de expresión de mRNA en GDMD GDME y NINJ-1.

Para las THP-1 (figura 8) donde teníamos cuatro condiciones:

El control que son sin tratamiento; sin tratar con PMA, pero induciendo con Nigericina; diferenciando con PMA, pero sin inducir con Nigericina y por último una condición Tratadas con PMA y con Nigericina.

En el caso de la expresión de la Caspasa-1 (8a) se observa un aumento gradual en la expresión desde la condición sin tratamiento hasta su mayor expresión con ambos tratamientos. Los que nos da una idea de que para encontrar mayor expresión de caspasa-1 debe de estar diferenciado a macrófago e inducido con Nigericina.

Con caspasa-4 (8b) vemos que respecto al control se aprecia un aumento en la expresión en la condición con PMA y Nigericina. Lo mismo se puede observar con IL1B (8e).

Para el mRNA de NINJ (8f) se puede apreciar un comportamiento similar al de caspasa-1.

Para GSDMD (8c) no se aprecia diferencias significativas entre las diferentes condiciones, todo lo contrario, en lo que se observa en la gráfica de GSDME, donde se observa una mayor expresión en la condición con la diferenciación a macrófagos con inducción del inflammasoma con Nigericina.

Según estos resultados podemos concluir que caspasa 4, IL1B NINJ-1 y GSDME se expresan en mayor medida en THP-1 diferenciadas a macrófagos y tratadas con Nigericina

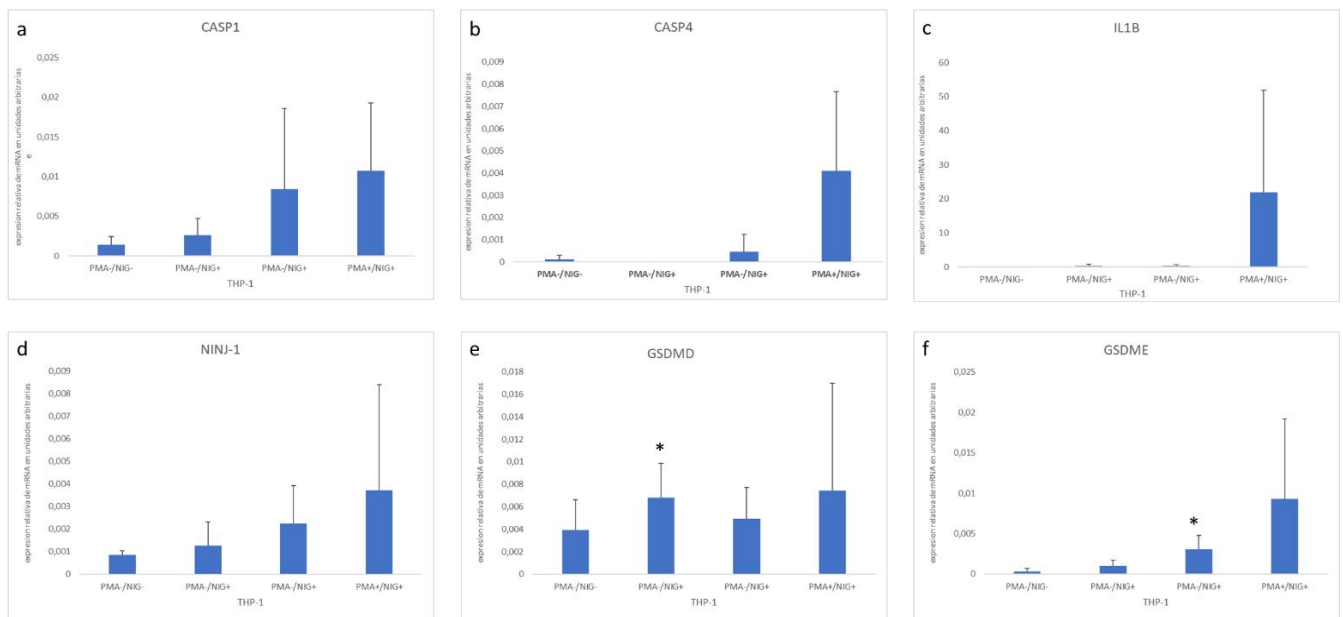


Figura 8 -el tratamiento de células THP-1 en diferentes condiciones con PMA y/o Nigericina induce diferencias en la expresión mRNA en componentes del inflammasoma. a) Casp1 b) Casp4 c) IL1B d) NINJ1 e) GSDMD f) GSDME. Panel de la expresión de mRNA por qPCR. Las barras de las gráficas representan la media de la expresión relativa de los genes indicados en unidades arbitrarias de 2 réplicas experimentales para a) y c) 3 réplicas para b) y d) y 4 réplicas para e) y f) Las barras de error representan la desviación estándar.

El análisis estadístico por t-student muestra una diferencia significativa en la figura 8e de la muestra sin PMA y con Nigericina respecto a su control. También se encuentra otra diferencia significativa en 8f de la muestra con PMA sin Nigericina. Estos resultados son robustos ya que habría que realizar más réplicas de todos los ensayos.

B) Ensayo de la activación del inflammasoma en THP-1 diferenciadas.

Para investigar la activación de la actividad proteolítica del inflammasoma, es necesario comprobar la producción de los fragmentos de lisis de las proteínas diana usando la técnica de western Blot.

Para ello hemos estudiado las caspasa1; caspasa 4; IL1B; GSDMD; GSDME y NINJ de las THP-1 y corroborar si expresan lo que se espera por western Blot y si es coherente o no con los resultados de mRNA por RT-qPCR

Hemos comenzado con un ensayo para conocer el tipo de membrana que necesitamos usar según el peso molecular de la proteína que queremos observar por Western Blot. Ya que podíamos usar dos tipos de membrana para realizar la transferencia del Western Blot (nitrocelulosa y PDVF). También queríamos saber si los anticuerpos que usábamos y la realización de la técnica de los westerns Blot nos aportaban unos resultados apropiados. Por ello usamos las células hTERT-HPNE ER:RAS, ya que como se explicó en materiales y métodos son células de cáncer de páncreas que han sido mutadas con un vector en RAS y que cuando se le añade tamoxifeno tienen una inducción de la actividad de RAS oncogénica

Realizamos la transferencia de un gel que fue cargado con concentraciones creciente de la muestra de hTERT-HPNE después de 8 días con tratamiento de tamoxifeno (figura 9), ya que así nos aseguramos que el inflamasoma se encuentra activado. Este proceso fue realizado por duplicado en el gel y luego transferido un duplicado en la membrana de nitrocelulosa y el otro en el de PDVF. Pudiendo comprobarse que en el pocillo de mayor concentración (80ug de proteína) y en la membrana de PDVF se comienza a observar el fragmento cortado de GSDMD.

Por lo que cuando hemos querido realizar ensayos de Western Blot para ver el corte de GSDMD hemos usado la membrana de PDVF a la máxima concentración de proteína que la muestra nos permitía.

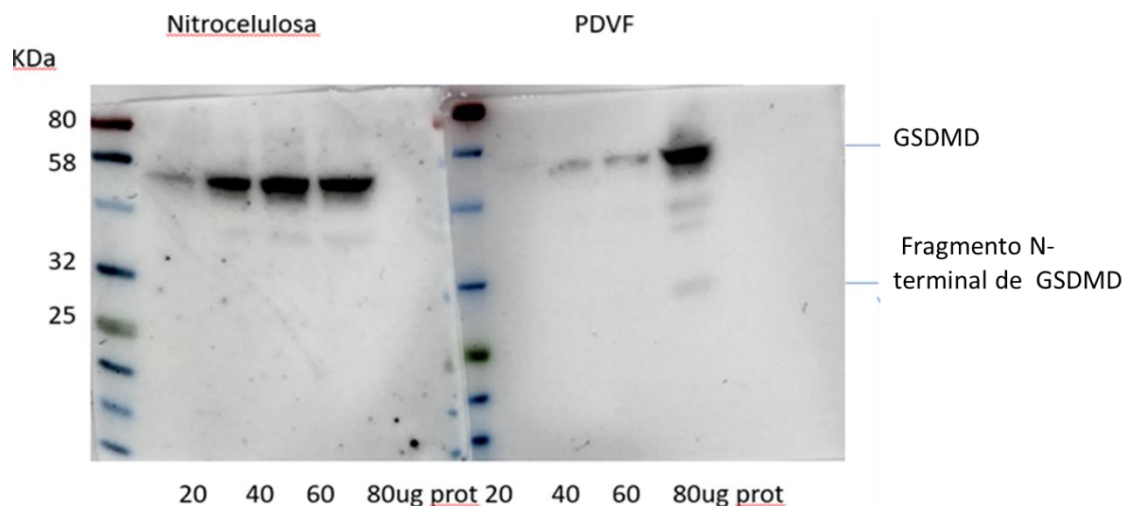


Figura 9 -En la membrana de PVDf con una mayor concentración de proteína se observa el GDMD cleave, proteína de bajo peso molecular. Western Blot de hTERT-HPNE ER:RAS tratadas 8 días con y tamoxifeno y en cada pocillo hemos puesto concentraciones crecientes. El anticuerpo usado fue full lenght GSSMD, su banda se observa a 50 Kda

Para comprobar la fiabilidad de nuestra técnica de western blot usamos hTERT-HPNE día 8 con y sin tamoxifeno (figura 10a y 10b), donde el anticuerpo primario usado el full lenght GSDMD y casp1 para comprobar si hay diferencias en las bandas de los días 8 con y sin tamoxifeno. .

No podemos ver una diferencia entre las hTERT-HPNE ER:RAS tratadas con tamoxifeno y las tratadas no tratadas (10a y 10b) para ninguno de los casos, incluso podríamos decir que se observan muchas bandas inespecíficas y en el caso de la caspasa-1 datos incoherentes, ya que se puede observar una banda a la altura de 50kda, que es el peso molecular de la caspasa-1, en la muestra de HPNE-tert ER:RAS sin tamoxifeno y no se observa en la de tamoxifeno.

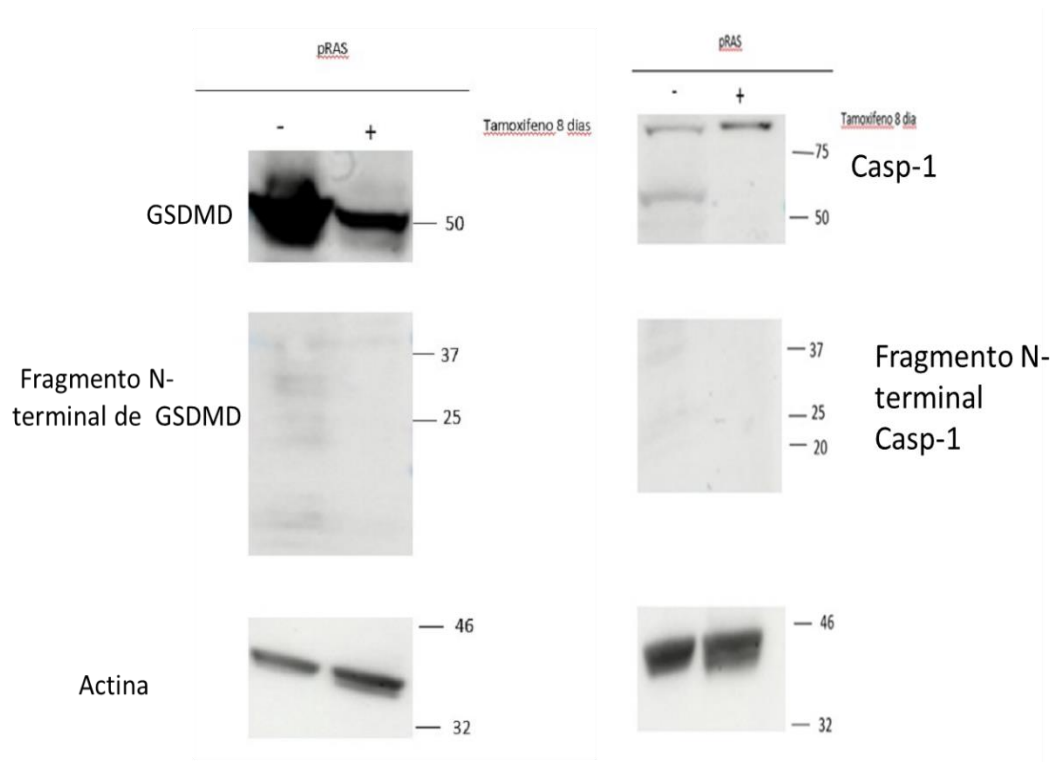


Figura 10 -células HPNE-tert ER:RAS con y sin tamoxifeno a) anticuerpo usado es full lenght GSDMD. b) anticuerpo usado casp-1 a)no muestra diferencias significativas en la expresión de GDMD y su fragmento N-termina. b)se observa banda en el pocillo de HPNE-tert ER:RAS sin tamoxifeno y no se observa con tamoxifeno de casp-1

Para comprobar si la diferenciación a macrófagos y la Nigericina provoca inducción de caspasa-1 y como consecuencia de esta, un aumento en la expresión de los fragmentos de corte de IL1 β , por parte de caspasa-1 así como conocer si la expresión de la proteína de caspasa-4; GSDMD y GSDME también se encuentra afectado por diferenciación y la exposición a Nigericina realizamos una serie de western blot.

Hemos realizado el ensayo de Western Blot (figura 11) con el fin de observar la expresión de caspasa-4 e IL1 β en la línea de THP-1 con las diferentes condiciones de PMA y/o Nigericina, donde no se observa banda en caspasa-4 en el pocillo que no habían sido tratadas ni con PMA ni con Nigericina, se comienza a ver la banda de caspasa-4 es cuando tratamos con PMA, pero se intensifica aún más cuando además se trata con Nigericina. En el caso de la IL1 β no se ve un resultado muy claro, porque, aunque al final podemos ver unas bandas, estas son inespecíficas. En este caso donde vemos IL1 β es en el pocillo que se encontraba las THP-1 tratadas con PMA y con Nigericina. Por tanto, los resultados indican que la exposición a Nigericina de células THP-1 diferenciadas induce la expresión de caspasa-4 e IL1 β de manera robusta, así como la aparición de un fragmento de corte de IL1 β a 17 Kda, lo que sugiere la activación del inflammasoma.

En las figuras 12 y 13 hemos realizado Western Blot para poder determinar en las diferentes condiciones que hemos puesto a las THP-1 como le afecta en la expresión de GSDMD, Caspasa-1 y GSDME respectivamente.

La banda de la GSDMD (figura 12) no se ve un resultado concluyente, puede dar a entender que en las que tienen PMA y Nigericina se observa una banda un poco marcada, pero no es concluyente. De igual modo nos ocurre con la banda del fragmento cortado de GSDMD, se podría suponer que se trata de la banda de arriba ya que es la más cercana a 30kda, pero al no estar en horizontal todas las bandas no se puede decir con seguridad. Esto nos puede dar a intuir que las THP-1 que han sido tratadas con PMA, pero sin Nigericina se ve más marcado el corte de GSDMD, en contraposición de lo esperado

Igualmente, en el western blot para caspasa-1 (figura 13a), podemos observar un resultado no muy claro, ya que caspasa-1 tiene un peso molecular de 50kda, podríamos intuir que las últimas bandas que observamos son caspasa 1 y que se encuentran más pronunciadas en los tratamientos con PMA con y sin Nigericina, pero no se observan diferencias significativas para los dos últimos tratamientos, cosa que se esperaba, ya que esto sí ocurriría con el anticuerpo de caspasa-4.

Por último, en la figura 13b, donde el Western Blot se incubó con el anticuerpo de GSDME, los resultados muestran algún problema técnico ya que no hay una correlación en los datos, además no se pudo obtener la banda de actina para conocer si todos los pocillos tenían la misma carga de proteína por problemas técnicos con la membrana.

Los datos de la figura 13b se interpreta como si, en la condición que no hay tratamiento hay una banda fina de GSDME, sin embargo, en el pocillo que no estaba diferenciada a macrófago, pero si había sido inducido por Nigericina es donde menos expresión de GSDME se puede observar y

la muestra que nos indica una mayor concentración de GSDME es la muestra que fue tratada con PMA, pero no con Nigericina

Por lo que podríamos decir que para la expresión de Caspasa-4 e IL1 β es necesario la activación y la inducción, pero para Caspasa-1, GSDMD y GSDME solo es necesario la diferenciación,

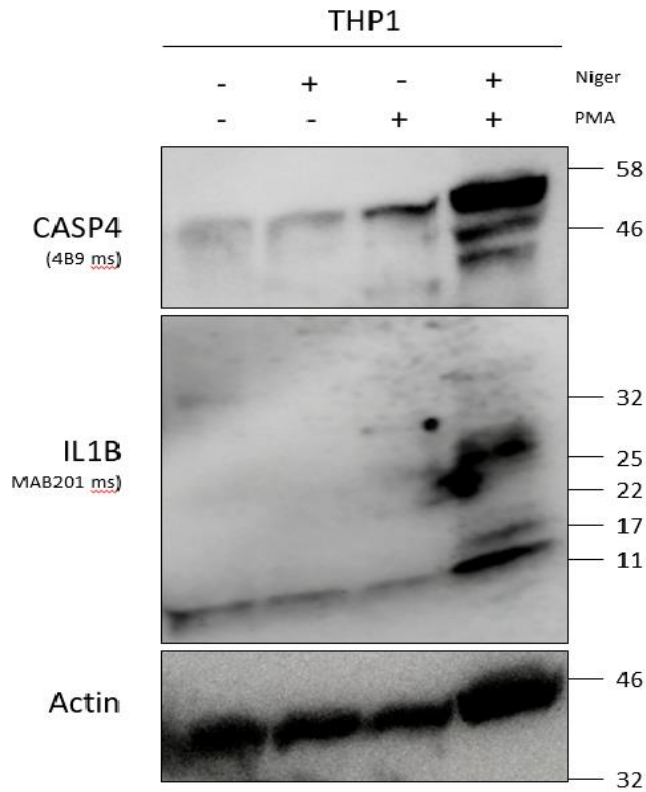


Figura 12 -el tratamiento De células THP-1 con PMA y Nigericina induce expresión de casp-4 e IL1. Western Blot de Células THP-1 con las cuatro condiciones de PMA y/o Nigericina incubadas con el anticuerpo primario de caspasa-4 e IL1B

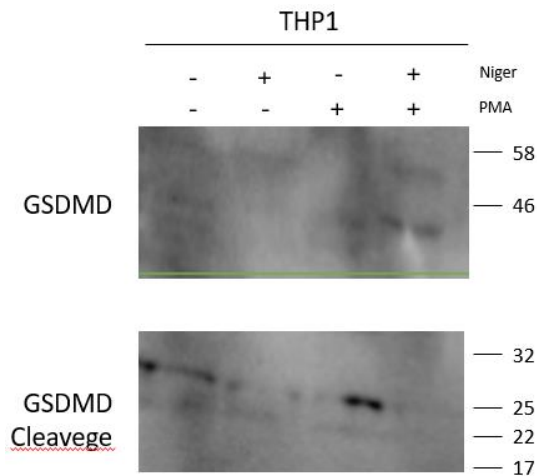


Figura 11 – inducción de GSDMD con PMA en THP-1. Western blot en la línea celular THP-1 cultivada en las diferentes condiciones en las que se expuesto con el anticuerpo full lenght de GSDMD.

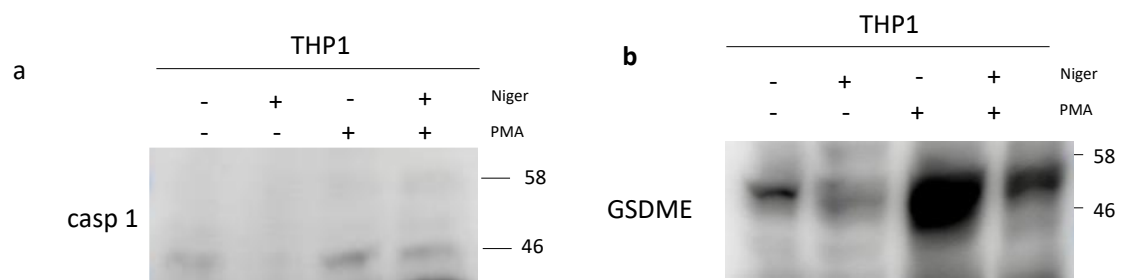


Figura 13 -cultivo celular de las THP-1 con las diferentes condiciones– a) THP-1 con anticuerpo primario para caspasa-1 b) anticuerpo primario para GSDME

Otra forma de poder ver activación del inflammasoma es con un ensayo de cross linking que nos muestra si hay oligomerización de casp-4 y de ASC. Ya que con esta técnica lo que se hace es añadir un crosslinker, disuccinimidyl suberate (DSS), que une covalentemente proteínas de un complejo, lo que hace que al separarse en electroforesis aparezcan con mayor peso molecular.

El ensayo de crosslinking tanto para caspasa-4 como para ASC se realizaron con las THP-1 diferenciadas a macrófagos con y sin Nigericina para conocer si la inducción del inflammasoma se puede ver a través del crosslinking

En la oligomerización de caspasa-4 con el crosslinker (figura 14a), esta no es apreciada, ya que debería de aparecer por encima de 50Kda y no se observa las bandas

Incubamos el crosslinker con ASC (figura 14a) donde en las células THP-1 diferenciadas y tratadas con Nigericina se aprecia bandas por encima del peso molecular de 21Kda y otra banda a 21Kda, lo que nos indica que ASC se encontraba activo y que pudo formar la oligomerización con el crosslinker .

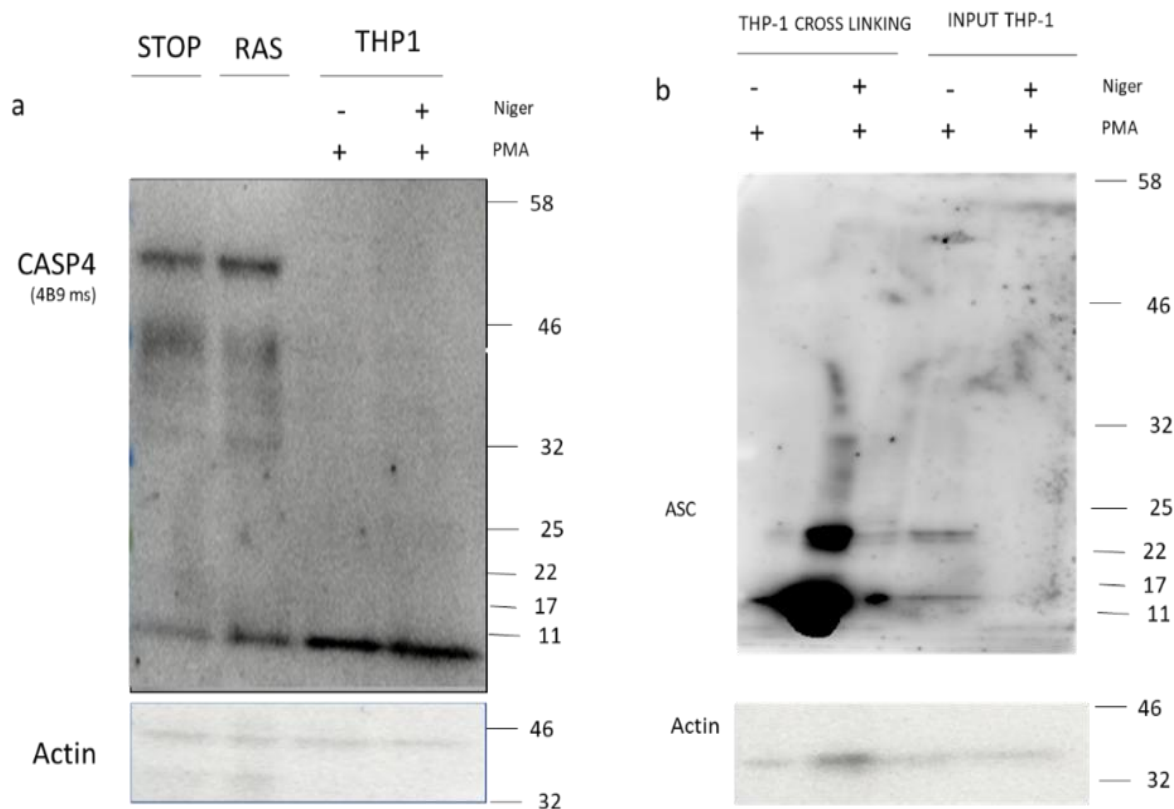


Figura 14 a) -cross linking THP-1 y HPNE-tert ER:RAS incubado con el anticuerpo de caspasa b) cross linking THP-1 incubado con el anticuerpo de ASC. Las THP-1 inducidas con PMA con y sin Nigericina.

2. La senescencia celular inducida por diversos agentes terapéuticos en células de cáncer de pulmón A549 induce la expresión de diversos componentes de la ruta del inflammasoma y la piroptosis.

A) Puesta a punto de un sistema de inducción de senescencia por agentes terapéuticos.

Para estudiar la activación del inflammasoma durante la senescencia inducida por agentes terapéuticos en células de cáncer, utilizamos células de cáncer de pulmón A549 tratadas con un agente inhibidor de CDK4 palbociclib, un compuesto activador de la vía de p53 por inhibición de la proteína MDM2 Nutlin-3a, y un agente inductor de daño al DNA como el etoposido. Estos compuestos conocidos por su capacidad de inducir senescencia

Realizamos un tratamiento con Palbociclib, Nutlin-3 y Etopósido durante 7 días, aunque para el cultivo que contenía Etopósido solo se puso durante las primeras 48 horas, ya que es muy tóxico y dañino para las células. (figuras 15 y 16) con el fin de conocer las diferencias morfológicas.

El control (15a, 15e, 16a, y 16e) se desarrolla de forma normal.

En el cultivo que se aplicó el tratamiento con Palbociclib (15b, 15f, 16b y 16f) se observa un cambio morfológico, con una morfología más ovoide y donde se puede apreciar que el núcleo está más condensado y granulado. La densidad celular se va reduciendo considerablemente conforme transcurre el tratamiento.

Las células que fueron tratadas con Nutlin-a3 (15c, 15g, 16b, y 16g) se observa que toman una morfología más estrellada con un citoplasma más amplio y más granulado que las tratadas con Palbociclib y además su núcleo se observa más laxo. Por último, el cultivo tratado con etopósido (15d, 15h 16d, y 16h), este al ser un agente que daña agresivamente el DNA se observa desde las 24 horas después de añadirle se reduce drásticamente la confluencia celular y la morfología es menos definida y con un núcleo grande, pero a la vez bastante más laxo que en el resto de tratamientos.

Estas imágenes se pueden ver correlacionadas con los resultados de la tinción con cristal violeta y con la de beta-gal, pero no se pueden afirmar que sean concluyentes.

El ensayo de tinción cristal violeta junto con el de Beta-galostidasa asociada a senescencia (figura 17 y 18) nos indican que las células tratadas con Nutlin-a3 perdieron su adherencia por lo que al realizar los ensayos estas células no se quedaron fijadas en el pocillo.

En el ensayo de tinción con cristal violeta (figura 17) podemos observar que de mayor a menor densidad celular tenemos el control (pocillo1), tratamiento con Palbociclib (pocillo2), etopósido(pocillo 5) y en el pocillo que contiene el cultivo con el tratamiento de Nutlin-a3(pocillo 4) que no se observa tinción de cristal violeta.

Con el ensayo de Beta-galostidasa asociada a senescencia (figura 18) observamos que el control, se encuentra demasiado teñido, por lo que no es un buen referente. Palbociclib (figura 18b) está muy teñido y muy confluyente. El beta-gal en el cultivo con el tratamiento de etopósido, donde una menor densidad celular o con citoplasma muy teñido, además de una morfología amorfa.

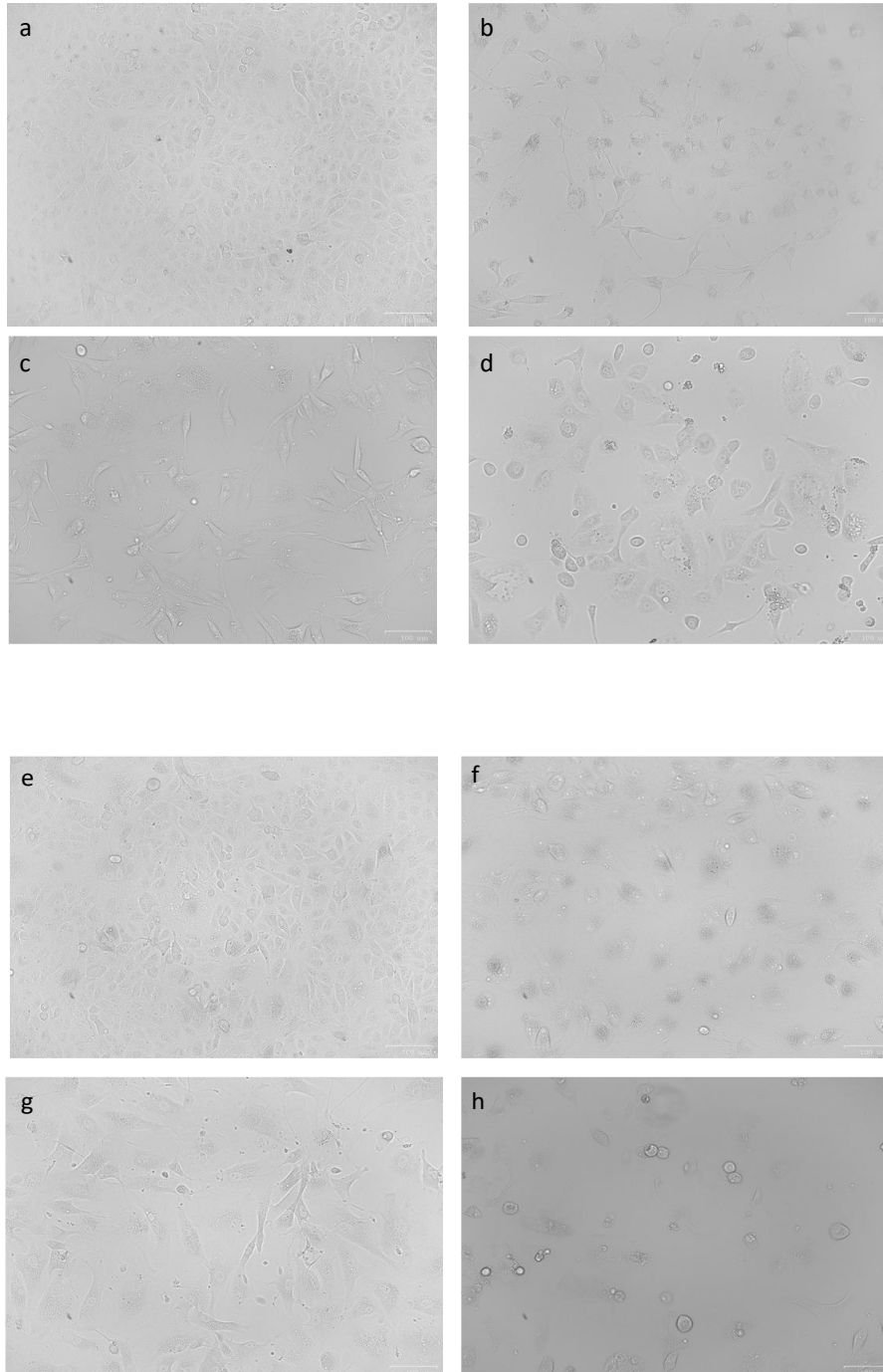


Figura 15 -el tratamiento de las células A549 con Palbociclib, nutlin-3 y etopósido inducen cambios morfológicos y reducción del contenido celular. Células A549 fueron cultivadas durante 24h(de la 15a a 15d) con a) sin tratamiento b) células con concentraciones de Palbociclib c) células con concentraciones de Nutlin-a3 d) células con concentraciones de Etopósido. durante 12h(de la 15e a 15h) con e) sin tratamiento f) células con concentraciones de Palbociclib g) células con concentraciones de Nutlin-a3 h) células con concentraciones de Etopósido.

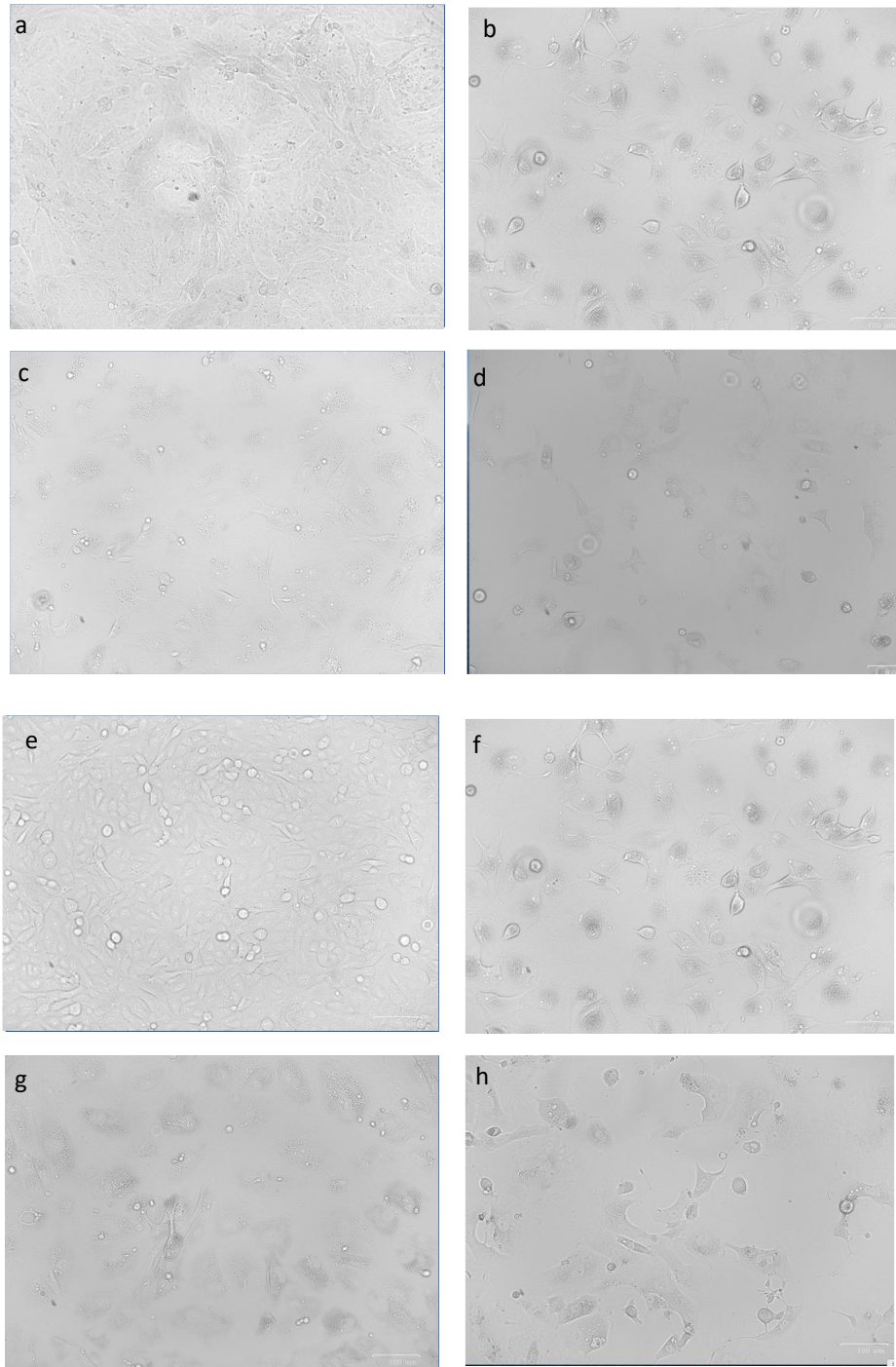


Figura 16 - el tratamiento de las células A549 con Palbociclib, nutlin-3 y etopósido inducen cambios morfológicos y reducción del contenido celular. Células A549 fueron cultivadas durante 5 días (de la 16a a 16d) con a) sin tratamiento b) células con concentraciones de Palbociclib c) células con concentraciones de Nutlin-a3 d) células con concentraciones de Etopósido. durante 7 días (de la 16e a 16h) con e) sin tratamiento f) células con concentraciones de Palbociclib g) células con concentraciones de Nutlin-a3 h) células con concentraciones de Etopósido.

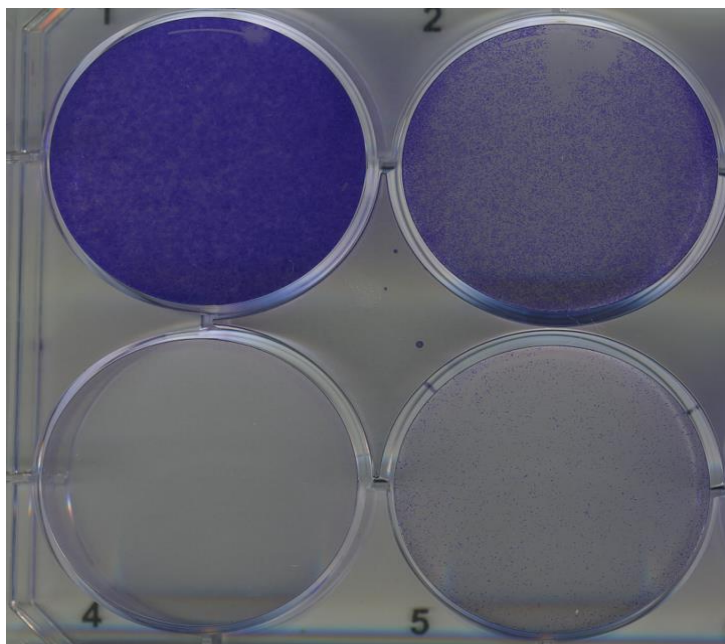


Figura 17 --el tratamiento de las células con Palbociclib, nutlin-3 y etopósido induce diferencias en la proliferación celular. Escáner del cristal violeta en el ensayo senescencia en A549

Tabla 9 -valores para la densidad celular mediada por espectrometría. Los valores corresponden a que el control es el 100% de densidad óptica y los diferentes tratamientos van en relación al control

Compuesto	Valor
Control	1
Palbociclib	0,403719595
Nutlin-3	0,070777774
Etopósido	0,319293674

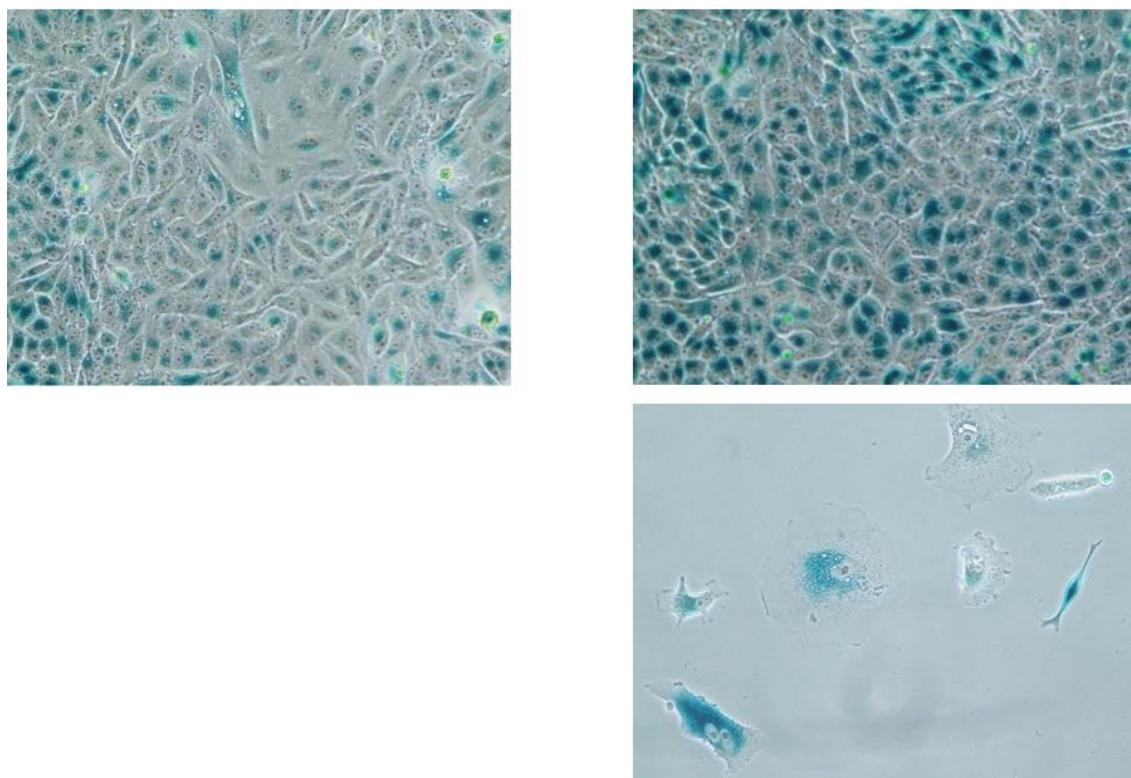


Figura 18 -tinción de beta-gal en las células A549 con tratamiento para la inducción de senescencia a) control, b) tratadas con Palbociclib, c) tratadas con etopósido

El tratamiento con palbociclib, nuttlin y etoposido de células A549 induce senescencia celular, y constituye un modelo ideal para estudiar la inducción del inflamasoma por agentes terapéuticos en células de cáncer.

B) Análisis de la expresión de componentes del inflamasoma en la senescencia inducida por terapia en A549.

Una vez sabemos que los compuestos Palbociclib, Nutlin-a3 y Etoposido de células A549 inducen senescencia celular, lo usaremos para ver cómo cada uno de ellos afecta a la expresión de mRNA de los mismos genes que habíamos usado para el estudio del inflamasoma en las THP-1

Empezamos haciendo un cribado de la familia de las GSDM y NINJ-1 (figura 19), los genes que se encuentran con mayor expresión en las células A549 con inducción de la senescencia por los compuestos de Palbociclib; Nutlin-a3 y Etoposido, son GSDME y NINJ-1.

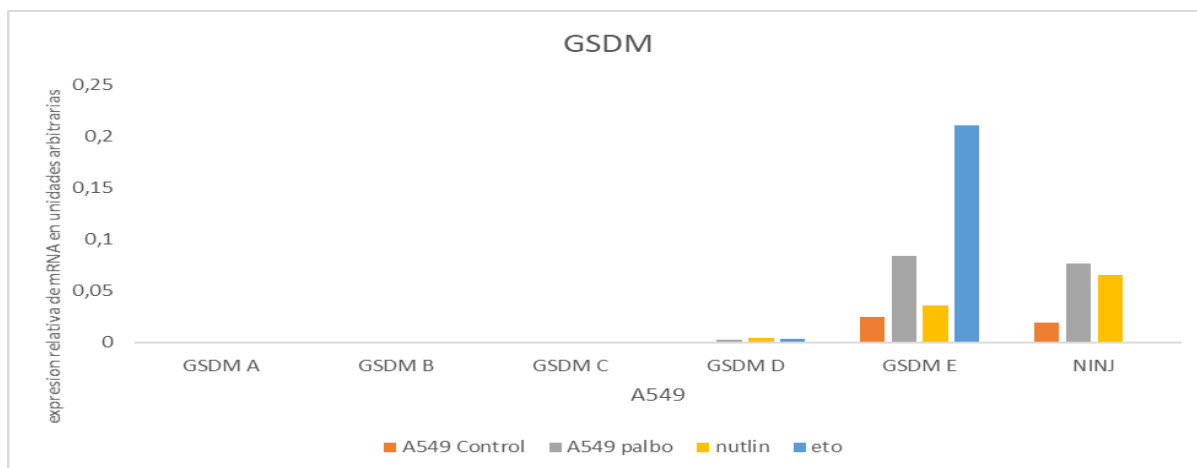


Figura 19 -la expresión de GSDME y NINJ-1 en las tres vías de inducción del inflammasoma se ve aumentada con respecto a las demás GSDM. Expresión de mRNA por RT- qPCR de la familia de las gasderminas en las diferentes condiciones de A549 con Palbociclib, Nutlin-a3 Una única replica, por lo que no hay barras de error. Expresión relativa de los genes indicados en unidades

Los resultados de las RT-qPCR (figura 20) muestra expresión de mRNA Caspasa-1 (figura 20a) donde no se aprecia un aumento expresión desde la condición control (sin tratamiento) con respecto a las que han sido tratadas. Los que nos da una idea de que la expresión de Caspasa-1 no se ve influenciada por el estado de senescencia inducida por estos compuestos.

Todo lo contrario, ocurre con la expresión de caspasa-4 (figura 20b), ya que se ve aumentada con el tratamiento de Palbociclib y no se aprecia expresión ni en el control ni en el resto de tratamientos. Lo mismo ocurre para IL1B (figura 20c) y con GSDMD (figura 20d).

Los resultados anteriores nos indicaron que la inducción de senescencia con Palbociclib activa la expresión de elementos del inflammasoma no canónico.

El tratamiento de las células A549 con Nutlin-a3 promueve la expresión de mRNA de NINJ1 y GSDME.

El análisis estadístico por t-student no muestra una diferencia significativa, esto se puede deber a la falta de réplicas y a las diferencias que hay entre las mismas replicas.

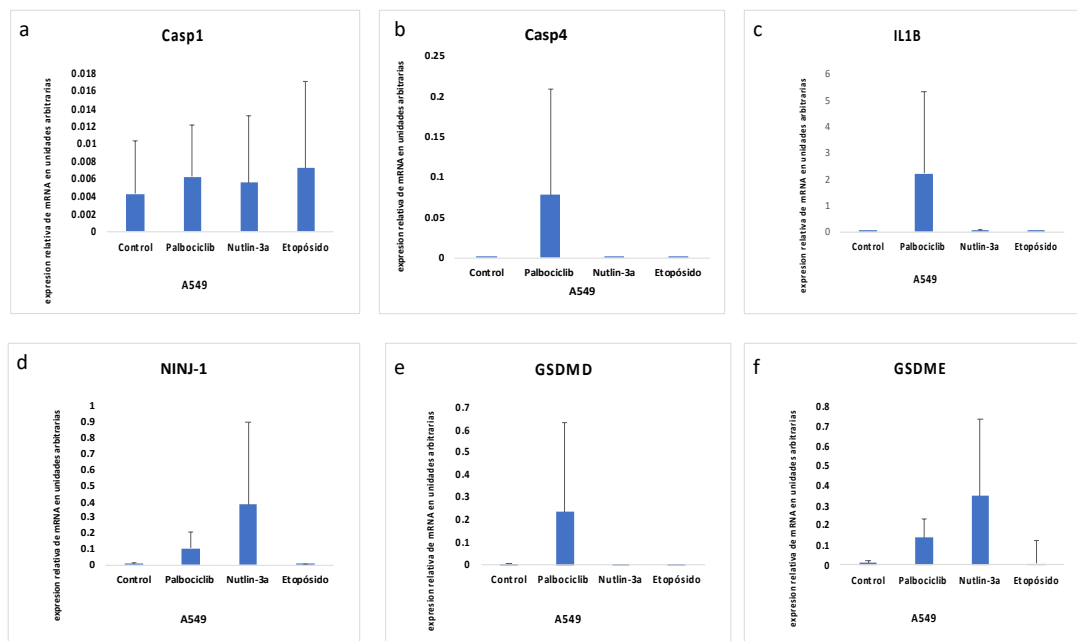


Figura 20 -la expresión de Casp-4; IL1B;GSDMD; se ve aumentada su expresión por Palbociclib a diferencia de GDMey NINJ-1 que se ve aumentada su expresión porNtlin-3a.. Expresión de mRNA por RT- qPCR de la familia de las gasderminas en las diferentes condiciones de senescencia. . Panel de la expresión de mRNA por qPCR. Las barras de las gráficas representan la media de la expresión relativa de los genes indicados en unidades arbitrarias de 2 réplicas experimentales para a) y c) 3 réplicas para b) y d) y 4 réplicas para e) y f) Las barras de error representan la desviación estándar.

DISCUSIÓN

En este trabajo nos hemos centrado en hacer ensayos de puesta a punto de protocolos que se usaran a lo largo de todo el proyecto, ya que es el inicio de un largo camino sobre el estudio del inflammasoma y de cómo este está involucrado en la evolución de las células cancerígenas.

Como se puede observar en los resultados los Western Blot no han sido de la calidad que les corresponde, ya que ni en la mayoría de ellos se aprecian las bandas horizontales y definida. Como las actinas nos solían mostrar, la carga de proteína no estaba igualadas. También es cierto que en algunos casos hemos tenido problemas técnicos a la hora de poder detectar la actina. Por lo que todo estos Western Blot habría que repetir como también realizar Western Blot para ver la actividad de ninj-1 en las condiciones tanto de senescencia como en las condiciones a las que hemos expuesto las THP-1.

Los resultados de las qPCR también nos indica que deberían de ser repetidos, ya que se encuentran con unas grandes barras de error, los que nos indica que hay inconsistencia entre las diferentes replicas.

De los ensayos que hemos realizados si podemos concluir que para poder ver la expresión de caspasa-4 e IL1B en las THP-1 hay que diferenciarlas a macrófagos e inducir el inflammasoma, y que la Nigericina es una buena opción para ello. También podemos deducir que se forma oligomerización con la proteína ASC en el momento que se han diferenciado a macrófagos y el inflammasoma se ha inducido. De la familia de las gasderminas se ha podido observar que las que tienen mayor expresión son las D y la E

En los estudios con células de cáncer A549 a las que se les indujo senescencia con tres compuestos diferentes, ya que tienen dianas diferentes, se observa por qPCR que la que produce mayor activación en diferentes partes de la cascada del inflammasoma como son casp-1, IL1B y GSDMD es el Palbociclib, que como se comentó es un inhibidor de quinasas CDK4/6. Sin embargo, GDSME y NINJ-1 se ve aumentada su expresión con Nutlin-a3, un compuesto activador de la vía de p53 por inhibición de la proteína MDM2. Todo esto sería apropiado verlo por Western Blot, que no se realizaron por falta de tiempo. Lo que nos indican que distintos estímulos de inducción de senescencia activan rutas de del inflammasoma distintas, y que no existe una ruta de activación del inflammasoma específica de senescencia en general.

Los datos obtenidos, demuestran que distintas moléculas terapéuticas activan la expresión del inflammasoma y efectores de piroptosis diferentes. El ensayo de tinción con cristal violeta y Beta-galostidasa asociada a senescencia reflejo muerte celular con el tratamiento de Nutlin-a3 y por RT-qPCR se cuantifico un incremento en la expresión de NINJ-1 y GSDME, lo que está estrechamente relacionado, ya que GDMDE y NINJ-1 promueven la muerte celular por piroptosis.

Realizando un estudio más amplio, con un mayor número de moléculas terapéuticas y con un panel celular más amplio se podría sugerir como estudio para dianas terapéuticas.

Ensayos que se deberían sugerir para este trabajo, además de afinar los experimentos realizados y realizar Western Blot para NINJ1. Previamente a inducir el inflammasoma con Nigericina, transfectaría con LPS para poder conocer si la inducción directa con LPS aumenta drásticamente los componentes conocidos del inflammasoma tanto en THP-1 como en líneas celulares cancerígenas. Para poder determinar cuál sería una buena diana terapéutica, y poder trabajar sobre ella.

Estudios previos determinan que caspasa-3 es el efector del fragmento cortado de GSDME(Be et al., 2021). Como hemos podido ver en la figura 8f y 20f, GSDME ha sido inducido por compuestos inductores de p53. A Por lo que sugeriría en futuros ensayos, el estudio de caspasa-3 como fuente de diana terapéutica.

CONCLUSIONES

Las conclusiones principales que podemos extraer de este trabajo son:

La exposición a Nigericina en células THP1 diferenciadas con PMA resulta en la activación del inflammasoma canónico y puede usarse como control para experimentos en otros contextos celulares.

La activación de la senescencia en células A549 con el inhibidor de la quinasa del ciclo celular CDK4 Palbociclib induce la expresión de la ruta del inflammasoma no canónico.

La exposición de células A549 al activador de p53 Nutlin-a3 induce la expresión de las proteínas inductoras de piroptosis GSDME y NINJ1.

BIBLIOGRAFÍA

- Baxter, E. W., Graham, A. E., Re, N. A., Carr, I. M., Robinson, J. I., Mackie, S. L., & Morgan, A. W. (2020). Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *Journal of Immunological Methods*, 478, 112721. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112721>
- Be, B., An, E., H, Z., & S, W. (2021). Gasdermin D in pyroptosis. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 11(9). <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.006>
- Benaoudia, S., Martin, A., Puig Gamez, M., Gay, G., Lagrange, B., Cornut, M., Krasnykov, K., Claude, J.-B., Bourgeois, C. F., Hughes, S., Gillet, B., Allatif, O., Corbin, A., Ricci, R., & Henry, T. (2019). A genome-wide screen identifies IRF2 as a key regulator of caspase-4 in human cells. *EMBO Reports*, 20(9), e48235. <https://doi.org/10.15252/embr.201948235>

- Cho, S.-J., Rossi, A., Jung, Y.-S., Yan, W., Liu, G., Zhang, J., Zhang, M., & Chen, X. (2013). Nijm1, a target of p53, regulates p53 expression and p53-dependent cell survival, senescence, and radiation-induced mortality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221242110>
- Fernández-Duran, I., Quintanilla, A., Tarrats, N., Birch, J., Hari, P., Millar, F. R., Lagnado, A. B., Smer-Barreto, V., Muir, M., Brunton, V. G., Passos, J. F., & Acosta, J. C. (2022). Cytoplasmic innate immune sensing by the caspase-4 non-canonical inflammasome promotes cellular senescence. *Cell Death and Differentiation*, 29(6), 1267-1282. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00917-6>
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Li, L., Jiang, M., Qi, L., Wu, Y., Song, D., Gan, J., Li, Y., & Bai, Y. (2021). Pyroptosis, a new bridge to tumor immunity. *Cancer Science*, 112(10), 3979-3994. <https://doi.org/10.1111/cas.15059>
- Pandey, A., Shen, C., Feng, S., & Man, S. M. (2021). Cell biology of inflammasome activation. *Trends in Cell Biology*, 31(11), 924-939. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.06.010>
- Sharma, B. R., & Kanneganti, T.-D. (2021). NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nature Immunology*, 22(5), 550-559. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00886-5>
- Sun, W., Lu, H., Dong, S., Li, R., Chu, Y., Wang, N., Zhao, Y., Zhang, Y., Wang, L., Sun, L., & Lu, D. (2021). Beclin1 controls caspase-4 inflammasome activation and pyroptosis in mouse myocardial reperfusion-induced microvascular injury. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 19(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00786-z>

- Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., Wang, K., & Shao, F. (2017). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 547(7661), 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature22393>
- X, L., S, X., Z, Z., H, W., & J, L. (2021). Channelling inflammation: Gasdermins in physiology and disease. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(5). <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00154-z>
- Xia, X., Wang, X., Cheng, Z., Qin, W., Lei, L., Jiang, J., & Hu, J. (2019). The role of pyroptosis in cancer: Pro-cancer or pro-“host”? *Cell Death & Disease*, 10(9), 650. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1883-8>
- Ys, Y. (2020). Functional crosstalk between non-canonical caspase-11 and canonical NLRP3 inflammasomes during infection-mediated inflammation. *Immunology*, 159(2). <https://doi.org/10.1111/imm.13134>
- Zhiyu, W., Wang, N., Wang, Q., Peng, C., Zhang, J., Liu, P., Ou, A., Zhong, S., Cordero, M. D., & Lin, Y. (2016). The inflammasome: An emerging therapeutic oncotarget for cancer prevention. *Oncotarget*, 7(31), 50766-50780. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9391>