UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E BIOAGENTES PATOGÊNICOS

**Ativação de caspase-1 e formação de poros em macrófagos infectados
por *Legionella pneumophila***

Tatiana Nunes Silveira

Ribeirão Preto

2010

TATIANA NUNES SILVEIRA

**Ativação de caspase-1 e formação de poros em macrófagos infectados
por *Legionella pneumophila***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Biologia Celular
e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Dario Simões
Zamboni

Ribeirão Preto

2010

Agradecimentos

Agradeço ao financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo: FAPESP, processos 06/55084-0 (bolsa de doutoramento) e 06/52867-4 (projeto Jovem Pesquisador); e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradeço ao Prof. Dr. Dario Zamboni, pela excelente orientação, por toda atenção dedicada ao meu projeto de doutorado, por ser paciente, sempre disponível para esclarecer dúvidas, discutir resultados e propor novos caminhos. Obrigada, acima de tudo, pela grande oportunidade de aprendizado e de formação como cientista em seu laboratório.

Agradeço ao Prof. Dr. Pedro M. Persechini por ceder células de animais deficientes P_2X_7 e por contribuir no estudo do possível envolvimento deste receptor nos mecanismos estudados neste trabalho. Agradeço ao Prof. Dr. Craig R. Roy por ceder as bactérias utilizadas neste estudo e as células deficientes para caspase-11.

Agradeço ao Dr. Lenaldo Rocha pela ajuda na aquisição de imagens no microscópio confocal.

Agradeço aos membros da minha banca de qualificação Dra. Josiane F. Sousa, Prof. Dr. Paulo R. Coelho e ao Prof. Dr. Marcelo D. Gomes pelas contribuições ao meu projeto.

Agradeço aos professores Dra. Patrícia T. Bozza, Dr. Sérgio C. Oliveira, Dra. Maria Cristina R. A. Barreira e Dr. Luís L. P. Silva pela disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho.

Agradeço aos professores do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, por todos os ensinamentos que transmitiram nas disciplinas, seminários, simpósios e reuniões. Agradeço ao departamento em geral por oferecer infra-estrutura para o desenvolvimento dos experimentos realizados neste estudo.

Agradeço às secretárias Rosângela e Ana pelo carinho e ajuda nas burocracias e em todos os processos do curso. Obrigada também a todos os outros funcionários do departamento, aos

funcionários do biotério e ao pessoal da limpeza. Agradeço em especial às funcionárias Inês e Sílvia, pelo preparo, limpeza e organização dos materiais do laboratório.

Agradeço aos alunos do departamento, pela companhia nas disciplinas, troca de idéias e momentos de descontração.

Agradeço, com muito carinho, aos queridos amigos do Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata: Liliana, Eulália, Catarina, Jonilson, Marcelo, Juliana, Luís Henrique, Larissa, José Eduardo, Fernanda, Grace, Djalma, Gabriel. Agradeço também a companhia dos recém-chegados Estela, Maira, Gabriela e Tamires. É difícil falar de como sou grata a todos eles, cada um teve sua contribuição especial. Em particular, gostaria de agradecer à Liliana, toda a ajuda com os protocolos de purificação da flagelina, o que contribuiu significativamente para minha tese e minha publicação. Em geral, agradeço a todos pela companhia diária, paciência, apoio, amizade e pela ajuda na elaboração e discussão dos experimentos. Agradeço, sobretudo, por terem sido a minha família em Ribeirão Preto. Irei sentir muitas saudades de vocês!

Agradeço imensamente à minha família: Cida e Jordan, meus pais; Luciana e Pedro, meus irmãos. O apoio e o amor de vocês foi fundamental durante todo o meu doutorado. Eu me sinto extremamente feliz por poder servir de orgulho para vocês.

Agradeço ao meu noivo Davide, pelo apoio e respeito. Ele me ajudou a ser responsável e dedicada ao meu trabalho, a estar concentrada e colocar meus experimentos como prioridade. Entendeu, com um imenso amor, que cada dia distante durante esses mais de três anos foi muito importante para que eu cumprisse meus objetivos.

Lista de abreviaturas

ATP: adenosina trifosfato

ANOVA: análise de variância

Anti-Lp: anti-*L.pneumophila*

BSA: albumina de soro bovino

BCYE: meio sólido de extrato de levedura contendo carvão ativado

BMMs: macrófagos derivados de medula óssea

cDNA: DNA complementar

CFU: unidade formadora de colônia

CM: cloranfenicol

DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenylindole

Dot: falha no tráfego de organelas

ER: retículo endoplasmático

EtBr: brometo de etídeo

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Fig.: figura

GFP: proteína fluorescente verde

Icm: multiplicação intracelular

kDa: kiloDaltons

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-1 α : interleucina-1 α

IPTG : isopropiltiogalactosídeo

LDH: lactato desidrogenase

LCCM: meio condicionado de células L929

LCV: vacúolo contendo *Legionella pneumophila*

LPS: lipopolissacarídeo

L: litro

μ g: micrograma

μ l: microlitro

mg: miligrama

ml: mililitro

MOI: multiplicidade de infecção

NLR: receptor do tipo NOD

OD: densidade óptica

PBS: salina tamponada com fosfato

p : probabilidade

SBF: soro bovino fetal

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TBS: salina tamponada com Tris

TBST: salina tamponada com Tris contendo Tween 20

U: unidades

Índice de figuras

Fig. 1. A caspase-1 é necessária para a formação de poro em resposta à infecção por <i>Legionella</i> ...	33
Fig. 2. A formação de poro é temporalmente coordenada com a secreção de IL-1 β e precede a lise da célula hospedeira.	34
Fig. 3. A formação de poro é dependente do sistema de secreção do tipo IV, mas independente da multiplicação bacteriana e da síntese <i>de novo</i> de proteínas.	37
Fig. 4. A formação de poro não é resultado de dano na membrana celular feito pelo aparato bacteriano Dot/Icm.....	41
Fig. 5. A formação de poro dependente de caspase-1 ocorre preferencialmente até 6 horas após a infecção.	43
Fig. 6. A internalização bacteriana facilita, mas não é necessária para a formação de poro.	46
Fig. 7. A flagelina bacteriana é suficiente para desencadear a formação de poro.....	49
Fig. 8. A expressão de flagelina é necessária para induzir a formação de poro.....	50
Fig. 9. O receptor intracelular Nlrc4 é necessário para a formação de poro.....	53
Fig. 10. A formação de poro é uma resposta do hospedeiro induzida pela infecção de diferentes espécies de <i>Legionella</i>	58
Fig. 11. Asc é parcialmente importante para a formação de poro em resposta à infecção por <i>L. pneumophila</i>	61
Fig. 12. A formação de poro induzida por <i>L. pneumophila</i> não requer a depleção do potássio intracelular.....	62
Fig. 13. A formação do poro em resposta à <i>L. pneumophila</i> difere do poro formado via P ₂ X ₇ /ATP.	65
Fig. 14. O receptor P2X ₇ não é necessário para a restrição do crescimento de <i>L. pneumophila</i>	66
Fig. 15. A caspase-1 ativa é detectada em macrófagos Asc ^{-/-} na fase inicial da infecção por <i>L. pneumophila</i>	69
Fig. 16. Produção de citocinas dependentes de caspase-1 em BMMs Asc ^{-/-} infectados com <i>L. pneumophila</i>	71
Fig. 17. Caspase-11 é parcialmente necessária para a formação de poro em resposta à <i>L. pneumophila</i>	73
Fig. 18. Macrófagos caspase-11 ^{-/-} ativam caspase-1 em resposta à infecção por <i>L. pneumophila</i>	75
Fig. 19. BMMs caspase-1 ^{-/-} apresentam deficiência de produção de caspase-11.....	77

Fig. 20. BMMs caspase-11 ^{-/-} restringem o crescimento de <i>L. pneumophila</i>	79
Fig. 21. Modelo proposto.	80

Sumário

Resumo.....	11
Abstract	12
I. Introdução.....	13
II. 1. Objetivo geral	20
II. 2. Objetivos específicos	20
III. Materiais e Métodos.....	21
III. 1. Preparo de macrófagos derivados de medula óssea	21
III. 2. Bactérias.....	21
III. 3. Ensaio de formação de poro.....	22
III. 4. Tratamento com citocalasina D e ensaio de proteção com gentamicina	23
III. 5. Ensaio de ELISA	24
III. 6. Quantificação de lactato desidrogenase.....	25
III. 7. Marcação da caspase-1 ativa com FAM-YVAD.....	25
III. 8. Purificação de flagelina	26
III.9. Geração de anticorpos	26
III. 10. Transfecção da flagelina bacteriana	27
III. 11. Imunofluorescência	27
III. 12. <i>Western blotting</i>	28
III. 13. Curva de crescimento	29
III. 14. Amplificação da região codificadora da caspase-11	30
III. 15. Análises estatísticas	30
IV. Resultados.....	31
IV. 1. A caspase-1 é necessária para a formação de poro e piroptose em macrófagos murinos infectados com <i>L. pneumophila</i>	31
IV. 2. O sistema de secreção bacteriano Dot/Icm funcional é necessário para a formação de poro	35
IV. 3. A atividade do Dot/Icm não é suficiente para desencadear a formação de poro em macrófagos.....	39
IV. 4. A internalização bacteriana facilita a formação de poro	44

IV. 5. A transfecção da flagelina é suficiente para desencadear a formação de poro dependente de caspase-1.....	47
IV. 6. A formação de poro é induzida através do reconhecimento da flagelina pelo inflamassoma de Nlrc4	51
IV. 7. A formação de poro é uma resposta celular contra espécies virulentas de <i>Legionella</i> que expressam flagelina.....	55
IV. 8. Asc é parcialmente importante para a formação do poro em resposta à infecção por <i>L. pneumophila</i>	59
intracelular.	62
IV. 9. A formação do poro em resposta à <i>L. pneumophila</i> difere do poro formado via P2X ₇ /ATP	63
IV. 10. Asc é importante para a ativação robusta de caspase-1.....	67
<i>pneumophila</i>	71
IV. 11. Caspase-11 é parcialmente necessária para a formação de poro em resposta à <i>L. pneumophila</i>	72
IV. 12. Macrófagos caspase-11 ^{-/-} infectados com <i>L. pneumophila</i> apresentam baixa ativação de caspase-1.....	74
IV. 14. Caspase-11 restringe o crescimento de <i>L. pneumophila</i>	78
V. Discussão	81
VI. Conclusões.....	85
VII. Referências	86
VIII. Anexo.....	99

Resumo

Legionella pneumophila, o agente etiológico da doença dos Legionários, é conhecida por desencadear a formação de poro em membranas de macrófagos derivados de medula óssea (BMMs) por mecanismos dependentes do sistema de secreção do tipo IV conhecido como Dot/Icm. Neste trabalho, foram utilizados vários mutantes de *L. pneumophila* em combinação com camundongos nocautes para investigar os fatores bacterianos e do hospedeiro envolvidos na formação de poro em BMMs. Observamos que apesar da atividade do Dot/Icm, a formação de poro não ocorre em BMMs deficientes para caspase-1 e Nlrc4. A formação de poro foi temporalmente associada com a secreção de IL-1 β e precedeu a lise celular e a piroptose. A formação de poro foi dependente do Dot/Icm, mas independente de várias proteínas efetoras, da multiplicação bacteriana e da síntese *de novo* de proteínas. A flagelina, a qual é conhecida em ativar o inflamassoma de Nlrc4, foi necessária para a formação de poro; a bactéria mutante $\Delta flaA$ falhou em induzir a permeabilização celular. Consequentemente, a transfecção da flagelina purificada foi suficiente para desencadear a formação de poro independente da infecção. Utilizando 11 diferentes espécies de *Legionella*, nós observamos alta formação de poro em resposta à *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. gratiana*, *L. jordanis* e *L. rubrilucens*, e essa resposta estava correlacionada com a expressão de flagelina por essas espécies. Além disso, verificamos que as proteínas Asc e Caspase-11 apresentam fenótipo intermediário na formação de poro, sugerindo que outras vias podem estar envolvidas no processo. Observamos também que a formação de poro desencadeada por *L. pneumophila* difere daquela induzida pelo ATP. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a formação de poro não é uma resposta específica de *L. pneumophila* nem o resultado de dano da membrana induzido pelo Dot/Icm. Ao invés disso, a formação de poro é uma resposta do hospedeiro altamente coordenada, dependente dos componentes do inflamassoma Nlrc4 e caspase-1 e é desencadeada em resposta a bactérias que expressam o sistema de secreção do tipo IV e flagelina.

Abstract

Legionella pneumophila, the etiological agent of Legionnaires' disease, is known to trigger pore formation in bone marrow-derived macrophages (BMMs) by mechanisms dependent on the type IVB secretion system known as Dot/Icm. Here, we used several mutants of *L. pneumophila* in combination with knockout mice to assess the host and bacterial factors involved in pore formation in BMMs. We found that regardless of Dot/Icm activity, pore formation does not occur in BMMs deficient in caspase-1 and Nlrc4/Ipaf. Pore formation was temporally associated with IL-1 β secretion and preceded host cell lysis and pyroptosis. Pore-forming ability was dependent on bacterial Dot/Icm but independent of several effector proteins, multiplication and *de novo* protein synthesis. Flagellin, which is known to trigger the Nlrc4 inflammasome, was required for pore formation as *flaA* mutant bacteria failed to induce cell permeabilization. Accordingly, transfection of purified flagellin was sufficient to trigger pore formation independent of infection. By using 11 different *Legionella* species, we found robust pore formation in response to *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. gratiana*, *L. jordanis* and *L. rubrilucens*, and this trait correlated with flagellin expression by these species. Furthermore, we found that Asc and Caspase-11 showed an intermediate phenotype in pore formation, suggesting that other pathways may be involved in this process. We also observed that the pore formation triggered by *L. pneumophila* differs from the pore induced by ATP. Together, the results suggest that pore formation is neither *L. pneumophila*-specific nor the result of membrane damage induced by Dot/Icm activity; instead, it is a highly coordinated host cell response dependent on host Nlrc4 and caspase-1 and on bacterial flagellin and type IV secretion system.

I. Introdução

Atualmente há mais de 42 espécies descritas do gênero *Legionella*, incluindo mais de 64 serogrupos diferentes (Benson & Fields, 1998). A espécie *Legionella pneumophila* foi originalmente identificada através de um surto de uma pneumonia severa entre os participantes da “Convenção Americana dos Legionários”, que ocorreu na Filadélfia, Estados Unidos, em 1976 (Fraser *et al.*, 1977). *L. pneumophila* pode causar, em humanos, a “Febre Pontíaca” ou a “Doença dos Legionários” (Marston, Lipman *et al.*, 1994). A “Febre Pontíaca” é um tipo de gripe, não-fatal, com duração de 2 a 5 dias, causando tosse, febre, calafrios e dores de cabeça (Glick *et al.*, 1978). A “Doença dos Legionários” é uma pneumonia severa, com período de incubação de 2 a 10 dias e uma taxa variável de fatalidade entre diferentes surtos (Doebbeling and Wenzel, 1987).

L. pneumophila é uma bactéria gram-negativa intravacuolar (Horwitz & Silverstein, 1980) cujos hospedeiros naturais são amebas de ambientes aquáticos, nas quais a bactéria replica-se intracelularmente em um vacúolo especializado que não se funde com os lisossomos. Em hospedeiros humanos, a inalação de aerossóis com bactéria ou amebas infectadas por *L. pneumophila* leva à infecção de macrófagos alveolares.

Tem sido sugerido que a seleção para a replicação de *L. pneumophila* em protistas tem também selecionado características que promovem a virulência dessa bactéria em humanos (Gao *et al.*, 1997; Fields, 1996). Análises genéticas identificaram um grupo de genes de *L. pneumophila* (*dot/icm*) que codificam um sistema de secreção do tipo IV, o qual é absolutamente necessário para a sobrevivência intracelular dessa bactéria e para o sucesso da sua replicação em todos os hospedeiros, como também para a virulência em modelos animais da “Doença dos Legionários” (Segal *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998). O sistema do tipo IV Dot/Icm é composto por cerca de 26 genes que codificam tipos diversos de proteínas. Algumas destas proteínas estão voltadas para o

citoplasma, tais como IcmW (Zuckman *et al.*, 1999), IcmQ, IcmR, IcmS (Coers *et al.*, 2000) e a ATPase DotB (Sexton *et al.*, 2004b), outras estão no periplasma, tais como IcmX (Matthews & Roy, 2000), e algumas se localizam na membrana bacteriana interna, tais como DotA (Zuckman *et al.*, 1999), DotL (Buscher *et al.*, 2005), DotU e IcmF (Sexton *et al.*, 2004a; VanRheenen *et al.*, 2004). A função do sistema Dot/Icm é translocar proteínas efetoras para dentro da célula hospedeira.

A infecção das células hospedeiras pela *Legionella* inicia-se com a fagocitose da bactéria de forma convencional ou por “coiling” (Horwitz, 1984). O contato íntimo entre a bactéria e os fagócitos profissionais durante a fagocitose parece promover a translocação rápida de efetores pelo Dot/Icm (Charpentier *et al.*, 2009). A secreção rápida de proteínas efetoras bacterianas é fundamental para modificar as vias de tráfego do hospedeiro para evitar a fusão do fagossoma recém-formado com os lisossomos (Roy *et al.*, 1998; Wiater *et al.*, 1998). De fato, nos primeiros 5 minutos de infecção, o vacúolo recém-formado denominado vacúolo contendo-*Legionella* (LCV: *Legionella* containing vacuole) escapa da fusão com os lisossomos, tornando-se envolto por vesículas derivadas do retículo endoplasmático (ER: endoplasmic reticulum), mitocôndria e ribossomos. A *Legionella* começa a se replicar vigorosamente nessa organela derivada do ER até que a lise do macrófago ocorra, liberando bactérias que possam infectar células vizinhas. As proteínas efetoras são provavelmente responsáveis para que ocorra o tráfego de vesículas para o LCV, incluindo o impedimento da fusão com os lisossomos como também a aquisição de material derivado do ER (Franco *et al.*, 2009).

Além da manipulação do tráfego de vesículas, outras alterações na fisiologia da célula hospedeira têm sido observadas em macrófagos infectados com *L. pneumophila*. Infecções com baixas doses da bactéria induzem vias anti-apoptóticas do hospedeiro de forma dependente do Dot/Icm. Por exemplo, a via anti-apoptótica do NF- κ B é altamente induzida em consequência da infecção por *L. pneumophila* de maneira Dot/Icm-dependente (Abu-Zant *et al.*, 2007; Losick &

Isberg, 2006). Uma explicação para isso é presumir a existência de um ou mais efetores translocados que funcionam para atenuar a morte celular do hospedeiro através da ativação do NF- κ B. Altas multiplicidades de infecção (MOIs: multiplicity of infection) com *L. pneumophila* selvagem levam a efeitos de citotoxicidade dose-dependentes em macrófagos derivados de medula óssea, contudo, bactérias deficientes para componentes do sistema de translocação do tipo IV não são citotóxicas (Conover *et al.*, 2003; Molmeret *et al.*, 2002; Kirby *et al.*, 1998). Da mesma forma, *L. pneumophila* é capaz de lisar hemácias de maneira Dot/Icm-dependente, um fenótipo que tem sido utilizado para avaliar a montagem adequada do sistema de translocação (Chen *et al.*, 2007; Kirby *et al.*, 1998). Tem sido sugerido que esses efeitos citotóxicos podem ser o resultado da habilidade de formação de poro da maquinaria de translocação do tipo IV na membrana plasmática das células do hospedeiro. Uma possibilidade intrigante é que efetores individuais possam contribuir para a ativação de vias de morte celular do hospedeiro (Ensminger & Isberg, 2009).

Em contraste às células humanas, os macrófagos obtidos da maioria das linhagens de camundongos não são permissivos para a replicação de *L. pneumophila* (Yamamoto *et al.*, 1988). Vários grupos têm demonstrado que a ativação de caspase-1 em macrófagos murinos contribui efetivamente para a restrição da multiplicação de *L. pneumophila*, por mecanismos ainda não identificados (Lamkanfi *et al.*, 2007; Amer *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006; Zamboni *et al.*, 2006). A caspase-1 é membro de uma família de cisteína proteases aspartato-específicas, conservada em metazoários, com 11 caspases humanas (caspases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 14) e 10 murinas (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 14). A caspase-1 compartilha alta similaridade de sequência com as caspases murinas 11 e 12 e com as caspases 4 e 5, os homólogos humanos da caspase-11 (Lamkanfi *et al.*, 2002). Juntas, elas são referidas como as “caspases inflamatórias”, pois têm demonstrado um papel importante durante o processo de inflamação (Ghayur *et al.*, 1997; Kuida *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995). Os zimógenos de caspases inflamatórias possuem grandes

prodomínios contendo CARD (caspase recruitment domain), os quais são essenciais para induzir a proximidade de dois ou mais zimógenos para a clivagem autocatalítica (Salvesen & Dixit, 1999).

Em adição à caspase-1, Naip5 e Nlrc4/Ipaf, os quais pertencem à família dos receptores Nod-like (NLRs: Nod-like receptors), são também necessários à efetiva restrição da multiplicação de *L. pneumophila* em BMMs (BMMs: bone-marrow macrophages) murinos (Lamkanfi *et al.*, 2007; Amer *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006; Zamboni *et al.*, 2006). Os NLRs funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRRs: pattern recognition receptors) que detectam componentes microbianos conservados. Os receptores Toll-like (TLRs: Toll-like receptors) foram a primeira família de PRRs a ser reconhecida por sua habilidade de detectar uma variedade de patógenos e ligantes na superfície celular e dentro dos endossomas. A descoberta dos NLRs como PRRs citosólicos sugeriu que os micróbios que evadissem a detecção de receptores extracelulares encontrariam uma segunda linha de reconhecimento dentro do citosol do hospedeiro (Philpott *et al.*, 2000). Em geral, os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) reconhecidos por tais PRRs são vitais para a sobrevivência microbiana, podendo ser, por exemplo, estruturas de ácidos nucléicos únicas aos patógenos ou componentes da parede celular diferente de células do hospedeiro (Lamkanfi & Dixit, 2009).

Os NLRs são proteínas citosólicas que formam complexos multiprotéicos chamados inflamassomas, os quais compreendem uma grande família de proteínas intracelulares com uma organização em domínios que geralmente inclui: (i) um domínio de interação proteína-proteína aminoterminal efetor do tipo CARD (caspase recruitment domain) ou pirina (exceto para a proteína inibitória de apoptose neuronal, (NAIP: neuronal apoptosis inhibitory protein) a qual tem motivos de repetição do tipo BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat); (ii) um domínio intermediário NOD, o qual é necessário para ligação a nucleotídeo e auto-oligomerização e (iii) um número variável de motivos de repetição ricos em leucina (LRR: leu^cine-rich repeat) na porção carboxiterminal (Lamkanfi & Dixit, 2009).

Os inflamassomas são importantes reguladores da inflamação e são necessários para a ativação proteolítica da caspase-1. A caspase-1 por sua vez é necessária para o processamento proteolítico e secreção de citocinas pro-inflamatórias tais como IL-1 β e IL-18, como também para a indução de um tipo de morte celular denominada piroptose (Fink & Cookson, 2005; Kuida *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995). As principais características da piroptose são a ruptura da membrana plasmática e a liberação do conteúdo intracelular pro-inflamatório (Bergsbaken *et al.*, 2009).

Acredita-se que múltiplos inflamassomas distintos podem existir, cada um contendo uma proteína chave da “superfamília” dos NLRs que confere especificidade de reconhecimento para um particular produto microbiano. Por exemplo, a proteína Nlrp1 (também chamado de Nalp1) parece ativar o inflamassoma em resposta à toxina letal do antrax (Boyden & Dietrich, 2006) e ao muramildipeptídeo bacteriano (Faustin *et al.*, 2007). Em contraste, a proteína Nlrp3 (também conhecida como Nalp3 ou criopirina) tem sido relacionada ao reconhecimento de uma vasta gama de estímulos incluindo RNA bacteriano (Kanneganti *et al.*, 2006), DNA viral (Muruve *et al.*, 2008), cristais de ácido úrico (Martinon *et al.*, 2006), muramildipeptídeo (Marina-Garcia *et al.*, 2008; Martinon *et al.*, 2004) nigericina (Mariathasan *et al.*, 2006), proteína β -amilóide (Halle *et al.*, 2008), sílica (Cassel *et al.*, 2008; Halle *et al.*, 2008), asbestos (Dostert & Pettrilli, 2008) e adjuvantes de alumínio (Eisenbarth *et al.*, 2008; Hornung *et al.*, 2008).

A restrição da multiplicação de *L. pneumophila* é também dependente da flagelina bacteriana, visto que bactérias mutantes deficientes para o gene *flaA* falham em desencadear a ativação de caspase-1 e se multiplicam livremente em BMMs restritivos (Amer *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006). A demonstração que ambos BMMs Nlrc4^{-/-} e Naip5^{-/-} falham em desencadear a ativação de caspase-1 em resposta à flagelina de *L. pneumophila* (Lightfield *et al.*, 2008) tem levado à especulação de que ambas as proteínas formam um inflamassoma responsável pelo reconhecimento da flagelina. Enquanto o inflamassoma de Nlrc4/Naip5 é necessário para o reconhecimento da flagelina num processo que culmina em

restrição da multiplicação de *L. pneumophila*, outro inflamassoma também parece estar envolvido na resposta à infecção por *L. pneumophila* (Case *et al.*, 2009). Esse segundo inflamassoma é dependente de Asc, mas independente de Nlrp3/Nalp3, e aparentemente não desempenha papel na restrição da multiplicação de *Legionella* em BMMs (Case *et al.*, 2009). Interessante, BMMs Asc^{-/-} foram severamente inibidos na ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β em resposta à *L. pneumophila*; então, o inflamassoma dependente de Asc pode desempenhar um papel principal na secreção de IL-1 β (Case *et al.*, 2009; Zamboni *et al.*, 2006). Embora extensivamente investigado, o mecanismo pelo qual a IL-1 β é secretada pelos BMMs ainda não está claro, pois a proteína não possui um sinal canônico de secreção do ER-Golgi. Possíveis mecanismos que explicam a secreção de IL-1 β incluem: a) liberação a partir da lise celular, b) liberação via exocitose de lisossomos, c) liberação pela fusão de microvesículas à membrana plasmática, d) liberação via fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática e subsequente liberação de exossomos contendo IL-1 β , ou e) liberação através de um transportador ou poros formados nas membranas celulares da célula hospedeira (Eder, 2009). Neste contexto, Fink e Cookson recentemente demonstraram que *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) induziu formação de poro nas membranas de células J774 macrófagos-like num processo temporalmente associado com a secreção de IL-1 β e IL-18 maduras (Fink & Cookson, 2006). Esse processo foi inibido pelo inibidor de caspase-1 Z-YVAD-fmk e foi dependente do sistema de secreção do tipo III de *S. Typhimurium* (Fink & Cookson, 2006). Interessante, estudos prévios demonstraram que *L. pneumophila* desencadeia formação de poro em BMMs por mecanismos dependentes do sistema de secreção Dot/Icm (Zuckman *et al.*, 1999; Kirby *et al.*, 1998). Entretanto, não estava claro se o poro era uma resposta celular do hospedeiro ou um dano na membrana induzido diretamente pelo sistema de secreção Dot/Icm. Como estudos recentes demonstraram que os efeitos citotóxicos de *L. pneumophila* foram independentes de Asc e Nlrp3, mas dependentes de flagelina, Naip5 e Nlrc4 (Case *et al.*, 2009; Lightfield *et al.*, 2008; Ren *et al.*, 2006), nós utilizamos *L. pneumophila* como um modelo para

acessar os fatores bacterianos e do hospedeiro envolvidos na formação de poro em BMMs e sua relação com a secreção de IL-1 β .

II. Objetivos

II. 1. Objetivo geral

Investigar os efeitos de caspase-1 na resposta imune inata de macrófagos murinos infectados por *L. pneumophila*

II. 2. Objetivos específicos

- Investigar o papel de proteínas do hospedeiro, tais como caspase-1, Nlrc4, Asc, P2X₇ e Caspase-11 no processo de formação de poro em macrófagos infectados com *L. pneumophila*
- Investigar o papel de fatores bacterianos, tais como o sistema de secreção do tipo IV, a flagelina e a motilidade bacteriana, na formação de poro em macrófagos infectados com *L. pneumophila*
- Investigar se o processo de formação de poro se estende a outras bactérias do gênero *Legionella*
- Comparar o processo de formação de poro induzido por ATP com a formação de poro induzida por *L. pneumophila*

III. Materiais e Métodos

III. 1. Preparo de macrófagos derivados de medula óssea

BMMs foram diferenciados a partir da medula óssea de fêmures de camundongos C57BL/6, caspase-1^{-/-}, Nlrc4^{-/-} e Asc^{-/-}, obtidos do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Os animais foram utilizados de acordo com as regras do comitê de ética desta universidade. Fêmures de camundongos P2X₇^{-/-} e caspase-11^{-/-} foram doados pelo Prof. Dr. Pedro M. Persechini (Universidade Federal do Rio de Janeiro) e pelo Prof. Dr. Craig R. Roy (Yale University), respectivamente.

Células da medula óssea dos fêmures dos camundongos foram diferenciadas em RPMI 1640 contendo 20% de soro bovino fetal (SBF), 30% de meio condicionado de células L929 (LCCM: L929-cell conditioned medium), 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de streptomina e 2mM de L-glutamina, em placas grau bacteriológico, a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após 7 dias de incubação, os macrófagos foram coletados pela lavagem das monocamadas com PBS (PBS: phosphate buffered saline) (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, pH of 7.4) gelado. As células foram plaqueadas em meio RPMI contendo 10% de SBF e 5% de LCCM (R10/5) e cultivadas por 24 horas antes de cada experimento.

III. 2. Bactérias

As bactérias utilizadas incluem *L. pneumophila* serogrupo 1 (Lp01) cepa selvagem CR39 (Berger and Isberg, 1993) ou mutantes isogênicos $\Delta ankB$, $\Delta ankW$, $\Delta ankWYZ$, $\Delta ankX$, $\Delta drrA$, $\Delta lidA$, $\Delta ralF$,

$\Delta ylfA ylfB$, $\Delta dotA$ (Zuckman *et al.*, 1999), $\Delta dotB$ (Sexton *et al.*, 2004b), $\Delta dotI$ (Andrews *et al.*, 1998), $\Delta icmR$, $\Delta icmQ$, $\Delta icmS$, $\Delta icmW$ and $\Delta icmW/\Delta icmS$ (Coers *et al.*, 2000), $\Delta icmX$ (Matthews and Roy, 2000) e $\Delta flaA$ (Ren *et al.*, 2006). As bactérias utilizadas na figura 6 (fig. 6) estão no “background” da cepa JR32 (Sadosky *et al.*, 1993). Todas as bactérias cresceram a 37°C em meio sólido de extrato de levedura contendo carvão ativado (BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extract) (1% de extrato de levedura; 1% de ácido *N*-(2 acetoamido)-2-aminoetanosulfônico (ACES), pH 6.9; 3.3mM L-cisteína; 0.33mM de Fe(NO)₃; 1.5% de ágar bacteriológico e 0.2% de carvão ativado) (Feeley *et al.*, 1979). O mutante *thyA* (Berger and Isberg, 1993) cresceu em BCYE suplementado com timidina (100mg/ml). *L. pneumophila* selvagem ou $\Delta dotA$ expressando GFP (*green fluorescent protein*) clonada no plasmídeo pMMB207 (Coers *et al.*, 1999) cresceram em BCYE suplementado com timidina (100 mg/ml) e cloranfenicol (10mg/L). A expressão de GFP foi induzida com 1 mM IPTG (*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*). O isolado clínico F2111, de *L. pneumophila*, foi previamente descrito (Edelstein and Edelstein, 1989). *L. gratiana* (ATCC 49413), *L. jordanis* (ATCC 33623), *L. longbeachae* (ATCC 33462), *L. micdadei* (ATCC 33218), *L. parisiensis* (ATCC 35299), *L. sainthelensi* (ATCC 35248), *L. wadsworthii* (ATCC 33877), *L. bozemanii* (ATCC 33217), *L. rubrilucens* (ATCC 35304), *L. dumoffii* (ATCC 332799) and *L. tucsonensis* (ATCC 49180) foram previamente descritas (Allard *et al.*, 2006; Cianciotto *et al.*, 1990). Para a infecção dos BMMs, todas as bactérias cresceram a 37°C por 48 horas. Antes das infecções, as bactérias foram ressuspensas em H₂O estéril e diluídas de acordo com a densidade óptica a 600nm. A razão do número de bactérias por macrófago está expressa em MOI.

III. 3. Ensaio de formação de poro

O ensaio de formação de poro foi feito pela marcação com brometo de etídeo (EtBr) como descrito anteriormente (Kirby *et al.*, 1998). BMMs foram cultivados em lamínulas de 13mm, em placas de

24 poços, na densidade de 1.5×10^5 células por poço. As células foram infectadas com bactérias do gênero *Legionella* nos MOIs indicados nas legendas das figuras, na presença ou ausência do anticorpo policlonal anti-Lp (anti-*L. pneumophila*, 1:2000, descrito abaixo) para opsonização, e centrifugadas a $200 \times g$ por 5 minutos. Após os períodos de infecção estabelecidos, as células aderentes foram viradas de encontro a 5µl de uma solução de PBS contendo EtBr (25µg/ml) e laranja de acridina (5µg/ml) em uma lâmina de microscopia. Todas as células foram permeáveis ao laranja de acridina, enquanto somente as células com poro na membrana plasmática permitiram a difusão do EtBr para seu interior. Imagens foram adquiridas com o microscópio Leica (DMI4000B) com objetivas de 10x e 40x e analisadas com o programa ImageJ. A formação de poro foi calculada como a porcentagem de células permeáveis ao EtBr, a partir de 3 diferentes campos, visualizados e fotografados com objetiva de 10x, contendo cerca de 400 células cada campo. No ensaio de permeabilização na presença de potássio, uma solução de KCl (50mM) foi adicionada ao meio de cultura das células no momento da infecção.

III. 4. Tratamento com citocalasina D e ensaio de proteção com gentamicina

Para o tratamento com citocalasina D (fig. 6A), os BMMs foram cultivados em lamínulas de 13mm, em placas de 24 poços, na densidade de 1.5×10^5 células por poço e pre-incubados com R10/5 contendo 20 µM citocalasina D (Sigma), nos poços onde está indicado “during phagocytosis”, ou DMSO (demais poços) por 2 horas antes da infecção. A cultura de células foi previamente resfriada à 4° C, e a bactéria *L.pneumophila*, MOI 10, juntamente com anti-Lp, foram adicionados aos poços e as placas foram centrifugadas a $200 \times g$ por 5 minutos. As placas foram posteriormente aquecidas a 37° C para permitir a fagocitose. Após 5 minutos de aquecimento, a cultura foi lavada três vezes com PBS estéril e foi adicionado R10/5 fresco contendo 20 µM citocalasina D nos poços nos quais

está indicado “during phagocytosis” e “after 5 minutes of phagocytosis”. Nos demais poços somente R10/5 fresco foi adicionado. Após 1 hora de infecção, as culturas foram processadas para a formação de poro conforme descrito anteriormente. Na fig 6B, quando indicado “citocalasina D”, os macrófagos foram pré-incubados por 2 horas com a droga e esta foi mantida durante os períodos de infecção. Para o ensaio de proteção com gentamicina, os macrófagos foram tratados conforme mencionado para a fig. 6B, porém, após a infecção, o antibiótico gentamicina (100µg/ml) foi adicionado em todos os poços. Após 1, 3, 6, ou 9 horas de infecção os poços foram lisados com H₂O estéril e os lisados celulares foram combinados com o sobrenadante da cultura de cada poço. Diluições seriadas de cada poço foram plaqueadas em BCYE e as unidades formadoras de colônia (CFU) foram obtidas a partir da contagem de colônias bacterianas presentes após 96 horas de incubação a 37°C.

III. 5. Ensaio de ELISA

Para a quantificação de citocinas por ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), BMMs foram plaqueados em placas de 24 poços (2.0 x10⁵ células/poço) e pré-tratados com 1µg/ml de LPS (*Escherichia coli* 055:B5 LPS, Sigma) por 4 horas e então infectados com *L. pneumophila* ou com a bactéria indicada. As citocinas IL-1β e IL-1α presentes nos sobrenadantes foram dosadas com kits BD OptEIA (BD Biosciences), de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Placas de 96 poços (Maxisorp, Nunc) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluído 1:250, em tampão carbonato de sódio (0.1M), por 16 horas, a 4° C. O bloqueio foi feito por uma hora com PBS contendo 10% de soro bovino fetal (PBS/SBF). Foram adicionados 100µl de amostra em cada poço e a placa permaneceu por 2 horas em temperatura ambiente. A solução streptoavidina-HRP foi preparada 1:250, em PBS/SBF, e distribuída 100µl/poço. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos e foram adicionados 100µl do substrato de revelação em cada poço. Entre

cada etapa, foram feitas várias lavagens da placa com uma solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20. Para parar a reação, 50µl de H₂SO₄ 16% foram adicionados em cada poço. A absorbância das amostras foi lida em 490nm e a concentração de IL-1β ou IL-1α foi calculada de acordo com uma curva padrão.

III. 6. Quantificação de lactato desidrogenase

A citotoxicidade foi quantificada colorimetricamente com o kit CytoTox96 LDH-release (Promega) pela avaliação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada de BMMs infectados. Os sobrenadantes das culturas foram coletados nos períodos indicados e incubados por 30 minutos com “substrate mix” reconstituído, em temperatura ambiente. A reação foi parada com a “stop solution” e a absorbância foi lida em 490 nm. A porcentagem de LDH foi calculada como a densidade óptica observada (490nm) / densidade óptica máxima (490nm). A densidade óptica máxima foi obtida de amostras de macrófagos não infectados incubados com “lysis solution” por 1 hora, a 37°C.

III. 7. Marcação da caspase-1 ativa com FAM-YVAD

Para visualizar a caspase-1 ativa por meio de microscopia de fluorescência, 2.5x10⁵ BMMs aderidos em lamínulas de 13mm em placas de 24 poços foram infectados com *L. pneumophila*, MOI 10, na presença de anti-Lp (1:2000). Após 20 minutos de infecção, as células foram incubadas com o reagente “carboxyfluorescein FLICA” (FAM-YVAD-FMK, Immunochemistry Technologies) a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Após 40 minutos, as lamínulas foram lavadas cinco vezes durante 3 minutos com PBS/SBF 10%, em temperatura ambiente, sob agitação.

As lamínulas foram invertidas em meio de montagem contendo DAPI (DAPI Prolong[®] Gold antifade reagent, Invitrogen) em lâminas para microscopia de fluorescência e imagens foram adquiridas com o microscópio Leica (IDM 4000B). As imagens foram analisadas com o software ImageJ.

III. 8. Purificação de flagelina

As preparações de flagelina foram obtidas de bactérias crescidas em BCYE por 4 ou 6 dias a 37°C. As bactérias foram ressuspensas em 1 ml de PBS e as suspensões foram vortexadas por 2 minutos para a liberação do flagelo. As bactérias foram mantidas no gelo e o procedimento foi repetido por 3 vezes. A suspensão foi então centrifugada a 20000×g a 4°C por 10 minutos para remover as bactérias. O sobrenadante foi transferido para tubos novos e os flagelos foram precipitados com 3ml de acetona, seguido de centrifugação 20000×g a 4°C por 15 minutos. A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Sigma). A extração foi analisada pela separação da flagelina em SDS-PAGE seguido pela coloração do gel com coomassie blue e *western blotting* com anti-flagelina, como descrito abaixo no item III.12.

III.9. Geração de anticorpos

A flagelina obtida da cepa JR32 de *L. pneumophila* foi utilizada para gerar o anticorpo anti-flagelina, em camundongos. Os animais foram desafiados com 5µg de proteína por 3 vezes com intervalos de 15 dias entre as imunizações. O sangue foi coletado uma semana depois da última dose e o soro foi adsorvido com a bactéria *AflaA* fixada com formalina. O anticorpo policlonal anti-Lp foi gerado em coelhos pela inoculação subcutânea de *L. pneumophila*, morta pelo calor, a 56° C

por 1 hora. Foram dadas três injeções de bactérias (2×10^{10} bactérias diluídas em PBS, por animal), com intervalos de 15 dias. O soro de cada um dos três coelhos utilizados foi testado para a presença de anti-Lp em ensaios de opsonização da bactéria em BMMs. BMMs foram adicionados a placas de 24 poços, 2.0×10^5 células por poço, e as bactérias foram adicionadas a cada poço com MOI de 0.015, juntamente com diferentes concentrações de anti-Lp. As placas foram centrifugadas a $200 \times g$ por 5 minutos e lavadas com PBS estéril. Após 2 horas de infecção, os macrófagos foram lisados com H_2O estéril e diluições seriadas de cada poço foram plaqueadas em BCYE. As unidades formadoras de colônia (CFU) foram obtidas a partir da contagem de colônias bacterianas presentes após 96 horas de incubação a $37^\circ C$. Os soros positivos para anti-Lp foram estocados a $-80^\circ C$.

III. 10. Transfecção da flagelina bacteriana

As preparações de flagelo foram monomerizadas a $65^\circ C$ por 1 hora. Para a degradação da flagelina, foi feita incubação dos monômeros com $1 \mu g/ml$ de proteinase K (Fermentas Life Sciences) por 16 horas, a $37^\circ C$, seguido de inativação da protease a $75^\circ C$ por 15 minutos. O lipídio catiônico 1,2-dioleoyl-3-(trimethylammonium) propane (DOTAP, Roche Diagnostics) foi utilizado para transfectar a flagelina em macrófagos. Três microlitros de DOTAP foram incubados por 30 minutos com $0.6 \mu g$ de flagelina e a mistura foi utilizada para estimular, por 6 horas, 2×10^5 macrófagos aderidos em lamínulas de 13 mm, em placas de 24 poços.

III. 11. Imunofluorescência

BMMs foram plaqueados em lamínulas de 13 mm na confluência de 2×10^5 células/poço, em placas de 24 poços. As células foram infectadas com *L. pneumophila*, MOI 10, na presença de anti-Lp

(1:2000). As placas foram centrifugadas a $200 \times g$ por 5 minutos, em temperatura ambiente e incubadas por 1 hora a 37°C e 5% CO_2 e então fixadas e permeabilizadas por 10 minutos com metanol gelado. As lamínulas foram lavadas com PBS e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com PBS contendo 5% BSA e 2% soro de cabra. As bactérias foram marcadas com anticorpo policlonal anti-Lp (1:2000) seguido da marcação com anticorpo secundário conjugado com Alexa-488 (diluição 1:300, Invitrogen, Molecular Probes). A ubiquitina foi marcada com anticorpo anti-ubiquitina clone FK2 (diluição 1:1000, Millipore) seguido por anticorpo secundário conjugado com Alexa-594 (diluição 1:300, Invitrogen Molecular Probes). Todas as lavagens dos anticorpos foram feitas em PBS e as todas as diluições foram em PBS-BSA. As lamínulas foram invertidas em meio de montagem contendo DAPI (DAPI Prolong[®] Gold antifade reagent, Invitrogen) em lâminas para microscopia de fluorescência. Imagens foram adquiridas com o microscópio invertido Leica TCS SP2 SE utilizando a objetiva 40x/1.25 a óleo (Leica HCX PL APO) e analisadas utilizando o software Leica Advanced Fluorescence. Pelo menos 100 bactérias associadas a células foram contadas e os desvios padrão foram calculados a partir de três lamínulas.

III. 12. Western blotting

BMMs foram adicionados em poços de placas de 48 poços, 1×10^6 células/poço, e infectados com *L. pneumophila*, MOI 10, na presença de anti-Lp (1:2000) por 1 ou 3 horas. As placas foram centrifugadas a $200 \times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente e então incubadas a 37°C e 5% CO_2 . Após a infecção, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para marcação com anticorpo primário monoclonal anti-caspase-1 p20, clone 4B4 (1:500, Genentech) ou com anti-IL-1 β (1:250, Sigma). Os extratos celulares foram lisados com RIPA (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio, 0.1% SDS) e utilizados para marcação com anti-IL-1 β , anti-caspase-11 (1:500, Abcam) ou anti-actina (1:3000, Sigma).

Para a detecção da flagelina de *Legionella*, as bactérias foram cultivadas em BCYE por 6 dias. As preparações de flagelina foram utilizadas para *western blotting* utilizando o anticorpo anti-flagelina (1:500) descrito anteriormente no item III.9. As proteínas foram ressuspensas em tampão de amostra contendo SDS (50 mM Tris (pH 6.8), 2% SDS, 0.1% azul de bromofenol, 10% glicerol, 2.5% β -mercaptoetanol), separadas em gel SDS-PAGE 15%, e transferidas (Semidry Transfer Cell; Bio-Rad Laboratories) a 15 volts por 45 minutos para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) em tampão de transferência (50 mM Tris, 40 mM glicina e 10% metanol). As membranas foram bloqueadas por 1 hora a 25°C em TBS (25mM Tris, pH 7.4, 3.0mM KCl, 140mM NaCl) contendo 0.1% Tween-20 (TBS-T) e 5% de leite em pó desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram marcadas com anticorpos primários por 1 hora. As membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas por 1 hora a 25°C com o anticorpo secundário apropriado conjugado com peroxidase (diluição 1:3000; KPL). Para a detecção dos anticorpos foi utilizado o reagente Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology) e filme Hyperfilm (GE Healthcare).

III. 13. Curva de crescimento

Para as curvas de crescimento de *L. pneumophila*, BMMs foram adicionados a placas de 24 poços na densidade de 2.0×10^5 células por poço. As bactérias foram adicionadas a cada poço com MOI de 0.015. Após os períodos de infecção, os macrófagos foram lisados com H₂O estéril e os lisados celulares foram combinados com o sobrenadante da cultura, garantindo todas as bactérias do poço pudessem ser contadas. Diluições seriadas de cada poço foram plaqueadas em BCYE e as unidades formadoras de colônia (CFU) foram obtidas a partir da contagem de colônias bacterianas presentes após 96 horas de incubação a 37°C.

III. 14. Amplificação da região codificadora da caspase-11

BMMs foram adicionados em poços de placas de 24 poços (1×10^6 células/poço) e estimulados com LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) por 30 minutos. O RNA total das células foi extraído com Trizol (Invitrogen) seguido de purificação com o kit “Illustra” (GE Healthcare), segundo informações fornecidas pelo fabricante. O cDNA foi obtido a partir de $1 \mu\text{g}$ RNA total por meio de amplificação com a enzima transcriptase reversa Impron II (Promega). Um micrograma de cDNA foi utilizado como molde para amplificação do gene da caspase-11 por reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores 5' ATGCCCGTACACGAAAGGCTCTTA 3' (direto) e 5' GCCTGCACAATGATGACTTTGGGT 3' (reverso) (Bulosan *et al.*, 2009). Após uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, cada amplificação foi realizada por 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, com anelamento ótimo de temperatura a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo.

III. 15. Análises estatísticas

Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM. Nos experimentos de cinética os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido de análise pós-teste Bonferroni. Todos os outros dados foram analisados com one-way ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad PRISM 5.0. As diferenças foram consideradas significativamente estatísticas se $p < 0.05$.

IV. Resultados

IV. 1. A caspase-1 é necessária para a formação de poro e piroptose em macrófagos murinos infectados com *L. pneumophila*

A citotoxicidade induzida por *L. pneumophila* tem sido relacionada à habilidade dessa bactéria de inserir poros nas membranas celulares das células infectadas (Zuckman *et al.*, 1999; Kirby *et al.*, 1998). Trabalhos recentes descrevem que macrófagos murinos infectados com *L. pneumophila* apresentam um tipo de morte celular dependente de caspase-1, em resposta à infecção (Lamkanfi *et al.*, 2007; Amer *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006; Zamboni *et al.*, 2006). A fim de investigar a participação da caspase-1 na formação de poro em resposta à infecção por *L. pneumophila*, nós infectamos BMMs derivados de camundongos C57BL/6 (BL/6) e de animais deficientes para caspase-1 e observamos o influxo do corante EtBr nestas células. Os macrófagos com membranas plasmáticas intactas não internalizam EtBr, enquanto BMMs contendo poros ou algum tipo de ruptura na membrana plasmática tornam-se permeáveis a este corante (McGahon *et al.*, 1995).

O ensaio de formação de poro foi realizado em combinação com laranja de acridina, um corante verde acidofílico, não seletivo, que cora tanto células permeabilizadas, quanto células intactas, permitindo determinar a porcentagem de formação de poro (Zuckman *et al.*, 1999). Como estes ensaios foram realizados em períodos curtos, a bactéria foi opsonizada para garantir a eficiência e a uniformidade da infecção (Zuckman *et al.*, 1999). Após 1 hora de infecção, a formação de poro em BMMs BL/6 foi evidente com MOI 10, e a eficiência de permeabilização foi

dependente do MOI utilizado (fig. 1A). Em contraste, BMMs derivados de animais caspase-1^{-/-} falharam em desencadear a formação de poro mesmo com MOI 100 (fig. 1A). Imagens representativas de BMMs infectados por 1 hora com MOI 10 são mostradas na figura 1B.

Em seguida, a formação de poro foi avaliada em uma cinética de 3 horas, na qual os BMMs foram infectados com MOI 10. BMMs de animais BL/6 permitiram o influxo de EtBr de maneira tempo-dependente, ao passo que BMMs caspase-1^{-/-} foram impermeáveis ao EtBr mesmo após 3 horas de infecção (fig. 2A). A formação de poros em membranas de BMMs leva a um processo de lise da célula hospedeira chamado de piroptose (Bergsbaken *et al.*, 2009; Fink & Cookson, 2007; Fink & Cookson, 2006). Com o objetivo de avaliar a formação de poro e a piroptose em resposta à *L. pneumophila*, nós analisamos a liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH). Nos sobrenadantes de BMMs BL/6, foram detectadas baixas quantidades de LDH após 1 e 2 horas de infecção (fig. 2B), ainda, nestes mesmos períodos, foi detectada uma alta porcentagem de células positivas para EtBr (fig. 2A). Esses dados sugerem que a formação de poro depende de caspase-1 precede a lise da célula hospedeira.

Uma vez que a ativação de caspase-1 em BMMs culmina com o processamento e secreção de IL-1 β , nós dosamos a secreção dessa citocina durante toda a cinética de 3 horas de infecção, para avaliar a relação entre a formação de poro, piroptose e a secreção de IL-1 β . Observamos que enquanto a secreção de IL-1 β foi temporariamente coordenada com a formação de poro (fig. 2C), a lise dos macrófagos ocorreu tardiamente após a infecção (fig. 2B). Esses dados suportam a hipótese de que a secreção de IL-1 β é um processo ativo e regulado, que precede a lise celular e a piroptose.

Fig. 1. A caspase-1 é necessária para a formação de poro em resposta à infecção por *Legionella*.

BMMs aderentes a lamínulas foram infectados com diferentes multiplicidades MOIs de *L. pneumophila* por 1 hora, na presença de anti-Lp, e as culturas foram analisadas em relação à formação de poro pela dupla marcação com os corantes EtBr e laranja de acridina.

(A) BMMs Caspase-1^{-/-} (círculos) e C57BL/6 (quadrados) foram infectados por uma hora com *L. pneumophila* com MOI 2, 10 ou 100. (B) Imagens representativas da formação de poro em BMMs caspase-1^{-/-} (cima) ou C57BL/6 (baixo) após 1 hora de infecção com *L. pneumophila*, MOI 10. Os BMMs corados com o corante laranja de acridina (verde) representam as células totais em cada campo (painéis à esquerda) e o corante EtBr (vermelho) representa os BMMs permeabilizados (painéis do meio). Os painéis da direita mostram imagens sobrepostas dos dois corantes. Os dados são representativos de quatro experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs C57BL/6.

Fig. 2. A formação de poro é temporalmente coordenada com a secreção de IL-1 β e precede à lise da célula hospedeira.

BMMs de camundongos caspase-1^{-/-} (círculos) e C57BL/6 (quadrados) foram tratados com LPS por 4 horas e infectados com *L. pneumophila*, MOI 10, na presença de anti-Lp. As culturas foram infectadas por 1, 2 e 3 horas e processadas para o ensaio de formação de poro (A), liberação de lactato desidrogenase (LDH) (B) ou secreção de IL-1 β (C). Os dados representados em A, B e C foram obtidos das mesmas culturas e são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs C57BL/6.

IV. 2. O sistema de secreção bacteriano Dot/Icm funcional é necessário para a formação de poro

Proteínas e processos altamente conservados em células eucariotas podem ser alvos de proteínas injetadas pelo sistema de secreção Dot/Icm (Campodonico *et al.*, 2005). Como trabalhos prévios demonstraram que o Dot/Icm é necessário para a formação de poro, nós investigamos a participação deste sistema de secreção na formação de poro dependente de caspase-1. Para isso, infectamos as células com bactérias *L. pneumophila* selvagem ou $\Delta dotA$ expressando a proteína fluorescente verde (GFP), MOI 10, por 1 hora, na presença de anti-Lp. A bactéria selvagem induziu eficientemente a formação de poro em BMMs, como demonstrado pelos núcleos vermelhos das células infectadas. Em contrapartida, BMMs infectados com a bactéria $\Delta dotA$ apresentaram membranas intactas e não permitiram o influxo de EtBr (fig 3A). Os experimentos utilizando bactérias expressando GFP demonstraram que a maioria das células foi infectada. Portanto, a deficiência da formação de poro observada nas culturas infectadas com $\Delta dotA$ não foi devido à ausência de infecção da célula hospedeira.

Com o objetivo de investigar os componentes do sistema Dot/Icm necessários para desencadear a formação de poro, BMMs BL/6 foram infectados com mutantes isogênicos para componentes estruturais do Dot/Icm de *L. pneumophila*. A expressão de várias proteínas tais como DotA, DotI, DotB, IcmX, IcmR e IcmQ foi necessária para a formação de poro nas células (fig. 3B). Entretanto, as chaperonas IcmW e IcmS, as quais facilitam a secreção de um subtipo de efetores do Dot/Icm (Cambronne & Roy, 2007; Ninio & Roy, 2007), não foram necessárias para a formação de poro em BMMs (fig. 3B). Para avaliar o papel de efetores bacterianos na formação de poro, nós realizamos o ensaio de permeabilidade ao EtBr utilizando vários mutantes deficientes para substratos do Dot/Icm. Observamos que *L. pneumophila* deficiente para *ankX*, *drrA*, *lidA*, *ralF* ou

ylfA/ylfB desencadeou a formação de poro em BMMs BL/6 a níveis similares aos da bactéria selvagem (fig. 3C).

Para investigar a importância da multiplicação bacteriana e a síntese *de novo* de proteínas na formação de poro em BMMs, realizamos o ensaio de poro na presença do antibiótico bacteriostático cloranfenicol ou utilizando o mutante auxotrófico deficiente para a produção de timidina (*thyA*), o qual é capaz de modular a biogênese do fagossomo, mas tem a multiplicação limitada devido à baixa quantidade de timidina dentro do LCV. Como mostrado na figura 3D, nem a multiplicação bacteriana, nem a síntese *de novo* de proteínas foi necessária para a formação de poro em resposta à infecção por *L. pneumophila*.

Fig. 3. A formação de poro é dependente do sistema de secreção do tipo IV, mas independente da multiplicação bacteriana e da síntese *de novo* de proteínas.

BMMs de camundongos C57BL/6 foram infectados por 1 hora com *L. pneumophila* selvagem (WT *L.p.*) ou mutantes isogênicos e processados para o ensaio de formação de poro. (A) Os BMMs

foram infectados com a WT L.p (esquerda) ou mutantes $\Delta dotA$ (direita), ambos expressando GFP, MOI 10, na presença de anti-Lp. As imagens mostram sobreposições de bactérias expressando GFP (verde) e núcleos positivos para EtBr (vermelhos). BMMs foram infectados com MOI de 100 WT L.p. ou mutantes isogênicos para (B) $\Delta dotA$, $\Delta dotB$, $\Delta dotI$, $\Delta icmR$, $\Delta icmQ$, $\Delta icmS$, $\Delta icmW$, $\Delta icmW/\Delta icmS$ (*icmWS*), $\Delta icmX$ ou $\Delta ankX$, $\Delta drrA$, $\Delta lidA$, $\Delta ralF$ e $\Delta ylfA/\Delta ylfB$ (*ylfAB*). (D) BMMs foram infectados com MOI de 100 WT L.p. na ausência (meio) ou presença de 20 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol (Cm) ou infectados com mutantes *thyA*, $\Delta dotA$. Os dados são representativos de três (A, B) ou dois (C, D) experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs infectados com WT L.p.

IV. 3. A atividade do Dot/Icm não é suficiente para desencadear a formação de poro em macrófagos

A demonstração de que bactérias mutantes para Dot/Icm falham em desencadear a formação de poro em BMMs tem levado à especulação de que este processo pode ser devido ao resultado direto da inserção de proteínas do Dot/Icm na membrana da célula hospedeira (Zuckman *et al.*, 1999; Kirby *et al.*, 1998). Entretanto, os dados demonstrados nas figuras 1, 2 e 3 sugerem que a formação de poro é uma resposta do hospedeiro, dependente de caspase-1, contra a bactéria *Legionella* que expressa o sistema de secreção Dot/Icm.

Para avaliar se a atividade do Dot/Icm é suficiente para desencadear a formação de poro em BMMs, utilizamos BMMs de camundongos caspase-1^{-/-} para realizar o ensaio de formação de poro sob condições nas quais o sistema Dot/Icm é ativo. Uma conhecida característica da atividade do Dot/Icm é o recrutamento de proteínas poliubiquitinadas para o LCV (Ivanov & Roy, 2009; Kubori *et al.*, 2008; Dorer *et al.*, 2006). Então, BMMs derivados de camundongos BL/6 e caspase-1^{-/-} foram infectados com *L. pneumophila* selvagem ou $\Delta dotA$ por 1 hora e corados com anticorpo anti-ubiquitina (fig. 4A e 4B). Uma porcentagem similar de LCV positivos para ubiquitina, cerca de 40%, foi observada em BMMs caspase-1^{-/-} e BL/6 infectado com a bactéria selvagem (fig. 4C). De modo oposto, as bactérias mutantes para *dotA* falharam em recrutar proteínas para o LCV (fig. 4C). Visto que o recrutamento de proteínas poliubiquitinadas é estritamente dependente de Dot/Icm, apesar de os dados demonstrarem que o Dot/Icm estar ativo, não houve formação de poro em BMMs caspase-1^{-/-}. Vale ressaltar que esse evento não foi devido a um atraso na cinética de formação de poro, pois experimentos realizados por períodos mais longos mostraram que BMMs caspase-1^{-/-} ainda falharam na formação de poro nas primeiras 6 horas de infecção (fig. 5A). Após este período, é possível detectar a formação de poro independente de caspase-1, embora não haja

diferença significativa em relação à quantidade de vacúolos replicativos entre BMMs caspase-1^{-/-} e os BMMs BL/6 (fig. 5B). Note que, para observarmos a formação de poro em períodos mais tardios, as bactérias não foram opsonizadas.

Uma vez que as funções do Dot/Icm são absolutamente necessárias para a multiplicação bacteriana (Vogel *et al.*, 1998; Segal & Shuman, 1997), esses dados fornecem confirmações independentes de que apesar do Dot/Icm estar ativo, a formação de poro não ocorre na ausência de caspase-1. Além disso, esses resultados suportam nossa hipótese de que a formação de poro é um evento dependente da resposta celular hospedeira de maneira dependente de caspase-1 e não da atividade de Dot/Icm *per si*.

Fig. 4. A formação de poro não é resultado de dano na membrana celular feito pelo aparato bacteriano Dot/Icm.

BMMs de camundongos caspase-1^{-/-} e C57BL/6 foram infectados com *L. pneumophila* selvagem (WT *L.p.*) ou mutantes isogênicos $\Delta dotA$ por 1 hora com MOI 10, na presença de anti-Lp. O recrutamento de ubiquitina (vermelho) para os vacúolos de *L. pneumophila* (verde) em BMMs caspase-1^{-/-} (A) ou C57BL/6 (B) infectados foram visualizados por microscopia confocal. O detalhe

de alta resolução dentro do quadrado pontilhado branco (inset) corresponde ao recrutamento de ubiquitina para os vacúolos. Barras de escala= 10 μ m. (C) Porcentagem de células positivas para vacúolos de *L. pneumophila* contendo ubiquitina após infecção com WT *L.p.* (barras pretas) ou mutantes $\Delta dotA$ (barras hachuradas). Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs infectados com WT *L.p.*

A **B**

Fig. 5. A formação de poro dependente de caspase-1 ocorre preferencialmente até 6 horas após a infecção.

BMMs de camundongos caspase-1^{-/-} (círculos) e C57BL/6 (quadrados) foram infectados com *L. pneumophila* selvagem, MOI 10, por até 10 horas. (A) A formação de poro foi calculada após 1, 6 e 10 horas de infecção. (B) A porcentagem de vacúolos replicativos foi determinada após 6 horas de infecção. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

IV. 4. A internalização bacteriana facilita a formação de poro

Embora tenha sido previamente descrito que a citotoxicidade de *L. pneumophila* é associada à célula, não estava claro se a fagocitose era necessária para a completa citotoxicidade em macrófagos (Kirby & Isberg, 1998). Além disso, um trabalho recente demonstrou que a atividade de actina foi necessária para a formação de poro caspase-1-dependente em resposta à infecção por *S. enterica* serovar Typhimurium (Fink & Cookson, 2006). Para investigar se a fagocitose de *Legionella* e o estabelecimento do fagossoma são necessários para a formação de poro, nós infectamos BMMs BL/6 na presença de citocalasina D, a qual perturba a polimerização de actina e inibe a fagocitose bacteriana (Husmann & Johnson, 1994; Elliott & Winn, 1986). Nós observamos que quando essa droga foi adicionada antes da infecção e mantida por 1 hora, a formação de poro foi substancialmente inibida. Em contraste, quando a internalização bacteriana foi permitida por 5 minutos e então feito o tratamento com citocalasina D, nós não observamos diferenças na formação de poro em relação às células não tratadas (fig. 6A). Esses dados sugerem que a polimerização de actina não é necessária para a formação de poro após a fagocitose.

Para investigar se há um atraso na formação de poro devido ao tratamento com citocalasina D, infecções foram feitas na presença da droga por 9 horas e a formação de poro foi quantificada. Apenas uma pequena proporção de células estava permeabilizada após uma hora, porém a permeabilização aumentou com o tempo de infecção, e os macrófagos tratados com citocalasina apresentaram níveis similares de formação de poro aos das células não tratadas após 6 horas de infecção (fig. 6B). E isso não foi devido à falta de efeito da citocalasina na fagocitose bacteriana, pois o ensaio de proteção por gentamicina realizado em paralelo demonstrou que o tratamento com citocalasina inibiu a internalização bacteriana durante as nove horas do experimento (fig. 6C). Esses

estudos podem nos ajudar a interpretar as contrastantes diferenças em relação à importância da internalização bacteriana para a atividade de formação de poro em resposta à *S. Typhimurium* versus *L. pneumophila* (Fink & Cookson, 2006; Kirby & Isberg, 1998). É possível que a internalização da bactéria facilite substancialmente o processo de formação de poro por permitir a geração de um fagossoma, o qual facilitaria o processo de secreção de produtos bacterianos dentro do citoplasma da célula, os quais podem ativar caspase-1 e desencadear a formação de poro.

Fig. 6. A internalização bacteriana facilita, mas não é necessária para a formação de poro.

BMMs C57BL/6 foram infectados com *L. pneumophila* selvagem, MOI 10, na presença de 20 μ M citocalasina D ou veículo (DMSO). As bactérias foram centrifugadas na cultura de células resfriada a 4° C, a qual foi posteriormente aquecida a 37° C para permitir a fagocitose. As células aderentes em lamínulas foram processadas para o ensaio de formação de poro. (A) Células tratadas com DMSO (sinal de menos) ou com citocalasina D por 2 horas antes da infecção (sinal de mais “before phagocytosis”) ou 5 minutos após infecção (sinal de mais “after 5 minutes of phagocytosis”). NI, não infectado. (B) Citocalasina D ou DMSO (untreated) foram adicionados à cultura de células 2 horas antes da infecção e mantidos por todo o experimento. A formação de poro foi calculada após 1, 3, 6 e 9 horas de infecção. (C) A infecção dos BMMs foi feita na ausência “untreated” ou presença de citocalasina D e ao meio das culturas foi adicionado o antibiótico gentamicina. Após os períodos de infecção indicados, os BMMs foram lisados e as bactérias plaqueadas em BCYE. Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs NI em (A) ou BMMs untreated em (B e C).

IV. 5. A transfecção da flagelina é suficiente para desencadear a formação de poro dependente de caspase-1

Dado que estudos prévios demonstraram que *L. pneumophila* mutante para flagelina falha em induzir a citotoxicidade em macrófagos (Akhter *et al.*, 2009; Lightfield *et al.*, 2008; Molofsky *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006), nós testamos se a transfecção da célula hospedeira com a flagelina purificada desencadearia a formação de poro independentemente da infecção. BMMs BL/6 foram estimulados com a flagelina purificada de *Legionella* na presença ou na ausência de DOTAP, um lipídio catiônico que possibilita a entrada de moléculas negativamente carregadas para dentro do citoplasma da célula hospedeira (Simberg *et al.*, 2004). O estímulo de BMMs com flagelina e DOTAP em conjunto, mas não com flagelina ou DOTAP individualmente, induziu a formação de poro (fig. 7A). Experimentos realizados com BMMs caspase-1^{-/-} indicaram que a caspase-1 foi necessária para a formação de poro em resposta à flagelina transfectada (fig. 7A).

Para demonstrar que a flagelina foi necessária para os efeitos citotóxicos em BMMs, transfectamos as células com i) uma proteína não relacionada (p131, derivada do parasita patogênico *Schistosoma mansoni*); ii) uma preparação MOCK de flagelina, obtida da *L. pneumophila* *AflaA* ou com iii) uma preparação de flagelina que foi tratada com proteinase K. Em todas as situações a formação de poro foi significativamente reduzida quando comparada com a transfecção da flagelina de *L. pneumophila* sem tratamento (fig. 7B). Esses dados reforçam a indicação que a flagelina induz especificamente a formação de poro num processo dependente de caspase-1. Deste modo, a formação de poro em BMMs pode ser o mecanismo subjacente à citotoxicidade dependente de flagelina previamente descrito (Akhter *et al.*, 2009; Lightfield *et al.*, 2008; Molofsky *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006).

Prosseguindo os estudos acerca da investigação do papel da flagelina no processo de formação de poro, avaliamos a resposta de BMMs infectados com *Legionella* deficiente para o gene da flagelina, (*ΔflaA*). Conforme observado na fig. 8A, verificamos que não houve formação de poro em resposta à bactéria *ΔflaA*. Em contrapartida, BMMs infectados com *ΔfliI*, bactéria deficiente para o gene que codifica uma ATPase necessária para a secreção de flagelina e formação do flagelo (Merriam *et al.*, 1997), apresentaram formação de poro a níveis similares aos obtidos com a infecção da bactéria selvagem. Logo, a formação de poro em BMMs é exclusivamente dependente da flagelina, mas não do flagelo, motilidade, do sistema de secreção do tipo IV ou da infecção bacteriana.

Com o objetivo de analisar a expressão da flagelina, foi feito *western blotting* utilizando um anticorpo gerado contra a flagelina purificada de *L. pneumophila*. Observamos que a *L. pneumophila* selvagem, *ΔdotA*, e em menor quantidade, *ΔfliI*, expressam flagelina; ao passo que a bactéria *ΔflaA* foi deficiente na expressão dessa proteína (fig. 8B).

Fig. 7. A flagelina bacteriana é suficiente para desencadear a formação de poro.

BMMs C57BL/6 e caspase-1^{-/-} (Casp-1^{-/-}) foram transfectados com proteínas utilizando DOTAP. As culturas foram estimuladas por 6 horas e processadas para formação de poro.

(A) As culturas foram tratadas com flagelina apenas, DOTAP apenas, DOTAP + p131 de *Schistosoma mansoni* ou DOTAP + flagelina. (B) As culturas de BMMs foram tratadas com DOTAP + preparação de MOCK flagelina (extraída de *L. pneumophila* Δ flaA), DOTAP + flagelina ou DOTAP + flagelina tratada com proteinase K. Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs tratados com DOTAP + flagelina.

Fig. 8. A expressão de flagelina é necessária para induzir a formação de poro.

(A) BMMs de camundongos C57BL/6 foram infectados com *L. pneumophila* selvagem (WT L.p.) da cepa JR32 ou mutantes isogênicos $\Delta fliI$, $\Delta flaA$ ou $\Delta dotA$, MOI 10, na presença de anti-Lp, por 1 hora e analisados para o ensaio de formação de poro. (B) Bactérias cultivadas em placas de BCYE por 2 dias foram utilizadas para preparar extratos totais de proteínas. Os extratos foram separados por SDS-PAGE, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e marcados com anticorpo anti-flagelina. Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs infectados com WT L.p.

IV. 6. A formação de poro é induzida através do reconhecimento da flagelina pelo inflamassoma de Nlrc4

Dentro do citosol dos macrófagos, a flagelina bacteriana é detectada por um inflamassoma possivelmente composto por Nlrc4, Naip5 e caspase-1 (Lightfield *et al.*, 2008; Franchi *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2006; Molofsky *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006; Subramanian & Qadri, 2006). Portanto, utilizamos BMMs Nlrc4^{-/-} para testar se o inflamassoma Nlrc4 é necessário para a formação de poro em resposta à *L. pneumophila*. Enquanto BMMs BL/6 apresentaram formação de poro com MOI 10, BMMs Nlrc4^{-/-} e caspase-1^{-/-} não formaram poro mesmo com MOI 100 (fig. 9A). De fato, a flagelina parece estar presente no início da via de sinalização, pois ambos os BMMs BL/6 e Nlrc4^{-/-} não apresentaram resposta de formação de poro quando infectados com a bactéria *AflaA* (fig. 9B).

Uma vez que nossos dados demonstram que Nlrc4 é necessário para a formação de poro, nós utilizamos BMMs de camundongos Nlrc4^{-/-} para investigar o possível papel da formação de poro na secreção de IL-1 β , um processo que ainda não está bem elucidado. Dessa forma, os macrófagos Nlrc4^{-/-} foram utilizados em condições nas quais não detectamos a formação de poro (MOI 10, por 1 hora). Observamos que embora não houvesse detecção da formação de poro, ainda houve ativação de caspase-1, como observado no ensaio de *western blotting* utilizando um anticorpo anti-caspase-1, que detecta tanto a pro-caspase-1, com peso molecular de 45kDa, quanto da subunidade ativa p20, de 20kDa, subproduto da clivagem da forma inativa p45 (fig. 9C). Houve também a secreção de IL-1 β por células Nlrc4^{-/-} (fig. 9D). Esses resultados sugerem que outros mecanismos além da formação de poro podem estar envolvidos com a liberação de IL-1 β por BMMs infectados com *L. pneumophila*.

Para investigar o papel da flagelina no processo de formação de poro independente de Nlrc4, avaliamos a resposta de BMMs Nlrc4^{-/-} transfectados com a flagelina purificada de *L. pneumophila*. Esses BMMs apresentaram formação de poro inferior aos BMMs selvagens, mas significativamente maior do que os caspase-1^{-/-}, o que confirma o reconhecimento de flagelina por Nlrc4, mas sugere que a flagelina pode estar sendo reconhecida por outro componente de inflamassoma ou que proteínas purificadas juntamente com a flagelina estão ativando o inflamassoma independente de Nlrc4 (fig. 9E).

Fig. 9. O receptor intracelular Nlrc4 é necessário para a formação de poro.

BMMs obtidos de camundongos C57BL/6, caspase-1^{-/-} (Casp-1^{-/-}) e Nlrc4^{-/-} foram infectados com *L. pneumophila* selvagem (A) ou mutantes $\Delta flaA$ (B) com MOI de 2, 10 ou 100, na presença de anti-Lp, por 1 hora, e processados para o ensaio de formação de poro (C). As proteínas de culturas de BMMs não-infectados (NI) ou BMMs infectados com *L. pneumophila* selvagem (WT L.p.) ou $\Delta dotA$, MOI 10, por 1 hora, na presença de anti-Lp, foram separados por SDS-PAGE, transferidos

para uma membrana de nitrocelulose, e marcados com um anticorpo anti-caspase-1. Na margem esquerda estão indicados os pesos moleculares referentes à pro-caspase-1 (45 kDa) e à subunidade ativa da caspase-1 p-20 (20 kDa). (D) Os BMMs foram pre-tratados com LPS por 4 horas e ou não-infectados (NI) ou infectados com *L. pneumophila* selvagem (WT L.p.) ou $\Delta dotA$ por 1 hora com MOI 10, na presença de anti-Lp,. A secreção de IL-1 β foi dosada por ELISA. (E) BMMs C57BL/6, Nlrc4^{-/-} e caspase-1^{-/-} (Casp-1^{-/-}) foram transfectados com flagelina utilizando DOTAP. As culturas foram estimuladas por 6 horas e processadas para formação de poro. Os dados são representativos de um (E) ou quatro experimentos independentes (A,B,C,D). O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs C57BL/6 (A, E) ou em comparação aos BMMs não infectados (D).

IV. 7. A formação de poro é uma resposta celular contra espécies virulentas de *Legionella* que expressam flagelina

Em seguida, investigamos se a formação de poro é uma resposta do hospedeiro específica contra *L. pneumophila* ou uma resposta geral contra bactérias intracelulares. Investigamos, então, se outras espécies do gênero *Legionella* poderiam desencadear a formação de poro em macrófagos. BMMs BL/6 foram infectados com onze espécies de *Legionella* não-*pneumophila* e cinco dessas espécies desencadearam formação de poro com eficiência variável: *L. bozemanii*, *L. gratiana*, *L. jordanis*, *L. micdadei* e *L. rubrilucens* (fig. 8A). De maneira oposta, seis espécies falharam em induzir o poro: *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, *L. parisiensis*, *L. sainthelensi*, *L. tucsonensis* e *L. wadsworthii*. Neste experimento também foi testado um isolado clínico altamente virulento de *L. pneumophila* SG1 (F2111), o qual foi muito eficiente em desencadear a resposta de formação de poro (fig. 10A). Observamos que a secreção de IL-1 β após a infecção com as diferentes espécies de *Legionella* correlacionou diretamente com a formação de poro, ou seja, as espécies que induziram o poro também desencadearam a secreção de IL-1 β (fig. 10B).

Visto que a flagelina foi necessária para a formação de poro dependente de caspase-1 em resposta à *L. pneumophila*, investigamos se a expressão de flagelina por diferentes espécies de *Legionella* correlacionava com a formação de poro. Após o cultivo das bactérias por 6 dias, até fase estacionária tardia, a flagelina foi extraída, fracionada em gel de poliacrilamida e corada diretamente com coomassie-blue. As espécies que desencadearam a formação de poro apresentaram a expressão de uma proteína de 48 kDa (fig. 8C). Para elucidar se essa proteína de 48 kDa seria a flagelina, analisamos os extratos protéicos por *western blotting* utilizando um anticorpo policlonal feito contra a flagelina de *L. pneumophila* (anti-flagelina). Como mostrado na fig. 10D, as extrações

obtidas de *L. pneumophila*, *L. gratiana*, *L. jordanis*, *L. micdadei*, *L. rubrilusces* e *L. tucsonensis* marcaram positivamente para flagelina. Algumas espécies que expressaram uma proteína com peso de 48 kDa, porém não reagiram com anti-flagelina, possivelmente porque essas espécies expressam variantes de flagelina, as quais não foram reconhecidas pelo anticorpo anti-flagelina de *L. pneumophila*.

É interessante notar que, espécies como *L. dumoffii* e *L. tucsonensis* expressaram uma proteína de 48 kDa, mas falharam em desencadear a formação de poro. Possivelmente, essas bactérias expressam flagelina, como mostrado com *L. tucsonensis*, mas a proteína pode não ter tido acesso ao citoplasma dos macrófagos e consequentemente falharam em induzir formação de poro. De acordo com essas especulações, foi recentemente demonstrado que embora as flagelinas de *L. parisiensis* e *L. tucsonensis* fossem tóxicas para BMMs, essas espécies foram capazes de multiplicar em BMMs BL/6 (Whitfield *et al.*). Apesar de haver secreção de flagelina através do Dot/Icm dessas outras espécies de *Legionella*, é importante destacar que nenhuma das bactérias que não expressam flagelina desencadeou a formação de poro. Dessa forma, estes resultados suportam nossas afirmações que a formação de poro é uma resposta celular do hospedeiro, dependente da flagelina bacteriana e não é específica para *L. pneumophila*.

Fig. 10. A formação de poro é uma resposta do hospedeiro induzida pela infecção de diferentes espécies de *Legionella*.

Diferentes espécies de *Legionella* foram utilizadas para analisar a formação de poro (A), secreção de IL-1 β (B), marcação direta das extrações de flagelina (C) e marcação com anticorpo anti-flagelina por *western blotting* (D). (A-B) BMMs obtidos de camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com LPS por 4 horas e ou não-infectados (NI) ou infectados, por 1 hora, MOI 50, com *L. pneumophila* selvagem (WT L.p.), mutante isogênico $\Delta dotA$, um isolado clínico altamente virulento de *L. pneumophila* (F2111) ou com as espécies de *Legionella* indicadas. As culturas infectadas foram processadas para o ensaio de formação de poro (A) e os sobrenadantes do mesmo experimento foram utilizados para dosar a secreção de IL-1 β por ELISA (B). As espécies de bactérias foram cultivadas em BCYE por 6 dias e utilizadas para a extração de flagelina. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e coradas com coomassie blue (C) ou foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e marcadas com um anticorpo anti-flagelina feito em camundongo (D). Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs NI.

IV. 8. Asc é parcialmente importante para a formação do poro em resposta à infecção por *L. pneumophila*

Alguns NLRs como os Nalps (ou Nlrps) (Nlrp1, Nlrp2, Nlrp3/Nalp3) não se associam diretamente à caspase-1 e requerem a proteína adaptadora Asc para recrutar e ativar essa caspase (Yu *et al.*, 2006; Agostini *et al.*, 2004). A deleção do gene *asc* em camundongos revelou que Asc é essencial para a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β madura em macrófagos, por diversos estímulos que induzem a geração desta citocina (Kanneganti *et al.*, 2006; Mariathasan *et al.*, 2006; Martinon *et al.*, 2006; Sutterwala *et al.*, 2006; Mariathasan *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004).

Com o objetivo de investigar o papel de Asc na formação de poro em resposta à *L. pneumophila*, nós infectamos macrófagos *Asc*^{-/-} com diferentes MOIs e avaliamos a permeabilização celular. Os BMMs *Asc*^{-/-} apresentaram uma permeabilização dose dependente ao EtBr, com fenótipo intermediário entre os macrófagos selvagens (C57BL/6) e os caspase-1^{-/-} (fig. 11A). A permeabilização foi significativamente reduzida nos BMMs *Asc*^{-/-} infectados com a bactéria Δ *flaA*, assim como também ocorreu com os outros grupos (fig. 11B). Posteriormente, avaliamos o papel de Asc através de uma cinética de infecção e observamos que a formação de poro em macrófagos *Asc*^{-/-} foi crescente com o decorrer do tempo de infecção. Após 3 horas de infecção, a porcentagem de poro observada em BMMs *Asc*^{-/-} foi igual à dos macrófagos selvagens (fig. 11C). Esses resultados sugerem que os macrófagos *Asc*^{-/-} apresentam formação de poro em resposta à infecção por *Legionella*, porém com um retardo temporal em relação aos macrófagos selvagens.

A ativação de caspase-1 através do receptor Nlrp3/Nalp3 é inibida na presença de altos níveis extracelulares de potássio. Dados *in vitro* sugerem que a inibição da ativação de caspase-1 pelo potássio pode ser um mecanismo comum entre todas as vias de Nlrp/Nalp dependentes de Asc devido à habilidade de altos níveis de potássio inibirem a oligomerização de Asc, um passo

essencial para a ativação de caspase-1 (Petrilli *et al.*, 2007). Em contraste, tanto a ativação de caspase-1 quanto a secreção de IL-1 β induzidas pela infecção de macrófagos com bactérias intracelulares, incluindo *Salmonella*, *Shigella* e *Listeria*, são independentes da depleção dos níveis citoplasmáticos de potássio (Franchi *et al.*, 2007; Petrilli *et al.*, 2007). Para avaliar se o efluxo de potássio está relacionado com a formação de poro, realizamos uma cinética de infecção na presença ou ausência de KCl, para inibir o efluxo de potássio dos macrófagos infectados com *L. pneumophila*. A formação de poro em BMMs BL/6, Asc^{-/-} e caspase-1^{-/-} não foi alterada com a adição de potássio no meio extracelular (fig. 12). Nossos resultados sugerem que o efluxo de potássio não tem interferência direta no fenômeno de formação de poro.

A necessidade da depleção de potássio citoplasmático para a ativação da caspase-1 induzida por bactérias intracelulares é controversa. Um trabalho recente mostrou que concentrações extracelulares de potássio acima de 90mM são capazes de inibir a ativação de Nlcr4 pela bactéria não flagelada *Pseudomonas aeruginosa* PA103 Δ U Δ T (Lindestam Arlehamn *et al.*). Os mesmos resultados foram encontrados na infecção com *S. typhimurium*, previamente descrita como independente de potássio extracelular. Entretanto, utilizando um fluoróforo sensível ao potássio, foi visto que a minoria das células apresentavam efluxo de potássio durante a infecção (Lindestam Arlehamn *et al.*). Além disso, resultados obtidos no nosso laboratório mostram que quantidades elevadas de potássio extracelular, acima de 90mM, são tóxicas para os BMMS e não apresentam inibição da ativação de caspase-1 e/ou formação de poro.

Fig. 11. Asc é parcialmente importante para a formação de poro em resposta à infecção por *L. pneumophila*.

BMMs obtidos de camundongos C57BL/6 (quadrados), caspase-1^{-/-} (círculos) e Asc^{-/-} (losangos) foram infectados, na presença de anti Lp, com *L. pneumophila* selvagem (A) ou mutantes $\Delta flaA$ (B) com MOI 2, 10 ou 100, por 1 hora, ou com *L. pneumophila* selvagem (C) MOI 10, por 3 horas, e processados para o ensaio de formação de poro nos períodos indicados. Os dados são representativos de quatro experimentos independentes.

Fig. 12. A formação de poro induzida por *L. pneumophila* não requer a depleção do potássio intracelular.

BMMs obtidos de camundongos C57BL/6 (quadrados), caspase-1^{-/-} (círculos) e Asc^{-/-} (losangos) foram infectados com *L. pneumophila* selvagem, MOI 10, na presença de anti-Lp, por 3 horas, na ausência (linhas contínuas) ou presença (linhas tracejadas) de KCl (50mM) e processados para o ensaio de formação de poro nos períodos indicados.

IV. 9. A formação do poro em resposta à *L. pneumophila* difere do poro formado via P2X₇/ATP

Foi demonstrado que o ATP é um sinal importante para a ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 β , ao se ligar a receptores purinérgicos expressos na superfície celular, os canais catiônicos do subtipo P2X₇ (Kahlenberg & Dubyak, 2004; Labasi *et al.*, 2002; Sanz & Di Virgilio, 2000). As consequências da ativação do P2X₇ incluem o efluxo de potássio, e tem sido sugerido que a depleção de potássio é crítica para a ativação de caspase-1 (Petrilli *et al.*, 2007; Perregaux & Gabel, 1994). Entretanto, a relevância da atividade mediada pelo ATP permanece controversa porque concentrações não fisiológicas de ATP são necessárias para a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β (Ferrari *et al.*, 2006; Khakh & North, 2006).

Para estudarmos a formação do poro em resposta ao ATP, foi feito o ensaio de permeabilidade ao EtBr utilizando macrófagos P2X₇^{-/-}. Foi visto que a formação do poro via ATP é dependente do receptor P2X₇, mas independente de caspase-1, Asc e Nlrp4 (fig. 13). Em paralelo, infectamos BMMs derivados de animais P2X₇^{-/-} com *L. pneumophila* para investigar se o receptor é necessário para a formação de poro em resposta a essa bactéria. A porcentagem de formação de poro nesses BMMs foi similar aos macrófagos selvagens infectados. Ainda investigando a participação do P2X₇ na infecção com *Legionella*, verificamos também que o receptor não é necessário para a restrição do crescimento de *L. pneumophila* em BMMs (fig. 14).

Trabalhos recentes demonstraram que a panexina-1, uma proteína que forma canais transmembrana não-seletivos (Barbe *et al.*, 2006), está envolvida no fenômeno de permeabilização da membrana associado ao P2X₇ induzida por ATP (Locovei *et al.*, 2007; Pelegrin and Surprenant, 2006). Contudo, há divergências sobre esses dados, pois no trabalho de Schachter e colaboradores (Schachter *et al.*, 2008) não foi observada inibição significativa do influxo de EtBr quando as

células foram tratadas com carbenoxolona, mefloquina ou Pnx10, três reagentes que foram descritos em diminuir as correntes associadas à panexina-1 e o influxo de corantes catiônicos associados ao P2X₇ (Locovei *et al.*, 2007; Pelegrin & Surprenant, 2006; Suadicani *et al.*, 2006; Bruzzone *et al.*, 2005). Os nossos resultados sugerem que a permeabilidade ao EtBr em resposta ao ATP depende do receptor P2X₇, mas não de componentes do inflamassoma como Asc, caspase-1 e Nlrc4. Portanto, a permeabilização induzida por ATP pode envolver outras proteínas e operar por vias de sinalização ainda não identificadas.

Fig. 13. A formação do poro em resposta à *L. pneumophila* difere do poro formado via P2X₇/ATP.

BMMs derivados de camundongos C57BL/6, P2X₇^{-/-}, Asc^{-/-}, Nlr4^{-/-} e caspase-1^{-/-} foram (A) infectados com *L. pneumophila* selvagem, MOI 10, por 1 hora, na presença de anti-Lp, ou (B) estimulados com ATP (5mM) por 10 minutos e processados para o ensaio de formação de poro. Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de *P* < 0.05 em comparação com BMMs C57BL/6 infectados com *L. pneumophila* (A) ou estimulados com ATP (B).

Fig. 14. O receptor P2X₇ não é necessário para a restrição do crescimento de *L. pneumophila*
 BMMs de camundongos C57BL/6 (quadrados), Asc^{-/-} (losangos), Nlrc4^{-/-} (triângulos) caspase-1^{-/-} (círculos) e P2X₇^{-/-} (estrelas) foram infectados com *L. pneumophila* selvagem com MOI 0,015. Foi feita uma cinética do crescimento bacteriano após 48 e 72 horas de infecção. Os macrófagos foram lisados com água estéril e o lisado foi combinado com o sobrenadante do mesmo poço. Unidades formadoras de colônia foram determinadas plaqueando as diluições em meio sólido de extrato de levedura contendo carvão ativado. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

IV. 10. Asc é importante para a ativação robusta de caspase-1

Para estudar a participação da caspase-1 na formação de poro em macrófagos deficientes para $Asc^{-/-}$, investigamos a presença de caspase-1 ativa nestes macrófagos na fase inicial de infecção com *L. pneumophila*. BMMs derivados de camundongos C57BL/6 e $Asc^{-/-}$ foram infectados por 3 horas com *L. pneumophila* selvagem ou $\Delta dotA$, e foi realizado um ensaio de *western blotting* com um anticorpo anti-caspase-1. A subunidade p20 da caspase-1 foi detectada somente nos macrófagos C57BL/6 infectados com a bactéria selvagem após 1 e 3 horas de infecção. Os macrófagos $Asc^{-/-}$ não apresentaram a caspase-1 ativa em nenhum ponto da cinética, nem mesmo no período de 3 horas de infecção, no qual a formação de poro foi semelhante a dos macrófagos selvagens (fig. 15A).

Visto que a detecção de subunidades pequenas como a p20 de caspase-1 ativa por western blot precisa de grandes quantidades de proteína, utilizamos uma técnica mais sensível para detectar a ativação de caspase-1 em macrófagos $Asc^{-/-}$. Para isso, marcamos os macrófagos com o corante fluorescente FAM-YVAD que tem afinidade para a forma ativa da caspase-1 (Smolewski *et al.*, 2001) e analisamos as células por microscopia de fluorescência. Após uma hora de infecção com *L. pneumophila*, MOI 10, uma pequena porcentagem dos macrófagos $Asc^{-/-}$ marcaram positivamente para a caspase-1 ativa (fig. 15B). A figura 15C contém imagens representativas das células totais coradas com DAPI (painéis da esquerda) e as células positivas para caspase-1, em verde, marcadas com FAM-YVAD (painéis da direita). Nossos resultados sugerem que a ativação de caspase-1 na primeira hora de infecção de macrófagos $Asc^{-/-}$ é baixa, porém ainda presente, aumentando com o decorrer da infecção. Entretanto, não descartamos a hipótese de que a marcação observada possa estar relacionada com a reatividade cruzada com outras caspases.

Uma vez que BMMs *Asc*^{-/-} apresentaram baixa ativação de caspase-1 nas primeiras horas de infecção, analisamos nestes macrófagos a secreção de citocinas dependentes de caspase-1 como IL-1 α e IL-1 β . A citocina pro-IL-1 α , análogo funcional da pro-IL-1 β , não é substrato da caspase-1 e não requer processamento para ligação ao receptor (Dinarello, 1998). Entretanto, a secreção dessa citocina ocorre somente quando há caspase-1 ativa (Keller *et al.*, 2008). Durante a cinética de infecção, macrófagos *Asc*^{-/-} apresentaram deficiência na secreção de IL-1 α (fig. 16A). A quantidade de IL-1 α detectada nestes macrófagos pode estar relacionada com a formação de poro que ocorre durante a infecção, que é seguida de lise e liberação do conteúdo citoplasmático. A secreção de IL-1 β , por sua vez, foi severamente diminuída durante toda a cinética de infecção. A clivagem de pro-IL-1 β poderia ocorrer nos macrófagos *Asc*^{-/-}, porém essas células poderiam apresentar deficiência apenas na secreção da forma ativa de IL-1 β . Para investigar essa hipótese, utilizamos um anticorpo que reconhece tanto a pro-IL-1 β (34 kDa), quanto a subunidade madura (17 kDa) por *western blotting* (fig. 16B). Todos os grupos apresentaram pro-IL1 β no extrato celular, pois todos foram estimulados por LPS, o qual promove a sinalização para a síntese dessa citocina via TLR4 (receptor do tipo toll 4), independente dos receptores do tipo NOD (Mariathasan *et al.*, 2006; Mariathasan *et al.*, 2004) (fig. 16C, parte superior). No entanto, a forma madura da IL-1 β foi detectada somente no extrato de macrófagos C57BL/6 infectados com *L. pneumophila* selvagem e nenhuma das formas de IL-1 β foi detectada no sobrenadante de BMMs caspase-1^{-/-} (fig. 16C, parte inferior).

Nossos resultados demonstram a importância de *Asc* para a formação de poro, ativação de caspase-1 e consequentemente secreção de citocinas em momentos iniciais da infecção de macrófagos com *L. pneumophila*. De fato, a importância de *Asc* para a secreção de IL-1 β sugere uma via distinta de *Nlrc4* na ativação de caspase-1, a qual estaria principalmente relacionada à secreção de citocinas pro-inflamatórias (Case *et al.*, 2009).

Fig. 15. A caspase-1 ativa é detectada em macrófagos Asc^{-/-} na fase inicial da infecção por *L. pneumophila*.

(A) BMMs derivados de camundongos C57BL/6 e Asc^{-/-} foram infectados com *L. pneumophila* selvagem (WT L.p.) ou $\Delta dotA$ por 1 e 3 horas, MOI 10, na presença de anti-Lp. As proteínas de

culturas de BMMs não-infectados (NI) ou BMMs infectados foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose, e marcadas com um anticorpo anti-caspase-1. Na margem esquerda estão indicados os pesos moleculares referentes à pro-caspase-1 (45 kDa) e à subunidade ativa da caspase-1 p-20 (20 kDa). (B) BMMs de camundongos C57BL/6, *Asc*^{-/-} e caspase-1^{-/-} foram infectados com *L. pneumophila* selvagem por 1 hora, MOI 10, na presença de anti-Lp e corados com FAM-YVAD. A porcentagem de células positivas para caspase-1 foi calculada em relação ao número de células totais. Em (C) estão imagens de microscopia de fluorescência representativas do experimento (B) nas quais os BMMs infectados foram corados com DAPI (esquerda) e FAM-YVAD (direita). Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs C57BL/6.

Fig. 16. Produção de citocinas dependentes de caspase-1 em BMMs Asc^{-/-} infectados com *L. pneumophila*.

BMMs derivados de camundongos C57BL/6 (quadrados), Asc^{-/-} (círculos) e caspase-1^{-/-} (losangos) foram estimulados com LPS (1μg/ml) por 4 horas e infectados com *L. pneumophila* selvagem ou $\Delta dotA$, MOI 10, por 3 horas, na presença de anti-Lp. A secreção de IL-1β madura (A) e de IL-1α (B) foram detectadas no sobrenadante por ELISA. (C) Após 1 hora de infecção as células foram lisadas e os extratos celulares (parte superior) e as proteínas secretadas (parte inferior) foram fracionadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e marcadas com um anticorpo anti-IL-1β. As setas na margem esquerda indicam os pesos moleculares de 34kDa e 17kDa. Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs C57BL/6.

IV. 11. Caspase-11 é parcialmente necessária para a formação de poro em resposta à *L. pneumophila*

A caspase-11 é uma das caspases inflamatórias murinas, homóloga às caspase-4 e 5 humanas (Wang *et al.*, 1996). Estudos demonstraram que a pro-caspase-11 interage com pro-caspase-1 em células transfectadas (Wang *et al.*, 1998) e que células deficientes para caspase-11 são resistentes à apoptose (Kang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998). Além disso, um modelo proposto para a formação do inflamassoma de Nlrp1/Nalp1 descreve a formação de um complexo formado por Asc, caspase-1 e caspase-11 (Martinon *et al.*, 2002). Esses e outros relatos têm sugerido o envolvimento de caspase-11 na ativação da caspase-1. Para investigar o papel da caspase-11 no processo de formação de poro em resposta à infecção com *L. pneumophila*, infectamos BMMs caspase-11^{-/-} com a bactéria selvagem, MOI 10, por 3 horas. Nesta cinética de infecção, observamos que os BMMs caspase-11^{-/-} apresentaram um fenótipo intermediário entre os macrófagos selvagens e os caspase-1^{-/-} (fig. 17A). Interessante, a formação de poro foi reduzida nos BMMs caspase-11^{-/-} infectados com a bactéria $\Delta flaA$ (fig. 17B). Esse resultado sugere um efeito aditivo da flagelina no desencadeamento da formação de poro em caspase-11^{-/-}. Esses dados em conjunto sugerem que caspase-1 e caspase-11 cooperam no processo de formação de poro.

A

B

Fig. 17. Caspase-11 é parcialmente necessária para a formação de poro em resposta à *L. pneumophila*

BMMs derivados de camundongos C57BL/6 (quadrados), caspase-11^{-/-} (círculos vazios) e caspase-1^{-/-} (círculos cheios) foram infectados com *L. pneumophila* selvagem, *ΔdotA* ou *ΔflaA*, MOI 10, na presença de anti-Lp. As culturas foram então processadas para o ensaio de formação de poro. (A) Os BMMs foram infectados com *L. pneumophila* selvagem por 3 horas (B) Os BMMs foram infectados com *L. pneumophila* selvagem (WT L.p.), *ΔdotA* ou *ΔflaA* por 1 hora. Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs infectados com WT L.p.

IV. 12. Macrófagos caspase-11^{-/-} infectados com *L. pneumophila* apresentam baixa ativação de caspase-1

Uma vez que nossos resultados demonstraram que BMMs caspase-11^{-/-} apresentam um retardo temporal na formação de poro em relação aos macrófagos selvagens, investigamos a ativação de caspase-1 nesses macrófagos. BMMs C57BL/6, caspase-1^{-/-} e caspase-11^{-/-} foram infectados com *L. pneumophila* selvagem, $\Delta dotA$ ou $\Delta flaA$, MOI 10, por uma hora. Assim como os macrófagos C57BL/6, os macrófagos caspase-11^{-/-} ativaram caspase-1 quando infectados com a bactéria selvagem (fig. 18A). Apesar da marcação do *blotting* ter sido de baixa qualidade, a intensidade da banda correspondente à caspase-1 ativa é menor em BMMs caspase-11^{-/-}, comparada com a banda correspondente dos macrófagos selvagens. Essa inferência sugere que BMMs caspase-11^{-/-} apresentam falha na ativação de caspase-1. Analisamos, então, durante uma cinética de infecção em BMMs caspase-11^{-/-}, a secreção das citocinas IL-1 β e IL-1 α , dependentes da clivagem e/ou secreção por caspase-1 ativa. Observamos menores níveis tanto de IL-1 β (fig. 18B) quanto de IL-1 α (fig. 18C) nos macrófagos caspase-11^{-/-} infectados. Esses resultados reforçam a hipótese da baixa ativação de caspase-1 em BMMs caspase-11^{-/-}. Sabe-se que caspase-11 não processa IL-1 β diretamente, mas a superexpressão de caspase-11 estimula o processamento de pro-IL1 β por caspase-1 (Wang *et al.*, 1996). Animais deficientes para caspase-11 estimulados com LPS apresentam severa diminuição dos níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-1 α . Alternativamente, essas citocinas reguladas por caspase-1 poderiam ter um *feedback* positivo na expressão de caspase-11 (Wang *et al.*, 1998), então, as duas caspases poderiam cooperar para a eficiente secreção das citocinas.

Fig. 18. Macrófagos caspase-11^{-/-} ativam caspase-1 em resposta à infecção por *L. pneumophila*. BMDMs derivados de camundongos C57BL/6 (quadrados), caspase-11^{-/-} (círculos vazios) e caspase-1^{-/-} (círculos cheios) foram estimulados com LPS (1μg/ml) por 4 horas. As células foram infectadas com *L. pneumophila* selvagem (WT *L.p.*), $\Delta dotA$ ou $\Delta flaA$, MOI 10, na presença de anti-*L.p.* A caspase-1 ativa foi detectada por *western blotting* e as citocinas foram dosadas por ELISA. (A) As proteínas dos sobrenadantes das células infectadas por 1 hora foram fracionadas por SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e marcadas com um anticorpo anti-caspase-1. Os pesos moleculares de 45kDa e 20kDa estão indicados na margem esquerda do *blotting*. A secreção de IL-1β (C) e IL-1α (D) foram dosadas por ELISA dos sobrenadantes das culturas infectadas por 1, 2 ou 3 horas. NI: não-infectado. Os dados são representativos de três experimentos independentes. O asterisco indica um valor de $P < 0.05$ em comparação com BMMs C57BL/6.

IV. 13. Macrófagos caspase-1^{-/-} apresentam deficiência de produção de caspase-11

Buscando compreender a cooperação entre a caspase-11 e a caspase-1, investigamos como seria a produção e ativação de caspase-11 por BMMs deficientes para caspase-1. Uma vez que a expressão da caspase-11 é altamente induzível por LPS (Wang *et al.*, 1996), realizamos um ensaio de dose-resposta estimulando BMMs C57BL/6 e caspase-1^{-/-} com diferentes concentrações de LPS de *E.coli*. Analisamos a presença de caspase-11 por *western blotting* utilizando um anticorpo monoclonal que detecta os polipeptídeos de 43 kDa e 38 kDa, codificados pelo mesmo *locus* gênico da caspase-11 e originados por sítios alternativos de iniciação da tradução. Esse anticorpo também pode detectar a presença dos subprodutos de clivagem com pesos moleculares 30 kDa e 10 kDa, porém é possível que esses produtos sejam instáveis e só observados quando os níveis de caspase-11 são altos (Kang *et al.*, 2000). Os BMMs selvagens responderam de forma eficiente ao LPS, com a produção dos polipeptídeos 43 e 38 kDa (fig. 19A). Entretanto os macrófagos caspase-1^{-/-} responderam com baixa produção de caspase-11, mesmo após 6 horas de estímulo.

Em seguida, investigamos os níveis de RNA mensageiro de caspase-11 em BMMs caspase-1^{-/-} para verificar se a diminuição de caspase-11 observada também ocorre a nível transcricional. BMMs C57BL/6 ou caspase-1^{-/-} foram estimulados com LPS por 30 minutos e o RNA mensageiro foi reversamente transcrito para DNA por RT-PCR. Os níveis de cDNA de caspase-11 obtidos foram semelhantes entre os macrófagos selvagens e os caspase-1^{-/-} (fig. 19B). Esses resultados demonstram que a deficiência da produção de caspase-11 em caspase-1^{-/-} ocorre somente a nível traducional.

Fig. 19. BMMs caspase-1^{-/-} apresentam deficiência de produção de caspase-11.

BMMs derivados de camundongos C57BL/6 e caspase-1^{-/-} foram estimulados com LPS para a detecção da proteína e do RNA mensageiro de caspase-11. (A) Análise por *western blotting* da presença da proteína caspase-11 em BMMs C57BL/6 ou caspase-1^{-/-} estimulados com LPS (1 μ g/ml) por 1, 3 e 6 horas. Os extratos celulares foram fracionados por SDS-PAGE, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e marcados com um anticorpo anti-caspase-11. Os pesos moleculares de 43 kDa e 38 kDa estão indicados na margem esquerda do *blotting*. A normalização foi feita com marcação da mesma membrana com anticorpo anti-actina. (B) Análise por RT-PCR da presença do RNA mensageiro de caspase-11 em BMMs C57BL/6 ou caspase-1^{-/-} estimulados com LPS (1 μ g/ml) por 30 minutos. A seta indica o tamanho do fragmento correspondente à região codificadora da caspase-11. M: marcador de tamanho molecular; ϕ : reação sem cDNA. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

IV. 14. Caspase-11 restringe o crescimento de *L. pneumophila*

Uma vez que BMMs caspase-11^{-/-} foram parcialmente deficientes em ativar caspase-1 nos momentos iniciais da infecção (fig. 18A), averiguamos como seria a restrição do crescimento de *L. pneumophila in vitro* nesses macrófagos. Assim como os macrófagos selvagens, bem como os Asc^{-/-}, os BMMs caspase-11^{-/-} restringiram o crescimento da bactéria (fig. 20). Apesar de apresentarem fenótipo intermediário na formação de poro, os macrófagos Asc^{-/-} e caspase-11^{-/-} controlam normalmente a infecção. Os resultados observados, em conjunto, para macrófagos deficientes para Asc e caspase-11 sustentam a hipótese de que essas proteínas possam atuar numa mesma via de ativação. Como os BMMs caspase-1^{-/-} são altamente susceptíveis à infecção e apresentam deficiência na produção de caspase-11, não pode-se excluir a hipótese que tanto caspase-11 quanto caspase-1 são necessárias e possivelmente cooperam para restringir o crescimento intracelular de *L. pneumophila*.

Fig. 20. BMMs caspase-11^{-/-} restringem o crescimento de *L. pneumophila*

BMMs de camundongos C57BL/6 (quadrados), Asc^{-/-} (losangos), caspase-1^{-/-} (círculos cheios) e caspase-11^{-/-} (círculos vazios) foram infectados com *L. pneumophila* (MOI 0.015). Para a cinética do crescimento bacteriano os macrófagos infectados foram lisados após 48 e 72 horas de infecção, com água estéril, e o lisado foi combinado com o sobrenadante do mesmo poço. Unidades formadoras de colônia foram determinadas plaqueando as diluições em meio sólido de extrato de levedura contendo carvão ativado. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

Fig. 21. Modelo proposto.

A fagocitose de *L. pneumophila* ou um contato íntimo com os BMMs são necessários para a injeção de proteínas bacterianas no hospedeiro pelo complexo Dot/Icm. A flagelina é reconhecida pelo receptor Nlrc4, o qual, juntamente com Naip5, ativa caspase-1 que desencadeia a formação de poro e o controle da infecção. A formação de poro é temporalmente associada à secreção de IL-1β e precede a morte celular. A proteína Asc e a caspase-11 seriam ativadas por outros efetores bacterianos e ativariam caspase-1 para a secreção de citocinas pro-inflamatórias. O ATP, ligante do receptor P2X7, ativa a via dependente do Nlrp3, o qual não participa da resposta celular à *L. pneumophila*. A via da permeabilização ao EtBr induzida pelo ATP ainda não está definida.

V. Discussão

A ativação de caspase-1 tem emergido como uma característica importante que explica diferentes processos da célula hospedeira incluindo: secreção não-convencional de proteínas, resposta contra patógenos intracelulares, a morte celular não-convencional e o controle da multiplicação de patógenos intracelulares (Keller *et al.*, 2008; Fink & Cookson, 2007; Zamboni *et al.*, 2006). Embora pouco se saiba a cerca dos alvos celulares para caspase-1, está claro que BMMs infectados expressando caspase-1 ativa secretam grandes quantidades de IL-1 β madura e sofrem de uma morte celular ainda pouco compreendida chamada piroptose (Fink & Cookson, 2007). Neste contexto, nossa investigação sobre os fatores bacterianos e do hospedeiro necessários para a formação de poro em resposta à *L. pneumophila*, contribuem para o entendimento da indução da piroptose em resposta à bactéria intracelular. É possível que os poros formados no início da infecção dos BMMs respondam diretamente pelo inchaço da célula hospedeira culminando com a lise das células infectadas (Fink & Cookson, 2006). Nós demonstramos que a formação de poro foi temporalmente associada com a secreção de IL-1 β e precedeu a lise da célula hospedeira e liberação de LDH (fig. 2). Portanto, a formação de poro aqui investigada, pode ser um passo importante e necessário para a piroptose.

A coordenação temporal da formação de poro e a secreção de IL-1 β tem levado à especulação de que a formação de poro possa ser o mecanismo pelo qual a IL-1 β é secretada (Fink & Cookson, 2006). Neste trabalho, nós utilizamos células deficientes para Nlrc4 para investigar essa questão. Isso foi possível visto que foi previamente demonstrado que *Legionella* desencadeia a ativação de caspase-1 dependente de Asc (e secreção de IL-1 β) independentemente de Nlrc4 (Case *et al.*, 2009).

Nesse contexto, utilizamos células de camundongos *Nlrc4*^{-/-} sob condições nas quais nós não detectamos formação de poro (MOI 10, por 1 hora) para realizar as infecções. Apesar da ausência de formação de poro, nós ainda detectamos ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β pelos macrófagos *Nlrc4*^{-/-} (fig. 7). Esses resultados podem indicar que a formação de poro não é um pré-requisito para a ativação de caspase-1, nem absolutamente necessário para a secreção de IL-1 β . Entretanto, nós não podemos descartar a possibilidade de que a baixa porcentagem de poro em células *Nlrc4*^{-/-} não seja suficiente para permitir a entrada de corantes, mas seja suficiente para permitir a secreção de citocinas.

Ainda que tenha sido descrito que a atividade citotóxica *L. pneumophila* é contato-dependente, não estava claro se a fagocitose é necessária para a total citotoxicidade nos BMMs (Kirby & Isberg, 1998). Neste trabalho, nós demonstramos que a transfecção da flagelina purificada foi suficiente para a formação de poro em macrófagos. De acordo com nossos achados, Lightfield e colaboradores (Lightfield *et al.*, 2008) demonstraram que a transdução de BMMs com uma construção retroviral que codifica flagelina bacteriana causou citotoxicidade aos BMMs. Além disso, foi recentemente demonstrado que a transfecção da flagelina de *L. parisiensis* e de *L. tucsonensis* desencadeou citotoxicidade em BMMs (Whitfield *et al.*).

Em conjunto, esses dados indicam que a internalização bacteriana e a formação do fagossoma não são necessários para a piroptose. Essas conclusões contrastam com uma publicação prévia que relata que a atividade de actina foi necessária para a formação de poro dependente de caspase-1 em resposta à infecção por *S. Typhimurium* (Fink & Cookson, 2006). Entretanto, os autores não investigaram a cinética de formação de poro em células J774 tratadas com citocalasina D. A fim de investigar essa questão, nós fizemos uma cinética de formação de poro induzida por *L. pneumophila* em BMMs tratados com citocalasina D (fig. 6B). Nós demonstramos que a formação de poro ocorre na presença de citocalasina, porém em períodos mais tardios da cinética. Então, nós

sugerimos que a internalização bacteriana e a formação do fagossoma não são essenciais para a formação de poro em BMMs.

Vale ressaltar que foi recentemente demonstrado que a fagocitose ou um contato íntimo são necessários para a injeção de proteínas bacterianas no hospedeiro pelo complexo Dot/Icm. (Charpentier *et al.*, 2009; Nagai *et al.*, 2005). Assim, é possível que a internalização bacteriana facilite a secreção de produtos de *L. pneumophila* para o interior do citoplasma da célula hospedeira. Entre esses produtos pode estar a flagelina, a qual corresponde à formação de poro dependente de Nlrc4 e caspase-1.

Embora nós demonstramos que Nlrc4 seja necessário para a formação de poro em resposta à *L. pneumophila*, o papel de Naip5 neste processo ainda não está claro. BMMs da linhagem de camundongos A/J, os quais possuem um alelo Naip5 deficiente desencadeiam efetivamente a formação de poro (Molofsky *et al.*, 2005; Zuckman *et al.*, 1999; Kirby *et al.*, 1998). Entretanto, camundongos Naip5^{-/-} foram gerados recentemente, e foi demonstrado que BMMs Naip5^{-/-} falharam tanto em desencadear ativação de caspase-1, quanto em liberar LDH em resposta à infecção por *Legionella* (Lightfield *et al.*, 2008). Portanto, nós especulamos que Naip5 desempenha um papel na formação de poro por *L. pneumophila*. Apesar da participação de Naip5, nós mostramos que a formação de poro em BMMs é um processo altamente coordenado de resposta celular do hospedeiro contra bactérias virulentas. Essa resposta envolve o Nlrc4 e a caspase-1 do hospedeiro e é possivelmente desencadeada em resposta à flagelina bacteriana que ganha acesso ao citoplasma dos macrófagos.

Os fenótipos intermediários de formação de poro, encontrados para macrófagos Asc^{-/-} e caspase-11^{-/-} infectados com *L. pneumophila* nos levaram a formular a hipótese de que estas proteínas possam atuar numa mesma via de sinalização. De acordo com essa hipótese, foi previamente sugerido que esse inflammasoma seria composto por Nlrp1 (ou Nalp1), Asc e caspase-11 (ou caspase-5 humana) (Martinon *et al.*, 2002). Tanto Asc quanto caspase-11 poderiam estar

relacionados com a ativação de caspase-1 para a secreção de citocinas pro-inflamatórias e não estariam ligados diretamente ao controle da infecção (fig. 21). De fato, experimentos realizados por Christopher L. Case e Prof. Dr. Craig R. Roy (Yale University, em colaboração conosco) demonstraram que macrófagos duplo-nocautes para Asc e caspase-11⁻ restringem o crescimento de *L. pneumophila* e apresentam o mesmo fenótipo parcial para a formação de poros quando comparados aos nocautes simples para caspase-11 e Asc.

Nesse sentido, estudos futuros devem contribuir para a determinação da composição molecular e as funções fisiológicas da formação do poro e piroptose. A investigação desses processos podem contribuir para nosso entendimento acerca de como as células da imunidade inata resistem à infecção e contribuem para a formação de uma resposta adaptativa apropriada.

VI. Conclusões

- Nossos dados suportam a hipótese de que a formação de poro não é um resultado direto da atividade de Dot/Icm de *L. pneumophila*. Ao invés disso, é uma resposta celular do hospedeiro altamente coordenada que requer Nlrc4 e caspase-1, e é desencadeada em resposta a bactérias patogênicas que expressam fatores de virulência tais como flagelina e sistema de secreção do tipo IV.
- A proteína Asc é parcialmente importante para a formação de poro e estaria relacionada à secreção de IL-1 β em resposta à infecção por *L. pneumophila*, independente do efluxo de potássio.
- A via de formação de poro em resposta ao ATP é dependente de P2X₇ e difere da via de formação de poro induzida por *L. pneumophila*. O receptor P2X₇ não participa do controle da infecção de *L. pneumophila*.
- A caspase-11 é parcialmente importante para a formação de poro e ativação da caspase-1. Asc e caspase-11 poderiam atuar numa mesma via em resposta à *L. pneumophila*.
- BMMs caspase-1^{-/-} apresentam deficiência na produção de caspase-11, o que poderia talvez explicar a alta susceptibilidade de caspase-1^{-/-}, *in vitro* e *in vivo*, por vários patógenos e estímulos.

VII. Referências

Abu-Zant, A., Jones, S., Asare, R., Suttles, J., Price, C., Graham, J. and Kwaik, Y.A. (2007) Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell Microbiol.* **9**: 246-264.

Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M.F., Hawkins, P.N. and Tschopp, J. (2004) NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. **20**: 319-325.

Akhter, A., Gavrilin, M.A., Frantz, L., Washington, S., Ditty, C., Limoli, D., *et al* (2009) Caspase-7 activation by the Nlrc4/IpaF inflammasome restricts *Legionella pneumophila* infection. *PLoS Pathog.* **5**: e1000361.

Allard, K.A., Viswanathan, V.K. and Cianciotto, N.P. (2006) lbtA and lbtB are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin. *J Bacteriol.* **188**: 1351-1363.

Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T.D., Body-Malapel, M., Ozoren, N., Brady, G., *et al* (2006) Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host IpaF. *J Biol Chem.* **281**: 35217-35223.

Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L.V., Torrisi, M.R. and Rubartelli, A. (2004) Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 β secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 9745-9750.

Andrews, H.L., Vogel, J.P. and Isberg, R.R. (1998) Identification of linked *Legionella pneumophila* genes essential for intracellular growth and evasion of the endocytic pathway. *Infect Immun.* **66**: 950-958.

Barbe, M.T., Monyer, H. and Bruzzone, R. (2006) Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)*. **21**: 103-114.

Benson, R.F. and Fields, B.S. (1998) Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect.* **13**: 90-99.

Berger, K.H. and Isberg, R.R. (1993) Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol.* **7**: 7-19.

Bergsbaken, T., Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2009) Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* **7**: 99-109.

Boyden, E.D. and Dietrich, W.F. (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet.* **38**: 240-244.

Bruzzone, R., Barbe, M.T., Jakob, N.J. and Monyer, H. (2005) Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem.* **92**: 1033-1043.

Bulosan, M., Pauley, K.M., Yo, K., Chan, E.K., Katz, J., Peck, A.B. and Cha, S. (2009) Inflammatory caspases are critical for enhanced cell death in the target tissue of Sjogren's syndrome before disease onset. *Immunol Cell Biol.* **87**: 81-90.

Buscher, B.A., Conover, G.M., Miller, J.L., Vogel, S.A., Meyers, S.N., Isberg, R.R. and Vogel, J.P. (2005) The DotL protein, a member of the TraG-coupling protein family, is essential for Viability of *Legionella pneumophila* strain Lp02. *J Bacteriol.* **187**: 2927-2938.

Cambronne, E.D. and Roy, C.R. (2007) The *Legionella pneumophila* IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog.* **3**: e188.

Campodonico, E.M., Chesnel, L. and Roy, C.R. (2005) A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol Microbiol.* **56**: 918-933.

Case, C.L., Shin, S. and Roy, C.R. (2009) Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **77**: 1981-1991.

Cassel, S.L., Eisenbarth, S.C., Iyer, S.S., Sadler, J.J., Colegio, O.R., Tephly, L.A., *et al* (2008) The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 9035-9040.

Charpentier, X., Gabay, J.E., Reyes, M., Zhu, J.W., Weiss, A. and Shuman, H.A. (2009) Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.* **5**: e1000501.

Chen, G., Zhuchenko, O. and Kuspa, A. (2007) Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science.* **317**: 678-681.

Cianciotto, N.P., Bangsberg, J.M., Eisenstein, B.I. and Engleberg, N.C. (1990) Identification of mip-like genes in the genus *Legionella*. *Infect Immun.* **58**: 2912-2918.

Coers, J., Monahan, C. and Roy, C.R. (1999) Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol.* **1**: 451-453.

Coers, J., Kagan, J.C., Matthews, M., Nagai, H., Zuckman, D.M. and Roy, C.R. (2000) Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol Microbiol.* **38**: 719-736.

Conover, G.M., Derre, I., Vogel, J.P. and Isberg, R.R. (2003) The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol Microbiol.* **48**: 305-321.

Dinareello, C.A. (1998) Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol.* **16**: 457-499.

Doebbeling, B.N. and Wenzel, R.P. (1987) The epidemiology of *Legionella pneumophila* infections. *Semin Respir Infect.* **2**: 206-221.

Dorer, M.S., Kirton, D., Bader, J.S. and Isberg, R.R. (2006) RNA interference analysis of *Legionella* in *Drosophila* cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog.* **2**: e34.

Dostert, C. and Petrilli, V. (2008) [Asbestos triggers inflammation by activating the Nalp3 inflammasome]. *Med Sci (Paris)*. **24**: 916-918.

Edelstein, P.H. and Edelstein, M.A. (1989) WIN 57273 is bactericidal for *Legionella pneumophila* grown in alveolar macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* **33**: 2132-2136.

Eder, C. (2009) Mechanisms of interleukin-1beta release. *Immunobiology*.

Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S. and Flavell, R.A. (2008) Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. **453**: 1122-1126.

Elliott, J.A. and Winn, W.C., Jr. (1986) Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **51**: 31-36.

Ensminger, A.W. and Isberg, R.R. (2009) *Legionella pneumophila* Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts. *Curr Opin Microbiol.* **12**: 67-73.

Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J.M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., *et al* (2007) Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell.* **25**: 713-724.

Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C. and Baine, W.B. (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol.* **10**: 437-441.

Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., *et al* (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol.* **176**: 3877-3883.

Fields, B.S. (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* **4**: 286-290.

Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2005) Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* **73**: 1907-1916.

Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2006) Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.* **8**: 1812-1825.

Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2007) Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol.* **9**: 2562-2570.

Franchi, L., Kanneganti, T.D., Dubyak, G.R. and Nunez, G. (2007) Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J Biol Chem.* **282**: 18810-18818.

Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Jagirdar, R., *et al* (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol.* **7**: 576-582.

Franco, I.S., Shuman, H.A. and Charpentier, X. (2009) The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cell Microbiol.* **11**: 1435-1443.

Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., *et al* (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med.* **297**: 1189-1197.

Gao, L.Y., Harb, O.S. and Abu Kwaik, Y. (1997) Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun.* **65**: 4738-4746.

Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., *et al* (1997) Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature.* **386**: 619-623.

Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., Jr. and Kassanoff, I. (1978) Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol.* **107**: 149-160.

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., *et al* (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.* **9**: 857-865.

Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., *et al* (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol.* **9**: 847-856.

Horwitz, M.A. (1984) Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell.* **36**: 27-33.

Horwitz, M.A. and Silverstein, S.C. (1980) Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest.* **66**: 441-450.

Husmann, L.K. and Johnson, W. (1994) Cytotoxicity of extracellular *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **62**: 2111-2114.

Ivanov, S.S. and Roy, C.R. (2009) Modulation of ubiquitin dynamics and suppression of DALIS formation by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Cell Microbiol.* **11**: 261-278.

Kahlenberg, J.M. and Dubyak, G.R. (2004) Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol Cell Physiol.* **286**: C1100-1108.

Kang, S.J., Wang, S., Hara, H., Peterson, E.P., Namura, S., Amin-Hanjani, S., *et al* (2000) Dual role of caspase-11 in mediating activation of caspase-1 and caspase-3 under pathological conditions. *J Cell Biol.* **149**: 613-622.

Kanneganti, T.D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J.H., Franchi, L., *et al* (2006) Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*. **440**: 233-236.

Keller, M., Ruegg, A., Werner, S. and Beer, H.D. (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. **132**: 818-831.

Khakh, B.S. and North, R.A. (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. **442**: 527-532.

Kirby, J.E. and Isberg, R.R. (1998) Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. *Trends Microbiol.* **6**: 256-258.

Kirby, J.E., Vogel, J.P., Andrews, H.L. and Isberg, R.R. (1998) Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol.* **27**: 323-336.

Kubori, T., Hyakutake, A. and Nagai, H. (2008) *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol Microbiol.* **67**: 1307-1319.

Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S. and Flavell, R.A. (1995) Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. **267**: 2000-2003.

Labasi, J.M., Petrushova, N., Donovan, C., McCurdy, S., Lira, P., Payette, M.M., *et al* (2002) Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J Immunol.* **168**: 6436-6445.

Lamkanfi, M. and Dixit, V.M. (2009) Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev.* **227**: 95-105.

Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X. and Vandenabeele, P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* **9**: 358-361.

Lamkanfi, M., Amer, A., Kanneganti, T.D., Munoz-Planillo, R., Chen, G., Vandenabeele, P., *et al* (2007) The Nod-like receptor family member Naip5/Birc1e restricts *Legionella pneumophila* growth independently of caspase-1 activation. *J Immunol.* **178**: 8022-8027.

Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., *et al* (1995) Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell.* **80**: 401-411.

Lightfield, K.L., Persson, J., Brubaker, S.W., Witte, C.E., von Moltke, J., Dunipace, E.A., *et al* (2008) Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nat Immunol.* **9**: 1171-1178.

Lindestam Arlehamn, C.S., Petrilli, V., Gross, O., Tschopp, J. and Evans, T.J. The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *J Biol Chem.*

Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D.C. and Dahl, G. (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett.* **581**: 483-488.

Losick, V.P. and Isberg, R.R. (2006) NF-kappaB translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*. *J Exp Med.* **203**: 2177-2189.

Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D.M., Vucic, D., French, D.M., Lee, W.P., *et al* (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature.* **430**: 213-218.

Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., *et al* (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* **440**: 228-232.

Marina-Garcia, N., Franchi, L., Kim, Y.G., Miller, D., McDonald, C., Boons, G.J. and Nunez, G. (2008) Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol.* **180**: 4050-4057.

- Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. **10**: 417-426.
- Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E. and Tschopp, J. (2004) Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol*. **14**: 1929-1934.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. and Tschopp, J. (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. **440**: 237-241.
- Matthews, M. and Roy, C.R. (2000) Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* IcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. *Infect Immun*. **68**: 3971-3982.
- McGahon, A.J., Martin, S.J., Bissonnette, R.P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., *et al* (1995) The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol*. **46**: 153-185.
- Merriam, J.J., Mathur, R., Maxfield-Boumil, R. and Isberg, R.R. (1997) Analysis of the *Legionella pneumophila* fliI gene: intracellular growth of a defined mutant defective for flagellum biosynthesis. *Infect Immun*. **65**: 2497-2501.
- Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I. and Aderem, A. (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol*. **7**: 569-575.
- Molmeret, M., Alli, O.A., Zink, S., Flieger, A., Cianciotto, N.P. and Kwaik, Y.A. (2002) icmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infect Immun*. **70**: 69-78.
- Molofsky, A.B., Shetron-Rama, L.M. and Swanson, M.S. (2005) Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infect Immun*. **73**: 5720-5734.

- Molofsky, A.B., Byrne, B.G., Whitfield, N.N., Madigan, C.A., Fuse, E.T., Tateda, K. and Swanson, M.S. (2006) Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med.* **203**: 1093-1104.
- Muruve, D.A., Petrilli, V., Zaiss, A.K., White, L.R., Clark, S.A., Ross, P.J., *et al* (2008) The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature.* **452**: 103-107.
- Nagai, H., Cambronne, E.D., Kagan, J.C., Amor, J.C., Kahn, R.A. and Roy, C.R. (2005) A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 826-831.
- Ninio, S. and Roy, C.R. (2007) Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends Microbiol.* **15**: 372-380.
- Pelegrin, P. and Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *Embo J.* **25**: 5071-5082.
- Perregaux, D. and Gabel, C.A. (1994) Interleukin-1 β maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem.* **269**: 15195-15203.
- Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F. and Tschopp, J. (2007) Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* **14**: 1583-1589.
- Philpott, D.J., Yamaoka, S., Israel, A. and Sansonetti, P.J. (2000) Invasive *Shigella flexneri* activates NF- κ B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol.* **165**: 903-914.
- Ren, T., Zamboni, D.S., Roy, C.R., Dietrich, W.F. and Vance, R.E. (2006) Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog.* **2**: e18.

Roy, C.R., Berger, K.H. and Isberg, R.R. (1998) *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol.* **28**: 663-674.

Sadosky, A.B., Wiater, L.A. and Shuman, H.A. (1993) Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infect Immun.* **61**: 5361-5373.

Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 10964-10967.

Sanz, J.M. and Di Virgilio, F. (2000) Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol.* **164**: 4893-4898.

Schachter, J., Motta, A.P., de Souza Zamorano, A., da Silva-Souza, H.A., Guimaraes, M.Z. and Persechini, P.M. (2008) ATP-induced P2X7-associated uptake of large molecules involves distinct mechanisms for cations and anions in macrophages. *J Cell Sci.* **121**: 3261-3270.

Segal, G. and Shuman, H.A. (1997) Characterization of a new region required for macrophage killing by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **65**: 5057-5066.

Segal, G., Purcell, M. and Shuman, H.A. (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 1669-1674.

Sexton, J.A., Miller, J.L., Yoneda, A., Kehl-Fie, T.E. and Vogel, J.P. (2004a) *Legionella pneumophila* DotU and IcmF are required for stability of the Dot/Icm complex. *Infect Immun.* **72**: 5983-5992.

Sexton, J.A., Pinkner, J.S., Roth, R., Heuser, J.E., Hultgren, S.J. and Vogel, J.P. (2004b) The *Legionella pneumophila* PilT homologue DotB exhibits ATPase activity that is critical for intracellular growth. *J Bacteriol.* **186**: 1658-1666.

Simberg, D., Weisman, S., Talmon, Y. and Barenholz, Y. (2004) DOTAP (and other cationic lipids): chemistry, biophysics, and transfection. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* **21**: 257-317.

Smolewski, P., Bedner, E., Du, L., Hsieh, T.C., Wu, J.M., Phelps, D.J. and Darzynkiewicz, Z. (2001) Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry.* **44**: 73-82.

Suadicani, S.O., Brosnan, C.F. and Scemes, E. (2006) P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci.* **26**: 1378-1385.

Subramanian, N. and Qadri, A. (2006) Lysophospholipid sensing triggers secretion of flagellin from pathogenic salmonella. *Nat Immunol.* **7**: 583-589.

Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Zamboni, D.S., Roy, C.R. and Flavell, R.A. (2006) NALP3: a key player in caspase-1 activation. *J Endotoxin Res.* **12**: 251-256.

VanRheenen, S.M., Dumenil, G. and Isberg, R.R. (2004) IcmF and DotU are required for optimal effector translocation and trafficking of the *Legionella pneumophila* vacuole. *Infect Immun.* **72**: 5972-5982.

Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K. and Isberg, R.R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science.* **279**: 873-876.

Wang, S., Miura, M., Jung, Y.K., Zhu, H., Li, E. and Yuan, J. (1998) Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell.* **92**: 501-509.

Wang, S., Miura, M., Jung, Y., Zhu, H., Gagliardini, V., Shi, L., *et al* (1996) Identification and characterization of Ich-3, a member of the interleukin-1beta converting enzyme (ICE)/Ced-3 family and an upstream regulator of ICE. *J Biol Chem.* **271**: 20580-20587.

Whitfield, N.N., Byrne, B.G. and Swanson, M.S. Mouse macrophages are permissive to motile *Legionella* species that fail to trigger pyroptosis. *Infect Immun.* **78**: 423-432.

Wiater, L.A., Dunn, K., Maxfield, F.R. and Shuman, H.A. (1998) Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **66**: 4450-4460.

Yamamoto, M., Yaginuma, K., Tsutsui, H., Sagara, J., Guan, X., Seki, E., *et al* (2004) ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes Cells.* **9**: 1055-1067.

Yamamoto, Y., Klein, T.W., Newton, C.A., Widen, R. and Friedman, H. (1988) Growth of *Legionella pneumophila* in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. *Infect Immun.* **56**: 370-375.

Yu, J.W., Wu, J., Zhang, Z., Datta, P., Ibrahimi, I., Taniguchi, S., *et al* (2006) Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ.* **13**: 236-249.

Zamboni, D.S., Kobayashi, K.S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E.M., Vance, R.E., *et al* (2006) The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat Immunol.* **7**: 318-325.

Zuckman, D.M., Hung, J.B. and Roy, C.R. (1999) Pore-forming activity is not sufficient for *Legionella pneumophila* phagosome trafficking and intracellular growth. *Mol Microbiol.* **32**: 990-1001.

VIII. Anexo

Trabalho desenvolvido durante o doutorado, publicado na revista “Infection and Immunity”:

SILVEIRA, T.N.; ZAMBONI, D.S. Pore formation triggered by *Legionella* is an Nlrc4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. Infection and Immunity IAI.00905-09v1, 2010. (doi:10.1128/IAI.00905-09)