



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

“Mecanismo de secreción de la citocina IL-36 γ en macrófagos”

TESIS

Que presenta

M. en C. Laura Denise Manzanares Meza

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

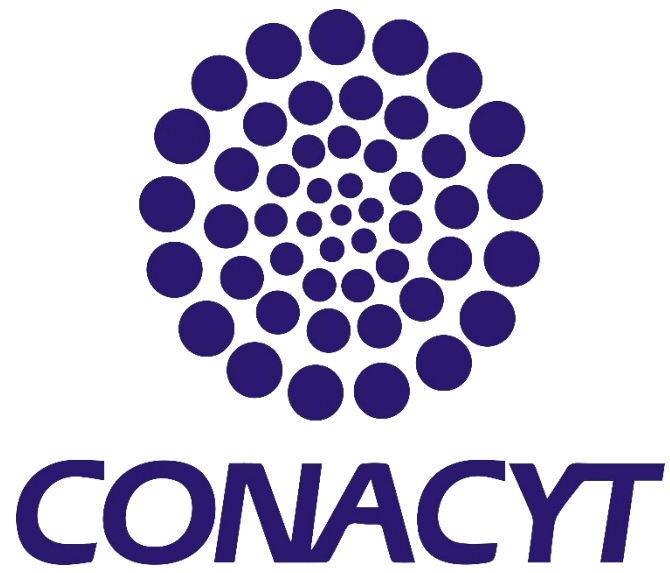
EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Dr. Oscar Medina Contreras



Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las facilidades otorgadas para la realización de mis estudios de doctorado. Y por el apoyo al proyecto número: CB-2016-01/280815. Becario número: 589088.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CINVESTAV por darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado en el departamento de biomedicina molecular. Agradezco a la unidad de microscopía y proteómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Agradezco al Dr. Oscar Medina Contreras por aceptarme en su laboratorio y permitirme iniciar mi camino como investigadora. Agradezco su apoyo tanto académico como personal a lo largo de estos seis años. Sobre todo, agradezco el tiempo y la paciencia que ha dedicado todo este tiempo a enseñarme, cuestionarme y orientarme, lo cual, me ha permitido adquirir habilidades tanto técnicas como de pensamiento para la realización y culminación de mi proyecto. Su orientación me permitió desarrollar independencia y confianza para tomar decisiones y resolver problemas que se presentaron a lo largo de la investigación.

Agradezco al Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete por aceptarme en su laboratorio y por aceptar la colaboración en el proyecto. Agradezco su apoyo tanto académico como personal a lo largo del desarrollo de mi investigación. Su orientación me permitió tomar decisiones y resolver problemas que fueron surgiendo a lo largo de mi proyecto.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio especialmente, al M. en C. Felipe Castro Martínez por su apoyo a nivel académico y personal. Agradezco a la QFB. Sara Miguel por su apoyo durante su estancia en el laboratorio y a la M. en C. Nelly Álvarez por su apoyo durante su estancia en el laboratorio. Agradezco a mis compañeras de generación la M en C. Paola Briseño y a la M. en C. Lourdes Mejía por su apoyo incondicional tanto académico como personal.

Agradezco a mis padres y a mi hermano por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera académica, por su comprensión y cariño me ha sido posible llegar tan lejos.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia quienes son los motores de mi vida, mi inspiración para superarme cada día y para tomar decisiones que los llenen de orgullo.

Este trabajo también está dedicado a mis amigos y compañeros de generación especialmente a Jessica Pérez, Rebeca Robles, Tomás Guerrero, Lourdes Mejía, Paola Briseño, Eliana Silva, Mileydi Martínez, Claudia Gutiérrez, Felipe Castro, Sara Miguel, Nelly Álvarez, Miguel Islas y Albertana Jiménez quienes me apoyaron durante el desarrollo de este proyecto y me ayudaron a liberar la frustración y el bloqueo mental que muchas veces surgen durante el desarrollo de una investigación.

Por último, dedico este trabajo a todas aquellas personas que persiguen sus sueños y que les interesa desarrollarse en el campo de la investigación. A todas aquellas niñas y mujeres que sueñan con convertirse en científicas, les digo que cualquier cosa que deseen y se propongan se puede lograr, con mucho trabajo y esfuerzo, un ejemplo de ello es este trabajo de investigación.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIA	4
SUMMARY	8
RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Vía UPS I: Formación de poros en la membrana plasmática	11
1.2 Vía UPS II: Secreción basada en transportadores ABC	11
1.3 Vía UPS III: Translocación mediada por organelos.	12
1.4 Vía UPS IV: Evitación del Golgi por las proteínas que contienen péptido señal o dominio transmembranal.	13
2. Proteínas secretadas por medio de las vías UPS: Citocinas	14
3. Expresión, procesamiento y secreción de la subfamilia de IL-1	15
3.1 IL-1 α	15
3.2 IL-1 β	16
4. Expresión, procesamiento y secreción de la subfamilia de IL-18.....	18
5. Subfamilia de IL-36	20
5.1 Importancia de las citocinas IL-36 en enfermedades inflamatorias	21
5.2 Procesamiento de las citocinas IL-36	22
5.3 Secreción de las citocinas IL-36	24
6. JUSTIFICACIÓN	26
7. HIPÓTESIS	27
8. OBJETIVOS	28
9. MATERIALES Y MÉTODOS	29
10. RESULTADOS.....	33
10.1 LPS/ATP inducen la expresión y secreción de IL-36 γ en macrófagos	33
10.2 IL-36 γ es capaz de pasar a través de los poros formados por P2X7R y GSDMD en un modelo <i>in silico</i>	35
10.3 IL-36 γ es secretada vía UPS I, a través de P2X7R, bajo condiciones inflamatorias	39
10.4 IL-36 γ se localiza en el citoplasma de los macrófagos	42
10.5 LPS/ ATP induce la secreción de catepsinas	45
10.6 IL-36 γ induce la expresión de catepsina S	47

11.	DISCUSIÓN	49
12.	References.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades asociadas con IL-1 α , IL-1 β e IL-18.....	- 19 -
Tabla 2. Iniciadores sentido y antisentido de IL1F9, P2X7R, GSDMD, CATSS y GAPDH -	32 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la vía convencional y las vías no convencionales de secreción (UPS).....	13
Figura 2. El estímulo LPS/ATP induce la expresión y secreción de IL-36 γ en IC21	34
Figura 3. Modelos tridimensionales de IL-36 γ , GSDMD y P2X7R	38
Figura 4. IL-36 γ es secretada a través de la vía UPS I utilizando al P2X7R.	40
Figura 5. IL-36 γ es secretada a través de la vía UPS I utilizando al poro de GSDMD	41
Figura 6. IL-36 γ se localiza en el citoplasma.....	44
Figura 7. LPS/ATP inducen la secreción de catepsinas.	46
Figura 8. IL-36 γ y LPS inducen la expresión de catepsina S.....	48
Figura 9. Expresión y secreción de IL-36 γ	53

SUMMARY

During infection and inflammation several cytokines and mediators are secreted by immune cells, especially macrophages, which recognize Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) through their Toll-like receptors (TLRs) which initiates downstream signaling pathways that promote the expression and secretion of inflammatory cytokines, such as members of the IL-1 superfamily. This superfamily of cytokines is formed by eleven members, classified in three subfamilies; IL-1 subfamily, IL-18 subfamily and, IL-36 subfamily. This subfamily has been recently described and its study has gained relevance due to its involvement in the development of several inflammatory diseases. The IL-36 subfamily consists of four members, a receptor antagonist (IL-36Ra), and three agonists, IL-36 α , IL-36 β and, IL-36 γ , previously known as IL-1F6, IL-1F8 and IL-1F9, respectively. Importantly, these agonists are not isoforms, they are transcribed from independent genes. Nevertheless, they signal through the same receptor (IL-36R), formed by a cytokine specific chain (IL-1RL2) and the accessory protein of IL-1R (IL-1RAcP).

Due to their role in inflammation these cytokines are regulated through their processing and secretion mechanisms, which are in charge of limiting their functions as well as availability; thus they function as regulatory checkpoints. IL-36 cytokines are processed mainly by neutrophil proteases, as well as cathepsins from macrophages and epithelial cells. Furthermore, secretion of these cytokines is affected by one of their main features, the lack of a signal peptide on their sequence. These cytokines use the unconventional protein secretion pathway (UPS) that involves membrane pores, vesicles, transporters, among others. Some members of the superfamily of IL-1 have been involved with two types of UPS vesicles and membrane pores. GSDMD and P2X7R have been highlighted as the membrane pores that participate in IL-1 β e IL-18 secretion under inflammatory conditions. It remains unknown if IL-36 γ uses these molecules for its secretion.

RESUMEN

Durante la infección y la inflamación, diversas citocinas y mediadores son secretados por células del sistema inmune, especialmente macrófagos, los cuales, reconocen Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) a través de sus Receptores tipo Toll (TLRs), lo que promueve la expresión y liberación de citocinas proinflamatorias entre las cuales se encuentran las citocinas de la superfamilia de IL-1. Dicha superfamilia está conformada por once miembros, clasificados en tres subfamilias, la subfamilia de IL-1, la subfamilia de IL-18 y la subfamilia de IL-36. La anterior ha sido recientemente descrita y su estudio ha ganado relevancia debido a su participación en el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias. Esta subfamilia de citocinas está conformada por 4 miembros, un antagonista del receptor IL-36Ra, y tres agonistas, IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ , previamente conocidas como IL-1F6, IL-1F8 e IL-F9, respectivamente. Importantemente, los agonistas no son isoformas, provienen de genes diferentes, sin embargo, señalizan a través del mismo receptor, formado por la cadena específica IL-1Rrp2 y la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RAcP). Debido a su papel durante la inflamación, dichas citocinas son reguladas a través de sus mecanismos de activación y secreción, los cuales, se encargan de limitar su función, así como su disponibilidad. Por lo tanto, son considerados puntos importantes de regulación. Las citocinas IL-36 son procesadas por proteasas de neutrófilo y catepsina S, en el caso de IL-36 γ , la cual, se expresa principalmente en macrófagos y células epiteliales. Por otro lado, la secreción de dichas citocinas se ve afectada por la falta de péptido señal en su secuencia, es por ello, que emplean el mecanismo no convencional de secreción de proteínas (UPS), la cual, involucra poros de membrana, vesículas, transportadores, entre otros. Algunos miembros de la superfamilia han sido asociados con dos tipos de UPS; vesículas y poros de membrana. Se han involucrado a GSDMD y P2X7R como los poros de membrana que participan en la secreción de IL-1 β e IL-18 bajo condiciones inflamatorias. Se desconoce si IL-36 γ emplea dichas moléculas para su secreción

1. INTRODUCCIÓN

La secreción es un proceso celular presente en cada organismo que se encarga de liberar componentes al medio extracelular. Es de particular interés el estudio de la secreción de proteínas que participan en la defensa del organismo en contra de patógenos, ya que defectos en dichos mecanismos culminan en el desarrollo de patologías (Stanley AC. *et al.*, 2010). En eucariotas, la secreción convencional de proteínas (CPS) es la ruta de tránsito que siguen las proteínas cuando son transportadas desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi y posteriormente a la membrana plasmática a través de vesículas (Fig.1) (Duitman EH. *et al.*, 2011). Las proteínas secretadas, así como las proteínas integrales de la membrana plasmática, llegan a su destino usando la vía de secreción convencional. Las proteínas que emplean este mecanismo contienen en su secuencia un péptido señal, y/o un dominio transmembranal, que dirige su inserción en el retículo endoplásmico (RE), desde donde salen en vesículas COPII para llegar al aparato de Golgi y finalmente a la membrana plasmática. Sin embargo, desde hace algunos años se ha observado que existen proteínas que también pueden ser llevadas a la membrana plasmática y el medio extracelular sin entrar al RE-Golgi, como es el caso de algunas citocinas. A esta vía alternativa se le conoce como secreción no convencional de proteínas (UPS) (Rabouille C., 2017). Existen dos casos en los que la célula puede recurrir a esta vía alterna de secreción. El primero es en condiciones de estrés, ya que se puede ver comprometida la integridad funcional de la vía clásica, forzando a la célula a buscar alternativas eficientes. El segundo caso se da con las proteínas que carecen de péptido señal, un ejemplo clásico de estas proteínas es IL-1 β , así como otros miembros de su familia. Hasta el momento se han identificado cuatro tipos de secreción no convencional (Fig.1) (Rabouille C., 2017).

1.1 Vía UPS I: Formación de poros en la membrana plasmática

La formación de poros en la membrana plasmática permite que las proteínas citoplasmáticas que carecen de péptido señal transloquen a través de la membrana plasmática (Rabouille C., 2017). (Fig.1) La proteína citosólica gasdermina D (GSDMD) se localiza en el citoplasma en un estado de auto inhibición, sin embargo, bajo condiciones inflamatorias es procesada por caspasa1, lo que induce la liberación de su fragmento C-terminal permitiendo así la oligomerización del N-terminal en la membrana plasmática formando estructuras en forma de anillos. Los anillos de GSDMD forman un poro en la membrana plasmática con un diámetro de aproximadamente 10-15nm (Mulvihill E. *et al.*, 2018).

Por otro lado, la liberación de ATP extracelular, por parte de células dañadas durante un proceso inflamatorio, activa al receptor purinérgico P2X7, lo cual, promueve la entrada de iones de calcio y la salida de iones de potasio (Alves L. *et al.*, 2014). Dicho proceso culmina con la activación del inflamosoma NLRP3, (Franceschini A. *et al.*, 2015) y la subsecuente activación de caspasa1 y GSDMD, así como citocinas de la superfamilia de IL-1 (Evavold C. *et al.*, 2018; Mulvihill E. *et al.*, 2018). Además, durante eventos inflamatorios, el receptor purinérgico P2X7 es capaz abrir un poro a través del cual salen proteínas como IL-1 β transglutaminasa 2 y tioredoxina, proteínas que carecen de péptido señal (Alves L. *et al.*, 2014; Di Virgilio F. *et al.*, 2018).

1.2 Vía UPS II: Secreción basada en transportadores ABC

Los transportadores facilitan el movimiento de un sustrato específico ya sea a favor o en contra de su gradiente de concentración; para lograrlo se requiere un cambio transformacional en el transportador (Vasiliou V. *et al.*, 2009). Los transportadores ABC consisten en cuatro dominios, dos dominios de unión a nucleótidos (NBDs) y dos dominios transmembranales (TMDs). Los NBDs se unen e hidrolizan ATP mientras que los TMDs participan en el reconocimiento y translocación del sustrato hacia el otro lado de la membrana plasmática (Wilkins S., 2015). El genoma humano codifica para 49 genes ABC organizados en siete subfamilias designados de la A-G. Estos

transportadores son responsables de múltiples actividades, han sido involucrados en la resistencia a múltiples drogas en células cancerígenas, también transportan un gran número de sustratos, incluyendo iones, péptidos, aminoácidos, azúcares y un gran número de compuestos hidrofóbicos a través de la membrana plasmática (Vasiliou V. et al., 2009). Se ha sugerido que algunas proteínas que carecen de péptido señal pueden ser secretadas a través de transportadores ABC. Estudios reportaron que la feromona de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae* es secretada de la célula a través del transportador ABC Ste6p (McGrath J. et al., 1989). Sin embargo, se requieren más estudios que permitan dilucidar el mecanismo preciso de la secreción no convencional mediada por transportadores ABC en el caso de otras proteínas como citocinas proinflamatorias (Kim J. et al., 2018)

1.3 Vía UPS III: Translocación mediada por organelos.

La vía III UPS provocada por estrés es mediada por organelos que divergen de su función normal para convertirse en órganos secretores. Se ha propuesto a endosomas, autofagosomas y lisosomas como dichos organelos. Se sabe que los endosomas tardíos son secretores y liberan sus vesículas internas (exosomas) (Fig.1). Sin embargo, diversas proteínas que carecen de péptido señal no utilizan exosomas para salir de la célula, sino que translocan a través de las membranas de los organelos de manera similar a la vía I UPS (Rabouille C., 2017). Un mecanismo para la translocación de proteínas a través de la membrana lisosomal existe en la forma de autofagia mediada por chaperonas (CMA) (Zhang M. et al., 2015). Los sustratos exhiben un motivo KFERC que es reconocido por Hsp70 y de esta manera las dirigen a la superficie del lisosoma, la cual cruzan en una forma dependiente de LAMP2a antes de ser degradadas. Sin embargo, algunas proteínas no son degradadas si no que son secretadas (Zhang M. et al., 2015).

1.4 Vía UPS IV: Evitación del Golgi por las proteínas que contienen péptido señal o dominio transmembranal.

De forma similar a las vías I y III, este mecanismo puede desencadenarse por estrés e involucra proteínas que contienen péptido señal o dominio transmembranal que son sintetizadas en el retículo endoplásmico, pero evitan el paso por el aparato de Golgi cuando son transportadas a la membrana plasmática (Fig.1). Como resultado, estas proteínas contienen cantidades elevadas de oligosacáridos de manosa. El defecto en el procesamiento de oligosacáridos en estas proteínas puede impactar en su función, ya sea impidiendo o favoreciendo la oligomerización o la afinidad por sus ligandos. Lo anterior podría darse en respuesta a las necesidades de la célula en un microambiente en particular (Rabouille C., 2017).

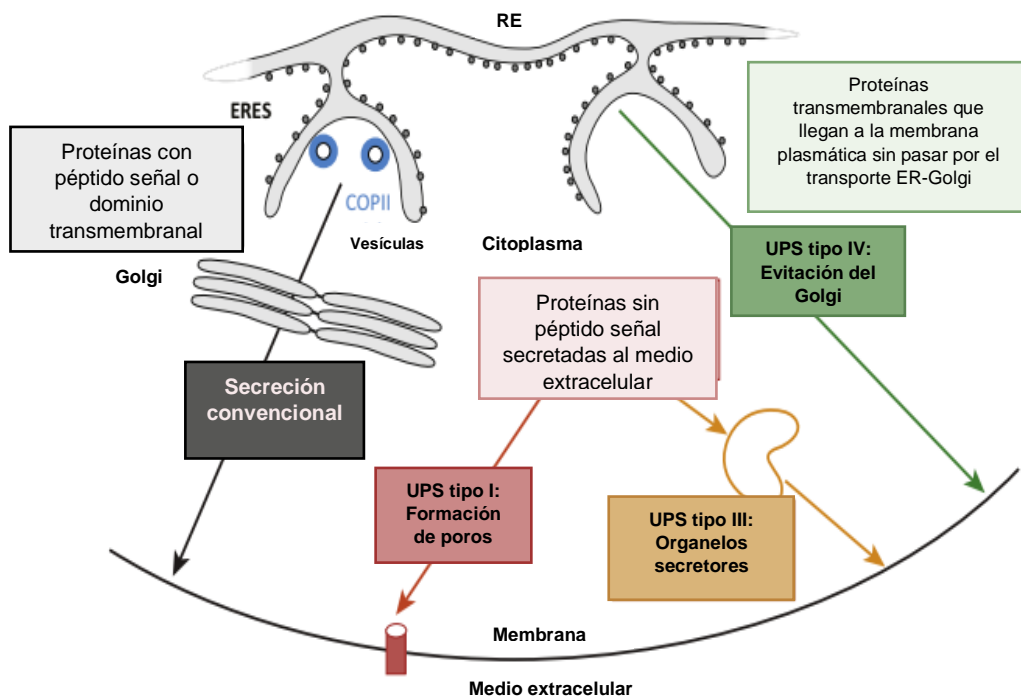


Figura 1. Representación esquemática de la vía convencional y las vías no convencionales de secreción (UPS). Modificado de (Rabouille C., 2017)

2. Proteínas secretadas por medio de las vías UPS: Citocinas

Existen proteínas, como algunas citocinas, que requieren de las vías UPS para su exocitosis. Dichas proteínas juegan un papel muy importante en la comunicación intercelular (Stenken JA. *et al.*, 2014). Su producción es transitoria y altamente regulada, mientras que su función depende de varios factores, como su disponibilidad en el medio extracelular, sus requerimientos de activación, su concentración, el efecto combinatorio con otras citocinas y la etapa en la que se encuentra la infección o la enfermedad. Comúnmente las citocinas son clasificadas en dos grandes grupos de acuerdo a su función. Son consideradas proinflamatorias cuando promueven la destrucción de patógenos y por ende la inflamación, o bien antiinflamatorias cuando promueven la activación de mecanismos de recuperación una vez que se han eliminado los patógenos del organismo (Soni *et al.*, 2020). Generalmente las citocinas se asignan a una familia de proteínas, basándose en criterios como la homología entre sus secuencias y sus propiedades funcionales (Akdis M. *et al.*, 2016). Una de las familias más estudiadas y de gran importancia para el funcionamiento del sistema inmunológico son las citocinas de la superfamilia de IL-1.

Esta familia comprende once miembros, incluyendo siete agonistas proinflamatorios (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ) y cuatro antagonistas (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-37 e IL-38) que ejercen actividades antiinflamatorias (Akdis M. *et al.*, 2016). Dicha superfamilia de citocinas y sus receptores afectan un amplio espectro de respuestas asociadas con inflamación y daño. Los once miembros de la familia se dividen en tres subfamilias: la subfamilia de IL-1, la subfamilia de IL-18, y la subfamilia de IL-36. Con excepción de IL-1Ra, todos los miembros de la familia de IL-1 carecen de péptido señal, por lo que no son secretados de forma convencional. Estos se encuentran en el citoplasma como precursores (Dinarello C., 2018a). Una de las características principales de la superfamilia de IL-1 es la necesidad de procesamiento para ser completamente bioactivas. Algunos miembros comparten a las proteasas encargadas de procesarlas, mientras que otros miembros son procesados por proteasas con diferentes requerimientos. El procesamiento funciona como el primer punto de control que regula la actividad de las citocinas de la superfamilia de IL-1. El segundo punto de control le corresponde al mecanismo de secreción de las citocinas, el cual, es una respuesta

fundamental al daño y la infección del organismo y su importancia radica en la capacidad de alertar o suprimir el resto del sistema inmunológico (Stanley AC. et al., 2010). La secreción de este tipo de citocinas se ve afectado por otra de sus características más importantes, la falta de péptido señal en su estructura (Dinarello C., 2018b). Esto les impide acceder al mecanismo convencional de secreción, es por ello que optan por utilizar los mecanismos no convencionales de secreción que involucran poros de membrana, vesículas, entre otros (Rabouille C., 2017).

3. Expresión, procesamiento y secreción de la subfamilia de IL-1

3.1 IL-1 α

IL-1 α se expresa de manera constitutiva en diversos tipos celulares en tejidos sanos. Se puede inducir un incremento en su expresión en respuesta a factores de crecimiento, estímulos proinflamatorios, estrés oxidativo, citocinas proinflamatorias como IL-1 β y la misma IL-1 α , así mismo, en respuesta a componentes de origen microbiano. IL-1 α es sintetizada como pro-IL-1 α , y es procesada por proteasas como calpaína, granzima B y elastasa, lo que lleva a la exposición de residuos clave para su unión con el receptor IL-1RI. El procesamiento por calpaína incrementa la actividad de la citocina y aumenta hasta cincuenta veces su afinidad por el receptor IL-1RI comparada con el precursor. Sin embargo, también presenta actividad como precursor (Pyrillou *et al.*, 2020).

Pro IL-1 α contiene una secuencia de localización nuclear (LKKRRL) en su porción N-terminal, la cual, es retenida a pesar de ser procesada por calpaína, granzima B y elastasa. Dicha secuencia le confiere la capacidad de translocarse al núcleo donde también posee actividad como factor de transcripción. Además, ha sido reportado que es capaz de interactuar con la acetiltransferasa de histonas p300/pCAF. Se encontró que IL-1 α es acetilada en la lisina 82 (K82) dentro de la secuencia de localización nuclear. Dicha acetilación es responsable de su localización nuclear, demostrando que la modificación postraduccional de IL-1 α regula su localización celular. Su regulación es de suma importancia para el organismo ya que esta es capaz de activar a la respuesta inflamatoria. Lo anterior se logra a través de IL-1R2 presente en el citoplasma, el cual se asocia con pro IL-1 α secuestrándola y bloqueando así su capacidad de señalización. Para llevar a

cabo su función, pro IL-1 α requiere de la pérdida de la integridad de la membrana para su secreción y la subsecuente activación de la cascada inflamatoria. Ha sido demostrado que IL-1 α es secretada durante la necrosis, sin embargo, la evidencia sugiere que también puede ser secretada por células que mantienen su integridad. Al carecer de péptido señal su secreción depende de mecanismos de secreción no convencional. Se ha observado que la secreción de pro IL-1 α depende de la activación del inflamosoma NLRP3 y de caspasa-1 post estimulación con LPS y ATP. Así mismo, se ha identificado que la acetilación de IL-1 α no solo regula su localización celular, sino que también juega un papel en la secreción de la citocina ya que al inhibir a las histona-desacetilasas (HDACs) se reduce la secreción del precursor de IL-1 α de macrófagos estimulados con LPS, demostrando que las HDACs juegan un papel importante como reguladores de la secreción de esta citocina (Cohen *et al.*, 2015; Di Paolo *et al.*, 2016). Se desconoce si este mecanismo podría estar regulando la secreción de otras citocinas de la superfamilia de IL-1. IL-1 α es activa a bajas concentraciones es altamente regulada y presenta un papel importante más allá de la inflamación. La señalización de esta citocina es vital para una respuesta innata eficiente. Los procesos mediados por IL-1 α incluyen secreción de otras citocinas proinflamatorias, regulación de la adhesión, reclutamiento y activación de distintas células del sistema inmune (Pyrillou *et al.*, 2020). Además, IL-1 α ha sido asociada con el desarrollo de diversas patologías (tabla 1).

3.2 IL-1 β

IL-1 β es producida en respuesta a una gran variedad de productos microbianos, y aparentemente es capaz de utilizar más de una vía de secreción UPS, entre las cuales se encuentran la secreción a través de poros de membrana (UPS I), a través de vesículas y lisosomas secretores (UPS III) (Dinarello C., 2018a; Qu Y. *et al.*, 2019; Rabouille C., 2017). Interesantemente, el procesamiento y la secreción de IL-1 β se encuentran acoplados. El procesamiento del precursor de IL-1 β puede darse de forma extracelular donde el procesamiento es llevado a cabo por proteinasa-3, elastasa, metaloproteasa 9 y granzima A, o bien, de forma intracelular por caspasa-1 ya sea en lisosomas secretores especializados o en el citoplasma (Dinarello C., 2018a; Qu Y. *et al.*, 2019). El

procesamiento del precursor de IL-1 β comienza tras la activación de NLRP3 y la subsecuente activación de caspasa-1 que reconoce un sitio de corte en IL-1 β , donde la procesa, generando así la forma madura de la citocina (Dinarello C., 2018a).

Recientemente se estableció que los macrófagos pueden secretar IL-1 β madura a través de poros de membrana formados por GSDMD, en respuesta a estímulos inflamatorios, en un estado de hiperactivación que se da en ausencia de lisis celular (Evavold C. et al., 2018). GSDMD, al igual que IL-1 β , también es procesada por caspasa-1 como consecuencia de la activación del inflamosoma (Dinarello C., 2018a). Esto ocurre durante la activación del receptor P2X7 por ATP proveniente de células y tejidos dañados durante la inflamación (Alves L. et al., 2014). IL-1 β ha sido vinculada con la secreción a través de poros de membrana formados por GSDMD y P2X7R, ya que al inhibir tanto P2X7R como GSDMD, IL-1 β se acumula dentro de la célula, sugiriendo que ambas moléculas están involucradas en su secreción (Di Virgilio F. et al., 2018; Evavold C. et al., 2018; Giuliani A. et al., 2017). Se ha descrito que IL-1 β también es capaz de usar la vía UPS III en condiciones de ayuno. Se ha propuesto que la citocina llega al lumen del endo/lisosoma donde es procesada a su forma madura. Al fusionarse este organelo con la membrana plasmática, la forma madura de la citocina es liberada al medio extracelular. Así mismo, se ha demostrado que IL-1 β puede translocar a través de la membrana lisosomal usando un transportador. El motivo necesario para la translocación de IL-1 β a través de la membrana lisosomal presenta características similares al empleado por CMA. Sin embargo, IL-1 β no es degradada si no secretada y su translocación parece depender de Hsp90 y no de Hsp70 (Rabouille, 2017; Zhang M. et al., 2015). Por otro lado, también se ha reportado que los microtúbulos participan en la secreción de IL-1 β , ya que al usar agentes desestabilizadores de microtúbulos como tazol y nocodazol, se inhibe la secreción de la citocina. Esto sugiere que se necesita una red de microtúbulos funcional para la secreción de IL-1 β . Además, se observó que inhibidores de HDACs logran reducir la secreción de IL-1 β de manera eficiente, por lo que es probable que el estado de acetilación de tubulina impacte de forma significativa en el proceso de secreción de este tipo de citocinas (Carta et al., 2006).

Dentro de los efectos biológicos de IL-1 β se han observado el reclutamiento de leucocitos al sitio de la inflamación, la producción de enzimas como fosfolipasa A2, ciclo oxigenasa 2, que llevan a la liberación de prostaglandina E2. Así mismo, se ha reportado que estimula la producción de varias metaloproteinasas, lo que lleva a la destrucción de tejido conectivo y la inhibición de la producción de colágeno tipo II y proteoglicanos, ejerciendo así un efecto negativo en el cartílago articular. Los efectos sistémicos de IL-1 incluyen hipotensión, fiebre, neutrofilia, trombocitosis y producción de proteínas de fase aguda. Algunos de estos efectos son inducidos de forma indirecta a través de otras citocinas y quimiocinas orquestadas por IL-1 β (Gabay *et al.*, 2010). Debido a estas funciones en la inflamación, se le ha relacionado con el desarrollo de más de una enfermedad (Tabla 1).

4. Expresión, procesamiento y secreción de la subfamilia de IL-18

La subfamilia de IL-18 está conformada por la citocina IL-18 y la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP), la cual, funciona como su antagonista.

IL-18 es una citocina de la superfamilia de IL-1 que se expresa de forma constitutiva principalmente en células de linaje monocítico. Sin embargo, también ha sido detectada en otros tipos celulares como células epiteliales, queratinocitos, y monocitos de individuos sanos. En ratones sanos se ha observado en macrófagos peritoneales y en el bazo. Es sintetizada como un precursor inactivo que carece de péptido señal. Al igual que IL-1 β , el procesamiento de IL-18 está a cargo de caspasa-1, como respuesta al ensamble del inflamosoma NLRP3. Una vez procesada, IL-18 es secretada al medio extracelular. No obstante, aproximadamente el 80% del precursor permanece no procesado de forma intracelular y una vez secretado es escindido por proteasas de neutrófilos en el medio extracelular (Dinarello C. *et al.*, 2013). La secreción de IL-18 se lleva a cabo a través de vías de secreción no convencionales debido a que carece de péptido señal. Se le ha involucrado con las vías UPS I y III. En cuanto a la vía I se observó su secreción a través de poros de membrana formados por P2X7R. Así mismo se le ha asociado con la vía UPS III que involucra organelos secretores. Se observó que en células dendríticas se encuentra el precursor de IL-18 en organelos secretores del compartimiento

endolisosomal; al entrar en contacto con linfocitos T antígeno específicos se induce la secreción del precursor de IL-18. Dicho mecanismo es dependiente de calcio, ya que al bloquear los canales de calcio tipo L se inhibe la liberación de la citocina (Gardella S. *et al.*, 2000; Lister M. *et al.*, 2007; Wiley JS. *et al.*, 2011).

IL-18 ha sido implicada en el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes como síndrome metabólico, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, síndromes hemo fagocíticos, sepsis y daño agudo a riñón. Sin embargo, al igual que otros miembros de la superfamilia, también se le ha involucrado en efectos protectores en algunas patologías. Una de las funciones características de IL-18 es la inducción de la producción de IFN- γ , con IL-12 o IL-15, por linfocitos T y células *natural killer* (NK). Es así como participa en la polarización a linfocitos Th1. La actividad biológica de IL-18 puede ser neutralizada por el otro miembro de esta subfamilia, la proteína de unión a IL-18, la cual, se une a la forma madura de la citocina con gran afinidad. IL-18BP es sintetizada con péptido señal, por lo que es rápidamente secretada y su expresión es altamente regulada a nivel de expresión génica. Interesantemente, IFN- γ aumenta su expresión, creando un bucle de retroalimentación negativa para IL-18 (Dinarello C. *et al.*, 2013). IL-18 ha sido involucrada en el desarrollo de más de una patología (Tabla 1).

Tabla 1. Enfermedades asociadas con IL-1 α , IL-1 β e IL-18

Citocina	Enfermedad	Referencia
IL-1 β	Diabetes tipo I	(Pyrillou <i>et al.</i> , 2020)
IL-1 β / IL-18	Diabetes tipo 2	(Kaplanski, 2018)
IL-1 β	Artritis reumatoide	(Pyrillou <i>et al.</i> , 2020)
IL-1 β	Psoriasis	(Cai <i>et al.</i> , 2019)
IL-18	Esclerosis múltiple	(Italiani <i>et al.</i> , 2018)
IL-1 α /IL-1 β	Cáncer	(Chiu <i>et al.</i> , 2021; Di Paolo <i>et al.</i> , 2016)
IL-18/IL-1 β	Ateroesclerosis	(Kaplanski, 2018)
IL-18	Asma	(Kaplanski, 2018)

5. Subfamilia de IL-36

Previamente conocidas como IL-1F6, IL-1F8 e IL-1F9 y posteriormente denominadas IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ respectivamente, las citocinas IL-36 fueron descubiertas por primera vez en bases de datos de secuencias como resultado de su homología con IL-1 α e IL-1 β (Debets R. *et al.*, 2001; Dunn E. *et al.*, 2001). Las tres citocinas IL-36 provienen de genes independientes y se encuentran agrupadas en el cromosoma 2 en humano junto con su receptor IL-36R, en el mismo *locus* que incluye genes de otros miembros de la superfamilia como IL-1 β e IL-1 α (Mulero J. *et al.*, 1999). Se ha observado la expresión de los miembros de la subfamilia de IL-36 bajo condiciones inflamatorias principalmente en piel, pulmón e intestino. Sin embargo, se ha observado una expresión diferencial entre ellas dependiendo del tejido. Se ha reportado la expresión preferencial de IL-36 α en piel durante psoriasis y en menor grado de IL-36 γ . En intestino se ha identificado la expresión predominante de IL-36 γ . Mientras que en pulmón durante infección por influenza se expresa predominantemente IL-36 α y en menor grado IL-36 γ . IL-36 β ha sido detectada de forma preferencial en piel durante la infección por herpes virus simplex-1 (Milora *et al.*, 2017). IL-36 α e IL-36 β presentan un 36.30% de identidad, IL-36 α e IL-36 γ presentan un 43.24% de identidad, mientras que IL-36 β e IL-36 γ presentan un 39.19% de identidad (Gabay C. *et al.*, 2015; Gresnigt MS. *et al.*, 2013; Medina-Contreras O. *et al.*, 2016). Las tres citocinas IL-36 señalizan a través del receptor heterodimérico IL-36R conformado por la proteína 2 relacionada al receptor de IL-1 (IL-1RL2), y la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL1RAcP). La proteína accesoria del receptor de IL-1 se comparte con IL-1 α , IL-1 β e IL-33, mientras que la cadena IL-36R es exclusiva para las citocinas IL-36 (Towne *et al.*, 2004). Una vez que los agonistas se unen al IL-36R, se recluta la proteína accesoria, resultando en la señalización por el dominio TIR en su cola citoplasmática, lo cual culmina en la activación de NF κ B y MAPKs (Gabay C. *et al.*, 2015).

Similar a IL-1, también la subfamilia de IL-36 cuenta con un antagonista del receptor (IL36Ra), el cual se une y previene la unión de los agonistas (Debets R. *et al.*, 2001). La unión del antagonista inhibe el reclutamiento de IL1RAcP bloqueando así la señalización (Fig. 2.) (Gabay C. *et al.*, 2015; Yi G. *et al.*, 2016). Las citocinas IL-36 como todos los miembros de la familia de IL-1 a excepción de IL-1Ra, son sintetizados sin péptido señal, por lo tanto, son secretadas siguiendo la vía no convencional de secreción (Towne JE. *et*

al., 2011). Además, requieren procesamiento postraduccional para su óptima actividad (Towne JE. *et al.*, 2011).

5.1 Importancia de las citocinas IL-36 en enfermedades inflamatorias

Con un papel reconocido en la regulación de la inflamación, las citocinas IL-36 han surgido como mediadoras de más de una enfermedad inflamatoria, y se ha observado que son capaces de inducir respuestas inflamatorias y regular la respuesta inmune en mucosas (Ngo VL. *et al.*, 2018). Además, han sido involucradas en el desarrollo de enfermedades en la piel, el intestino y los pulmones (Ding L. *et al.*, 2018; Medina-Contreras O. *et al.*, 2016; Towne JE. *et al.*, 2012).

IL-36 γ e IL-36 α han sido identificadas como dos de los trece marcadores característicos de genes que se encuentran activados en las lesiones de psoriasis. Lo anterior fue reportado tras encontrar un *set* de genes activados en la piel de pacientes con psoriasis, entre los cuales destacaban de forma importante dichas citocinas (Blumberg H. *et al.*, 2010; Keerman M. *et al.*, 2015). Por otro lado, estudios realizados en ratones deficientes de IL36R (*Il36r*^{-/-}) demostraron que la deficiencia en la señalización de las citocinas resulta en una disminución de IL-17A y en una versión más leve de lesiones tipo psoriasis en ratones tratados con imiquimod. En contraste, ratones transgénicos que presentan sobre expresión de IL-36 α , desarrollan lesiones espontáneas en la piel muy similares a lesiones de psoriasis. Sugiriendo que las citocinas IL-36 regulan la inflamación en la piel. Se ha reportado que dichas citocinas son capaces de activar a los queratinocitos y mediar la interacción de las células dendríticas con las células T, lo cual resulta en la infiltración del tejido, la activación celular y proliferación anormal de los queratinocitos, lo que contribuye a las características principales de psoriasis (Fig. 3) (Blumberg H. *et al.*, 2010; Ding L. *et al.*, 2018; Tortola L. *et al.*, 2012; Towne JE. *et al.*, 2012). Además, aproximadamente del 20-30% de los pacientes con psoriasis desarrollan artritis (Gresnigt MS. *et al.*, 2013), enfermedad en la cual también han sido involucradas las citocinas IL-36. Se observó que en el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide se encuentra un aumento en la expresión de IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ particularmente en células plasmáticas CD-138⁺ (Ding L. *et al.*, 2018).

Así mismo, se observó que IL-36 γ se expresa en enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en humanos, la cual comprende a la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerosa (UC), así como durante la colitis experimental. Dichos estudios demostraron que la microbiota intestinal juega un papel importante en la inducción de la expresión de la citocina, ya que al eliminar la microbiota se abate su expresión incluso bajo estímulos inflamatorios (Medina-Contreras O. et al., 2016). Por otro lado, se reportó que la fuente de IL-36 γ son principalmente monocitos/macrófagos y células dendríticas en la mucosa intestinal inflamada y en menor proporción por parte de linfocitos infiltrados en la mucosa, sin embargo, los miofibroblastos y las células epiteliales también podrían ser fuentes importantes de esta citocina (Medina-Contreras O. et al., 2016; Nishida A. *et al.*, 2016); Scheibe *et al.* (2017). Sorprendentemente, los ratones deficientes de IL36R mostraron defectos en la recuperación post tratamiento con DSS. La incapacidad de los ratones deficientes del receptor para recuperarse está asociada con una significativa reducción en la expresión de IL-22 (Medina-Contreras O. et al., 2016). Diversos tipos celulares expresan el receptor de IL-36 γ y se ha observado que durante el tratamiento con DSS se da un aumento significativo en su expresión, el cual correlaciona con la acumulación de células dendríticas CD11b+ CD103+, las cuales son la fuente principal de IL-23 según varios reportes (Vigne S. *et al.*, 2011). Dichas células dendríticas son capaces de secretar IL-23 en respuesta a IL-36 γ . Seguido de la expresión de IL-23, diversos tipos de células que expresan IL-23R son capaces de producir IL-22 en respuesta a la anterior (Ngo VL. et al., 2018). Además, se observó que las citocinas IL-36 son capaces de inducir otras citocinas proinflamatorias en células epiteliales, así como las quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL6 y CXCL8 (Nishida A. et al., 2016).

5.2 Procesamiento de las citocinas IL-36

La necesidad de procesamiento es una de las características de los miembros de la superfamilia de IL-1 (Dinarello C., 2018a). Dicho requerimiento se hizo evidente para las citocinas IL-36 tras el reporte de la utilización de elevadas concentraciones de las citocinas para ejercer su efecto biológico y la incapacidad de replicar el efecto antagónico de IL-36Ra (Towne JE. et al., 2011). Se demostró que al eliminar la metionina inicial de IL-36Ra se lograba replicar el efecto antagónico reportado previamente (Debets R. et al.,

2001). Esto fue el primer indicio que sugirió que los miembros de la subfamilia de IL-36 también requieren procesamiento. Posteriormente se observó que al truncar las citocinas IL-36 α , IL-36 β e IL-36 γ en una posición específica 9 aminoácidos del N-terminal aumenta su actividad hasta 10,000 veces. Aún no está claro si el procesamiento de las citocinas IL-36 está acoplado a su secreción, como ha sido reportado para IL-1 β e IL-18 (Towne JE. et al., 2011). Reportes previos demostraron que las citocinas IL-36 son activadas por proteasas provenientes de neutrófilos. Se demostró que Catepsina G escinde a IL-36 β en Arg5, mientras que IL-36 γ es procesada por elastasa y proteinasa-3 en el residuo Val15 (Henry C. et al., 2016). Sin embargo, la expresión de dichas proteasas de neutrófilos se encuentra limitada a sitios de inflamación aguda (Ainscough et al., 2017).

En 2017 se reportó que el procesamiento de IL-36 γ es independiente de caspasa-1 y que la cisteín-proteasa catepsina S es capaz de procesarla y activarla (Ainscough et al., 2017). Se detectó la actividad de catepsina S tanto intracelular como extracelularmente y se observó que puede ser secretada por células residentes de la piel tales como fibroblastos y queratinocitos, sugiriendo que catepsina S podría ser la principal procesadora de IL-36 γ en tejidos de barrera (Ainscough et al., 2017). Además, se observó que tanto los niveles, así como la actividad de catepsina S se encuentran elevados en lesiones de piel con psoriasis y que IL-36 γ (S18) el producto de catepsina S, lleva al desarrollo de hiperqueratosis (Ainscough et al., 2017). La mayoría de las proteasas que procesan a los precursores de IL-1 han sido identificadas como proteasas citosólicas, por lo tanto, la mayoría de los modelos de secreción de IL-1 indican que el procesamiento ocurre antes de la secreción (Dinarello C., 2018b). En contraste, se ha reportado en tejidos de barrera como la piel, que catepsina S es rápidamente secretada sugiriendo que esta proteasa también se encuentra de forma abundante en el espacio extracelular (Ainscough et al., 2017). Ya que IL-36 γ presenta señalización autocrina en queratinocitos (Towne JE. et al., 2012) y es inducida por estímulos microbianos (Medina-Contreras O. et al., 2016), se ha hipotetizado que IL-36 γ secretada como consecuencia de la muerte celular por necrosis, es rápidamente activada por catepsina S extracelular (Ainscough et al., 2017). Sin embargo, podrían existir otros mecanismo de salida de la citocina como ha sido reportado para otros miembros de la superfamilia como IL-1 β e IL-18, las cuales utilizan más de un mecanismo de secreción no convencional, principalmente poros de

membrana y vesículas (Evavold C. et al., 2018; Qu Y. et al., 2019). Por lo tanto, es probable que IL-36γ utilice alguno de estos mecanismos de secreción no convencional.

5.3 Secreción de las citocinas IL-36

Existen diversos factores que pueden impactar en el mecanismo de secreción de una proteína como la existencia de péptido señal en su secuencia, el tamaño de la proteína, la carga neta y la asociación física con componentes del citoesqueleto. Dichas características participan en la selección del mecanismo de secreción adecuado para cada proteína. Al igual que el resto de los miembros de la superfamilia de IL-1, las citocinas IL-36 se traducen a partir de RNA mensajero que carece de secuencias codificantes para un péptido señal. Es por ello, que una vez que son traducidas, se acumulan en el citosol hasta ser liberadas. Estudios previos sobre la secreción de algunos miembros de la superfamilia de IL-1 han demostrado que es un proceso orquestado por una activación a través de dos señales (Martin U. et al., 2009). La primera señal es dada por la señalización a través de los TLRs en respuesta a PAMPs como LPS, Poly (I:C), flagelina, entre otros. Esta señal funciona como estímulo inductor de la expresión de dichas citocinas proinflamatorias (Lian L-H. et al., 2012; Medina-Contreras O. et al., 2016). La segunda señal, dada por la estimulación con ATP, funciona como estímulo activador de la secreción (Martin U. et al., 2009). Dicha señalización es mediada por el receptor purinérgico P2X7R, el cual se expresa de forma importante en células del sistema inmunológico como monocitos, macrófagos y linfocitos (Wiley JS. et al., 2011). Su activación promueve la salida de K⁺ y la subsecuente activación del inflamosoma NLRP3 (He Y. et al., 2016; Lister M. et al., 2007), lo cual culmina en el procesamiento de IL-1β, IL-18 y GSDMD. GSDMD forma poros en la membrana plasmática, lo que permite la salida de contenido citoplasmático, incluyendo a IL-1β e IL-18 previamente activadas (Evavold C. et al., 2018). Por otro lado, se ha demostrado en algunos tipos celulares como en macrófagos THP-1, que la señalización de ATP a través de P2X7R también lleva a la liberación de micro vesículas provenientes de la superficie celular, que van cargadas con IL-1β (Giuliani A. et al., 2017; Martin U. et al., 2009; Qu Y. et al., 2019). El papel del P2X7R en la secreción de dichas citocinas ha sido demostrado ya que, al bloquearlo, se impide la exocitosis de IL-1β e IL-18 (Giuliani A. et al., 2017).

Previamente se demostró que la exposición a LPS promueve la síntesis de IL-36 α (Martin U. et al., 2009), IL-36 γ (Medina-Contreras O. et al., 2016) e IL-1 β (Martin U. et al., 2009) y prepara a la célula para el estímulo de la secreción, dado por ATP, pueda activar al inflamosoma (He Y. et al., 2016). Así mismo, se reportó que IL-36 α no es secretada de forma constitutiva, sino que requiere de ambas señales para su secreción, la cual es rápida y no específica (Martin U. et al., 2009). De igual manera, se demostró que IL-36 γ también emplea el modelo de dos señales para su secreción en queratinocitos. Se observó su exocitosis en respuesta a flagelina y la subsecuente exposición a ATP (Lian L-H. et al., 2012). Lo que sugiere que la señalización a través de los TLRs y la activación del P2X7R constituyen un mecanismo complejo y regulado que controla la liberación de citocinas proinflamatorias de la superfamilia de IL-1 (Martin U. et al., 2009).

6. JUSTIFICACIÓN

El estudio de la activación y secreción de las citocinas como puntos de regulación es de gran importancia debido a su impacto en la funcionalidad de la citocina, lo cual podría ayudar en el diseño de nuevos blancos terapéuticos contra las patologías exacerbadas por las citocinas IL-36. Desde su descubrimiento, IL-36 γ ha sido involucrada en el desarrollo de más de una enfermedad inflamatoria y autoinmune. A pesar del gran avance que se ha logrado en el descubrimiento de su función y mecanismo de señalización, aún hay aspectos que requieren ser investigados. En particular, los mecanismos que regulan su función, como el mecanismo empleado para su secreción. Hasta el momento se desconoce si el resto de los miembros de la superfamilia de IL-1 siguen los mismos mecanismos de secreción. Por lo tanto, hipotetizamos que IL-36 γ es secretada a través de poros de membrana bajo condiciones inflamatorias.

7. HIPÓTESIS

IL-36 γ es secretada a través de poros de membrana de la vía UPS I en macrófagos.

8. OBJETIVOS

- Objetivo general:

Determinar el mecanismo de secreción de IL-36γ.

- Objetivos específicos:

1. Determinar por modelado *in silico* si IL-36γ es secretada a través de poros de membrana
2. Evaluar de forma experimental la secreción de IL-36γ a través de poros de membrana
 - a) A través del poro formado por P2X7R
 - b) A través del poro formado por GSDMD
3. Establecer si IL-36γ es secretada completa o procesada

9. MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

En este estudio se utilizó la línea celular de macrófagos de ratón IC21 ATTC TIB-186.

Detalles metodológicos

Construcción de los modelos y docking de las moléculas IL-36 γ , P2X7R y GSDMD

Las secuencias de aminoácidos de IL-36 γ , GSDMD y P2X7R de ratón fueron obtenidas de uniprotKB (Q8R460, Q9D8T2 y Q9Z1M0 respectivamente). Posteriormente se construyeron los modelos en el servidor SWISS-MODEL, de donde se obtuvieron los monómeros de las proteínas. En seguida, se utilizó el programa MOE para refinar los modelos. Además, para el caso de GSDMD y P2X7R que son oligómeros, se realizó la construcción de las moléculas en su estado de oligómero. De 16 subunidades para el caso de GSDMD y de 3 subunidades para el caso de P2X7R. Lo anterior se realizó en el servidor SymmDock.

Expresión de IL-36 γ

Se sembraron 1×10^6 células IC21 ATTC TIB-186 en placas de cuarenta y ocho pozos (Corning, MA), se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 (Corning, MA) suplementado con 10% suero fetal bovino (PAN Biotech, DEU), antibiótico/antimicótico (Corning, MA) y L-glutamina (Corning, MA). 24h después de sembrar las células, se estimularon con $1 \mu\text{g/ml}$ de LPS (Sigma-Aldrich, MO) durante 18h, posteriormente se lisaron las células y se evaluó la expresión de IL-36 γ a nivel del ARNm y proteína a través de RT-PCR y Western blot respectivamente.

Secreción de IL-36 γ a través de poros de membrana

Se sembraron 1×10^6 células IC21 en placas de cuarenta y ocho pozos (Corning, MA), se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 (Corning, MA) suplementado con 1% suero fetal bovino (PAN Biotech, DEU), antibiótico/antimicótico (Corning, MA) y L-glutamina (Corning, MA). 24h después de sembrar las células, se estimularon con $1 \mu\text{g/ml}$ de LPS

(Sigma-Aldrich, MO) durante 18h para inducir la expresión de IL-36 γ y posteriormente se estimularon con 3mM ATP (InvivoGen, CA) en presencia o ausencia del inhibidor específico de P2X7R A438 (TOCRIS, UK) y GSDMD Necrosulfonamida (TOCRIS, UK) durante 1h. Posteriormente, se recuperaron los sobrenadantes y se lisaron las células para evaluar la presencia de IL-36 γ por western blot tanto en lisados como en sobrenadantes.

Precipitación de proteínas del sobrenadante

Se recuperaron los sobrenadantes y se precipitaron las proteínas con una solución 1:4 agua-acetona, se congelaron a -20°C durante 24h y posteriormente se centrifugaron las proteínas precipitadas a 4704 g (Thermo-Fisher, MA) durante 30 min. Posteriormente, se lavó la pastilla 2 veces con la misma solución de agua-acetona y finalmente se resuspendió la pastilla con RIPA (Sigma-Aldrich, MO), se hirvieron durante 10 min a 95°C. Posteriormente, se evaluó la presencia de IL36 γ en los sobrenadantes a través de western blot.

Localización de IL-36 γ en macrófagos IC21

Se sembraron 1x10⁶ células IC21 en cubreobjetos estériles (Corning, MA) en placas de seis pozos (Corning, MA), se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 (Corning, MA) suplementado con 10% suero fetal bovino (PAN Biotech, DEU), antibiótico/antimicótico (Corning, MA) y L-glutamina (Corning, MA). 48h posteriores a la siembra, las células se estimularon con 1 μ g/ml de LPS (Sigma-Aldrich, MO) durante 18h para inducir la expresión de IL-36 γ y posteriormente se estimularon con 3mM ATP (InvivoGen, CA) durante 1h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío (Sigma-Aldrich, MO) y fueron fijadas con 4% PFA durante 15 min. Las células se lavaron con PBS frío (Sigma-Aldrich, MO) y permeabilizadas con Triton 0.2% durante 15 min. Las células se lavaron con PBS frío (Sigma-Aldrich, MO) y posteriormente se añadió la solución de bloqueo 0.2% BSA-PBS (Sigma-Aldrich, MO) durante 1h a temperatura ambiente. Después se agregó el anticuerpo primario, α -IL-36 γ (Origene, MD) dilución 1:200, se incubó a 4°C toda la noche. Posteriormente las células se lavaron con PBS frío (Sigma-Aldrich, MO) y se agregó el anticuerpo secundario α -Rabbit-Alexa 594 (Origene, MD) dilución 1:1000 y

DAPI (Sigma-Aldrich, MO) dilución 1:1,500, se incubaron durante 1h a temperatura ambiente en obscuridad, después se lavó con PBS frío (Sigma-Aldrich, MO) y se montaron los cubreobjetos. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio Leica () con el objetivo de 40x.

Espectrometría de masas de sobrenadantes

Se realizó espectrometría de masas, cuadro polo-ESI-TOF (Braker, DEU), de los sobrenadantes de células IC21 estimuladas solo con 1µg/ml de LPS durante 18 h y 1µg/ml de LPS durante 18h, posteriormente 1h con 3mM ATP. De cada condición se tomaron 100 µg de proteína y fueron digeridos con tripsina. Se realizaron 3 inyecciones de cada condición y se realizó la búsqueda de péptidos en *Protein Scape*.

Inducción de catepsina S por IL-36γ

Se sembraron 1×10^6 células IC21 en placas de cuarenta y ocho pozos (Corning, MA), se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640 (Corning, MA) suplementado con 1% suero fetal bovino (PAN Biotech, DEU), antibiótico/antimicótico (Corning, MA) y L-glutamina (Corning, MA). 24h después de sembrar las células, se estimularon con 100ng/ml de IL-36γ (R&D, MN) recombinante durante (12h), posteriormente se lisaron las células y se terminó la expresión de catepsina S a nivel de ARN mensajero por RT-PCR y a nivel de proteína por western blot.

RT-PCR

Posterior a la estimulación, se agregaron 100µl de buffer RLT a 1×10^6 células IC21, se extrajo RNA empleando el kit Quick ARN Miniprep plus kit (Zymo Research, CA). Posteriormente se utilizó 1µg para sintetizar cDNA utilizando el kit de transcripción reversa QuantiTec (Qiagen, DEU). Una vez obtenido el cDNA se realizaron las qPCRs empleando sybgreen RT2 (Qiagen, DEU) y los iniciadores específicos para cada gen.

Tabla 2. Iniciadores sentido y antisentido de IL1F9, P2X7R, GSDMD, CATSS y GAPDH

Gene	Iniciador sentido	Iniciador anti sentido
IL1F9	5'-TTGACTTGGACCAGCAGGTGTG-3'	5'-GGGTACTTGCATGGGAGGATAG-3'
P2X7R	5'-CTGGTTTTTCGGCACTGGA-3'	5'-CCAAGTAGGACAGGGTGA-3'
GSDMD	5'-TGTC AACCTGTCAATCAAGGA-3'	5'-AGCCAAAACACTCCGGTTC-3'
CATSS	5'-GCATAGAGGCAGACGCTTCTTA-3'	5'-CCACTGCTTCTTTCAGGGCAT-3'
GAPDH	5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3'	5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'

10. RESULTADOS

10.1 LPS/ATP inducen la expresión y secreción de IL-36 γ en macrófagos

Se evaluó la expresión de IL-36 γ en la línea celular de macrófagos de ratón IC21 a nivel de ARNm y proteína bajo condiciones inflamatorias. Observamos que al agregar LPS al cultivo celular hay un incremento en los niveles de ARNm (Fig. 2A), así como de proteína (Fig. 2B). Estos resultados concuerdan con reportes previos donde se demostró que la expresión de IL-36 γ se da en respuesta a componentes bacterianos (Medina-Contreras O. et al., 2016). Se demostró que otros miembros de la subfamilia de IL-36 se expresan bajo condiciones inflamatorias similares. La expresión de IL-36 α es inducida no solo en respuesta a componentes bacterianos si no también ante otros estímulos como LPS/ATP en macrófagos derivados de médula ósea (Martin U. et al., 2009) lo cual, también se observa en nuestro modelo para IL-36 γ . Sin embargo, se observa una inducción de la expresión discreta en comparación con LPS (Fig. 2A) a nivel de ARN mensajero, pero no a nivel de proteína. Existen reportes donde ATP inhibe la expresión de ciertas moléculas, lo cual, tendría que ser explorado para el caso de IL-36 γ . Por otro lado, observamos que el estímulo de LPS/ATP induce la liberación de IL-36 γ hacia el medio extracelular (Fig. 2B). En conjunto, nuestros datos confirman que los componentes bacterianos inducen la expresión de IL-36 γ . Además, el estímulo con ATP induce su secreción en macrófagos IC21.

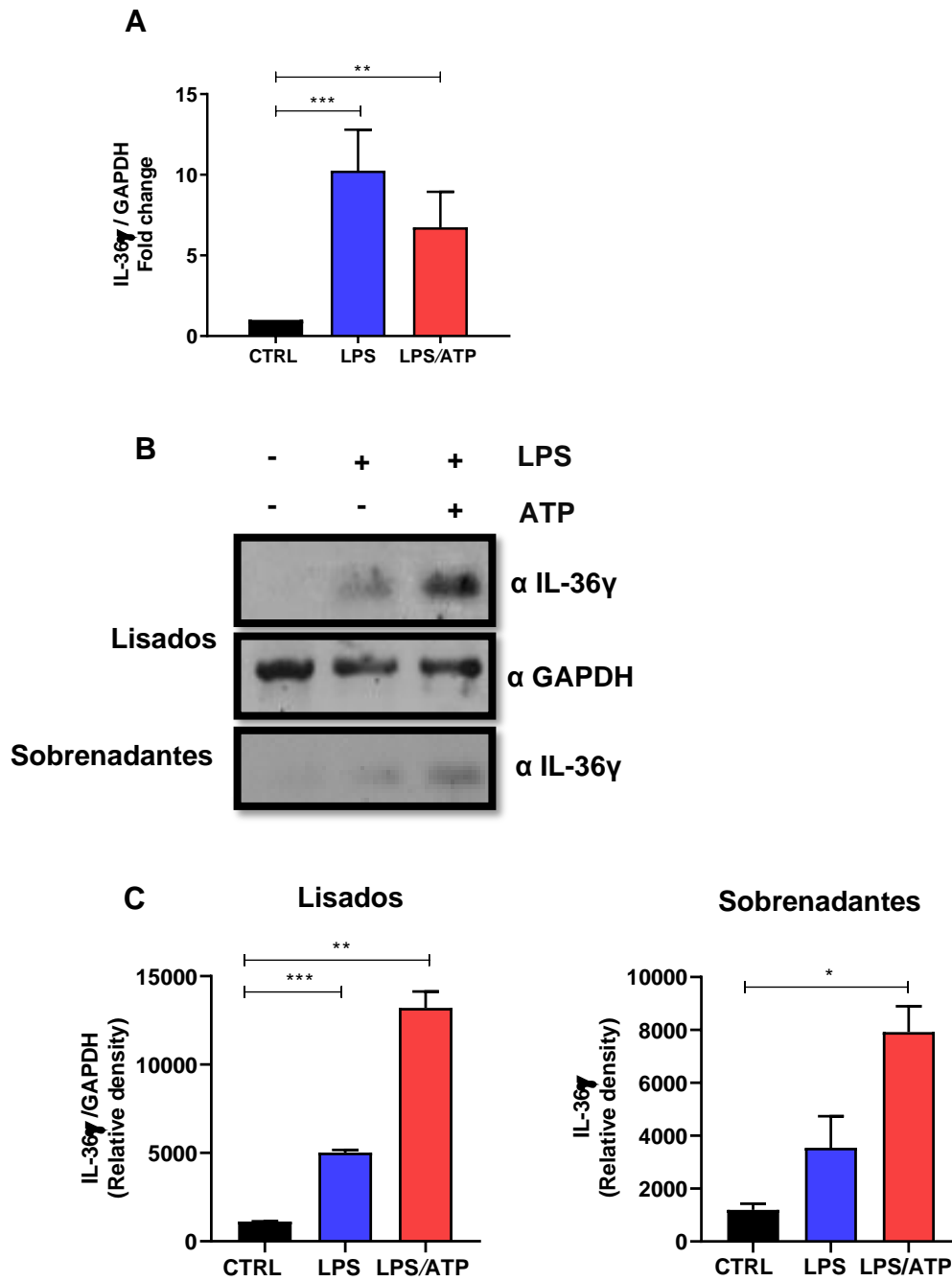


Figura 2. El estímulo LPS/ATP induce la expresión y secreción de IL-36γ en IC21. A) Expresión a nivel de ARN mensajero de IL-36γ en condiciones control, LPS, LPS/ATP, expresión normalizada con GAPDH. B) Expresión a nivel de proteína de IL-36γ en condiciones control, LPS, LPS/ATP, lisados y sobrenadantes. C) Cuantificación de la densidad relativa de la señal para IL-36γ en los lisados y sobrenadantes

10.2 IL-36 γ es capaz de pasar a través de los poros formados por P2X7R y GSDMD en un modelo *in silico*

Similar a la mayoría de las citocinas de la superfamilia de IL-1, IL-36 γ carece de péptido señal, es por ello que es incapaz de utilizar la vía no convencional de secreción de proteínas para su exocitosis (Martin U. et al., 2009). Lo anterior implica que la vía no convencional de secreción de proteínas es el mejor candidato para su exocitosis. Es por ello que primero evaluamos a través de modelos *in silico*, si IL-36 γ , al igual que otros miembros de la superfamilia, utiliza al P2X7R y GSDMD, moléculas formadoras de poros de membrana de la vía no convencional de secreción tipo I, para su secreción.

Para ello se construyeron los modelos de IL-36 γ , P2X7R y GSDMD de ratón a partir de sus secuencias de aminoácidos obtenidas de UniprotKB. Lo anterior se realizó en tres servidores diferentes que de acuerdo con la literatura son los mejores para realizar modelado por homología. Estos fueron: Swiss-Model, IntFold y Robetta. Realizamos los modelos y evaluamos su calidad a través del valor de Qmean, el cual se refiere a la estimación del error global de la estructura completa y la estimación del error local, es decir, de cada residuo. El score de Ramachandran, el cual permite determinar las conformaciones posibles para los ángulos psi y phi de los aminoácidos en una proteína. El valor ideal es de más de 98%, que indicaría que la mayoría de los aminoácidos se encuentran en conformación permitida. Finalmente, el score Molprobit, el cual supone la resolución cristalográfica que tendría una molécula, se basa en el *clash score* y en el *score* de no favorecidos de Ramachandran. Entre menor sea el número se refleja un modelo de buena calidad. En base a los tres parámetros anteriores, elegimos los modelos generados en el Swiss-Model (Waterhouse *et al.*, 2018), ya que eran los que presentaban mejor calidad.

Para IL-36 γ de ratón realizamos el modelo de la proteína completa y la procesada en el aminoácido S42 (Fig. 3A,B). Estos modelos se generaron a partir de su secuencia de aminoácidos, utilizando el cristal resuelto de IL36 γ humano como base con el que comparte 58.28% de identidad. La validación del modelo arrojó un Qmean de -0.53, score de Ramachandran del 96.64% y score Molprobit de 1.29. En conjunto, estos datos

indicaron que el modelo es de buena calidad. Para el caso de IL-36 γ procesada obtuvimos los mismos resultados, lo que indica que el procesamiento de la citocina genera un cambio en el tamaño; sin embargo, no genera cambios estructurales significativos en el modelo *in silico*. Posteriormente analizamos el tamaño y carga neta de IL-36 γ completa y procesada, observamos que ambas formas de la citocina presentan carga neta positiva y un tamaño aproximado de 3.7nm y 3.5 nm de diámetro la forma completa y procesada respectivamente.

Posteriormente, generamos el modelo del homotrímero de P2X7R en estado abierto, es decir, en presencia de ATP (Fig. 3F). Este se realizó a partir de su secuencia de aminoácidos, utilizando el cristal resuelto de rata como base con el que comparte 85% de identidad. La validación del modelo arrojó un Qmean de -2.70, score de Ramachandran de 94.79 y score Molprobability de 1.26. En conjunto estos datos indican que el modelo es de buena calidad. Posteriormente, se realizaron minimizaciones de energía y simulaciones de dinámica molecular para que la proteína obtuviera una forma más parecida a la que tendría la proteína nativa. Al analizar el diámetro del poro que se abre en presencia de ATP, observamos que éste es capaz de dilatarse hasta 5nm aproximadamente, en la molécula generada *in silico*. Además, analizamos la carga neta del receptor, donde encontramos que posee carga neta negativa, particularmente en la porción que se encuentra embebida en la membrana plasmática. En seguida, realizamos el modelo del fragmento N-terminal de GSDMD ya que esta es la fracción que oligomeriza en la membrana plasmática para formar el poro (Fig. 3D, E). Se realizó el modelo a partir de la secuencia de aminoácidos, utilizando el cristal resuelto de GSDMD de ratón como base con el cual presenta 97.95% de identidad. Sin embargo, obtuvimos un modelo de mediana-baja calidad en los tres servidores utilizados, obtuvimos un Qmean de -4.73, score de Ramachandran del 86.67%, y score Molprobability de 2.86. Lo cual podría deberse a una baja resolución del cristal en esta porción de la proteína. Posteriormente, se realizaron minimizaciones de energía y simulaciones de dinámica molecular para generar una configuración más parecida a la configuración nativa a través del programa MOE. Posteriormente, se importó a SymmDock, servidor que permite la generación de oligómeros (Schneidman-Duhovny *et al.*, 2005), donde pudimos generar la estructura del poro constituido de 16 monómeros de fragmentos N-terminal de GSDMD. Posteriormente

analizamos el tamaño del poro generado por GSDMD, el cual, es de aproximadamente 14nm de diámetro. De acuerdo con los datos obtenidos *in silico*, los tamaños de 3.7 y 3.5nm, así como, la carga neta positiva de IL-36 γ completa y procesada le permiten a travesar tanto el poro de 5nm formado por P2X7R como el poro de 14nm generado por GSDMD, de forma teórica, lo cual requiere confirmación experimental.

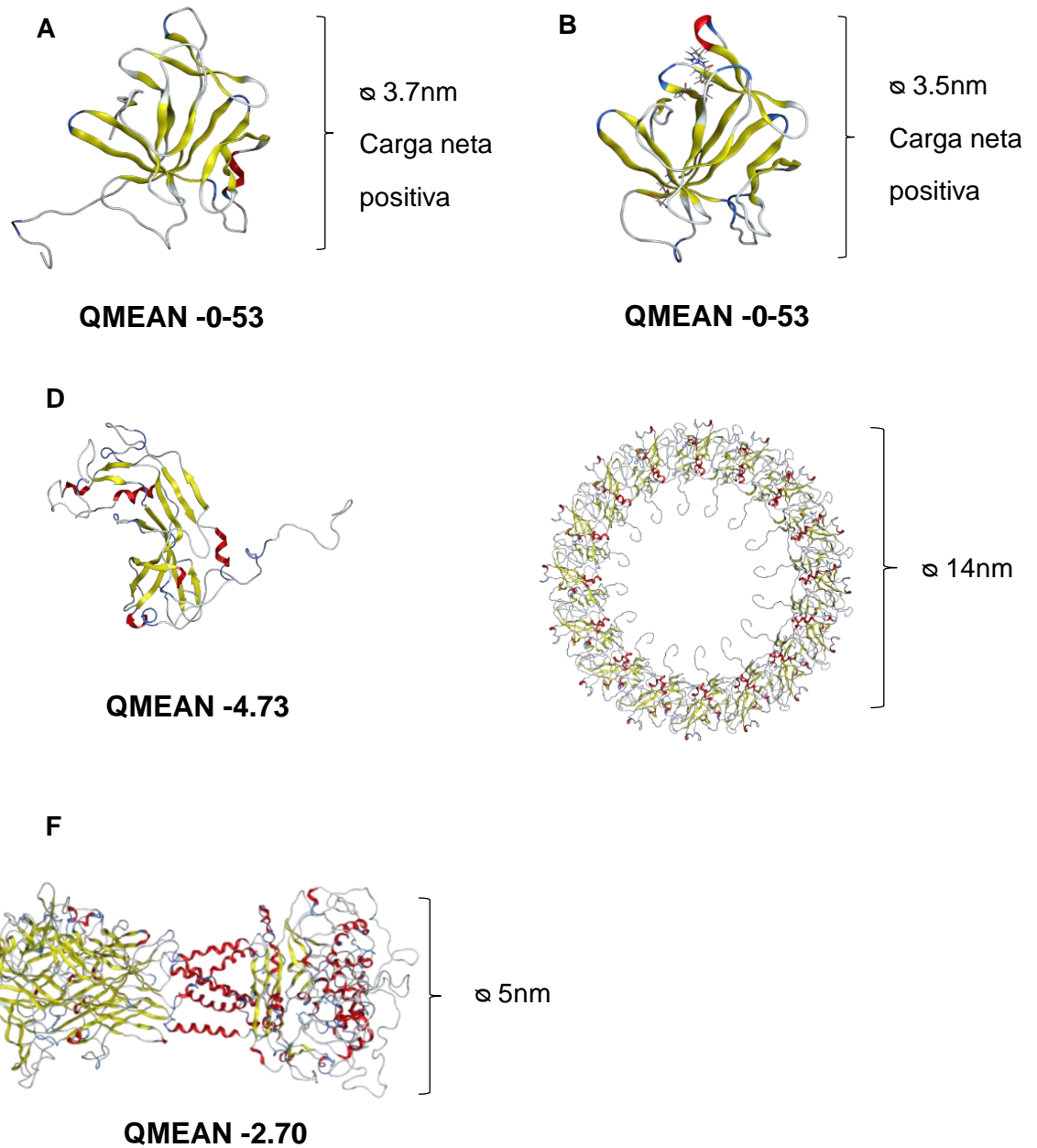


Figura 3. Modelos tridimensionales de IL-36 γ , GSDMD y P2X7R. A) Modelo de IL-36 γ completa y su validación, B) Modelo de IL-36 γ procesada y su validación, D) Modelo de GSDMD procesada y su validación, E) Modelo del poro de 16 monómeros de GSDMD, F) Modelo de P2X7R y su validación. ∅ Diámetro.

10.3 IL-36 γ es secretada vía UPS I, a través de P2X7R, bajo condiciones inflamatorias

Para confirmar los datos obtenidos a través de los modelos *in silico*, probamos de forma experimental la secreción de IL-36 γ a través del poro P2X7R de la vía UPS tipo I. Para evaluar lo anterior se utilizó el inhibidor específico de P2X7R A438, el cual funciona uniéndose al interior del receptor bloqueando su apertura, incluso en presencia de su ligando ATP. Se determinó la presencia de IL-36 γ tanto en lisados como en sobrenadantes de células tratadas con LPS, estímulo inductor de su expresión y ATP, estímulo inductor de la secreción, en presencia y ausencia de A438, por western blot. Observamos que en presencia del inhibidor específico de P2X7R, IL-36 γ se acumula dentro de la célula, como se observó en los lisados. En contraste, al evaluar los sobrenadantes, observamos una reducción significativa de IL-36 γ , de aproximadamente 75%, (Fig 4A) sugiriendo que P2X7R participa en la secreción de IL-36 γ .

Así mismo, se evaluó la secreción de IL-36 γ a través del poro formado por GSDMD. Para ello se utilizó el inhibidor específico Necrosulfonamida (NSA), el cual se une al fragmento N-terminal de GSDMD e impide su oligomerización y la formación del poro en la membrana plasmática. Se evaluó la presencia de IL-36 γ tanto en lisados como en sobrenadantes de células tratadas con LPS, estímulo inductor de su expresión y ATP, estímulo inductor de la secreción, en presencia y ausencia de NSA, por western blot. Observamos que en presencia del inhibidor específico de GSDMD, IL-36 γ se acumula dentro de la célula, como se observó en los lisados (Fig. 5A). En contraste, al evaluar los sobrenadantes, observamos una reducción significativa de IL-36 γ (Fig. 5A) sugiriendo que el poro formado por GSDMD participa en la secreción de IL-36 γ . Para dilucidar si estos son los únicos dos mecanismos de secreción utilizados por IL-36 γ bajo estímulos inflamatorios, se utilizaron ambos inhibidores y se evaluó la presencia de IL-36 γ en lisados y sobrenadantes por western blot. Observamos que en presencia de ambos inhibidores IL-36 γ se acumula en el interior de la célula como se observa en los lisados y disminuye significativamente en los sobrenadantes (Fig. 5C). Sin embargo, no desaparece por completo de los sobrenadantes indicando que podría existir un tercer poro o un tercer mecanismo que permite la salida de la citocina. En conjunto nuestros

datos demuestran que IL-36 γ es secretada por poros de membrana formados por P2X7R y GSDMD pertenecientes a la vía UPS I bajo estímulos inflamatorios.

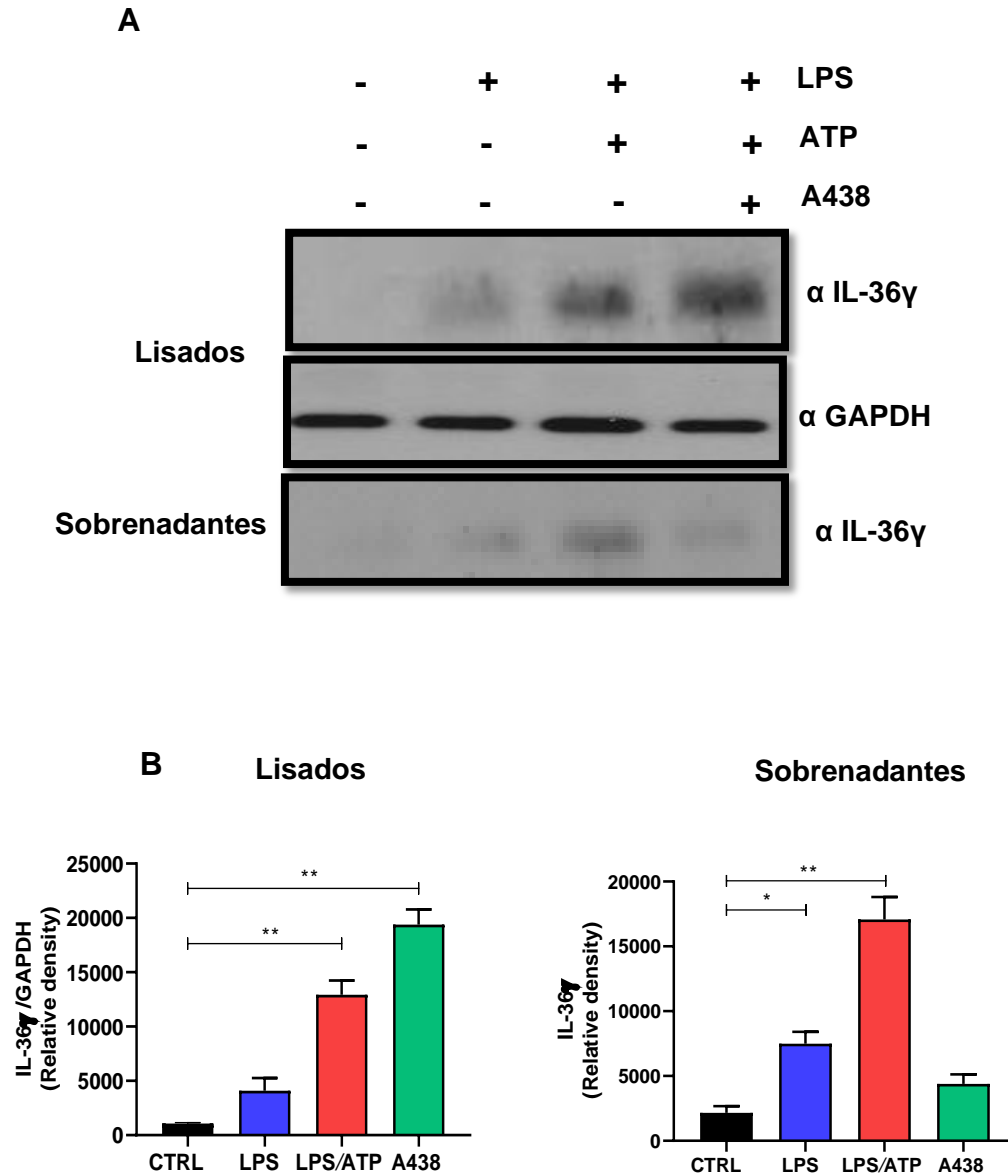


Figura 4. IL-36 γ es secretada a través de la vía UPS I utilizando al P2X7R. A) Western blot de lisados y sobrenadantes de células bajo condiciones CTRL, LPS, LPS/ATP y LPS/ATP+A438. B) Cuantificación de la densidad relativa de la señal para IL-36 γ en los lisados y sobrenadantes.

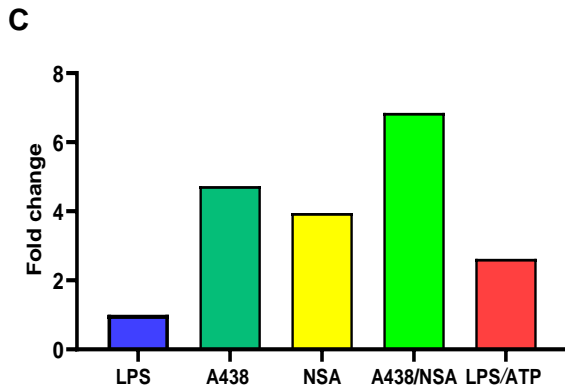
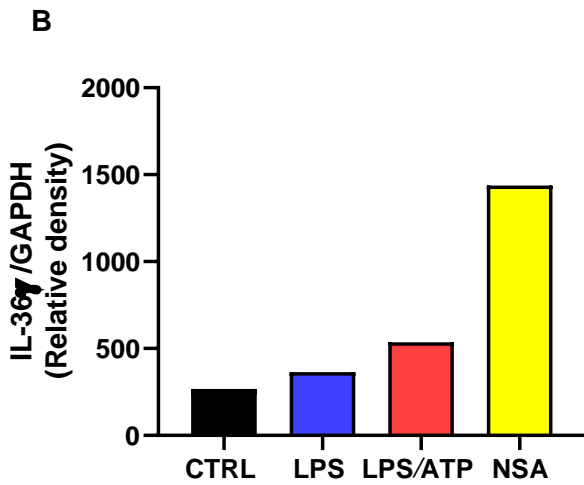
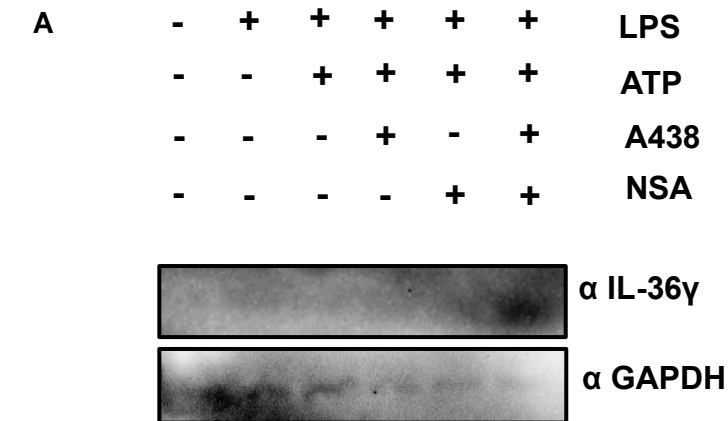
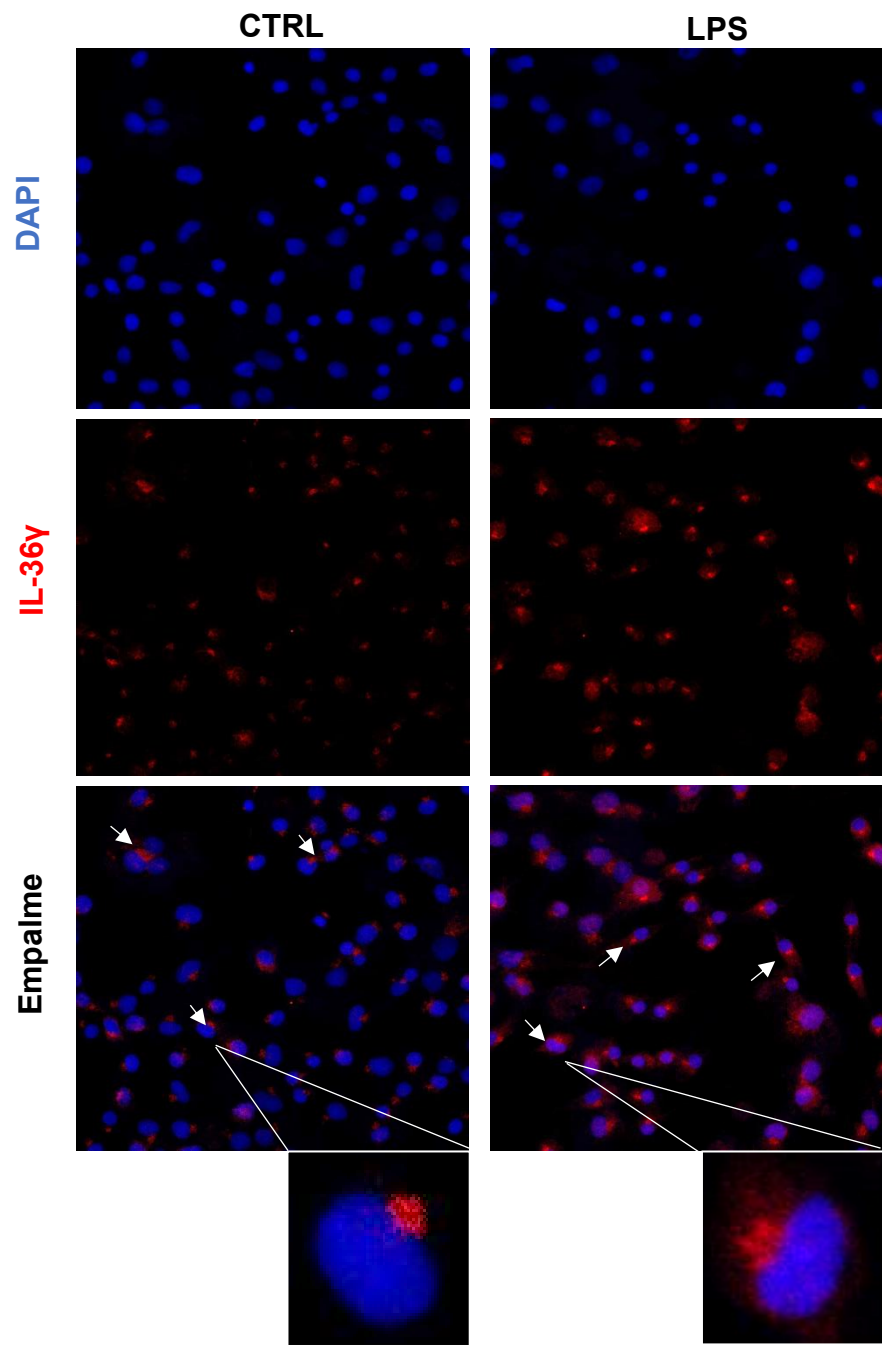


Figura 5. IL-36 γ es secretada a través de la vía UPS I utilizando al poro de GSDMD. A) Western blot de lisados de células IC21 bajo condiciones CTRL, LPS, LPS/ATP y LPS/ATP+A438, LPS/ATP+NSA, LPS/ATP+A438/NSA B) Cuantificación de la densidad relativa de la señal para IL-36 γ en los lisados. C) Veces de cambio de la señal de IL-36 γ en los lisados.

10.4 IL-36γ se localiza en el citoplasma de los macrófagos

Posteriormente, determinamos la localización de IL-36γ dentro de la célula bajo los estímulos que inducen su expresión y secreción. Observamos que IL-36γ se localiza en el citoplasma de los macrófagos IC21 particularmente, se observa concentrada de forma perinuclear tanto en condiciones control como bajo estimulación con LPS (Fig. 6). Sin embargo, bajo la estimulación combinatoria de LPS/ATP, en ausencia del inhibidor específico de P2X7R, observamos que IL-36γ se encuentra dispersa en el citoplasma y cercana a la membrana plasmática, indicando que LPS/ATP al promover la secreción de la citocina provoca la movilización de IL-36γ dentro de la célula observándose así cercana a la membrana plasmática. En contraste, al agregar el inhibidor específico A438, IL-36γ cambia su localización y vuelve a concentrarse de forma perinuclear como se había observado previamente en el control y bajo la estimulación con LPS. Estos resultados indican que la inhibición de la secreción no solo bloquea su exocitosis, sino que también promueve su relocalización dentro de la célula.



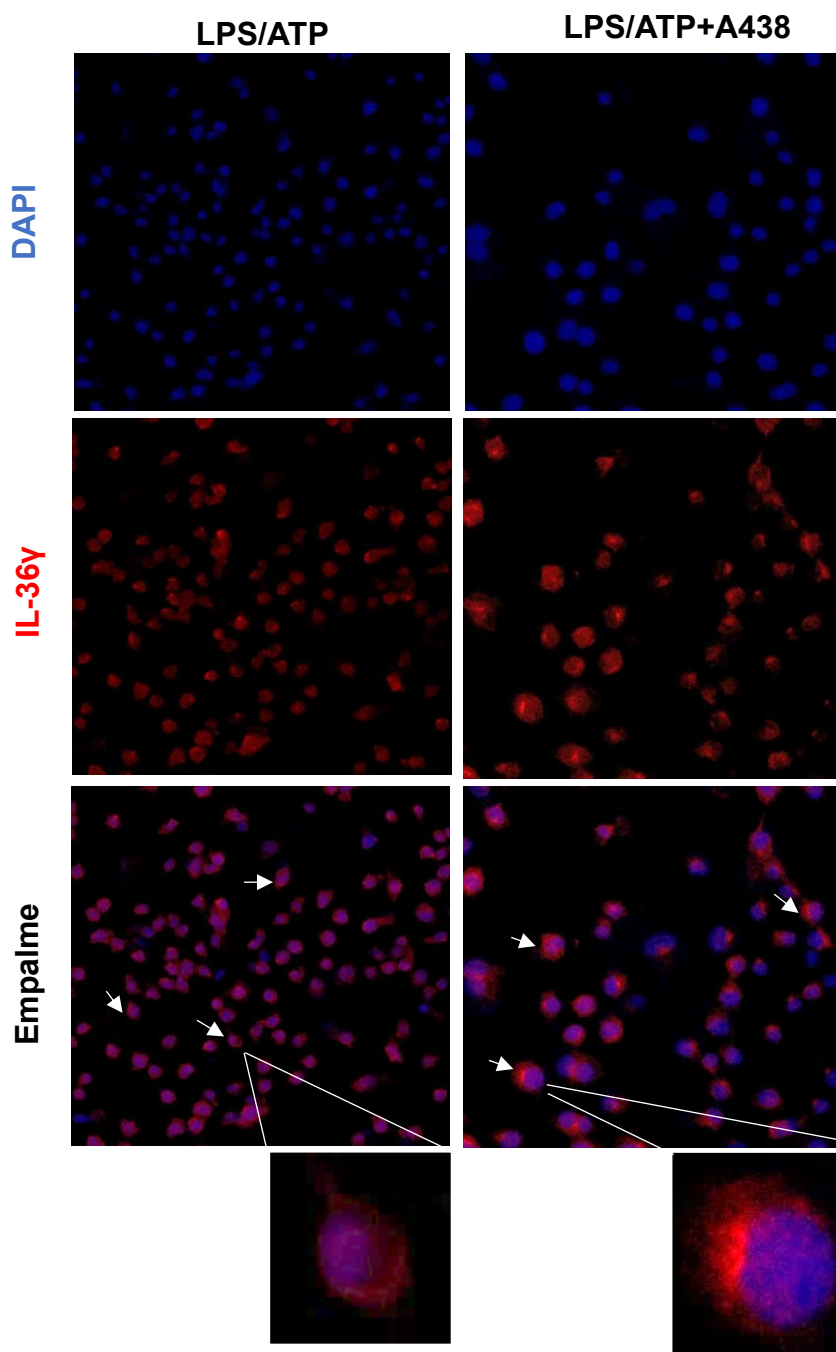


Figura 6. IL-36γ se localiza en el citoplasma. Localización de IL-36γ en macrófagos IC21 en condiciones CTRL, LPS, LPS/ATP y LPS/ATP+A438. DAPI tinción de núcleo, Alexa Fluor594 para IL-36γ y empalme.

10.5 LPS/ ATP induce la secreción de catepsinas

Posteriormente, nos preguntamos qué otras proteínas podrían estar siendo secretadas por el estímulo LPS/ATP. Para determinarlo evaluamos las proteínas presentes en los sobrenadantes de células IC21 estimuladas con LPS y LPS/ATP, estímulos que inducen la expresión y secreción de IL-36 γ .

Entre las proteínas encontradas en los sobrenadantes, observamos que de las más abundantes son catepsina D, B, K y CCL2 (Fig. 7A, anexo 1). Todas estas proteínas están presentes en ambas condiciones, mientras que en la condición LPS/ATP observamos de manera exclusiva a catepsina C, al inhibidor de serin proteasas cistatina-C (Fig.7A).

Posteriormente realizamos una predicción *in silico* del procesamiento de IL-36 γ , a través del servidor PACMANS (Protease-Ase Cleavages from MEROPS ANalyzed Specificities), el cual predice los posibles sitios de corte de una proteína por una proteasa en particular, asignando scores a cada sitio de corte de acuerdo a la afinidad del sitio catalítico de la proteasa por los aminoácidos presentes en cada sitio de corte encontrado, siendo los scores más altos una predicción de mayor afinidad del sitio catalítico de la proteasa por ese sitio de corte en particular (Ferrall-Fairbanks *et al.*, 2017). Encontramos que los sitios de corte reportados previamente (Henry C. *et al.*, 2016; Towne JE. *et al.*, 2011) pueden ser procesados por catepsina D, B, K y C, siendo catepsina C la que presenta los scores más altos para el procesamiento de los sitios de corte S37 y S41, mientras que catepsina D presenta el score más alto para el procesamiento en el sitio de corte V51 (Fig.6), sugiriendo que probablemente son las catepsinas que podrían estar procesando a IL-36 γ . Sin embargo, estos datos deben ser confirmados de forma experimental.

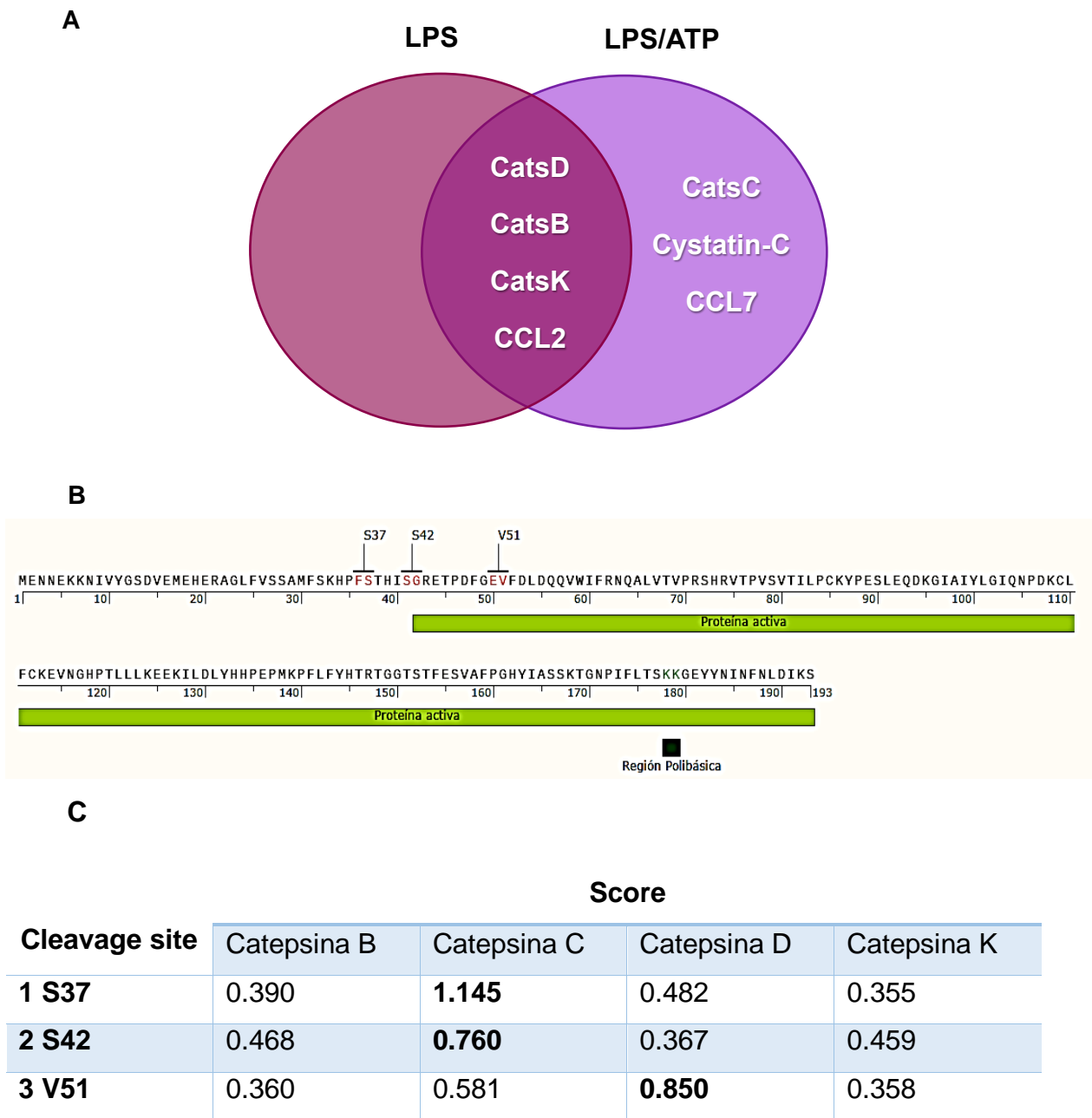


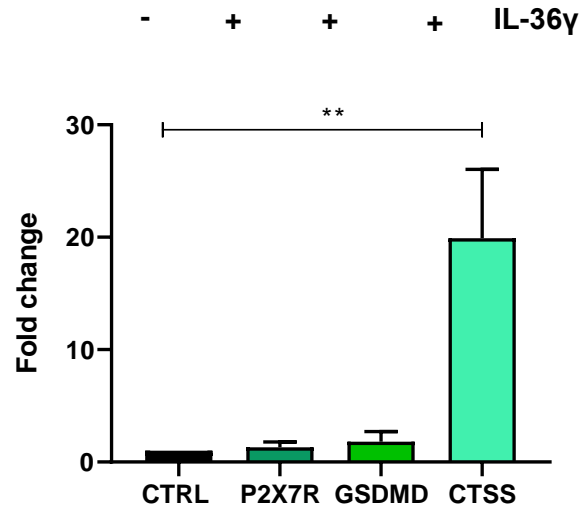
Figura 7. LPS/ATP inducen la secreción de catepsinas. Análisis de espectrometría de masas de sobrenadantes de IC21 estimulados con LPS, LPS/ATP. A. Proteínas encontradas en los sobrenadantes de IC21 con LPS/LPS respectivamente. B. Representación esquemática de la secuencia de aminoácidos de IL-36 γ y sus sitios de corte. C. Scores obtenidos de la predicción del procesamiento de IL-36 γ por cada una de las catepsinas.

10.6 IL-36 γ induce la expresión de catepsina S

Ha sido demostrado que IL-36 γ participa en el desarrollo de patologías como psoriasis (Towne JE. *et al.*, 2012). Interesantemente, una de las proteasas involucradas en dicha patología es catepsina S (Schonefuss *et al.*, 2010), la cual también ha sido identificada como proteasa de IL-36 γ (Ainscough *et al.*, 2017). Así mismo, se demostró previamente que la expresión de catepsina S es regulada a través de citocinas inducidas por la activación del TLR4 al ser estimulado con LPS (Creasy BM. *et al.*, 2011) además de otras citocinas como IFN- γ (Beers C. *et al.*, 2003; Gravesande KS. *et al.*, 2002). Ya que IL-36 γ es una citocina inducida por la señalización de TLR4, y debido a que catepsina S es su proteasa (Ainscough *et al.*, 2017), evaluamos si IL-36 γ es capaz de inducir su expresión.

Se determinó la expresión de P2X7R, GSDMD y catepsina S en respuesta a IL-36 γ . Observamos que IL-36 γ induce un incremento significativo de hasta 20 veces en la expresión de su proteasa catepsina S. En contraste, observamos que la estimulación con IL-36 γ no induce un incremento significativo en la expresión de P2X7R y GSDMD, moléculas involucradas en su secreción (Fig. 8A). Lo anterior sugiere que IL-36 γ procesada es capaz de inducir la expresión de su procesadora en un bucle de retroalimentación positiva. Posteriormente evaluamos la expresión de catepsina S en respuesta a los estímulos que inducen la expresión de IL-36 γ . Observamos que bajo el estímulo de LPS hay un incremento significativo de hasta seis veces en la expresión de catepsina S como había sido reportado con anterioridad (Creasy BM. *et al.*, 2011). Al estimular con la combinación de LPS/ATP se observa un aumento significativo de hasta 2 veces en la expresión de catepsina S. Sin embargo, al compararlo con el estímulo solo de LPS, observamos que ATP impacta de manera negativa en la expresión de catepsina S (Fig. 8B)

A



B

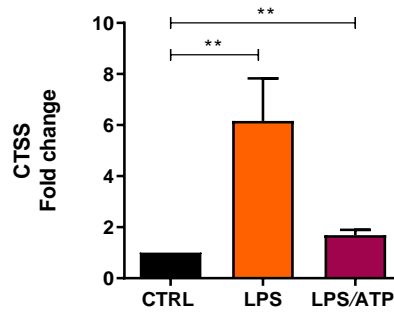


Figura 8. IL-36γ y LPS inducen la expresión de catepsina S. A) Expresión de catepsina S a nivel de mensajero en condiciones control, LPS y LPS/ATP. B) Expresión de P2X7R, GSDMD y CTSS a nivel de mensajero en respuesta a la estimulación con IL-36γ. Expresión normalizada con GAPDH.

11. DISCUSIÓN

A pesar del gran avance que se ha logrado en el descubrimiento de la función de IL-36 γ y su participación en el desarrollo de más de una enfermedad inflamatoria, aún se desconocen los mecanismos que regulan su secreción. IL-36 γ es sintetizada sin péptido señal, en respuesta a componentes microbianos (Gabay C. et al., 2015; Medina-Contreras O. et al., 2016). Lo anterior implica que tendría acceso a los mecanismos no convencionales de secreción (Boutet *et al.*, 2016; Rabouille C., 2017). Nuestros datos confirmaron que en la línea celular de macrófagos de ratón IC21 LPS induce la expresión de IL-36 γ . Así mismo, observamos que al estimular a los macrófagos con LPS/ATP se induce la secreción de la citocina. Nuestros datos coinciden con reportes previos que han establecido que la secreción de algunos miembros de la superfamilia de IL-1 como IL-1 β , IL-18 e IL-36 α requieren dos señales para llevarse a cabo, siendo LPS la primera señal y el estímulo inductor de la expresión de las citocinas, y ATP la segunda señal siendo el estímulo que desencadena la secreción (Martin U. et al., 2009) (Di Virgilio F. et al., 2018; Gardella S. et al., 2000). Ya que dichos estímulos inflamatorios activan a P2X7R, receptor de ATP, y al inflamosoma, que a su vez activa a GSDMD, formadora de poros de membrana, y debido a que ambas moléculas participan en de la vía de secreción no convencional de tipo I, hipotetizamos que las moléculas P2X7R y GSDMD podrían estar involucradas en la secreción de IL-36 γ .

Lo anterior se evaluó *in silico*, a través de la generación de modelos en el servidor SWISS-MODEL. De acuerdo con los datos obtenidos el tamaño y carga neta de IL-36 γ completa y procesada le permiten atravesar tanto el poro de P2X7R como el poro generado por GSDMD, de forma teórica. Al evaluar la secreción de manera experimental nuestros datos demostraron que al inhibir al P2X7R con el inhibidor específico A438, IL-36 γ se acumula en el interior de la célula y disminuye en el medio extracelular. En contraste, al estar ausente el inhibidor específico, observamos la presencia de IL-36 γ en el medio extracelular y una reducción dentro de la célula. Esto sugiere que P2X7R participa en el mecanismo de secreción de IL-36 γ , como ha sido reportado para otros miembros de la super familia como IL-1 α , IL-1 β e IL-18 (Di Virgilio F. et al., 2018; Gardella S. et al., 2000; Qu Y. et al., 2019), implicando que P2X7R podría estar funcionando como un sitio de

salida común para las citocinas de esta superfamilia. Así mismo, nuestros datos experimentales demostraron que al inhibir al poro formado por GSDMD con el inhibidor específico NSA, IL-36 γ se acumula en el interior de la célula y disminuye en el medio extracelular. En contraste, al estar ausente el inhibidor NSA, observamos la presencia de IL-36 γ en el medio extracelular y una reducción dentro de la célula, sugiriendo que GSDMD participa en el mecanismo de secreción de IL-36 γ , como ha sido demostrado para otros miembros de la superfamilia como IL-1 β (Evavold C. et al., 2018). En conjunto nuestros datos sugieren que la secreción a través de poros de membrana de la vía UPS I podría ser un mecanismo de salida común para las citocinas de la superfamilia de IL-1. Al bloquear ambos poros a través de la utilización de los dos inhibidores (A438/NSA) observamos que hay una acumulación de IL-36 γ en el interior de la célula de hasta 6.7 veces más que la observada con LPS, sugiriendo que ambos poros de membrana participan en la secreción de la citocina.

Al evaluar la localización de IL-36 γ , esta se ubica preferencialmente en el citoplasma de los macrófagos, particularmente acumulada en la región perinuclear en condiciones de homeostasis. Al evaluar la localización bajo la estimulación con LPS observamos que IL-36 γ sigue localizada en el citoplasma acumulada en la región perinuclear. Sin embargo, al agregar LPS/ATP observamos que la citocina se dispersa en el citoplasma y se encuentra cercana a la membrana plasmática. Otros miembros de la superfamilia, como IL-1 α , IL-1 β e IL-18, presentan regiones poli básicas en sus secuencias, lo que les permite adherirse a la membrana plasmática en preparación para su secreción; al evaluar la secuencia de IL-36 γ observamos que cuenta con una región poli básica pequeña que podría permitirle la asociación con la membrana plasmática por unión electrostática (Fig. 7B) como ha sido reportado para IL-1 β (Monteleone M. et al., 2018)

Nos preguntamos si la inhibición de la secreción tendría un efecto en la localización de la proteína por lo que agregamos el inhibidor A438 a los cultivos y observamos que IL-36 γ se relocaliza hacia la región perinuclear similar a lo observado en las condiciones control y LPS. Lo anterior sugiere que bajo el estímulo LPS/ATP no solo se induce la secreción de las citocinas, sino que también se promueve su relocalización, pasando desde la región perinuclear hasta la proximidad con la membrana plasmática, lo que concuerda con su secreción a través de poros de membrana según nuestros resultados. La

localización perinuclear de IL-36 γ podría indicar que se encuentra sobre el MTOC en preparación para su secreción. Sin embargo, es necesario comprobar esta hipótesis de forma experimental.

IL-36 γ al igual que el resto de los miembros de la superfamilia de IL-1, requiere de procesamiento para ser completamente bioactiva (Towne JE. et al., 2011). Recientemente se demostró que puede ser procesada por proteasas de neutrófilo como elastasa y proteinasa-3. Es por ello que se ha propuesto que su procesamiento podría darse de forma extracelular en el sitio de inflamación por proteasas de neutrófilo que arriban al sitio (Henry C. et al., 2016). Así mismo, se reportó que otra proteasa, catepsina S, presente en macrófagos y células epiteliales también es capaz de procesar a la citocina de forma extracelular en condiciones de inflamación. Hasta el momento se desconoce si IL-36 γ es secretada en forma completa o procesada. Una vez que determinamos que IL-36 γ es secretada a través de poros de membrana, evaluamos que otras proteínas son exocitadas durante su secreción. Lo anterior se determinó a través de espectrometría de masas (MS/MS), evaluando las proteínas presentes en los sobrenadantes de células estimuladas con LPS y LPS/ATP. De manera interesante no identificamos péptidos de IL-36 γ que correspondieran a la forma procesada, lo que podría sugerir que es secretada en su forma nativa y procesada extracelularmente, o bien que la cantidad de IL-36 γ que es secretada es muy poca lo que dificultaría su identificación. Es importante comprobar este dato con otra metodología como una secuenciación de EDMAN para identificar el primer aminoácido de IL-36 γ secretada. Por otro lado, observamos que las proteínas más abundantes presentes en los sobrenadantes fueron catepsina B, catepsina D, catepsina K y CCL2, estas proteínas estaban presentes en los sobrenadantes de ambas condiciones. Interesantemente, encontramos que catepsina C, y el inhibidor de serin proteasas cistatina-C, así como, CCL7 solo estaban presentes en la condición LPS/ATP. Posteriormente realizamos una predicción *in silico* a través del servidor PACMANS sobre el procesamiento de IL-36 γ por cada una de las proteasas encontradas en los sobrenadantes. Encontramos que catepsina C y catepsina D cuentan con los mejores scores de procesamiento, sugiriendo la posibilidad de que sean estas proteasas las procesadoras de IL-36 γ en este modelo. Interesantemente, no observamos a catepsina S entre las proteínas de los sobrenadantes. Ya que dicha proteasa ha sido involucrada

tanto en su activación como en patologías en las que también participa IL-36 γ , nos preguntamos si una vez procesada es capaz de inducir a catepsina S.

Nuestros datos demostraron que IL-36 γ induce significativamente la expresión de catepsina S a nivel de ARN mensajero, sugiriendo que una vez que ha sido procesada es capaz de inducir la expresión de dicha proteasa, posiblemente creando un bucle de retroalimentación positiva. Al evaluar su expresión en respuesta a otros estímulos como LPS y LPS/ATP, observamos que LPS induce significativamente la expresión de catepsina S. Sin embargo, bajo el estímulo LPS/ATP, aunque observamos un aumento significativo en su expresión, este es más discreto que el observado solo con LPS. Existen reportes sobre el papel de ATP en la secreción de catepsina S, en donde la estimulación de macrófagos derivados de médula ósea con ATP lleva a la inducción de la secreción de la proteasa al medio extracelular en un proceso dependiente de P2X7R (Lopez-Castejon *et al.*, 2010). Sin embargo, no hay información concluyente sobre el papel de ATP en la expresión de la proteasa. Por otro lado, observamos que la estimulación con IL-36 γ no induce un incremento significativo en la expresión de P2X7R y GSDMD, moléculas involucradas en las vías de secreción no convencional de IL-36 γ .

De acuerdo con los datos presentados en este estudio, demostramos que IL-36 γ es secretada a través de mecanismos de secreción no convencional UPS tipo I, es decir, por poros de membrana en un mecanismo mediado por el P2X7R y GSDMD en respuesta a LPS/ATP. Además de IL-36 γ , también son secretadas catepsina B, C, D y K. Debido a las predicciones sobre el procesamiento de IL-36 γ sugerimos que catepsina C y D pueden estar procesando a la citocina de forma inicial. Una vez procesada IL-36 γ induce la expresión de otra de sus proteasas, catepsina S, posiblemente generando un bucle de retroalimentación positiva para mayor biodisponibilidad de IL-36 γ en su forma madura (Fig. 10).

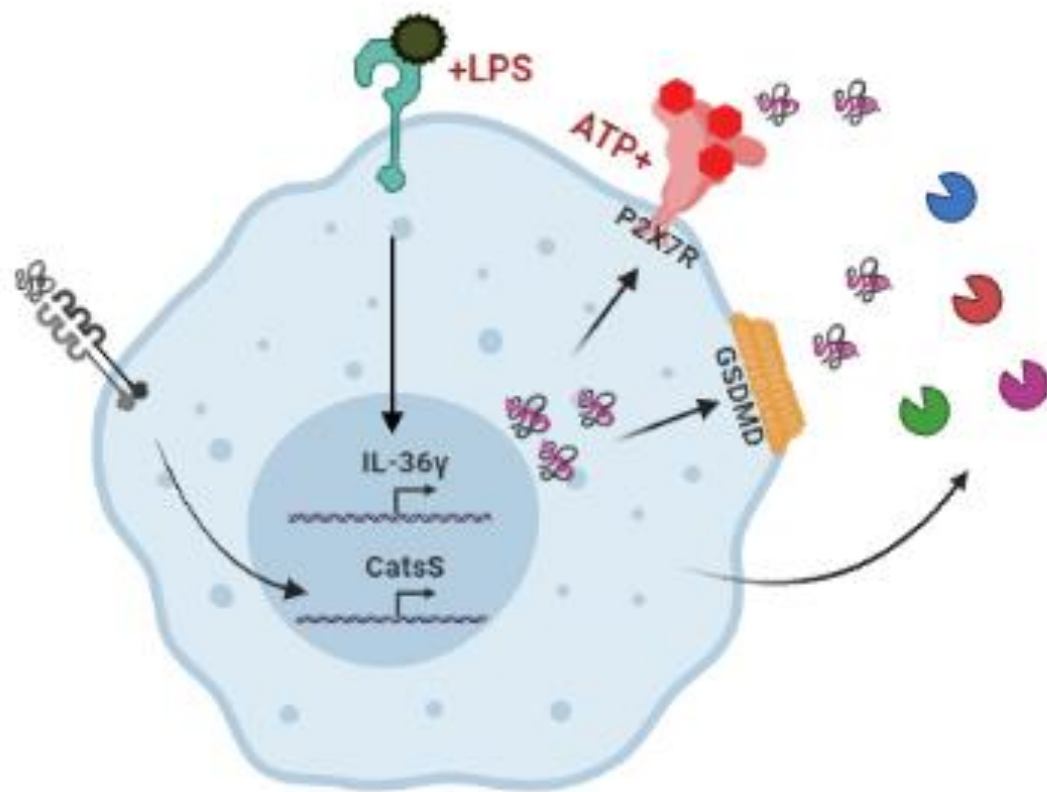


Figura 9. Expresión y secreción de IL-36 γ . LPS induce la expresión de IL-36 γ a nivel de ARNm y proteína. ATP activa al P2X7R y desencadena el ensamble de los poros de GSDMD en la membrana plasmática, induciendo así la secreción de IL-36 γ a través de ambos poros de membrana. Además de IL-36 γ , también son secretadas las proteasas catepsina B, C, D y K, las cuales posiblemente procesan a IL-36 γ de forma inicial. Una vez que IL-36 γ ha sido procesada, induce la expresión de otra de sus proteasas, catepsina S.

12. References

Ainscough, J. S., Macleod, T., McGonagle, D., Brakefield, R., Baron, J. M., Alase, A., Wittmann, M., & Stacey, M. (2017). Cathepsin S is the major activator of the psoriasis-associated proinflammatory cytokine IL-36gamma. *PNAS*, *114*(13), E2748-E2757. doi:10.1073/pnas.1620954114

Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K., Costa R., Cramer R., Duan S., Eiwegger T., Eljaszewicz A., Ferstl R., Frei R., Garbani M., Globinska A., Hess L., Huitema C., Kubo T., Komlosi Z., Konieczna P., Kovacs N., Kucuksez U., Meyer N., Morita H., Olzhausen J., O'Mahony L., Pezer M., Prati M., Rebane A., Rhyner C., Rinaldi A., Sokolowska M., Stanic B., Sugita K., Treis A., van de Veen W., Wanke K., Wawrzyniak M., Wawrzyniak P., Wirz OF., Sierra-Zakzuk J., & Akdis CA. (2016). Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. *Fundamentals of allergy and immunology*, *138*(4), 984-1007.

Alves L., Melo-Reis R., Magalhães de Souza C., Santos de Freitas M., Nogueira-Teixeira P., Moreira-Ferreira D., & Faria-Xavier R. (2014). The P2X7 receptor: Shifting from a low- to a high-conductance channel — An enigmatic phenomenon? *Biochimica et Biophysica acta*, *1838*, 2578-2587.

Beers C., Honey K., Fink S., Forbush K., & Rudensky A. (2003). Differential Regulation of Cathepsin S and Cathepsin L in Interferon γ -treated Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, *197*(2), 169-179.

Blumberg H., Dinh H., Dean C., Trueblood ES., Bailey K., Shows D., Bhagavathula N., Aslam MN., Varani J., Towne JE., & Sims J. (2010). IL-1RL2 and Its Ligands Contribute to the Cytokine Network in Psoriasis. *The Journal of Immunology*, *185*, 4354-4362.

Boutet, M. A., Bart, G., Penhoat, M., Amiaud, J., Brulin, B., Charrier, C., Morel, F., Lecron, J. C., Rolli-Derkinderen, M., Bourreille, A., Vigne, S., Gabay, C., Palmer, G., Le Goff, B., & Blanchard, F. (2016). Distinct expression of interleukin (IL)-36alpha, beta and gamma, their antagonist IL-36Ra and IL-38 in psoriasis, rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Clinical and Experimental Immunology*, *184*(2), 159-173. doi:10.1111/cei.12761

Cai, Y., Xue, F., Quan, C., Qu, M., Liu, N., Zhang, Y., Fleming, C., Hu, X., Zhang, H. G., Weichselbaum, R., Fu, Y. X., Tieri, D., Rouchka, E. C., Zheng, J., & Yan, J. (2019). A Critical Role of the IL-1beta-IL-1R Signaling Pathway in Skin Inflammation and Psoriasis Pathogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*, *139*(1), 146-156. doi:10.1016/j.jid.2018.07.025

Carta, S., Tassi, S., Semino, C., Fossati, G., Mascagni, P., Dinarello, C. A., & Rubartelli, A. (2006). Histone deacetylase inhibitors prevent exocytosis of interleukin-1beta-containing secretory lysosomes: role of microtubules. *Blood*, *108*(5), 1618-1626. doi:10.1182/blood-2006-03-014126

Cohen, I., Rider, P., Vornov, E., Tomas, M., Tudor, C., Wegner, M., Brondani, L., Freudenberg, M., Mittler, G., Ferrando-May, E., Dinarello, C. A., Apte, R. N., & Schneider, R. (2015). IL-1alpha is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity. *Scientific Reports*, *5*, 14756. doi:10.1038/srep14756

Creasy BM., & McCoy KL. (2011). Cytokines regulate cysteine cathepsins during TLR responses. *Cellular Immunology*, *267*, 56-66.

Chiu, J. W., Binte Hanafi, Z., Chew, L. C. Y., Mei, Y., & Liu, H. (2021). IL-1alpha Processing, Signaling and Its Role in Cancer Progression. *Cells*, *10*(1), 1-19. doi:10.3390/cells10010092

Debets R., Timans J., Homey B., Zurawski S., Sana T., Lo S., Wagner J., Edwards G., Clifford T., Menon S., Bazan F., & Kastelein R. (2001). Two Novel IL-1 Family Members, IL-1 δ and IL-1 ϵ Function as an Antagonist and Agonist of NF- κ B Activation Through the Orphan Receptor-Related Protein 2 *The Journal of Immunology*, 167, 1440-1446.

Di Paolo, N. C., & Shayakhmetov, D. M. (2016). Interleukin 1alpha and the inflammatory process. *Nature Immunology*, 17(8), 906-913. doi:10.1038/ni.3503

Di Virgilio F., Schmalzing G., & Markwardt F. (2018). The Elusive P2X7 Macropore. *Cell*, xx(yy), 1-13.

Dinarello C. (2018a). Introduction to the Interleukin-1 Family of Cytokines and Receptors: Drivers of Innate Inflammation and Acquired Immunity. *Immunol Rev.*, 281(1), 5-7.

Dinarello C. (2018b). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunolo Rev*, 281(1), 8-27.

Dinarello C., Novick D., Kim S., & Kaplanski G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in Immunology*, 4(289), 1-10. doi:10.3389/fimmu.2013.0028

Ding L., Wang X., Hong X., Lu L., & Liu D. (2018). IL-36 cytokines in autoimmunity and inflammatory disease. *Oncotarget*, 9(2), 2895-2901.

Duitman EH., Orinska Z., & Bulfone-Paus S. (2011). Mechanisms of cytokine secretion: A portfolio of distinct pathways allows flexibility in cytokine activity. *European Journal of Cell Biology*, 90, 476-483.

Dunn E., Sims J., M., N., & O'Neill L. (2001). Annotating genes with potential roles in the immune system:six new members of the IL-1 family. *TRENDS in Immunology*, 22(10), 1-4.

Evavold C., Ruan J., Tan Y., Xia S., Wu H., & Kagan JC. (2018). The pore forming protein gasdermin D regulates interleukin-1 secretion from living macrophages. *Immunity*, 48(1), 35-44.

Ferrall-Fairbanks, M. C., Barry, Z. T., Affer, M., Shuler, M. A., Moomaw, E. W., & Platt, M. O. (2017). PACMANS: A bioinformatically informed algorithm to predict, design, and disrupt protease-on-protease hydrolysis. *Protein Science*, 26(4), 880-890. doi:10.1002/pro.3113

Franceschini A., Capece M., Chiozzi P., Falzoni S., Sanz JM., Sarti A., Bonora M., Pinton P., & Di Virgilio F. (2015). The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein. *The FASEB Journal*, 29, 2450-2462.

Gabay, C., Lamacchia, C., & Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(4), 232-241. doi:10.1038/nrrheum.2010.4

Gabay C., & Towne JE. (2015). Regulation and function of interleukin-36 cytokines in homeostasis and pathological conditions. *Journal of Leukocyte Biology*, 97, 645-653.

Gardella S., Andrei C., Poggi A., Zocchi R., & Rubartelli A. (2000). Control of interleukin-18 secretion by dendritic cells: role of calcium influxes. *FEBS Letters*, 481(3), 245-248. doi:10.1016/s0014-5793(00)02015-9

Giuliani A., Sarti A., Falzoni S., & Di Virgilio F. (2017). The P2X7 Receptor-Interleukin-1 Liaison. *Frontiers in Pharmacology*, 8(123), 1-10.

Gravesande KS., Layne MD., Ye Q., Le L., Baron RM., Perella MA., Santambrogio L., Silverman ES., & Riese RJ. (2002). IFN Regulatory Factor-1 Regulates IFN- γ - Dependent Cathepsin S Expression. *The Journal of Immunology*, 168, 4488-4494.

Gresnigt MS., & Van de Veerdonk F. (2013). Biology of IL-36 cytokines and their role in disease. *Seminars in Immunology*, 25, 458-465.

He Y., Hara H., & Núñez G. (2016). Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci*, 41(12), 1012-1021.

Henry C., Sullivan G., Clancy D., Afonina I., Kulms D., & Martin SJ. (2016). Neutrophil-Derived Proteases Escalate Inflammation through Activation of IL-36 Family Cytokines. *Cell*, 14, 708-722.

Italiani, P., Manca, M. L., Angelotti, F., Melillo, D., Pratesi, F., Puxeddu, I., Boraschi, D., & Migliorini, P. (2018). IL-1 family cytokines and soluble receptors in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy*, 20(1), 27. doi:10.1186/s13075-018-1525-z

Kaplanski, G. (2018). Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunological Reviews*, 281(1), 138-153. doi:10.1111/imr.12616

Keerman M., Koks S., Reimann E., Prans E., Abram K., & Kingo K. (2015). Transcriptional landscape of psoriasis identifies the involvement of IL36 and IL36RN. *BMC Genomics*, 16(322), 1-11.

Kim J., Gee HY., & Lee MG. (2018). Unconventional protein secretion – new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases. *Journal of Cell Science*, 131, 1-11.

Lian L-H., Milora K., Manupipatpong K., & Jensen LE. (2012). The double-stranded RNA analogue Polyinosinic-polycytidylic acid induces keratinocyte pyroptosis and release of interleukin-36 γ *Journal of Investigative Dermatology*, 132(5), 1346-1353.

Lister M., Sharkey J., Sawatzky D., Hodgkiss JP., Davidson DJ., Rossi A., & Finlayson K. (2007). The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *Journal of Inflammation*, 4(5), 1-14.

Lopez-Castejon, G., Theaker, J., Pelegrin, P., Clifton, A. D., Braddock, M., & Surprenant, A. (2010). P2X(7) receptor-mediated release of cathepsins from macrophages is a cytokine-independent mechanism potentially involved in joint diseases. *Journal of Immunology*, 185(4), 2611-2619. doi:10.4049/jimmunol.1000436

Martin U., Scholler J., Gurgel J., Renshaw B., Sims J., & Gabel C. (2009). Externalization of the Leaderless Cytokine IL-1F6 Occurs in Response to Lipopolysaccharide/ATP Activation of Transduced Bone Marrow Macrophages. *The Journal of Immunology*, 183, 4021-4030.

McGrath J., & Varshavsky A. (1989). The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature*, 340, 1-5.

Medina-Contreras O., Harusato A., Nishio H., Flannigan K., Ngo V., Leoni G., Neumann PA., Geem D., Lili LN., Ramadas RA., Chassaing B., Gewirtz AT., Kohlmeier JE., CA., P., Towne JE., Nusrat A., & Denning TL. (2016). IL-36 receptor promotes resolution of intestinal damage. *The Journal of Immunology*, 196(1), 1-12.

Milora, K. A., Uppalapati, S. R., Sanmiguel, J. C., Zou, W., & Jensen, L. E. (2017). Interleukin-36beta provides protection against HSV-1 infection, but

does not modulate initiation of adaptive immune responses. *Scientific Reports*, 7(1), 5799. doi:10.1038/s41598-017-05363-4

Monteleone M., Stanley AC., Chen KW., Brown DL., Bezbradica JS., von Pein JB., Holley CL., Boucher D., Shakespear MR., Kapetanovic R., Rolfes V., Sweet MJ., Stow JL., & Schroder K. (2018). Interleukin-1b Maturation Triggers Its Relocation to the Plasma Membrane for Gasdermin-D-Dependent and -Independent Secretion. *Cell Reports*, 24, 1425–1433.

Mulero J., Pace A., Nelken ST., Loeb DB., Correa TR., Drmanac R., & Ford JE. (1999). IL1HY1: A Novel Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 263, 702-706.

Mulvihill E. , Sborgi L., A Mari S., Pfreundschuh M., Hiller S., & Müller DJ. (2018). Mechanism of membrane pore formation by human gasdermin-D. *The EMBO Journal*, 37, 1-11.

Ngo VL., Aboa H., Maxima E., Harusato A., Geema D., Medina-Contreras O., Merlin D., Gewirtza AT., Nusrat A., & Denning TL. (2018). A cytokine network involving IL-36 γ , IL-23, and IL-22 promotes antimicrobial defense and recovery from intestinal barrier damage. *PNAS*, 1-10.

Nishida A., Hidaka K., Kanda T., Imaeda H., Shioya M., Inatomi O., Bamba S., Kitoh K., Sugimoto M., & Andoh A. (2016). Increased Expression of Interleukin-36, a Member of the Interleukin-1 Cytokine Family, in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Disease*, 22(2), 303-315.

Pyrrillou, K., Burzynski, L. C., & Clarke, M. C. H. (2020). Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. *Front Immunol*, 11, 613170. doi:10.3389/fimmu.2020.613170

Qu Y., Franchi L., Nunez G., & Dubyak GR. (2019). Nonclassical IL-1 β Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *The Journal of Immunology*, 179, 1913-1925.

Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Cell*, 27(3), 230-241.

Rabouille C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Cell*, 27(3), 231-240.

Scheibe, K., Backert, I., Wirtz, S., Hueber, A., Schett, G., Vieth, M., Probst, H. C., Bopp, T., Neurath, M. F., & Neufert, C. (2017). IL-36R signalling activates intestinal epithelial cells and fibroblasts and promotes mucosal healing in vivo. *Gut*, 66(5), 823-838. doi:10.1136/gutjnl-2015-310374

Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2005). Geometry-based flexible and symmetric protein docking. *Proteins*, 60(2), 224-231. doi:10.1002/prot.20562

Schonefuss, A., Wendt, W., Schattling, B., Schulten, R., Hoffmann, K., Stuecker, M., Tigges, C., Lubbert, H., & Stichel, C. (2010). Upregulation of cathepsin S in psoriatic keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 19(8), e80-88. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00990.x

Soni, B., & Singh, S. (2020). Cytokine Milieu in Infectious Disease: A Sword or a Boon? *J Interferon Cytokine Res*, 40(1), 24-32. doi:10.1089/jir.2019.0089

Stanley AC., & Lacy P. (2010). Pathways for Cytokine Secretion. *Physiology*, 25, 218-229.

Stenken JA., & Poschenrieder AJ. (2014). Bioanalytical Chemistry of Cytokines-A Review. *Analytica Chimica Acta*, 1-66.

Tortola L., Rosenwald E., Abel B., Blumberg H., Schäfer M., Coyle AJ., Renauld JC., Werner S., Kisielow J., & Kopf M. (2012). Psoriasiform dermatitis is driven by IL-36-mediated DC-keratinocyte crosstalk. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(11), 3965-3976.

Towne, J. E., Garka, K. E., Renshaw, B. R., Virca, G. D., & Sims, J. E. (2004). Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. *J Biol Chem*, 279(14), 13677-13688. doi:10.1074/jbc.M400117200

Towne JE., Renshaw B., Douangpanya J., Lipsky B., Shen M., Gabel C., & Sims J. (2011). Interleukin-36 (IL-36) Ligands Require Processing for Full Agonist (IL-36 α , IL-36 β and IL-36 γ) or Antagonist (IL-36Ra) Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42594–42602.

Towne JE., & Sims J. (2012). IL-36 in psoriasis. *Current Opinion in Pharmacology*, 12, 486–490.

Vasiliou V., Vasiliou K., & Nebert D. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics*, 3(3), 281-290.

Vigne S., Palmer G., Lamacchia C., Martin P., Talabot-Ayer D., Rodriguez E., Ronchi F., Sallusto F., Dinh H., Sims J., & Gabay C. (2011). IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells. *Blood*, 118(22), 5813-5825.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures

and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296-W303.
doi:10.1093/nar/gky427

Wiley JS., Sluyter R., Gu J., Stokes L., & Fuller SJ. (2011). The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens*, 78, 321-332.

Wilkens S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*, 7(14), 1-9.

Yi G., Ybe JA., Saha SS., Caviness G., Raymond E., Ganesan R., Mbow ML., & Kao CC. (2016). Structural and Functional Attributes of the Interleukin-36 Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(32), 16597–16609,.

Zhang M., Kenny S., Ge L., Xu K., & Schekman R. (2015). Translocation of interleukin-1b into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *eLife*, 4, 1-23.